

宁夏水稻高效再生体系的建立

张 丽,王敬东,陈晓军,宋玉霞

(宁夏农业生物技术重点实验室,宁夏 银川 750002)

【摘 要】 【目的】建立宁夏水稻高效转化再生系统,为利用基因工程技术定向改良宁夏水稻品种奠定基础。【方法】以 8 个宁夏主栽水稻品种成熟胚为外植体,利用组织培养法,研究了基因型、外源激素、头孢霉素(Cef)对外植体培养及再生的影响。【结果】在愈伤组织诱导培养基中添加 ABA 2 mg/L 及在分化培养基中添加 6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L,对愈伤组织诱导、分化及出苗有显著的促进作用;在此优化条件下,秋田小町再生情况最好,其诱导率和出苗率分别达 100.00%和 300%;优育 27 号次之,分别达 95.00%和 286.7%。此外,初步确定转化时 Cef 的质量浓度上限为 500 mg/L。【结论】明确了外源激素、基因型及 Cef 对宁夏水稻成熟胚离体培养的影响效果,初步建立了宁夏水稻高效转化再生系统。

【关键词】 宁夏水稻;成熟胚;再生体系

【中图分类号】 S511.035.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)09-0047-06

Efficient regeneration system from *in vitro* of rice in Ningxia

ZHANG Li, WANG Jing-dong, CHEN Xiao-jun, SONG Yu-xia

(Ningxia Key Laboratory for Agri Biotechnology, Yinchuan, Ningxia 750002, China)

Abstract: 【Objective】 In this study, a highly efficient regeneration system from mature embryo of rice in local varieties was established preliminarily for genetic transformation. 【Method】 Using mature embryo of eight rice varieties in Ningxia as explants and utilizing the plant tissue culture method, the effect of exogenous hormone, genotype and cephamycin (Cef) on *in vitro* culture and regeneration was studied. 【Result】 The result showed that the supplementation of 2 mg/L of ABA in inducing medium expressed the highest efficiency of induction, combination of 3 mg/L of 6-BA and 0.5 mg/L of NAA was effective to accelerate differentiation and regeneration. Different genotypes showed a great difference in mature embryo culture. Akitakomati was the best with its induction rate and regeneration rate as high as 100.00% and 300%, respectively, followed by Youyu 27 (95.00% and 286.7%). 500 mg/L of Cef was considered as up-limit concentration in transformation. 【Conclusion】 Using mature embryo of eight rice varieties in Ningxia, the culture effect of exogenous hormone, geneotype and Cef was defined basically, and the highly efficient regeneration system of rice in local varieties for genetic transformation was established preliminarily.

Key words: rice of Ningxia; mature embryo; regeneration system

水稻是宁夏的主要粮食作物之一,面积虽仅占全区粮食播种面积的 8%左右,产量却达到全区粮食总产量的 20%,因此创造高产、优质的水稻新种质资源对宁夏粮食生产具有重要的现实意义^[1]。随

着分子生物学的快速发展,基因工程技术已成为改良作物性状、培育作物新品种的重要手段。外源基因对植物的转化首先依赖于高效的植物再生体系。用于转基因的植物再生体系,应具有高频、稳定的再

* [收稿日期] 2010-03-03

[基金项目] 宁夏回族自治区科技攻关项目(KGZ-16-07-02)

[作者简介] 张 丽(1982—),女,宁夏银川人,研究实习员,硕士,主要从事植物生物技术育种研究。E-mail:lesley119@163.com

[通信作者] 宋玉霞(1963—),女,宁夏银川人,研究员,主要从事植物生物技术育种研究。E-mail:songyx666@163.com

生能力,在转化中对抗生素要有良好的敏感性等。从国内水稻再生体系建立的研究来看,材料的基因型及外源激素的种类、质量浓度和配比,是影响水稻胚性愈伤组织形成和再生能力的最主要因素^[2]。不同水稻品种的基因型差异主要表现在其对外源激素的敏感性与作用效果的差异上^[3]。因此,不同材料及区域性差异,难以使用统一的水稻再生系统获得理想效果。为此,在前人研究基础上,本试验通过对外源激素、水稻基因型及转化中抑菌抗生素使用质量浓度的筛选,建立宁夏水稻高效转化再生系统,以期为利用基因工程技术定向改良宁夏水稻品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试水稻 供试水稻品种为宁粳 23 号、优育 7 号、优育 27 号、T39、秋田小町、优育 40 号、W-372、优育 39 号,均由宁夏农林科学院作物研究所提供。

1.1.2 培养基 愈伤组织诱导培养基:改良 NB5 (N6 大量元素+B5 微量元素+B5 有机成分+水解酪蛋白 0.3 mg/L+脯氨酸 0.5 mg/L+谷氨酰胺 0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉)+2,4-D 2 mg/L。

分化基本培养基:MS 培养基+20 g/L 蔗糖+70 g/L 琼脂粉。

1.2 方 法

1.2.1 种子预处理 选取饱满的成熟水稻种子剥去颖壳,用体积分数 75%的乙醇消毒 1 min,灭菌蒸馏水冲洗 2 次,体积分数 0.1%升汞消毒 15 min,灭菌蒸馏水冲洗 4~6 次。

1.2.2 ABA 对水稻成熟胚愈伤组织诱导的影响 将灭菌后的供试水稻种子,置于添加不同质量浓度(0,2,3,4,5 mg/L)ABA 的愈伤组织诱导培养基中,进行愈伤组织诱导,15 d 后挑取种胚上诱导形成的淡黄色、颗粒状的愈伤组织,置于不含 ABA 的愈伤组织诱导培养基中进行愈伤组织增殖,继续培养 15 d 后统计水稻愈伤组织的诱导率。

1.2.3 不同激素组合对水稻愈伤组织分化及出苗的影响 挑选诱导效果好的水稻品种,将其诱导形成的愈伤组织,置于含不同质量浓度激素组合(表 1)的分化培养基中进行分化培养,30 d 后观察水稻愈伤组织分化情况,统计愈伤组织分化率。将已分化出绿色芽点的愈伤组织,转入分化培养基(表 1)

中,继代培养 30 d 后,统计水稻出苗率。

表 1 不同质量浓度激素组合的分化培养基
Table 1 Different combinations of plant hormone

培养基 Medium	differentiation medium			mg/L
	6-BA	KT	NAA	
A	2	—	0.5	
B	3	—	0.5	
C	—	1	0.2	
D	—	2	0.5	
E	—	3	0.5	

1.2.4 不同质量浓度头孢霉素(Cef)对水稻愈伤组织分化的影响 将供试水稻秋田小町、优育 27 号成熟胚诱导形成的愈伤组织,置于含不同质量浓度(0,200,400,500,600,700 mg/L)头孢霉素的分化培养基(6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L)中,30 d 后观察分化情况,统计分化率。将已分化出绿点的水稻愈伤组织,再置于含上述质量浓度头孢霉素的分化培养基中,继代培养 30 d 后观察出苗情况,统计出苗率。

1.3 培养条件

愈伤组织诱导阶段:光照培养,光照强度 1 000~2 000 lx,培养温度 30 ℃。

愈伤组织增殖、分化和出苗阶段:光周期为 16 h,光照强度 1 000~2 000 lx,温度 25 ℃(昼)/18 ℃(夜)。

1.4 数据处理

诱导率=出现愈伤组织数/接种数×100%;分化率=出现绿色芽点愈伤组织数/转移的愈伤组织数×100%;出苗率=分化出的绿苗数/出现绿色芽点愈伤组织数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同水稻品种对成熟胚愈伤组织形成的影响

将 8 个水稻品种成熟胚,在含 ABA 2 mg/L 和 2,4-D 2 mg/L 的改良 NB5 培养基上进行愈伤组织诱导,5~7 d 可观察到愈伤组织在成熟胚上萌发;15 d 后挑出愈伤组织,置于不含 ABA 的上述培养基中可成功进行愈伤组织增殖,继续培养 15 d 后统计水稻愈伤组织诱导率(表 2)。由表 2 可以看出,不同水稻品种愈伤组织诱导率差异较大,为 15.00%~100.00%。其中秋田小町愈伤组织诱导率最高,达 100.00%;优育 27 号次之,诱导率为 95.00%;优育 40 号最低,诱导率仅为 15.00%。此外,从获得的愈伤组织外观来看,优育 7 号、优育 27 号、秋田小町 3 个水稻品种形成的愈伤组织饱满、致密样,颜色淡

黄;宁粳 23 号的愈伤组织饱满、疏松,颜色乳白;W-372的愈伤组织瘦小、疏松,增殖培养中易褐化。表明优育 27 号、秋田小町、优育 7 号、宁粳 23 号 4 个水稻品种的成熟胚愈伤组织诱导发生较好,可用于后续试验。

表 2 不同水稻品种愈伤组织诱导率的比较
Table 2 Comparison of callus induction on different rice varieties

品种 Cultivar	实际接种数 Actual No. of explants inoculated			诱导率/% Ratio of callus induced			平均 Average
	I	II	III	I	II	III	
宁粳 23 号 Ningjing 23	95	95	100	94.74	93.75	95.44	94.70 b
优育 7 号 Youyu 7	74	80	80	85.00	86.50	86.50	85.00 c
优育 27 号 Youyu 27	78	79	60	95.00	98.25	91.75	95.00 b
T39	30	40	47	70.00	72.44	67.69	70.00 d
秋田小町 Akitakomati	69	80	85	100.00	100.00	100.00	100.00 a
优育 40 号 Youyu 40	73	7	64	15.00	17.45	12.55	15.00 e
W-372	70	73	80	94.52	90.64	95.48	94.50 b
优育 39 号 Youyu 39	60	40	45	85.00	87.55	82.45	70.00 c

注:同列数值后标不同小写字母者表示 $P=0.05$ 水平差异显著。
Note: Different letters in the same column represent significant difference(ANOVA, $P=0.05$).

2.2 ABA 对水稻成熟胚愈伤组织诱导的影响

由图 1 可知,当 ABA 质量浓度为 0 mg/L 时,在改良 NB5 培养基中仅添加 2,4-D 并不能提高水稻愈伤组织诱导率,其成熟胚上芽的快速生长抑制了愈伤组织的发生(图 2A),宁粳 23 号、优育 7 号、秋田小町、优育 27 号 4 个水稻品种的愈伤组织诱导率均低于 30%;随着质量浓度的增加,ABA 可有效抑制水稻芽的生长,促进愈伤组织发生,当 ABA 质量浓度为 2 mg/L 时,4 个水稻品种愈伤组织发生最好(图 2B),诱导率均高于 80%,其中秋田小町诱导率较对照增幅超过 70%;之后随 ABA 质量浓度的继续增加,4 个水稻品种愈伤组织诱导率均有所下降,形成的愈伤组织多表现为疏松,颜色多呈乳白色。表明诱导培养基中添加 2 mg/L ABA 可有效促

进水稻愈伤组织的发生。

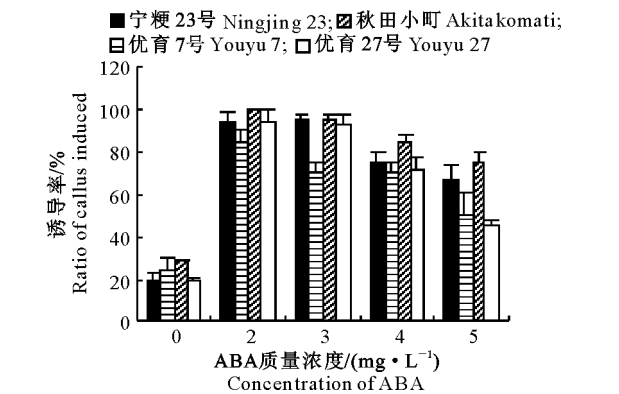


图 1 不同质量浓度 ABA 对水稻愈伤组织诱导率的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of ABA ratio on rice callus induction

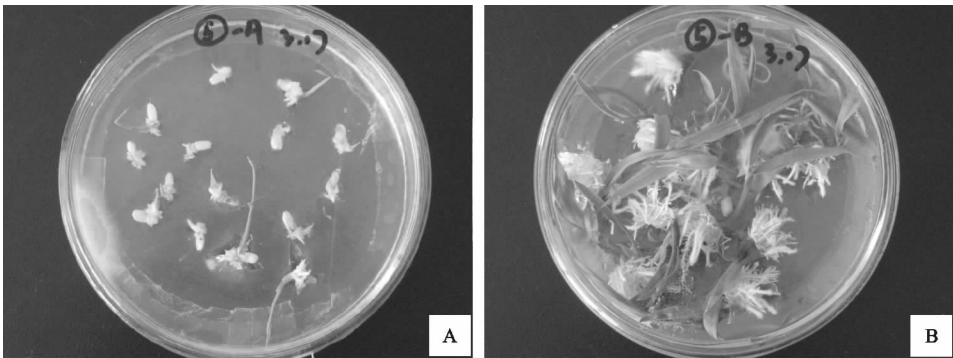


图 2 添加 8 d 后 ABA 对秋田小町发芽的影响
A. 2 mg/L ABA; B. 0 mg/L ABA
Fig. 2 Effects of ABA's infliction for 8 d on germination of Akitakomati

2.3 不同激素组合对水稻愈伤组织分化及出苗的影响

以出愈好的 4 个水稻品种为材料,在 MS 基本培养基上分别添加不同质量浓度的 6-BA 与 NAA、KT 与 NAA,观测不同外源激素组合对愈伤组织分化及出苗的影响,结果见图 3 和图 4。图 3 和图 4 显示,在愈伤组织开始分化时,添加 6-BA 与 KT 均可促进出芽,4 个水稻品种在激素组合 B(6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L)和 C(KT 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L)的处理下分化效果最好;但在进一步继

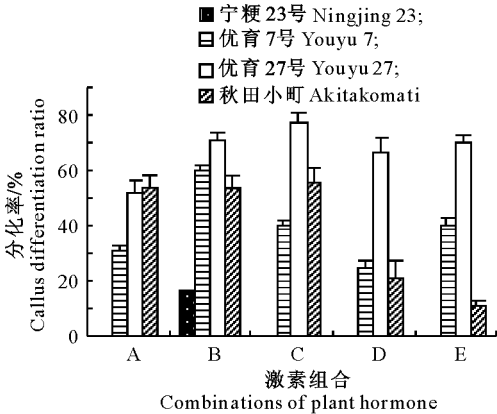


图 3 不同激素组合对水稻愈伤组织分化的影响
Fig. 3 Effects of different combinations of plant hormone on rice callus differentiation

2.4 不同质量浓度 Cef 对水稻愈伤组织分化的影响

Cef 作为一种广谱抑菌剂,是当前基因工程中应用最广的抑菌剂之一。由于不同植物对 Cef 的敏感性均不相同,因此在转化进行前,筛选植物对 Cef 的敏感质量浓度十分必要。图 5 表明,在愈伤组织开始分化时,低质量浓度(200~500 mg/L) Cef 对出芽的影响不大,2 个水稻品种分化率较对照(Cef 质量浓度为 0 mg/L)降幅均低于 10%;当 Cef 质量浓度高于 500 mg/L 时,出芽受到明显抑制,2 个水

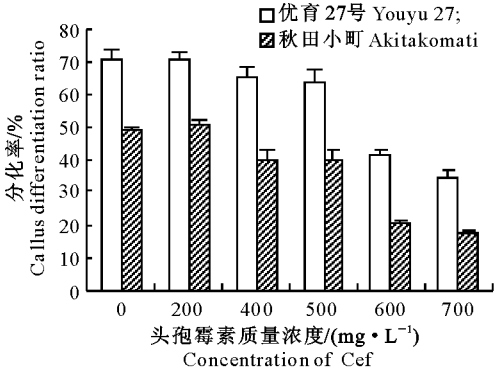


图 5 不同质量浓度 Cef 对水稻愈伤组织分化的影响
Fig. 5 Effects of Cef on rice callus differentiation

代分化培养中,使用 6-BA 比 KT 更易出苗,由一个芽点分化出的绿芽基本都能出苗,且分化出的绿苗长势较好;而使用 KT 时,分化的绿芽成苗速度慢,且绿苗长势弱。总体来看,6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L 对本试验供试的 4 个材料分化效果更好。在该组合处理下,优育 27 号和秋田小町的分化和出苗表现均较佳,分化率分别为 77.10%,55.00%,出苗率分别为 286.7%,300%;宁梗 23 号分化与出苗效果较差,分化率仅为 16.67%,出苗率为 0%。

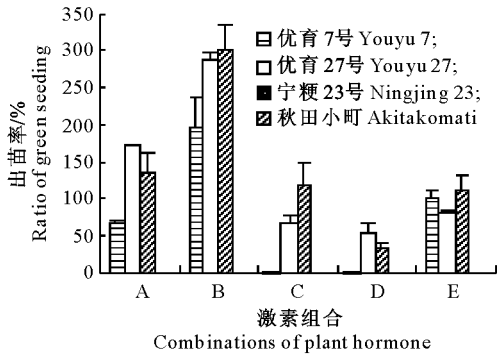


图 4 不同激素组合对水稻出苗的影响
Fig. 4 Effects of different combinations of plant hormone on rice regeneration

稻品种分化率降幅均超过 25%,且出现的芽点随培养时间的增加而逐渐褐化。

图 6 显示,在进一步继代分化过程中,低质量浓度(200~500 mg/L)Cef 对出苗的抑制作用增强,但分化出的绿苗长势良好;当 Cef 质量浓度高于 500 mg/L 时,仅少数芽点出苗,即使成苗也长势细弱。可见高质量浓度的 Cef 对水稻再生的伤害较大,因此在水稻转化中 Cef 的质量浓度上限为 500 mg/L。

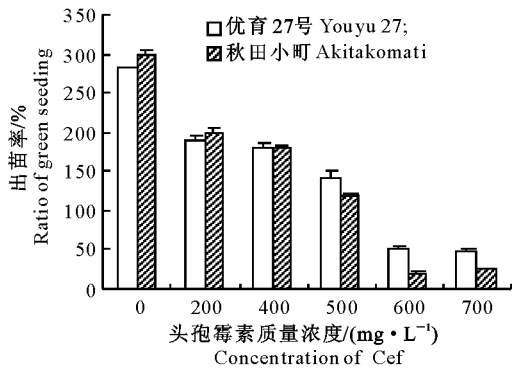


图 6 不同质量浓度 Cef 对水稻愈伤组织出苗的影响
Fig. 6 Effects of Cef on rice callus seeding

3 讨论

用于转基因的植物再生体系应具有高频、稳定的再生能力,在转化中对抑菌抗生素要有良好的敏感性等。基因型、外源激素、培养条件等是影响高效再生体系的主要因素。其中,外源激素种类、质量浓度与配比是植物愈伤组织分化再生的重要调控因子。ABA在禾本科植物组织和细胞培养中的作用已受到广泛肯定,在适当时间加入外源ABA,可促进胚性愈伤组织的形成及胚状体发生,对促进正常胚发育有一定作用^[4-7]。本研究在愈伤组织诱导发生前期,将水稻成熟胚置于含ABA的诱导培养基中,8 d左右可观察到水稻发芽被有效地抑制,10~15 d即可获得致密、颗粒状、淡黄色的愈伤组织,明显提高了水稻愈伤组织诱导率;且质量浓度2 mg/L ABA对促进水稻愈伤组织发生最为适宜。6-BA与KT是禾本科植物再生分化中常用的细胞分裂素。袁云香等^[8]认为,添加6-BA诱导水稻分化,出苗率较好;周玲艳等^[9]认为,6-BA有利于水稻愈伤组织的分化。本研究结果表明,3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,1 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 2种激素组合对水稻愈伤组织分化均有一定的促进作用,但6-BA更有利于水稻的出苗,且3 mg/L 6-BA处理效果最佳。

基因型差异是贯穿水稻再生体系建立过程中的主要因素。不同品种的基因型差异主要表现在它们对外源激素的敏感性和作用效果等^[3]。本研究中,秋田小町与优育27号在再生体系建立的过程中表现出了高频、稳定的培养特性,是适宜组织培养与遗传转化的水稻品种材料。本研究得出优育27号具有高频分化能力的结果与孙建昌等^[10]得出的结论不一致,这可能与分化培养中所使用的外源激素不同有关。

添加抑菌抗生素可有效降低转化过程中农杆菌污染、提高转化效率、减轻转化工作量。由于不同植物外植体对抗生素的敏感性亦不相同,转化前筛选水稻对抑菌抗生素的敏感性质量浓度十分必要。Cef作为一种广谱抑菌剂,是当前基因工程中应用最广的抑菌剂之一。马炳田等^[11]对水稻遗传转化选择系统进行优化后认为,Cef质量浓度为300~400 mg/L时,可以得到较高的抗性愈伤组织筛选率和绿苗分化率,但也表明不同水稻材料有一定差异。在本研究中,高质量浓度Cef对水稻愈伤组织分化及出苗表现出了强烈的抑制作用,不利于植株的正

常生长,建议转化时Cef的质量浓度上限以500 mg/L为宜。

本研究以宁夏主栽的水稻品种成熟胚为材料,研究建立了农杆菌介导法转化所必需的高效再生体系及合适的抑菌抗生素浓度,为下一步遗传转化工作奠定了基础。

参考文献

- [1] 王兴盛. 宁夏水稻 [J]. 北方水稻, 2007(1): 19-22, 31.
Wang X S. Ningxia rice [J]. North Rice, 2007(1): 19-22, 31. (in Chinese)
- [2] 高三基, 陈如凯, 马宏敏. 影响籼稻成熟胚愈伤组织植株再生频率的几个因素 [J]. 作物学报, 2004, 30(12): 1254-1258.
Gao S J, Chen R K, Ma H M. Factors influencing the regeneration frequency of mature embryo-derived callus in hsien rice cultivars (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(12): 1254-1258. (in Chinese)
- [3] 黄赛麟, 李东宣, 甘树仙, 等. 水稻成熟胚培养高效再生系统的创新 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(4): 801-806.
Huang S L, Li D X, Gan S X, et al. Innovation of high effective regeneration system for matured embryo in vitro culture of rice [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(4): 801-806. (in Chinese)
- [4] 李霞, 陈婷, 周月兰. 籼粳稻成熟胚愈伤组织培养力的比较 [J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2005, 28(4): 103-107.
Li X, Chen T, Zhou Y L. The comparison in tissue culture ability from mature embryo in Indica and Japonica rice cultivars [J]. Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition, 2005, 28(4): 103-107. (in Chinese)
- [5] 王亚琴, 段中岗, 黄江康. 水稻幼穗培养高效再生系统的建立 [J]. 植物学通报, 2004, 21(1): 52-60.
Wang Y Q, Duan Z G, Huang J K. Efficient regeneration from *in vitro* culture of young panicles of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2004, 21(1): 52-60. (in Chinese)
- [6] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 44-45.
Huang X L, Li X J. Morphogenesis and modulated control of tissue in control of tissue in isolated culture of higher plant [M]. Beijing: Science Press, 1995: 44-45. (in Chinese)
- [7] 李雪梅, 刘熔山. 小麦幼穗胚性愈伤组织诱导及分化过程中内源激素的作用 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30: 255-326.
Li X M, Liu R S. The effect of endogenous hormones on callus induction and plant regeneration from wheat immature spike [J]. Plant Physiology Communications, 1994, 30: 255-326. (in Chinese)
- [8] 袁云香, 王志刚, 孙丙耀. 水稻愈伤组织再分化培养方法的优化 [J]. 种子, 2008, 27(1): 13-15.
Yuan Y X, Wang Z G, Sun B Y. Optimization on plant regeneration method of rice callus [J]. Seed, 2008, 27(1): 13-15. (in Chinese)

[9]

周玲艳,秦华明,谢俊平,等. 提高水稻愈伤组织再生频率的研究 [J]. 种子,2006,25(7):28-35.
Zhou L Y,Qin H M,Xie J P,et al. Study on the enhancement of regeneration frequency of callus in rice [J]. Seed,2006,25(7):28-35. (in Chinese)

[10]

孙建昌,马 静,杨生龙,等. 宁夏水稻成熟胚离体再生体系的建立 [J]. 西北农业学报,2009,18(1):80-84.
Sun J C,Ma J,Yang S L,et al. The establishment of regenera-

ted system in mature embryo of Ningxia japonica rice [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2009,18(1):80-84. (in Chinese)

[11]

马炳田,朱 桢,李 平,等. 水稻遗传转化选择系统优化初探 [J]. 西南农业学报,2003,16(1):28-31.
Ma B T,Zhu Z,Li P,et al. Studies on screening system of rice genetic transformation [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences,2003,16(1):28-31. (in Chinese)

[8]

邢秀梅,杨福合,苏伟林,等. 新疆马鹿血液蛋白多态性研究 [J]. 特产研究,2002(3):1-3.
Xing X M,Yang F H,Su W L,et al. Studies on blood protein polymorphism in Xinjiang wapiti [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research,2002(3):1-3. (in Chinese)

[9]

萨姆布鲁克,福瑞特斯,马尼亚提斯. 分子克隆实验指南 [M]. 北京:科学出版社,2003:507-520.
Sambrook K H,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular cloning laboratory manual [M]. Beijing: Science Press,2003:507-520. (in Chinese)

[10]

李顺才,杜利强,安瑞永. 中国野生马鹿资源的保护与利用 [J]. 草业科学,2008(4):82-85.
Li S C,Du L Q,An R Y. Conservation and utilization of wild *Cervus elaphus* resource in China [J]. Pratacultural Science,2008(4):82-85. (in Chinese)

[11]

刘向华,王义权,刘忠权,等. 从 Cyt b 基因序列探讨鹿亚科动物的系统发生关系 [J]. 动物学研究,2003,24(1):27-33.
Liu X H,Wang Y Q,Liu Z Q,et al. Phylogenetic relationships of cervinae based on sequence of mitochondrial cytochrome b gene [J]. Zoological Research,2003,24(1):27-33. (in Chinese)

[12]

Renee O,Polziehn,Curtis Strobeck. A phylogenetic compari-

son of red deer and wapiti using mitochondrial DNA [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2002,22(3):342-356.

[13]

大泰司纪之. 中国鹿类的起源和进化 [M]//盛和林. 中国鹿类动物. 上海:华东师范大学出版社,1992:18-161.
Ohtaishi N. The origin and evolution of Chinese deer [M]//Sheng H L. Cervidae Animal in China. Shanghai: Shanghai East China Normal University Press,1992:18-161. (in Chinese)

[14]

李 明,王小明,盛和林. 四种鹿属动物的线粒体 DNA 差异和系统进化关系研究 [J]. 动物学报,1999,45(1):99-101.
Li M,Wang X M,Sheng H L. Mitochondrial DNA divergence and phylogeny of four species of deer of the *genus gervus* [J]. Acta Zoologica Sinica,1999,45(1):99-101. (in Chinese)

[15]

Kuwayama R,Ozawa T. Phylogenetic relationships among european Red deer, wapiti, and Sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2000,15(1):115-123.

[16]

Mahmut H,Ganzorig S,Onuma M,et al. A preliminary study of the genetic diversity of Xinjiang Tarim red deer (*Cervus elaphus yarkandensis*) using the microsatellite DNA method [J]. Japanese Journal of Veterinary Research,2001,49(3):231-237.

(上接第 46 页)