

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.06.026

张春艳, 王义, 孙春玉, 等. 吉粳 88 高效再生体系的建立[J]. 广西植物, 2013, 33(6): 865—869

Zhang CY, Wang Y, Sun CY, et al. Establishment of an efficient regeneration system of Jijing88[J]. *Guihaia*, 2013, 33(6): 865—869

吉粳 88 高效再生体系的建立

张春艳, 王义, 孙春玉, 王康宇, 张美萍*

(吉林农业大学, 吉林 长春 130118)

摘要: 以吉粳 88 为材料, 通过对不同培养基和激素的筛选, 确定最佳的再生体系。结果表明: NMB 培养基为吉粳 88 最适的愈伤组织诱导培养基。通过 $L_9(3^3)$ 正交实验研究最适激素浓度配比, 筛选出吉粳 88 愈伤组织诱导的最佳激素配比为 2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA。在添加 2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的 NMB 基本培养基条件下, 吉粳 88 的分化率最高, 成苗率也最高。

关键词: 吉粳 88; 培养基; 诱导率; 分化率; 成苗率

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)06-0865-05

Establishment of an efficient regeneration system of Jijing88

ZHANG Chun-Yan, WANG Yi, SUN Chun-Yu,

WANG Kang-Yu, ZHANG Mei-Ping*

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Jijing 88 was used as the research material and different media and hormone combinations were selected, in order to obtain its optimal in-vitro regeneration system. The results showed that NMB medium was the most suitable medium for rice callus induction among the 5 medium. The most suitable plant hormone ratio was investigated by using orthogonal test $L_9(3^3)$, and the induction rate was the highest when 2.0 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L 6-BA, 0.10 mg/L NAA were added. The differentiation rate and regeneration rate were the highest when 2.0 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L NAA were added.

Key words: Jijing 88; culture medium; induction rate; differentiation rate; regeneration rate

水稻(*Oryza sativa*)是最重要的粮食作物之一, 种植已超过一万年(Sasaki *et al.*, 2005)。全球有超过 2/3 的人是以水稻为主食(Pathak *et al.*, 1982)。吉粳 88 株型理想、高产稳定, 可抗稻瘟病和稻曲病。其米质优良, 外观品质好且食味佳。吉粳 88 还具有茎秆粗壮、抗倒伏、根系发达和耐冷性强等优良农艺性状。吉粳 88 具有较多优良农艺性状, 为吉林省广泛栽培品种(张三元等, 2005)。但是关于吉粳 88 的组织培养的研究及其应用研究的相关报道较少。为了更好

地开发并利用该品种的资源, 吉粳 88 离体培养体系的构建就显得极为重要和必要。

组织培养技术是一项目前已广泛应用于水稻的遗传改良(Raina *et al.*, 1989)。刘巧泉等(2004)为提高中国稻米的铁含量, 通过农杆菌介导将自行克隆的菜豆铁结合蛋白基因导入到一个高产粳稻品种中并获得了稳定遗传的高铁含量的植株。国际水稻研究所(IRRI)将 β 胡萝卜素基因导入水稻中得到了可以表达维生素 A 的黄金水稻。(Jacqueline A

收稿日期: 2013-03-23 修回日期: 2013-05-09

基金项目: 长春市科技计划项目(11kz77); 吉林省自然科学基金(201215181)

作者简介: 张春艳(1985-), 女, 湖南郴州人, 硕士研究生, 主要从事植物细胞工程方面的研究, (E-mail)zhangcy1985@yahoo.com。

*通讯作者: 张美萍, 博士, 教授, 主要从事功能基因组学与系统生物学方面的研究, (E-mail)wanglaoshi0606@163.com。

Paine, 2005)。因此,构建一个稳定的水稻再生体系对于水稻的遗传转化就显得尤其重要。

前人主要从培养基类型、激素类型、激素添加浓度、外植体材料等方面进行水稻再生体系的研究。卢勤等(1989)、欧阳琳等(2007)研究了不同培养基及激素类型对胚性愈伤组织诱导及愈伤组织分化的影响。王辉等(2012)以花药为外植体材料诱导愈伤组织,并将诱导体系进行了优化。不同品种对培养基的类型及激素配比要求不一,本实验在前人研究的基础上,进一步探讨几种培养基对吉梗 88 的适用性,且以正交实验优化愈伤组织诱导体系,该体系的成功构建为遗传转化奠定了坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

超级稻吉梗 88,由吉林省农业科学院水稻研究所提供。

1.2 方 法

1.2.1 种子的消毒处理 选取籽粒饱满且无虫咬过的成熟水稻种子,去壳,用 75%酒精表面消毒 90 s,再用 0.1%的升汞振荡消毒 7 min,无菌水冲洗 4~5 次,用无菌滤纸吸干表面水分。将消毒后的种子接种于诱导培养基,每瓶均匀接种 8 粒,于 26~28 °C 暗培养。定期进行观察记录,28 d 左右统计愈伤的诱导情况。

1.2.2 培养基筛选 以 NMB、N6、MS、B5 和 LS 为基础培养基,根据表 1 添加不同种类和浓度的植物生长调节剂,筛选最适合水稻愈伤组织诱导、继代增殖和分化的培养基(表 1)。

表 1 培养基的组成

Table 1 Medium components

培养基类型 Medium type	成分 Component
MS	MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,+3%蔗糖+0.65%琼脂,pH5.8-6.0
N6	N6+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+3%蔗糖+0.65%琼脂,pH5.8
LS	LS+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+3%蔗糖+0.65%琼脂,pH5.8
B5	B5+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+5%蔗糖+0.65%琼脂,pH5.5
NMB	NMB+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+3%蔗糖+0.65%琼脂,pH5.8

1.2.3 优化愈伤组织诱导体系 以 NMB 培养基为基础培养基,琼脂 0.65%,蔗糖 3%,500 mg/L 脯氨

酸,300 mg/L 酸水解酪蛋白,pH5.8。以 2,4-D,6-BA,NAA 三个激素为因素设计正交实验进行愈伤组织诱导(表 4)。

1.2.4 优化愈伤组织分化体系 以 NMB 为基础培养基,琼脂 0.65%,蔗糖 3%,500 mg/L 脯氨酸,300 mg/L 酸水解酪蛋白,pH5.8。添加不同浓度配比的激素(表 2)。将继代培养 1~2 次的愈伤置于滤纸上干燥处理 2 d 后,在光强为 3 000 lx 的条件下培养,光照 16 h,黑暗 8 h 的培养周期培养。培养 28 d 后,统计分化率及成苗率。

表 2 分化培养

Table 2 Differentiation culture

序号 No.	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
1	1	0.5
2	1	1.0
3	1	1.5
4	2	0.5
5	2	1.0
6	2	1.5
7	3	0.1
8	3	0.5
9	3	1.5

1.3 统计方法

愈伤组织诱导率=产生愈伤组织数/接种数×100%;愈伤组织分化率=分化愈伤组织数/接种数愈伤数×100%;成苗率=成苗的愈伤块数/接种的愈伤块数×100%

2 结果与分析

2.1 不同培养基对诱导率及愈伤状态的影响

吉梗 88 种子在 5 种愈伤诱导培养基中培养 28 d(表 3),以 B5 培养基出愈率最高,为 82.11%;NMB 为其次,出愈率为 81.73%;诱导效果最差的为 LS 培养基,诱导率仅为 64.85%。从愈伤组织形态观察,虽然 B5 培养基的诱导率高,但诱导出的愈伤组织含水量高,继代后褐化较为严重,愈伤增殖效果也不佳;而 NMB 培养基诱导出的愈伤组织色泽淡黄,结构致密,继代培养后增殖迅速(图 1)。因此,后续研究均采用 NMB 培养基作为基础培养基。

2.2 以 NMB 为基础培养基进行正交试验诱导愈伤结果

接种表 4 培养基上的水稻成熟胚在诱导培养 7 d 后,胚一端盾片处开始有淡黄色的愈伤组织形成。

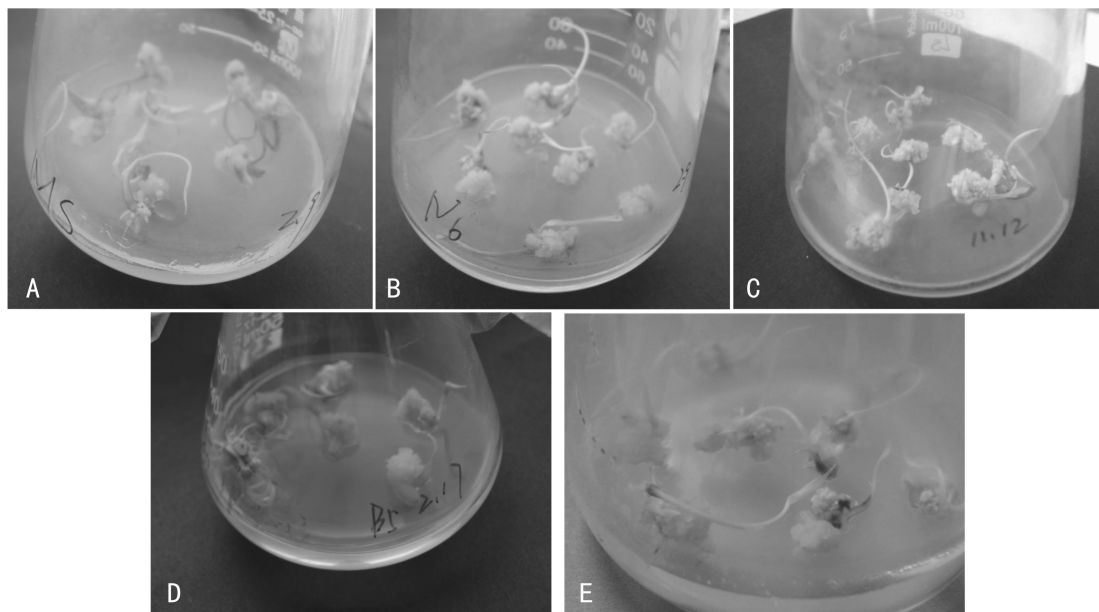


图 1 不同培养基诱导 28 d 后的愈伤组织 A. MS 培养基; B. N6 培养基; C. LS 培养基; D. B5 培养基; E. NMB 培养基。

Fig. 1 Induced rice callus on different media cultivation after 28 d A. MS medium; B. N6 Medium; C. LS medium; D. B5 Medium; E. NMB Medium.

表 3 五种不同培养基诱导率及诱导效果

Table 3 Induction rate and status of five different media

培养基 Medium	接种数(个) Inoculate number	诱导数(个) Induction number	诱导率 Induction rate (%)	愈伤状态 Callus status
MS	464	345	74.35	淡黄,但增殖速度慢
N6	504	376	74.60	色泽淡黄,继代后愈伤稍微水化
LS	528	341	64.58	过于致密,且有较多根状物,增殖慢
B5	626	514	82.11	色泽偏暗黄,含水高,继代后易褐化
NMB	312	255	81.73	色泽淡黄,致密,增殖速度快

诱导培养 28 d 后进行计数,统计结果见表 4。

当 2,4-D 的浓度为 2 mg/L,6-BA 为 0.2 mg/L,NAA 为 0.05 mg/L 时,均值分别为最大。通过综合比较,诱导的最佳激素配比应为 2 mg/L 2,4-D,0.2 mg/L 6-BA,0.05 mg/L NAA。

$R_{2,4-D} > R_{6-BA} > R_{NAA}$,说明 2,4-D 对诱导率影响最大,6-BA 次之,NAA 最小。结果显示组 2 诱导率最高,基本符合最佳激素组合,且因 2,4-D 为主导因素,NAA 的量变化对诱导率影响最小,最终本实验选择 2 mg/L 2,4-D,0.2 mg/L 6-BA,0.10 mg/L NAA 这一激素浓度配比为最佳激素配比。

2.3 愈伤分化率

继代培养 1~2 次的愈伤组织置于滤纸上干燥处理 2 d 后接种于不同激素配比的分化培养基上(表 3)。接种 30 d 左右进行分化率和成苗率的统计。分化出的苗进行移栽,并收集成熟后的种子。

分化出的苗及移栽后的苗和抽穗后的水稻苗如图 2。

结果表明,3、4、6 组愈伤分化的效果最好。其中 4 组愈伤分化效果不仅明显,分化率达 76%,而且成苗率高达 43.75%。其他组的愈伤在分化培养了 2~3 个星期后,愈伤出现褐化现象,可能与添加的激素浓度有关。4、5、6 组愈伤褐化不太明显。综合愈伤分化效果及成苗率和愈伤状态等因素的考虑,最终选择 4 组为最佳激素配比:2 mg/L 6-BA,0.5 mg/L NAA。

3 结论与讨论

影响水稻再生的因素有很多,包括培养基的类型、培养条件、激素配比和基因型等。本实验在相同培养条件下,诱导率最高的为 B5 培养基,其次为

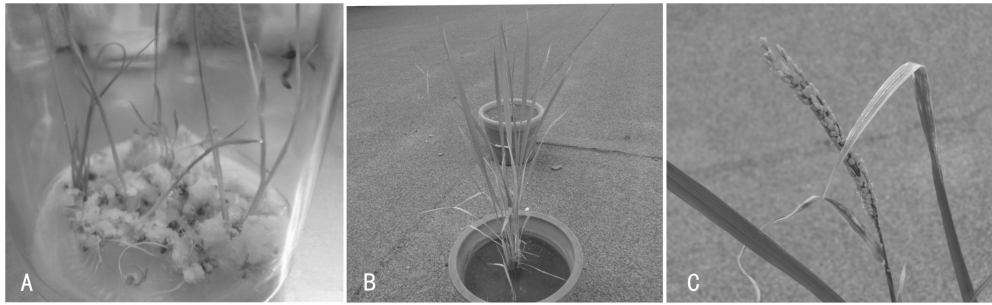


图 2 分化出的苗及炼苗移栽 A. 愈伤组织诱导出的再生苗; B. 移栽后的苗; C. 移栽苗结的穗。

Fig. 2 Regenerated plants and planting A. Regenerated rice plants from callus; B. Transplant; C. Rice spike

表 4 激素配比及结果

Table 4 Hormone combination and results

序号 No.	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	诱导率 Induction rate (%)	污染率 Contamination rate (%)
1	1	0.2	0.05	52.19	17.5
2	2	0.2	0.10	66.25	12.5
3	3	0.2	0.15	56.25	20
4	1	0.5	0.10	50.19	20
5	2	0.5	0.15	57.44	17.5
6	3	0.5	0.05	58.88	20
7	1	0.8	0.15	51.44	20
8	2	0.8	0.05	62.69	7.5
9	3	0.8	0.10	44.44	22.5
T1	153.82	174.69	173.76		
T2	186.38	166.51	160.88		
T3	159.57	158.57	165.13		
T1	51.27	58.23	57.92	T=499.77	
T2	62.13	55.50	53.63		
T3	53.19	52.86	55.04		
R	10.86	5.37	4.29		

表 5 在不同激素配比下愈伤组织分化及成苗率

Table 5 Differentiation and regeneration rate under different hormone combinations

序号 No.	接种数(块) Inoculate number	分化数(块) Differentiation number	分化率 Differentiation rate (%)	成苗率 Planting rate (%)
1	100	67	67	26.25
2	100	61	61	18.75
3	100	70	70	31.25
4	100	76	76	43.75
5	100	51	51	22.5
6	100	74	74	32.5
7	100	68	68	28.75
8	100	66	66	31.25
9	100	57	57	27.5

NMB培养基,最差的为LS培养基,与 Niroula *et al.* (2005)、李楠等(2010)报道的N6培养基是最适合水稻愈伤组织诱导和分化的培养基结果不一致。其原因可能是本实验在培养基中添加酸水解酪蛋白

和脯氨酸。由于基因型,培养条件等差异,诱导率可能有微小的差异。MS培养基诱导和继代的愈伤较软且继代后易于褐化,B5培养基诱导的愈伤过于致密,且易于产生根状物,与 Jaruwana *et al.* (2008)报道的结果相似。刘香玲等(2005)都通过NMB培养基进行水稻愈伤组织的诱导和继代,都得到了较高的诱导率,适合水稻的诱导和分化。

2,4-D为水稻诱导最有效的激素,且以2.0 mg/L 2,4-D为最佳的诱导激素。李楠等(2010)在诱导愈伤实验中选用了2,4-D,6-BA和KT为诱导激素,而向阳等(2004)在诱导中运用了2,4-D和6-BA这两种激素。本实验以2,4-D,6-BA和NAA设计了一个3因素3水平的正交实验,结果显示,对诱导率影响最大的激素为2,4-D。但由于种子陈旧程度不同,有些种子已被虫咬过,在进行诱导培养时污染率较正常情况大很多,这也是与李楠等(2012)的结果相比,诱导率偏低的原因之一。本实验用6-BA和NAA诱导分化,结果表明添加2.0 mg/L 6-BA和0.5 mg/L NAA分化率最高,成苗率也最高,为49.67%。这与曾桂萍等(2004)最适激素比为3 mg/L 6-BA,0.5 mg/L NAA不完全一致。

水稻以其基因组小且已测序等优点,已广泛作为遗传转化的受体。但水稻为单子叶植物,不是农杆菌的天然受体从而导致转化率低。因此,构建一个高效的水稻再生体系可以弥补水稻不是农杆菌的天然受体的缺陷。本实验通过培养基及激素的优化,成功建立相对较成熟的离体培养体系,并很好地解决了成苗率低的难题,为下一步水稻的遗传转化奠定了前期基础。

参考文献:

Li N(李楠), Liu Q(柳青), Jiang SC(将士翠), *et al.* 2010. Establishment of regeneration system for mature embryo of

- “Jijing88”(超级稻吉粳 88 再生体系的建立)[J]. *Crops* (作物杂志), **2**:71—76
- Liu QQ(刘巧泉), Yao QH(姚泉洪), Wang HM(王红梅), et al. 2004. Endosperm-specific expression of the ferritin gene in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) results in increased iron content of milling rice(转基因水稻胚乳中表达铁结合蛋白提高稻米铁含量)[J]. *Acta Gen Sin* (遗传学报), **31**(5):518—524
- Liu XL(刘香玲), Wang YZ(王玉珍), Luo JL(罗景兰). 2005. Study on callus induction and regeneration from rice mature embryo scutum(水稻成熟胚愈伤组织的诱导和分化因素的研究)[J]. *Shandong Agric Sci* (山东农业科学), **5**:7—9
- Lu Q(卢勤), Chen Z(陈璋), Zhu XY(朱秀英). 1989. The effect on rice callus induction and differentiation of different medium (诱导培养基对水稻愈伤组织形成和分化的影响)[J]. *J Fujian Agric Coll* (福建农学院学报), **18**(4):510—514
- Niroula RK, Sah BP, Bimb HP, et al. 2005. Effect of genotype and culture media on callus induction and plant regeneration from matured rice grain culture[J]. *Inst Agric Anim Sci*, **26**:21—26
- Ouyang L(欧阳琳) Hong YH(洪亚辉), Wang RZ(王若仲), et al. 2007. Optimization of super rice in vitro cultivation conditions (超级稻离体再生培养条件的优化)[J]. *J Hunan Agric Univ: Nat Sci Edit* (湖南农业大学学报·自然科学版), **33**(5):522—524
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, et al. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-Vitamin A content[J]. *Nat Biotechnol*, **23**(4):482—487
- Pathak MD. 1980. The Genetic Evaluation and Utilization Program at IRRI[C]//IRRI. Rice Tissue Culture Planning Conference, Philippine:3—13
- Raina SK. 1989. Tissue culture in rice improvement: status and potential[J]. *Adv Agron*, **42**:339—398
- Sasaki T. 2005. The mapped base sequence of the rice genome[J]. *Nature*, **436**:793—800
- Summart J, Panichajakul S, Prathepha P, et al. 2008. Callus induction and influence of culture condition and culture medium on growth of Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, cell culture [J]. *World Appl Sci J*, **5**(2):246—25
- Wang H(王辉), Xiao XH(肖小辉), Qi ZM(齐泽民), et al. 2012. Studies on anther callus induction of rice by Orthogonal test(水稻花药愈伤组织诱导的多因子正交试验的研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **31**(4):545—549
- Xiang Y(向阳), Zhao DG(赵德刚), Zhu DX(朱冬雪), et al. 2004. Callus induction and adventitious buds differentiation from mature embryos in indica rice(籼稻成熟胚愈伤组织诱导及不定芽分化)[J]. *J Mount Agric Biol* (山地农业生物学报), **23**(3):193—197
- Zeng GP(曾桂萍), Yu XQ(余显权), Liu RX(刘仁祥), et al. 2004. Improvement of callus differentiation frequency for indica rice(提高籼稻愈伤组织分化频率的研究)[J]. *Guizhou Agric Sci* 贵州农业科学, **32**(3):12—13
- Zhang SY(张三元), Zhang JG(张俊国), Zhao JS(赵劲松), et al. 2005. A brief introduction of rice variety Jijing 88(水稻吉粳 88 号品种简介)[J]. *Jilin Agric* (吉林农业), **5**:26—28
- Zhang XX(张秀香). 2012. Efficient regeneration from in vitro culture of mature seeds of rice(水稻成熟种子组织培养体系的优化及建立)[J]. *Anhui Agric Sci Bull* (安徽农学通报), **18**(12):39—40

(上接第 762 页 Continue from page 762)

- bean (*Vicia faba* L.) [J]. *Sci Hortic*, **113**:322—328
- Pompelli MF, Antunes WC, Ferreira DTRG, et al. 2012. Allometric models for non-destructive leaf area estimation of *Jatropha curcas* [J]. *Biom & Bioen*, **36**:77—85
- Selamat A, Dayao M, Hakim MA, et al. 2012. Empirical models for leaf area estimation based on leaf physical parameters in rambutan (*Nephelium lappaceum*), pulasan (*Nephelium mutabile*), carambola (*Averrhoa carambola*) and limau madu (*Citrus suhuiensis*) grown in Peninsular Malaysia [J]. *J Food Agric & Environ*, **10**(3,4):281—286
- Timothy MS, Richard JH. 2010. A simple method for non-destructive estimation of total shoot leaf area in tree fruit crops [J]. *Sci Hortic*, **125**:528—533
- Tsialtas JT, Koundouras S, Zioziou E. 2008. Leaf area estimation by simple measurements and evaluation of leaf area prediction models in Cabernet-Sauvignon grapevine leaves [J]. *Photosynthetica*, **46**(3):452—456
- Wang Y(王洋), Qi XN(齐晓宁), Shao JF(邵金锋), et al. 2009. Effects of shading at the whole growth stage on the leaf morphology and function of different maize varieties(遮阴对不同品种玉米叶片形态和功能的影响)[J]. *System Sci Compr Stud Agric* (农业系统科学与综合研究), **25**(4):450—453, 457
- Xia SZ(夏善志), Zhu XJ(祝旭加). 2009. Review of the measuring methods in leaf area(林木叶面积研究方法综述)[J]. *For Inv Des* (林业勘查设计), **2**:72
- Xie AD(谢安德), Wang LH(王凌晖), Pan QL(潘启龙). 2011. Establishment of leaf area of *Manglietia glauca* by regression equation(灰木莲叶面积回归方程的建立)[J]. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), **4**:28—29, 32
- You WB(游巍斌), Tu YH(涂育和), Hong W(洪伟), et al. 2008. Study on improvement of leaf area measurement model of *Tripterygium wilfordii* (雷公藤叶面积测算模型的改进研究) [J]. *J Southwest For Coll* (西南林学院学报), **28**(6):36—39
- Young YC, Sungbong O, Myoung MO, et al. 2007. Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.) using leaf length, width, and SPAD value [J]. *Sci Hortic*, **111**:330—334
- Zhao GF(赵桂范). 2010. Effect of drought on leaves of different soybean varieties(干旱对不同大豆品种叶片的影响)[J]. *Heilongjiang Agric Sci* (黑龙江农业科学), **10**:19—21
- Zhao Y(赵燕), Dong WY(董雯怡), Li JY(李吉跃), et al. 2010. Regression estimation of leaf area for clones of *Populus tomentosa* (毛白杨无性系叶面积的回归测算)[J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **26**(12):94—97
- Zhu HG(朱宏光), Zhao JL(赵金龙), Wen YG(温远光), et al. 2010. Leaf area calculation model of *E. wrophylla* and *E. grandis* × *E. wrophylla* (尾叶桉和巨尾桉叶面积的测算模型研究) [J]. *Agric Sci & Technol* (农业科学与技术), **11**(8):4—6, 9