

# 籼稻 Kra Dang Ngah 植株再生体系影响因素研究

张银霞

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 以籼稻 Kra Dang Ngah 成熟胚为材料, 探讨了培养基、植物凝胶质量浓度、激素配比、碳水化合物等因素对其再生体系的影响。结果表明, 籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织的最佳分化培养基为 ARDA 培养基, 植物凝胶为 3.0 g/L, 细胞分裂素(6-BA、KT)与生长素(NAA)配比为 6:1, 碳水化合物为山梨醇 15 g/L、水解酪蛋白 1 g/L, 在此条件下再生芽获得频率较高, 为 75.0%。将上述条件下获得的再生芽转移到生根培养基(MS 培养基+0.1 mg/L IAA+30 g/L 蔗糖)中可获得 100% 具有完全根系的再生植株, 移栽炼苗 7 d 后生长 1 个月, 再生植株的成活率达到 100%。

**关键词:** 籼稻 Kra Dang Ngah; 再生体系; 影响因素

中图分类号: S511.21 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)11-0027-05

## Study on Factors Influencing Plantlet Regeneration of *Indica* Rice(*Oryza sativa* L.) Kra Dang Ngah

ZHANG Yin-xia

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** The embryogenic calli of *indica* rice Kra Dang Ngah was as material and the effect of culture media, phytagel concentrations, the ratio of plant phytohormones, carbohydrates on plantlet regeneration were studied. The results showed that the optimum culture media was ARDA, the optimum concentration of phytagel was 3.0 g/L, the optimum ratio of cytokinin(6-BA, KT) to auxin(NAA) was 6:1, the optimum carbohydrates was 15 g/L sorbitol and 1 g/L casein hydrolysate. Under this conditions the highest regeneration shoots was obtained with 75.0%. Then the regeneration shoots were transferred to root initiation media(MS+0.1 mg/L IAA+30 g/L sugar), the 100% regeneration plantlets with complete roots were obtained. After seven days of acclimatization, the survival rate of plantlets was 100% after growth for one month.

**Key words:** *indica* rice Kra Dang Ngah; plantlet regeneration system; regeneration frequency

利用转基因技术对水稻进行遗传改良是改善水稻品质、提高抵抗病虫害能力、培育新品种的重要手段之一, 而高效的再生体系是遗传转化成功的先决条件。籼稻由于具有顽拗性, 不容易接受外界的刺激<sup>[1]</sup>。虽然科研人员在籼稻组织培养和遗传转化方面的研究已取得一定进展<sup>[2-5]</sup>, 但迄今为止, 完善的籼稻组织培养体系尚未建立, 特别是

一些优良生产品种的组织培养已成为限制籼稻遗传转化的主要因素, 直接影响水稻功能基因组和分子育种的研究进度。本研究探讨了培养基、植物凝胶质量浓度、植物激素配比和碳水化合物对籼稻成熟胚愈伤组织再生能力的影响, 从而优化再生体系, 建立籼稻成熟胚高效再生体系, 为其遗传转化和分子育种奠定基础。

收稿日期: 2014-06-20

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(NZ14005)

作者简介: 张银霞(1979-), 女, 宁夏平罗人, 讲师, 博士, 主要从事作物遗传育种学的教学与科研工作。

E-mail: zyinxia2008@126.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及其预处理

以籼稻 Kra Dang Ngah (*Oryza sativa*, L) 成熟种子为试验材料, 将其剥去外壳后浸入 70% 乙醇中表面消毒 1 min; 随后放入 20% 的次氯酸钠溶液中, 滴入 2~3 滴 Tween-20, 消毒 5 min; 然后在超净工作台用无菌蒸馏水洗 4~5 次; 最后将种子放在无菌滤纸上吸干水分, 备用。

### 1.2 培养基

诱导培养基: MS+2 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+0.5 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+1 g/L 水解酪蛋白(CH), pH 值调节至 5.7, 然后加入 7.5 g/L 琼脂粉, 于 121 °C、1.07 kg/cm<sup>2</sup> 条件下高压灭菌 15 min。

继代培养基: MS+1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.25 mg/L KT+1 g/L CH+30 g/L 蔗糖, pH 值调节至 5.7, 然后加入 7.5 g/L 琼脂粉, 高压灭菌(条件同上)。

分化培养基: MS、N6<sup>[6]</sup> 和 ARDA<sup>[7]</sup>, 每种培养基中均添加 30 g/L 蔗糖、0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA、2.0 mg/L KT、1 g/L CH, 在此基础上调整细胞分裂素(6-BA+KT)与生长素(NAA)配比、碳水化合物种类(具体方案见 1.3.2), pH 值调节至 5.7, 然后加入 7.5 g/L 琼脂粉或者植物凝胶(具体方案见 1.3.2), 高压灭菌(条件同上)。

生根培养基: MS 或者 MS+0.1 mg/L IAA, pH 值调节至 5.7, 添加 30 g/L 蔗糖、7.5 g/L 琼脂粉, 高压灭菌(条件同上)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 胚性愈伤组织的诱导和继代培养 将灭菌的种子接种到愈伤组织诱导培养基上, 于 16 h 光照条件下培养 4 周, 调查诱导率及愈伤组织的状态, 愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的种子数/接种的种子数。然后将愈伤组织转接到继代培养基上, 继代培养 3 周, 挑选质量好(淡黄色、紧凑颗粒状)的胚性愈伤组织进行分化培养。

#### 1.3.2 胚性愈伤组织分化成再生苗的影响因素分析

1.3.2.1 培养基 将继代培养后质量好的胚性愈伤组织转接到 MS、N6 和 ARDA 3 种分化培养基上, 培养 3~4 周, 统计胚性愈伤组织的分化率及所需的时间和再生率。分化率=长出绿点的愈伤组织数/愈伤组织总数; 再生率=生成再生芽的愈伤组织数/愈伤组织总数。

1.3.2.2 植物凝胶质量浓度 将继代培养后质量好的胚性愈伤组织转接到 1.3.2.1 筛选出的最好的含有 1.7、2.5、3.0、3.5 g/L 植物凝胶的分化培养基上, 并与培养基中添加 7.5 g/L 琼脂粉的处理相比较。培养 4 周, 统计每个愈伤组织上的分化芽数、再生率。

1.3.2.3 细胞分裂素与生长素的配比 将继代培养后质量好的胚性愈伤组织转接到 1.3.2.2 筛选出的最好的分化培养基上, 并调整细胞分裂素与生长素配比, 其处理分别为: 1.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT+1.0 mg/L NAA, 细胞分裂素与生长素配比为 3:1; 1.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT+1.0 mg/L NAA, 细胞分裂素与生长素配比为 3.5:1; 1.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT+0.5 mg/L NAA, 细胞分裂素与生长素配比为 6:1; 1.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT+0.5 mg/L NAA, 细胞分裂素与生长素配比为 7:1。培养 4 周, 统计分化率和再生率, 同时记录根的生长情况。

1.3.2.4 碳水化合物 将继代培养后质量好的胚性愈伤组织转接到 1.3.2.3 筛选出的最好的分化培养基上, 并调整碳水化合物种类, 其处理分别为: 1 g/L CH(对照)、300 mg/L CH+500 mg/L L-脯氨酸+500 mg/L 谷氨酰胺、1 g/L CH+15 g/L 山梨醇。培养 4 周, 统计分化率和再生率。

1.3.3 再生芽的生根培养和移栽 再生芽长到 3~4 cm 时转接到生根培养基上, 培养至完全根形成, 然后移栽到花盆中, 炼苗 7 d, 移栽到温室, 在 28~30 °C 下培养 1 个月, 统计成活率。

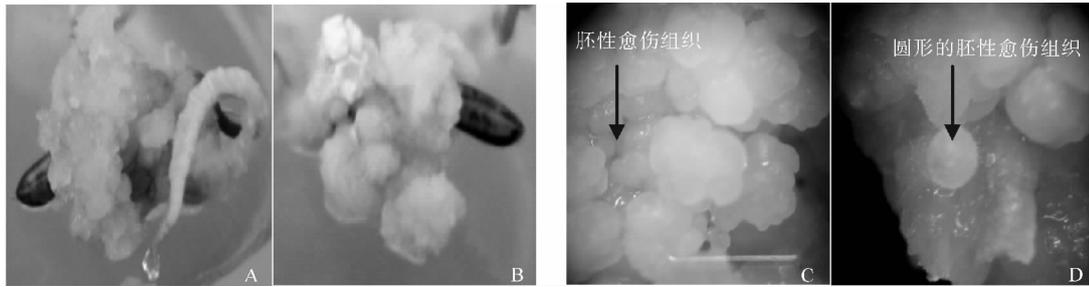
### 1.4 数据分析

用 SAS 6.11 统计软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织的诱导和继代培养

灭菌的籼稻 Kra Dang Ngah 种子在愈伤组织诱导培养基上培养 4 周后, 获得了不同类型的愈伤组织, 然后转接到继代培养基上, 愈伤组织扩繁并进一步促进了胚性愈伤组织的发育, 继代培养 3 周, 可以明显分辨出胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织。胚性愈伤组织特征为: 乳白色、紧凑且易散(图 1A), 在立体显微镜下观察为一簇或单个球状细胞(图 1C-D), 胚性愈伤组织容易分化并获得再生植株。而黄色带点褐化、松软且质地紧密的为非胚性愈伤组织(图 1B)。非胚性愈伤组织容易褐化且不易分化获得再生植株。



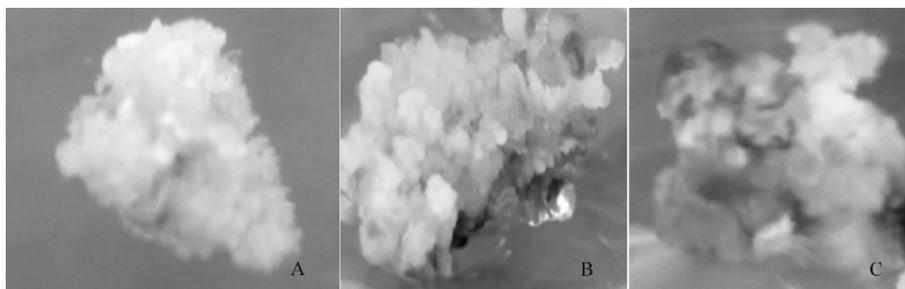
A. 乳白色、紧凑、易散的球状胚性愈伤组织；B. 黄色、致密且软的非胚性愈伤组织；  
C—D. 立体显微镜下观察的胚性愈伤组织

图 1 籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织的形态学特征

## 2.2 籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织分化成再生芽的影响因素

2.2.1 培养基 为了提高籼稻 Kra Dang Ngah 的植株再生频率, 将胚性愈伤组织转接到 MS、N6 和 ARDA 3 种不同的分化培养基上, 观察胚性愈伤组织在不同培养基上表现出的分化能力(图 2)。胚性愈伤组织在 ARDA 培养基上培养 20 d 就长出绿点, 表明愈伤组织开始分化, 培养 30 d 再生率达到

61.3%, 在该培养基上胚性愈伤组织分化最早、获得的再生芽最多; 在 N6 培养基上培养 20 d 长出少许绿点, 培养 30 d 再生率达到 8.6%; 而在 MS 培养基上培养 30 d 没有出现绿点和绿芽(图 2 和图 3)。由图 3 可以看出, 在相同的培养时间内, 不同分化培养基对胚性愈伤组织分化成再生芽的能力有显著影响。其中, ARDA 培养基最适宜籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织分化成再生芽, 选择用于下面的试验。



A. MS 培养基; B. N6 培养基; C. ARDA 培养基

图 2 籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织在不同分化培养基上培养 30 d 再生芽的发育情况

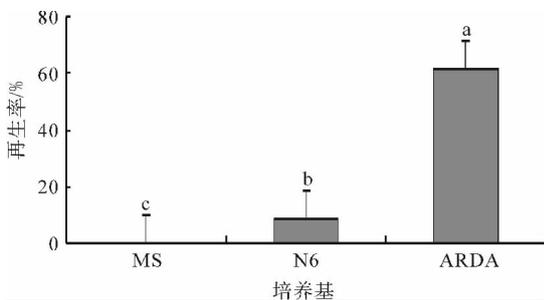


图 3 籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织在不同分化培养基上培养 30 d 的再生率

2.2.2 植物凝胶质量浓度 由表 1 可以看出, 植物凝胶处理(除 1.7 g/L 植物凝胶处理)的籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织分化率和再生率均显著高于对照(琼脂粉处理), 胚性愈伤组织的分化率从 32.1%(琼脂粉处理)提高到 100.0%(植物凝胶处理), 再生率从 8.3%(琼脂粉处理)提高到 63.6%

(植物凝胶处理); 添加 2.5~3.5 g/L 植物凝胶处理的胚性愈伤组织分化率和再生率均显著高于添加 1.7 g/L 植物凝胶处理; 2.5~3.5 g/L 植物凝胶处理的胚性愈伤组织分化率无显著差异, 3.0、3.5 g/L 植物凝胶处理胚性愈伤组织再生率没有显著差异, 而 3.0 g/L 植物凝胶处理显著高于 2.5 g/L 植物凝胶处理; 3.0 g/L 植物凝胶处理每个胚性愈伤组织上

表 1 不同质量浓度植物凝胶对籼稻 Kra Dang Ngah 植株再生的影响

植物凝胶质量浓度/(g/L)	分化率/%	再生率/%	单个愈伤组织分化芽数/个
对照	32.1b	8.3c	3
1.7	0c	0d	0
2.5	87.5a	21.5b	5
3.0	100.0a	61.0a	7
3.5	100.0a	63.6a	6

注: 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著, 下同。

的分化芽数最多,达到 7 个。因此,培养基中添加 3.0 g/L 植物凝胶最适宜胚性愈伤组织的植株再生。

2.2.3 细胞分裂素与生长素的配比 由表 2 可以看出,不同配比的细胞分裂素和生长素对籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织的分化有着显著的影响。当细胞分裂素与生长素的配比为 6:1 时可以显著提高胚性愈伤组织的分化率和再生率,分别可以达到 75.5% 和 33.3%,与配比为 7:1 处理差异不显著,同时,再生植株上均长出了初生根;而低配比的细胞分裂素和生长素表现出低分化率和再生率,且没有根产生。因此,细胞分裂素与生长素比例在 6:1~7:1 时适合于植株再生,尤其是 6:1。

表 2 细胞分裂素(6-BA+KT)与生长素(NAA)的配比对籼稻 Kra Dang Ngah 植株再生的影响

细胞分裂素		生长素	配比	分化率/ %	再生率/ %	根
6-BA/ (mg/L)	KT/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)				
1.0	2.0	0.5	6:1	75.5a	33.3a	有
1.5	2.0	0.5	7:1	69.3a	32.1a	有
1.0	2.0	1.0	3:1	45.8c	20.3b	无
1.5	2.0	1.0	3.5:1	52.5bc	25.4b	无

2.2.4 碳水化合物 由表 3 可以看出,在再生培养基中仅 1 g/L CH 时,籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织的分化率和再生率很低。但降低 CH 质量浓度至 300 mg/L,同时配合 500 mg/L L-脯氨酸和 500 mg/L 谷氨酰胺可以显著提高再生率,但分化率提高不显著,说明 L-脯氨酸和谷氨酰胺可以促进愈伤组织分化芽的再生生长。相比前 2 个处理,在分化培养基中添加 1 g/L CH 和 15 g/L 山梨醇可以提高分化率,并显著提高再生率,再生率高达 75.0%。说明山梨醇对籼稻植株的再生起着非常重要的作用,相比 L-脯氨酸和谷氨酰胺更能有效提高籼稻植株再生。

表 3 碳水化合物对籼稻 Kra Dang Ngah 植株再生的影响

碳水化合物处理	愈伤组织 数/个	分化率/ %	再生率/ %
CH 1 g/L	28	20.0a	0c
CH 300 mg/L+L-脯氨酸 500 mg/L+ 谷氨酰胺 500 mg/L	28	22.0a	27.3b
CH 1 g/L+山梨醇 15 g/L	28	26.0a	75.0a

### 2.3 籼稻 Kra Dang Ngah 再生芽的生根培养和移栽

经调查发现,将 3~4 cm 高的籼稻 Kra Dang Ngah 再生芽转接到生根培养基上,因分化培养基不同,其生根情况也不同。将 ARDA 培养基+0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT 处理中获得的再生芽转接到 MS 培养基上,不添加任何植物

激素,培养 3 周就可以长出根并获得具有完全根系的再生植株;将 ARDA 培养基+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L KT 处理中获得的再生芽转接到 MS 培养基上,需要添加 0.1 mg/L IAA,培养 3 周才能长出根并获得具有完全根系的再生植株,两者生根率均达到 100%。将具有完全根的植株移栽到花盆中,炼苗 7 d 后移到温室,培养 1 个月(图 4),成活率可达到 100%。



图 4 移栽 1 个月后的籼稻 Kra Dang Ngah 再生植株

## 3 结论与讨论

微量元素对诱导愈伤组织、防止褐化、继代培养和植株再生有重要的影响<sup>[8]</sup>。本研究对籼稻 Kra Dang Ngah 的再生体系进行优化发现,分化培养基成分显著影响植株的再生能力,在 ARDA 培养基上胚性愈伤组织分化率和再生率较高,这是由于 ARDA 培养基中的微量元素含量比 N6 培养基和 MS 培养基中的微量元素都要高一些,特别是硫酸锰含量更高些。Ge 等<sup>[9]</sup>的研究也发现 S 培养基中高浓度的硫酸锰可以提高愈伤组织的分化率和再生率。

凝胶对植株再生的作用也不容忽视,本研究采用的植物凝胶效果显著好于琼脂粉。这是因为琼脂粉含有琼脂胶、硫酸盐和其他一些不纯的物质,可能会抑制外植体的生长和继代培养,从而抑制植株的再生<sup>[9]</sup>;而植物凝胶纯度比较高,且不含琼脂粉中发现的不纯物质,这可能是植物凝胶可以提高愈伤组织再生率的原因。另外,适当浓度的植物凝胶具有可以调节湿度、可利用水分和微量盐含量的作用<sup>[10]</sup>。3.0~3.5 g/L 植物凝胶比低浓度(小于 3.0 g/L)的效果好,因为低浓度的植物凝胶含水量多,培养环境湿度高导致植株再生率降低。

在许多组织培养研究中,高比例的生长素和细胞分裂素用于诱导胚性愈伤组织,低比例的生长素

和细胞分裂素用于植株再生培养<sup>[8]</sup>。细胞分裂素对根的启动和发育有调节作用,生长素可以通过调节关键基因控制细胞周期<sup>[11]</sup>。所以,生长素和细胞分裂素的比例对组织培养各个阶段都起着非常重要的作用,它们的作用根据组织、培养阶段和培养条件的不同可能是协同的、抵消的或者是加性的<sup>[12]</sup>,因而决定了最终的作用是诱导愈伤组织产生、器官发生还是胚胎发育。本研究在培养基中添加(6-BA+KT)和NAA的比例从3:1提高到7:1,发现两者配比为6:1~7:1时可以显著提高籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织分化率和再生率。证实了高比例的细胞分裂素与生长素可以促进植株再生<sup>[13]</sup>。但是籼稻具有强的基因型独立性,根据基因型的不同调节生长素和细胞分裂素的比例对于植株再生是有必要的。

碳水化合物、渗透调节物质、氮源等对籼稻的再生都起着重要的作用。本研究表明,山梨醇对籼稻 Kra Dang Ngah 胚性愈伤组织的再生效果显著好于L-脯氨酸+谷氨酰胺和单独使用CH的效果。CH能够提供氨基酸可以促进胚性愈伤组织的诱导和植株再生,但单独使用效果不明显。L-脯氨酸具有渗透调节的作用,可以促进植株再生能力的提高,本研究借鉴前人<sup>[14]</sup>在籼稻组织培养中添加L-脯氨酸和谷氨酰胺用量500~600 mg/L的研究结果,在籼稻培养基中添加L-脯氨酸和谷氨酰胺各500 mg/L,结果表明L-脯氨酸和谷氨酰胺对植株的再生有促进作用,但效果不显著。山梨醇既是一种渗透调节物质也是碳源,可以提高胚性愈伤组织的植株再生率<sup>[15]</sup>。Shahsavari等<sup>[16]</sup>研究发现,山梨醇可以大大提高籼稻愈伤组织的植株再生频率。本研究将山梨醇配合CH使用,也得到了相同的结果。

经分析发现,在ARDA培养基中添加细胞分裂素(6-BA+KT)与生长素(NAA)配比6:1、植物凝胶3.0 g/L、山梨醇15 g/L、水解酪蛋白1 g/L可以使籼稻 Kra Dang Ngah 再生率达到75.0%。达到了优化籼稻 Kra Dang Ngah 植株再生体系的目的,为籼稻的遗传转化及分子育种奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] 阎丽娜,李霞,吴丹. 不同类型水稻材料成熟胚组织培养力的比较[J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1127-1135.

[2] 殷绪明,徐庆国,李海林. 籼型杂交稻亲本成熟胚愈伤组织再生体系的建立[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7

(3): 347-350.

[3] 周凤,于卉,葛占宇,等. 微量元素浓度对3个籼稻品种愈伤组织褐化和分化的影响[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 702-706.

[4] 古旭,胡道芬,洪立芳,等. 培养基和基因型对粳籼稻杂交种花培的影响[J]. 华北农学报, 1992, 7(4): 57-60.

[5] 金迪,杨宇,徐海,等. 光照培养的籼稻成熟胚高效再生及转化的研究[J]. 华北农学报, 2012, 27(5): 110-113.

[6] 朱至清,王敬驹,孙敬三,等. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基[J]. 中国科学, 1975, 18(5): 659-668.

[7] Te-chato S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in somaclones of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) [J]. Thai J Agric and Sci, 2000, 33: 137-145.

[8] 王萍,徐大勇,王昱. 粳籼稻两个亚种成熟胚组织培养与再生能力的比较研究[J]. 种子, 2007, 10(6): 66-67.

[9] Ge X J, Chu Z H, Lin Y J, et al. A tissue culture system for different germplasm of *indica* rice [J]. Plant Cell Report, 2006, 25(5): 392-402.

[10] Bhojani S S, Razdan M K. Plant tissue culture: Theory and practices [M]. Amsterdam: Elsevier Publishers, 1996: 50-51.

[11] Zaidi M A, Narayanan R, Sardana M, et al. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different *indica* rice genotypes [J]. Agron Research, 2006, 4(2): 563-575.

[12] Busch W, Benfey P N. Information processing without brains—the power of intercellular regulators in plants [J]. Development, 2010, 137: 1215-1226.

[13] Joyia F A, Khan M S. Reproducible and expedient rice regeneration system using *in vitro* grown plants [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11: 138-144.

[14] Abolade S, Oyeboji O, Odusanya O, et al. Regeneration of plants from rice caryopsis derived callus culture of Nigerian local cv. Suakoko 8 and a NERICA cv. FARO 55 [J]. African Journal of Plant Science, 2008, 2(9): 109-112.

[15] Geng P P, La H G, Wang H Q, et al. Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2008, 92: 303-313.

[16] Shahsavari E, Maheran A A, Hanafi M M, et al. The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(14): 2088-2094.