

普通野生稻胚性愈伤组织诱导体系的建立

潘英华^{1,2}, 梁云涛^{1,3*}, 陈成斌¹, 梁世春¹, 段俊枝⁴,
余建平², 黄娟¹, 徐志健¹

(1. 广西农业科学院 水稻研究所, 广西 南宁 530005;

2. 中国农业大学 农业与生物技术学院 北京市作物遗传改良重点实验室, 北京 100193;

3. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081;

4. 河南省农业科学院 农业经济与信息研究所, 河南 郑州 450000)

摘要: 为了建立野生稻的脱分化与分化体系, 以普通野生稻为试验材料, 通过在 N6D、NB 基本培养基中添加不同质量浓度激素(IAA、NAA、2,4-D、6-BA、KT), 统计野生稻在不同诱导培养基上的出愈率, 从而确定最佳诱导培养基, 并观察胚性愈伤组织分化成苗的情况。结果发现, 以 N6D 为基本培养基, 添加质量浓度分别为 6.0 mg/L、3.0 mg/L、3.0 mg/L、1.5 mg/L 的 2,4-D、NAA、IAA、KT, 接种 7 d 后出愈率高达 56.7%, 愈伤组织直径为 0.31 cm, 将其转入 MS 分化培养基, 24 d 后分化成苗。说明该诱导培养基是培养普通野生稻产生胚性愈伤组织的最佳培养基。

关键词: 普通野生稻; 愈伤组织; 脱分化; 分化

中图分类号: S511 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)06-0025-05

Study on Differentiation and Dedifferentiation of *Oryza rufipogon* Griff.

PAN Ying-hua^{1,2}, LIANG Yun-tao^{1,3*}, CHEN Cheng-bin¹, LIANG Shi-chun¹, DUAN Jun-zhi⁴,
YU Jian-ping², HUANG Juan¹, XU Zhi-jian¹

(1. Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530005, China;

2. Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, College of Agriculture and Biotechnology,
China Agricultural University, Beijing 100193, China;

3. Crop Science Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

4. Institute of Agricultural Economics and Information, Henan Academy of Agricultural Sciences,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The N6D and NB medium containing different hormones(IAA, NAA, 2,4-D, 6-BA and KT) were used to study the callus rate of *Oryza rufipogon* Griff, so as to determine the best medium for *O. rufipogon* Griff. And the shoot induction rate from embryonic calli was also observed. The result showed that, after the seeds were placed on medium for 7d, the callus ratio from N6D medium with 6.0 mg/L 2,4-D, 3.0 mg/L NAA, 3.0 mg/L IAA, 1.5 mg/L KT was 56.7%, while the diameter of callus reached to 0.31 cm. And then the callus of *O. rufipogon* Griff were

收稿日期: 2013-12-28

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1123001-3A); 广西自然科学基金项目(桂科青 0991053, 桂科青 0933001z, 桂科青 0832001z); 广西农业科学院基本科研业务专项(200923); 广西农业科学院面上项目(2007027); 广西农业科学院院基金项目(200901Z); 广西农业科学院发展基金项目(2005002z)

作者简介: 潘英华(1981-), 女, 广西田东人, 助理研究员, 硕士, 主要从事野生稻利用和基因发掘工作。

E-mail: panyinghua2008@163.com

* 通讯作者: 梁云涛(1975-), 男, 广西崇左人, 助理研究员, 硕士, 主要从事野生稻分子生物学研究工作。

transferred to MS dedifferentiation medium for 24 d, the callus became the green plants. This is a quick system for differentiation and dedifferentiation of *O. rufipogon* Griff.

Key words: *Oryza rufipogon* Griff; callus; differentiation; dedifferentiation

野生稻是栽培稻的祖先,在自然环境中受到各种逆境条件的胁迫,形成了丰富的遗传多样性,累积了优良的变异基因^[1]。普通野生稻在世界各地广泛分布,因其染色体组与栽培稻相同,为二倍体(AA),所以不育性和抗病、虫特性均已被用于改良栽培稻的产量与质量。

保存濒危野生稻和利用野生稻的优良特性,对水稻的研究和育种工作有着重要意义。由于工业用地的增多和耕地面积的减少,许多野生稻资源遭到了严重破坏,建立完整保存野生稻资源遗传多样性的方法显得尤为重要。利用植物细胞全能性,应用细胞工程技术获得组培离体苗,可以实现在人工可控条件下资源的长期安全保存,同时还能保证资源遗传多样性的完整性。实现野生稻离体保存的关键是高效快速地获得高分化能力的愈伤组织,进而分化成苗进行安全保存。

植物脱分化与分化受多种因素的影响,如基因型、外植体选择、培养基类型及其之间的互作,但至今尚未能建立一种适应所有基因型的万能培养基^[2]。野生稻基因组与栽培稻基因组有很大不同,所以野生稻的离体培养难度较大。研究发现,药用野生稻的离体培养较难获得胚性愈伤组织,或是诱导效率较低^[3]。为此,对普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff., 染色体为 AA)胚性愈伤组织诱导体系的建立进行研究,并分析其分化成苗情况,以期对野生稻离体保存库体系的构建奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

普通野生稻,现保存于国家种质南宁野生稻圃内,采取池栽方式进行异位种植管理。

1.2 试剂

IAA、NAA、2,4-D、6-BA、KT 与各类组织培养所用化学试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 普通野生稻胚性愈伤组织的诱导培养 将新收获的普通野生稻种子放入烘箱 35℃ 烘干 24 h,将烘干的野生稻种子脱壳,然后用 75% 的乙醇浸泡 2 min,再用 20% 的 NaClO 振荡消毒 50 min,无菌水冲洗 6~7 次后置于无菌滤纸上吸干水分,置于超净

工作台吹干 30 min 并接种在不同的愈伤组织诱导培养基(表 1)上,每皿放置 10 粒作为 1 个重复,每种培养基设置 3 个重复。于 28℃ 条件下进行光照培养,光照强度为 30 000 lx,光照时间为 16 h/d。接种 7 d 后计算出愈率,出愈率=长出愈伤组织的种子数/接种种子数×100%。

表 1 培养基成分

用途	编号	基本培养基	激素/(mg/L)				蔗糖/(g/L)	植物凝胶/(g/L)
			2,4-D	NAA	IAA	KT		
脱分化	A	N6D	2.0				30	2.5
	B	N6D	6.0				30	2.5
	C	N6D	18.0				30	2.5
	D	N6D	6.0	3.0	3.0	1.5	30	2.5
	E	N6D	18.0	9.0	9.0	4.5	30	2.5
	F	NB	2.0				30	2.5
	G	NB	2.0	3.0	3.0	1.5	30	2.5
分化	R	MS		0.02		2.0	30	3.5

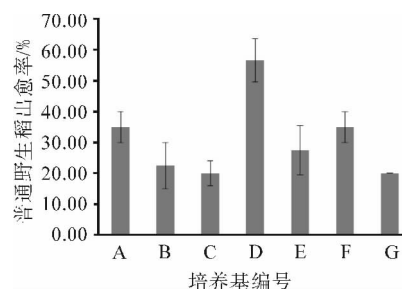
1.3.2 普通野生稻胚性愈伤组织的分化培养

挑选大小一致、色泽淡黄、质地紧密、直径在 0.25 cm 以上的胚性愈伤组织接种于分化培养基(表 1)中,每皿放置 10 粒为 1 个重复,设置 3 个重复,暗培养 3 d 后进行光照培养,光照强度为 30 000 lx,光照时间为 16 h/d,3 周后统计出苗率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对普通野生稻出愈率的影响

由图 1 可知,以 N6D 为基本培养基,分别添加 2.0 mg/L、6.0 mg/L、18.0 mg/L 2,4-D 的 A、B、C 培养基,野生稻出愈率为 35.0%、22.5%、20.0%。说明,以 N6D 为基本培养基,仅添加 2,4-D 时,2,4-D 质量浓度越高越不利于普通野生稻胚性愈伤组织的诱导,但 2,4-D 的质量浓度在 18.0 mg/L 以下均能诱导普通野生稻产生愈伤组织。



A、B、C、D、E、F、G 对应表 1 中培养基编号,图 2、3 同

图 1 不同培养基诱导普通野生稻的出愈率

由图 1 可知,以 N6D 为基本培养基,同时添加质量浓度分别为 6.0 mg/L、3.0 mg/L、3.0 mg/L、1.5 mg/L 的 2,4-D、NAA、IAA、KT(D 培养基),野生稻出愈率为 56.7%;以 N6D 为基本培养基,同时添加质量浓度分别为 18.0 mg/L、9.0 mg/L、9.0 mg/L、4.5 mg/L 的 2,4-D、NAA、IAA、KT(E 培养基),野生稻的出愈率为 27.5%;D 培养基的出愈率比 E 培养基的出愈率高 29.2 个百分点,且差异达显著水平($P < 0.05$)。说明,以 N6D 为基本培养基,同时添加低浓度的 2,4-D、NAA、IAA、KT 能够高效诱导普通野生稻产生胚性愈伤组织,但当添加的 4 种激素质量浓度较高时,虽然仍可以诱导普通野生稻产生愈伤组织,但出愈率降低。

由图 1 可知,以 NB 为基本培养基,添加 2.0 mg/L 2,4-D(F 培养基),野生稻出愈率为 35.0%;同时添加 2.0 mg/L 2,4-D、3.0 mg/L NAA、3.0 mg/L IAA、1.5 mg/L KT(G 培养基),野生稻出愈率为 20.0%;F 培养基的出愈率比 G 培养基的出愈率高 15.0 个百分点。说明,以 NB 为基本培养基,仅添加 2,4-D 比同时添加 4 种激素更有利于诱导普通野生稻产生胚性愈伤组织,但 2 种处理均能够诱导普通野生稻产生胚性愈伤组织,出愈率均在 20.0% 以上。

对比普通野生稻种子在 7 种不同诱导培养基中的出愈率,结果发现:出愈率最高的是以 N6D 为基本培养基的 D 培养基,出愈率为 56.7%,分别比培养基 A、B、C、E、F、G 诱导的出愈率高 21.7、34.2、36.7、29.2、21.7、36.7 个百分点,且与培养基 B、C、E、G 差异达到显著水平($P < 0.05$)。此结果说明,培

养基 D 诱导普通野生稻产生愈伤组织的能力最强;在不同基本培养基中,添加的多种激素对诱导普通野生稻产生胚性愈伤组织的能力不同。

2.2 不同培养基对普通野生稻愈伤组织质量的影响

为了研究不同培养基对普通野生稻愈伤组织质量的影响,观察了 7 种培养基上愈伤组织的直径、颜色及质地(图 2、图 3)。由图 2 可知,以 N6D 为基本培养基,添加 2.0 mg/L 2,4-D 的 A 培养基诱导的愈伤组织直径为 0.30 cm,比添加 6.0 mg/L 2,4-D 的 B 培养基仅长 0.02 cm,直径增长量占 B 培养基诱导愈伤组织直径全长的 7.71%;比含 18.0 mg/L 2,4-D 的 C 培养基愈伤组织长 0.06 cm,直径增长量占 C 培养基诱导愈伤组织直径全长的 26.52%。B 培养基上的愈伤组织直径比 C 培养基的愈伤组织直径长 0.04 cm。3 种培养基诱导的愈伤组织色泽淡黄、质地紧密。说明,以 N6D 为基本培养基,2,4-D 的质量浓度不仅严重影响出愈率,而且影响愈伤组织直径。质量浓度在 2.0~6.0 mg/L 的 2,4-D 对愈伤组织直径的影响不大;当 2,4-D 的质量浓度达到 18.0 mg/L,愈伤组织直径明显缩小,说明过高的 2,4-D 质量浓度不仅降低出愈率,也减小愈伤组织直径。

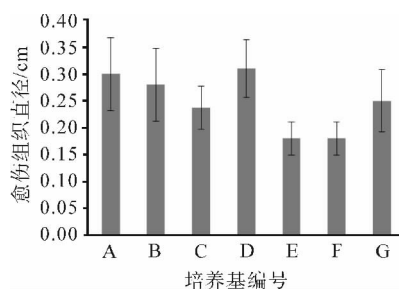


图 2 不同培养基诱导野生稻愈伤组织的直径

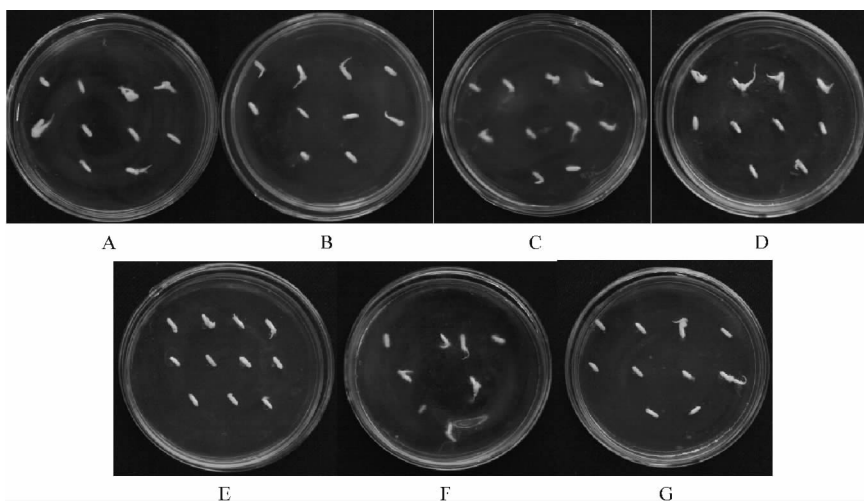


图 3 不同培养基诱导普通野生稻产生胚性愈伤组织的形态

由图 2、图 3 可知,D 培养基诱导的愈伤组织直径为 0.31 cm,比 E 培养基中诱导的愈伤组织直径长 0.13 cm,直径增长量占 E 培养基诱导愈伤组织直径的 72.2%,二者差异达到显著水平($P<0.05$)。D 培养基诱导的愈伤组织色泽淡黄偏白色、质地紧密,E 培养基诱导的愈伤组织色泽偏白,质地疏松。说明,以 N6D 为基本培养基,添加 4 种激素的培养基 D 诱导的普通野生稻愈伤组织在 7 d 内生长迅速,添加高质量浓度 4 种激素的培养基 E 则抑制了普通野生稻愈伤组织的生长。

由图 2、图 3 可知,F 培养基诱导的愈伤组织直径为 0.18 cm,比 G 培养基诱导的愈伤组织直径短 0.07 cm,直径缩短量占 F 培养基诱导愈伤组织直径全长的 38.9%。培养基 F、G 诱导的愈伤组织色泽偏白、质地紧密。说明,以 NB 为基本培养基,添加 4 种激素的培养基虽然降低了普通野生稻的出愈率,但对已经诱导出的愈伤组织有加速生长的作用。

对比普通野生稻种子在 7 种不同培养基中诱导产生的愈伤组织直径、色泽与质地,结果表明,D 培养基诱导的愈伤组织生长最快,在进行脱分化 7 d 后愈伤组织直径达到 0.31 cm,色泽偏黄白,比 A、B、C、E、F、G 培养基诱导的愈伤组织直径分别长 0.01 cm、0.03 cm、0.07 cm、0.13 cm、0.13 cm、0.06 cm。说明,以 N6D 为基本培养基,添加低质量浓度的 4 种激素的 D 培养基能够快速高效诱导普通野生稻产生质量良好的胚性愈伤组织,添加高质量浓度的激素不仅降低出愈率,而且使已诱导的愈伤组织生长缓慢;以 NB 为基本培养基,单一的激素虽然对愈伤组织的诱导率影响不大,但严重影响了愈伤组织生长的速度和质量。

2.3 分化培养基对普通野生稻胚性愈伤组织分化成苗的影响

挑选色泽淡黄、质地紧密、直径在 0.25 cm 以上的普通野生稻胚性愈伤组织,转移到分化培养基中,暗培养 3 d,然后光照培养 21 d,统计分化成苗的比例。结果发现,普通野生稻胚性愈伤组织在光照培养 14 d 后,以 MS 为基本培养基,在含有 0.02 mg/L NAA、2.0 mg/L KT 的分化培养基 R 上出现绿色芽点,光照培养 21 d 后成苗率为 42.86%。说明良好的胚性愈伤组织在 24 d 的培养后能够分化成苗(图 4),MS 分化培养基能够使普通野生稻胚性愈伤组织分化成正常植株。



图 4 普通野生稻胚性愈伤组织分化成苗

3 结论与讨论

优质的野生稻愈伤组织是野生稻离体保存和遗传转化的物质基础^[4]。基因型与外植体状态、培养基类型之间的互作会影响植物组织的再生能力。本研究表明,选择以 N6D 为基本培养基,普通野生稻在 D 培养基上培养 7 d 后出愈率为 56.7%,诱导的愈伤组织直径为 0.31 cm,培养基 D 的诱导效率和诱导质量均比培养基 A、B、C、E、F、G 好。良好的胚性愈伤组织进入分化培养基之后,暗培养 3 d、光照培养 14 d 后出现绿色芽点,光照培养 21 d 分化成苗。说明选择培养基 D 进行普通野生稻的脱分化与分化过程,能够在 30 d 内获得成株。选择培养基 D 与 MS 分化培养基对普通野生稻进行脱分化与分化处理,能够突破季节限制,快速稳定地保存普通野生稻。

3.1 基本培养基对野生稻愈伤组织的诱导作用

在籼稻的愈伤组织诱导培养基中,使用 MB 基本培养基和 2,4-D 相互作用能够在 20 d 内诱导籼稻产生愈伤组织^[5]。研究不同基本培养基和激素对籼稻成熟胚愈伤组织诱导的影响发现,4 种籼稻在 NMB 基本培养基中愈伤组织的诱导率最高^[6]。MS、NB 和 N6 培养基诱导不同品种水稻产生愈伤组织的能力存在差异^[7-8]。使用 MS 和 N6 培养疣粒野生稻、景洪野生稻和药用野生稻的愈伤组织,发现药用野生稻极难产生愈伤组织,并且 3 种野生稻的出愈率较低^[3]。高秆野生稻的叶片可以在 N6 为基本培养基的改良培养基上生长并产生愈伤组织,但是不能在 MS 培养基上产生愈伤组织^[9]。本研究,使用 N6D 与 NB 培养基,添加 2.0 mg/L 的 2,4-D,普通野生稻在 2 种培养基的出愈率均为 35.0%。说明尽管 2 种基本培养基成分不同,但是基本培养基对普通野生稻诱导胚性

愈伤组织的能力不相上下。

3.2 激素对野生稻产生愈伤组织的影响

在LS培养基上对不同的水稻品种进行愈伤组织的诱导发现,增加2,4-D和2,4-5T的质量浓度有利于提高水稻的出愈率^[10]。在含0.5 mg/L 2,4-D的培养基中添加0.2 mg/L 6-BA,对籼稻愈伤组织诱导率作用不明显,但抑制愈伤组织分化成苗^[11]。使用4种培养基诱导不同品种的籼稻产生胚性愈伤组织,结果发现,3.0 mg/L 2,4-D与不同质量浓度的KT或6-BA联合使用时,对不同籼稻品种出愈率的影响有较大差异^[12]。本研究中,2,4-D质量浓度上升会抑制普通野生稻诱导胚性愈伤组织,但是在N6D中添加2,4-D、IAA、NAA、KT之后,D培养基的出愈率达到56.7%。说明添加的激素和基本培养基相互作用,可以诱导普通野生稻胚性愈伤组织的产生。

3.3 野生稻快速脱分化与分化体系的建立

云南不同染色体组野生稻从脱分化到成苗需要60 d时间;杂交籼稻亲本产生胚性愈伤组织并分化成苗需要38 d^[13];不同材料脱分化过程需要20 d以上^[6-7]。本研究从脱分化开始到成苗,普通野生稻脱分化产生胚性愈伤组织的时间为7 d,分化的时间为24 d,全程产生绿苗的过程为31 d,大大缩短了脱分化和分化的时间。建立普通野生稻快速脱分化与分化体系,将为濒危野生稻的离体保存奠定技术基础,对野生稻的基因转化进行基因功能验证也具有重要意义。

参考文献:

[1] 鄂志国,王磊. 野生稻有利基因的发掘和利用[J]. 遗传,2008,30(11):1397-1405.
[2] Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M. Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants[J]. Euphytica,2006,149:73-83.
[3] 丁玉梅,程在全,黄兴奇,等. 云南野生稻不同染色体组

型和外植体材料的离体培养研究[J]. 西北植物学报,2003,23(11):1922-1926.

- [4] Huang N, Wang J H, Yan Q S, *et al.* Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1995,14:730-734.
[5] 于洋,张业胜,董扬,等. 广适应性籼稻愈伤组织诱导培养基的筛选[J]. 西南农业学报,2011,24(3):839-843.
[6] 廖鹏飞,赵君幸,雷发扬,等. 不同基本培养基和激素对籼稻成熟胚愈伤组织诱导的影响[J]. 湖北农业科学,2012,51(18):4121-4124.
[7] Pathak A K, Ghosh J, Choudhury P Ray, *et al.* Comparative assessment of somatic embryogenesis and plant regeneration in dormant and non-dormant indica rice varieties[J]. ORYZA-An International Journal on Rice,2012,49(4):296-298.
[8] 郭晓丽,白丽荣,时丽冉. 不同激素对比对旱稻愈伤组织诱导率的影响[J]. 河南农业科学,2011,40(8):81-83.
[9] 倪文津,程方民,张建军. 高秆野生稻(*Oryza alta* L.) 叶片组织培养中通过胚状体获得再生植株[J]. 上海农业学报,2007,23(4):18-20.
[10] Maruthi Rao A, Sampath Kumar I, Kavi Kishor P B. Effect of growth regulators and physiological gradients on the high frequency plant regeneration from the long-term callus cultures of different germplasms of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Phytology, 2012,4(2):6-15.
[11] 李玉静,陈彦龙,王玲玲,等. 2,4-D和6-BA对水稻愈伤组织培养力的影响[J]. 河北师范大学学报,2005,29(4):395-398.
[12] 苗春波,万志刚,孙丙耀. 2,4-D和6-BA对籼稻成熟胚愈伤组织诱导和植株再生的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(27):12927-12929.
[13] 沈显华,黄仁良,朱珊. 杂交籼稻亲本成熟胚组培研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(25):10776-10778.