

几个光温敏核不育水稻品种组织培养特性的研究

周玲艳, 姜大刚, 吴 豪, 庄楚雄

(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 选用了两系杂交稻的母本光温敏核不育系 籼稻品种培矮 64S、粳稻品种农垦 58S 和 7001S 作为材料, 对其在组织培养中愈伤组织诱导和植株再生进行了比较研究. 结果表明, 不同水稻品种和不同外植体状态在愈伤组织诱导上有较大的差异. 对籼稻品种而言, 幼胚愈伤组织诱导率明显高于成熟胚; 而对粳稻品种而言, 幼胚与成熟胚愈伤组织诱导率没明显差异. 培养基种类对愈伤组织诱导影响不大, 但对愈伤组织状态有显著影响. 培矮 64S 使用 MB 培养基较好; 农垦 58S 和 7001S 使用 NB 培养基较佳. 籼稻品种植株再生率明显低于粳稻品种. 愈伤组织断代超过 3 个月, 再生频率下降.

关键词: 光温敏核不育水稻; 外植体; 再生

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)02-0045-03

虽然有关水稻组织培养和遗传转化研究的报道很多, 而且许多相关技术已逐步建立起来, 但研究中发现不同水稻品种间差异明显^[1,2], 所以对某些特异品种进行研究是必要的. 培矮 64S 和 7001S 是目前“两系法”杂交水稻育种中广泛采用的母本, 对其进行遗传改良和对它们所携带的光温敏核不育基因进行克隆和分析是目前的研究热点. 遗传改良和基因克隆最重要的基础之一是建立稳定的遗传转化, 而遗传转化成功的前提是建立完善而稳定的组织培养和再生体系^[3]. 本试验以两系杂交稻的母本光温敏核不育品种为材料, 探索适合不同水稻品种的组织培养和再生条件, 为其品质遗传改良和光温敏核不育基因克隆的遗传转化奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为光温敏核不育系 籼稻品种培矮 64S、粳稻品种农垦 58S 和 7001S, 分别以成熟种子和幼胚作为外植体.

1.2 方法

(1)培养基: 以水稻组织培养常用的 N₆ 培养基为基本培养基, 愈伤组织诱导继代分别为 N₆; N₆ 大量+N₆ 微量+N₆ 有机+30 g/L 蔗糖+500 mg/L 谷氨酰胺+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+2 mg/L 2, 4-D+3.0 g/L phytagel(pH 5.8); MB; MS 大

量+B₅ 微量+B₅ 有机+30 g/L 麦芽糖+500 mg/L 谷氨酰胺+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+2 mg/L 2, 4-D+3.0 g/L phytagel(pH 5.8); NB; N₆ 大量+B₅ 微量+B₅ 有机+30 g/L 蔗糖+500 mg/L 谷氨酰胺+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+2 mg/L 2, 4-D+3.0 g/L phytagel(pH 5.8). 再生培养基为 RM; MS 大量+MS 微量+MS 有机+3 g/L 蔗糖+300 mg/L 水解酪蛋白+3 mg/L BA+1 mg/L NAA+3.0 g/L phytagel(pH 5.8).

(2)愈伤组织诱导和继代: 选取饱满、无虫害的培矮 64S、农垦 58S 和 7001S 的成熟种子, 去壳后, 用 $\varphi=70\%$ 的乙醇消毒 1 min, 蒸馏水中冲洗 3 次, 然后用 15 g/L NaClO 浸泡 20 min, 蒸馏水冲洗多次, 取出放在带滤纸的培养皿上风干. 将成熟种子接种于不同诱导培养基上诱导愈伤组织, 26℃暗培养. 7 d 后, 将从成熟胚盾片处长出的愈伤组织分离, 并继代于愈伤组织诱导培养基上, 此后, 每 15 d 继代 1 次.

取授粉后 14 d 左右的幼果, 去壳取得幼胚, 用 $\varphi=70\%$ 的乙醇消毒 1 min, 蒸馏水中冲洗 3 次, 然后用 20 g/L NaClO 消毒 20 min, 重复 1 次, 蒸馏水冲洗多次, 剥取幼胚, 盾片向上接种于诱导培养基上, 26℃暗培养, 5 d 后, 将芽掐除, 并继代于诱导培养基上, 每 15 d 继代 1 次.

(3)植株再生: 选取生长一致, 新鲜、乳白色或淡黄色、颗粒状的胚性愈伤组织接入再生培养基上,

收稿日期: 2002-11-06

作者简介: 周玲艳(1972-), 女, 助教, 硕士, 现工作单位为仲恺农业技术学院农学系.

通讯作者: 庄楚雄(1964-), 男, 副研究员, 博士.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990696); 广东省自然科学基金团队项目(20003023)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

26 ℃, 2 000 lx, 光照培养 10 h/d. 比较不同水稻品种愈伤组织的再生率及继代次数对再生的影响.

2 结果

2.1 培养基对愈伤组织诱导和愈伤组织状态的影响

将水稻品种的成熟胚接种于几个不同的培养基上, 以研究培养基对水稻品种愈伤组织诱导和状态的影响, 结果见表 1. 对于试验所用的 3 个水稻品种来说, 愈伤组织诱导率受培养基影响不大, 而愈伤组织生长状态则与培养基种类密切相关. 结果表明籼稻品种培矮 64S 在 MB 培养基上, 愈伤组织生长状态最好; 而对农垦 58S 和 7001S 来说, 在 NB 培养基上, 愈伤组织分裂旺盛, 具疣状突起, 质地坚硬, 干爽而呈乳白色. 说明籼稻使用 MB 培养基较好, 粳稻使用 NB 培养基较好.

表 1 不同培养基对培矮 64S、农垦 58S 和 7001S 成熟胚愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effects of medium on calli induction from mature embryos of Pei' ai 64S, Nongken 58S and 7001S				
培养基 medium	水稻品种 rice variety	成熟胚数 no. of mature embryos	诱导率 rate of calli induction/ %	愈伤组织状态及颜色 status and color of calli
N ₆	培矮 64S	200	25	停止生长 白色
	农垦 58S	100	100	结构致密 湿润 淡黄色
	7001S	250	93	结构致密 湿润 淡黄色
NB	培矮 64S	200	26	生长缓慢 褐色
	农垦 58S	98	100	结构致密 干爽 乳白色
	7001S	242	96	结构致密 干爽 乳白色
MB	培矮 64S	200	30	生长旺盛 淡黄色

2.2 几个水稻品种及不同外植体愈伤组织诱导率

将不同水稻品种成熟种子和幼胚接入相应的诱导培养基上观察愈伤组织的诱导状况. 结果表明(表 2), 无论是成熟种子还是幼胚, 粳稻品种农垦 58S 和 7001S 愈伤组织诱导率和愈伤组织继代成功率较高, 均在 90% 以上, 而籼稻品种培矮 64S 愈伤组织诱导率相对较低, 成熟种子和幼胚愈伤组织诱导率分别为 30% 和 52%, 继代成功率分别为 19% 和 30%. 说明粳稻品种农垦 58S 和 7001S 愈伤组织诱导率高于籼稻品种培矮 64S. 从不同外植体看, 就粳稻品种农垦 58S 和 7001S 而言, 幼胚和成熟种子的愈伤组织诱导率没有明显差异, 而对于籼稻品种培矮 64S 而言, 幼胚愈伤组织诱导率明显高于成熟种子.

2.3 不同水稻品种再生能力的比较

成熟种子愈伤组织继代 1 次后, 选取直径为 3~

4 mm 左右的颗粒状胚性愈伤组织接入再生培养基观察愈伤组织的再生能力. 从表 3 可以看出, 粳稻品种农垦 58S 和 7001S 的愈伤组织再生率相差不大, 再生率均在 85% 左右. 对籼稻品种培矮 64S 来说, 接入再生培养基后, 部分愈伤组织褐化死亡, 不能分化成苗, 因此, 再生率相对较低, 大约为 62%.

表 2 不同水稻品种及不同外植体愈伤组织诱导率和继代成功率的比较

Tab. 2 The rate of calli induction and subcultural success of different rice varieties and explants				
水稻品种 rice varieties	外植体种类 kind of explants	接种外植体数 no. of explants	愈伤诱导率 rate of calli induction/ %	继代成功率 rate of subcultural success/ %
培矮 64S Pei' ai 64S	幼胚	147	52	30
	成熟胚	200	30	19
农垦 58S Nongken 58S	幼胚	102	90	90
	成熟胚	100	100	100
7001S	幼胚	57	97	97
	成熟胚	242	96	96

表 3 不同水稻品种再生能力的比较

Tab. 3 Comparison of regeneration capability of different rice varieties

水稻品种 rice varieties	愈伤组织块数 no. of calli	再生率 rate of regeneration/ %
培矮 64S Pei' ai 64S	32	62
农垦 58S Nongken 58S	35	86
7001S	29	83

2.4 愈伤组织继代次数对愈伤组织再生的影响

挑取粳稻品种 7001S 继代不同次数、生长一致的颗粒状愈伤组织接入再生培养基观察不同继代次数对再生的影响, 结果表明(表 4): 愈伤组织的继代次数对再生有明显的影 响, 愈伤组织随着继代次数的增多, 其再生能力逐步减弱.

表 4 继代次数对 7001S 愈伤组织再生的影响

Tab. 4 Effect of subculture times on callus regeneration of 7001S

继代培养代数 subculture times	愈伤组织块数 No. of calli	再生率 rate of regeneration/ %
1	34	85
4	31	65
6	32	25
8	29	10
12	30	0

3 讨论

成熟组织培养体系的建立是植物遗传转化的前提和关键因素之一。影响水稻愈伤组织诱导和生长状态以及再生能力的因素很多, 包括培养基种类、培养条件(温度和光照)、外植体类型和水稻基因型等^[4,5]。目前, 已有一系列培养基被用于水稻组织培养, 不同培养基适合于不同的水稻品种, MS 和 N₆ 培养基是水稻组织培养中最普遍的培养基, 很多研究者在水稻组织培养中以 N₆、MS 和 B₅ 培养基不同成分进行组合也取得较好的结果。本试验以 3 个光温敏核不育系水稻品种为材料, 探索了不同培养基对水稻愈伤组织诱导和状态的影响, 结果表明, 不同水稻品种对培养基组成有不同要求, 籼稻使用 MB 培养基获得较好的效果, 与前人结果一致^[1,4,5], 而粳稻品种以 NB 培养基较好。因此在对某一品种进行组织培养研究或遗传转化时, 应有针对性地选取合适的培养基。

越来越多的研究者认为愈伤组织的产生与水稻的基因型密切相关^[1,6]。总的趋势是粳稻品种诱导率高于籼稻品种。培矮 64S 是组织培养较为困难的籼稻品种之一, 组织培养的难度严重影响了其在遗传转化中的应用, 本试验使用幼胚作为外植体得到较高的愈伤组织诱导率, 因此, 在遗传转化时, 最好使用幼胚作为外植体。而组织培养特性好的粳稻品种农垦 58S 和 7001S 可以直接使用成熟种子来诱导愈伤组织, 建立组织培养体系。

愈伤组织的再生能力也与品种基因型相关^[1,6,7]。一般来说, 粳稻愈伤组织再生能力高于籼稻。同时, 愈伤组织再生能力还受其他多种因素的影

响, 如继代时间和次数, 培养基组成成分、光照条件等等, 杨跃生等^[8]认为培养基的辅加成分如 Cu²⁺ 能明显促进水稻愈伤组织植株再生能力。本试验研究发现, 继代时间过长及继代次数越多, 愈伤组织再生能力降低, 继代时间及继代次数与愈伤组织再生能力呈负相关。另外, 当愈伤组织较难再生时, 将愈伤组织接入附加有 5 mg/L ABA 的预再生培养基中培养 15 d 左右, 将有利于愈伤组织再生能力的改善。

参考文献:

[1] ABE T, FUTSUHARA Y. Genotypic variability of callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1986 (72): 3—10.
[2] 易自力, 曹守云, 王 力, 等. 提高农杆菌转化水稻频率的研究 [J]. 遗传学报, 2001, 28 (4): 352—358.
[3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 185—188.
[4] CRONGHAN T P, CHU Q R. Rice: Estallishment of callus cultures and the regeneration of plant [M]. New York: Springer-Verlag, Berlin Heideberg, 1991. 19—37.
[5] CHRISTOU P. Rice biotechnology and genetic engineering [M]. Lancaster: Technomic Publishing Co Inc, 1994. 41—49.
[6] 张 林. 水稻组织培养特性的遗传学研究 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2001, 21: 171—172.
[7] ZHANG L, HATTORIK K. Inheritance of high shoot regeneration ability from seed callus in a rice cultiva Joshu [J]. Breeding Sciences, 1998, 48(1): 41—44.
[8] YANG Y S, JIAN Y Y, ZHENG Y D. Copper enhance plant regeneration in callus culture of rice [J]. Chinese J Rice Sci, 1999, 13(2): 95—98.

Studies on Tissue Culture Characteristics of Several Photoperiod-Temperature Sensitive Genic Male Sterile Rice

ZHOU Ling-yan, JIANG Da-gang, WU Hao, ZHUANG Chu-xiong
(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The callus induction and plantlet regeneration of photoperiod-temperature sensitive genic male sterile rice Pei' ai 64S (*Indica* variety) and Nongken 58S, 7001S (*Japanica* varieties) were studied. The results showed that the rates of calli induction were greatly affected by the kind of explants from different rice varieties. As to *Indica*, the induction rate of immature embryos was higher than that of mature embryos; while in the case of *Japanica*, there's no obvious difference. Media had great effect on growth state of calli, MB was suitable for Pei' ai 64S, and NB for Nongken 58S and 7001S. The differentiation and regeneration of callus was also affected by the genotypes of explants and subculture times. *Japanica* variety was better than *Indica*, and the more subculture times, the lower regeneration rates.

Key words: photoperiod-temperature sensitive genic male sterile rice; explant; regeneration