

## 影响籼稻成熟胚愈伤组织植株再生频率的几个因素

高三基<sup>1</sup> 陈如凯<sup>1</sup> 马宏敏<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建福州 350002; <sup>2</sup> 福建省农业科学院稻麦研究所, 福建福州 350019)

**摘要** 以优良籼稻品种的成熟胚为材料, 探讨不同浓度 ABA、愈伤组织继代次数、培养时间以及干燥处理等因素对籼稻成熟胚愈伤组织再生能力的影响。结果表明: (1) 在分化培养基上添加 3.0 ~ 5.0 mg/L ABA 对促进胚性愈伤组织的形成及胚状体发生, 提高植株再生能力有显著作用。(2) 继代 3 次、培养 20 ~ 30 d 的成熟胚愈伤组织质量较好, 分化率较高水平。随着继代次数和培养时间的进一步增加, 分化率有明显下降的趋势。(3) 分化前对愈伤组织进行干燥处理有利于芽的分化。对于已分化出绿点而难于分化出芽的愈伤组织, 转移至壮苗培养基前, 经过适当干燥处理, 分化率明显提高。(4) 通过优化以上几个影响因素, 明恢 81、优 99、R527、N175、航 1 号等 5 个籼稻品种成熟胚愈伤组织的平均分化率可达 87.5% ~ 90.8%。

**关键词** 籼稻 (*Oryza sativa* L.); 成熟胚; 植株再生; 分化

**中图分类号**: S511.1; Q812

## Factors Influencing the Regeneration Frequency of Mature Embryo-derived Callus in Hsien Rice Cultivars (*Oryza sativa* L.)

GAO San-Ji<sup>1</sup>, CHEN Ru-Kai<sup>1</sup>, MA Hong-Min<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian; <sup>2</sup> Institute of Rice and Wheat, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, Fujian, China)

**Abstract** The effects of different ABA concentration, subculture passages, incubation time and partial desiccation of callus on plant regeneration capacity of mature embryo-derived callus in *hsien* rice cultivars were investigated. The results showed as follows. (1) The addition of 3.0 - 5.0 mg/L ABA in differentiation medium contributed to embryogenesis and organogenesis, then enhanced significantly the plant regeneration frequency. (2) Superior embryogenic callus after three subculture passages and 20 - 30 days incubation were with higher plant regeneration frequency. However, with the further increase of subculture passages and incubation time, plant regeneration frequency would be decreased step by step. (3) Embryogenic callus partially desiccated before transferring to differentiation medium benefited shoot differentiation, and the differentiation frequency of callus with green spot that could not regenerate into shoot would be increased when the callus had been desiccated properly before transferring to the 1/2 MS medium. (4) Plant regeneration frequency of the five *hsien* rice cultivars Minghui 81, You 99, R527, N175, and Hang No. 1 reached from 87.5% to 90.8% by optimizing the measures above.

**Key words** *Hsien* rice (*Oryza sativa* L.); Mature embryos; Plant regeneration; Differentiation

由于多数籼稻品种愈伤组织分化率很低, 又高度依赖于水稻基因型和外植体来源<sup>[1,2]</sup>, 所以转基因水稻育种的前提和基础是建立供试品种相应外植体高效稳定的组织培养再生体系。目前用于转基因的外植体主要有胚性悬浮细胞系、原生质体、成熟胚愈

伤组织、幼穗、幼胚及其愈伤组织。胚性悬浮细胞系和原生质体的培养时间长、操作困难、细胞无性系变异频率高; 幼穗和幼胚取材受季节限制, 在操作中易污染、工作量大; 成熟胚有来源不受生长季节限制、取材方便、外植体均匀、灭菌容易、重复性好等优点,

\* 基金项目: 福建农林大学青年教师科研基金(02B01)项目资助。

作者简介: 高三基(1973-), 男, 助理研究员, 在职博士生, 研究方向: 甘蔗遗传育种与植物基因工程。E-mail: gsanji@163.com

Received (收稿日期): 2003-07-25, Accepted (接受日期): 2003-12-02.

因此,现在越来越多研究者采用成熟胚愈伤组织作为遗传转化的受体。

水稻愈伤组织培养成功率的大小是对水稻离体组织进行遗传操作的关键。影响水稻愈伤组织培养成功率的因素很多,主要是品种的基因型、外植体来源和外界培养条件等因素。本研究拟从添加不同 ABA 浓度、愈伤组织继代次数、培养时间及部分干燥处理等方面探讨它们对籼稻成熟胚愈伤组织再生能力的影响,从而进一步优化实验条件,以期建立一套籼稻成熟胚高效绿苗再生体系,提高水稻外源基因遗传转化的效率,同时也为水稻成熟胚愈伤组织高频植株再生体系的研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

选用由福建省三明市农业科学研究所提供的明恢 81、明恢 86、优 99、R527 以及由福建省农业科学院稻麦研究所提供的 N175、航 1 号等 6 个优良水稻恢复系作为培养材料。

将成熟种子除去颖壳,在 70%乙醇中浸泡 1 min,然后在 20%次氯酸钠溶液(滴加数滴 Tween 20)中,磁力搅拌 30 min。经无菌水冲洗 3~5 次,用无菌滤纸吸干后,接种于诱导培养基上。每个品种接种 360~400 粒。

### 1.2 培养基

诱导、继代和分化培养基均以 NB(N<sub>6</sub> 培养基的大量元素,加 B<sub>5</sub> 培养基的微量元素和有机物)为基本培养基,添加 0.03% (W/V) 水解酪蛋白、0.05% (W/V) L-脯氨酸、0.025% (W/V) L-谷氨酰胺、0.75% (W/V) 琼脂粉以及 3% (W/V) 蔗糖。诱导和继代培养基另加 2 mg/L 2,4-D;分化培养基另加 3.5 mg/L KT、1.0 mg/L NAA 和 5.0 mg/L ABA。壮苗培养基为不含任何激素的 1/2 MS 培养基,添加 1 g/L 活性碳。

### 1.3 培养条件

将成熟胚置 25℃ 恒温培养箱暗培养 7~10 d 后计算诱导率。从种子胚盾片部位切下诱导出的愈伤组织接种于新鲜的继代培养基上暗培养,每隔 15~20 d 继代 1 次。每品种挑选 100~110 粒胚性愈伤组织,接种于分化培养基上,于 16 h/d, 80~100  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  光照条件下再生植株,培养温度为 28℃。培养 35 d 后统计分化率。愈伤组织分化率 = 出现绿苗的愈伤组织数/接种的愈伤组织数 × 100%。待幼苗在分化培养基上长到 2~3 cm 时,转

移到壮苗培养基上,培养 15~20 d 后进行移栽试验。

### 1.4 试验处理

1.4.1 ABA 浓度试验 设置 0、1.0、3.0、5.0、7.0 mg/L 浓度梯度。

1.4.2 继代次数试验 选用直接诱导出的愈伤组织(初始愈伤组织)及继代 1、3、5、7、9 次后的愈伤组织。

1.4.3 培养时间试验 选用培养 20、30、40、50、60 d 的愈伤组织。

1.4.4 部分干燥处理试验 将愈伤组织置铺有 3 层无菌滤纸的培养皿中,于光照或黑暗培养条件下分别干燥 2、4 d 后转移到分化培养基上。

有的愈伤组织分化 35 d 后,仅分化出绿点但难于分化出芽,将这部分带绿点的愈伤组织适当干燥(2 d),然后接种于壮苗培养基上,15 d 后统计分化率。

1.4.5 高效植株再生体系的验证试验 优化影响分化频率的几个因子,建立籼稻品种成熟胚愈伤组织模式化的高频植株再生体系流程。其操作程序如下:挑选继代 3 次、培养 20~30 d 的胚性愈伤组织 部分干燥 2~3 d (表面干缩,稍变白) 接种于分化培养基上(NB + 5.0 mg/L ABA + 3.5 mg/L KT + 1.0 mg/L NAA) 当分化苗长至 2~3 cm,转移至壮苗培养基(1/2 MS + 1 g/L 活性碳) 培养 15~20 d

移栽成活。按照这个实验程序验证该再生体系的有效性和稳定性。

1.4.6 统计分析 方差分析选用双因素无重复观测值统计分析模型,均值多重比较采用 Student-Newman-Keuls 检验法(*q* 检验法),所有统计分析应用 SAS 软件完成<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 不同 ABA 浓度对愈伤组织分化率的影响

实验表明,未加 ABA 激素的愈伤组织出现绿点最早,分化培养 7 d 左右,愈伤组织表面开始出现绿点,随着 ABA 激素浓度的提高,出现绿点的时间相应推迟。未加 ABA 的愈伤组织表面较为湿润、颜色深黄、愈伤组织增殖较快,分化率较低,部分绿点不能分化出苗。而在加有 ABA 的愈伤组织表面较为干燥、颜色鲜艳、增殖缓慢,分化率较高。

从图 1 看出,外加一定浓度的 ABA 对促进胚性愈伤组织的生长和胚状体发生、发育具有一定作用,从而提高成熟胚愈伤组织的分化率,特别是添加

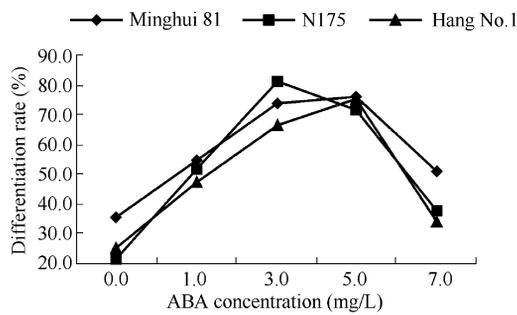


图1 不同 ABA 浓度对胚性愈伤组织分化率的影响

Fig. 1 Effect of different ABA concentrations on differentiation rate of embryogenic callus

3.0~5.0 mg/L ABA 浓度处理,比未加 ABA 处理提高 1.1~2.7 倍;但过高 ABA 浓度(>7.0 mg/L)反而会抑制愈伤组织的分化。方差分析结果表明,基因型间差异未达显著水平,而不同 ABA 浓度梯度间的差异却达极显著水平( $P < 0.01$ )。q 测验表明,在分化培养基上添加 3.0~5.0 mg/L ABA 明显提高胚性愈伤组织的分化能力(表 1)。

表 1 ABA 浓度对胚性愈伤组织分化率的影响

Table 1 Effect of ABA concentration on differentiation rate of embryogenic callus

ABA 浓度 ABA concentration (mg/L)	分化率 Differentiation rate (%)			均值 * Average (%)
	明恢 81 Minghui 81	N175	航 1 号 Hang No. 1	
0.0	35.8	21.8	25.5	27.7 d
1.0	54.6	52.0	47.3	51.3 b
3.0	74.0	80.9	66.4	73.8 a
5.0	75.8	71.8	75.5	74.4 a
7.0	51.0	38.0	33.6	40.9 c

注: \* 平均数间相同字母表示差异未达显著水平( $P > 0.05$ ),下同。

Notes: \* Means that the figures with the same letter are not significantly different. The same below.

## 2.2 不同继代次数对愈伤组织分化率的影响

方差分析表明,不同继代次数对愈伤组织分化率有极显著影响( $P < 0.01$ ),而基因型间差异不显著。从表 2 看出,初始愈伤组织分化率较低,约 34%;经过 3 次继代培养,愈伤组织分化率达最高值,约为 77%;随着继代次数进一步增加,分化率逐步降低。初始愈伤组织在分化过程中,愈伤组织不断增殖膨大,多数愈伤组织表面出现绿点,但部分绿点未能分化出芽,每块愈伤组织分化出的丛生芽较少,一般为 1~3 芽。

表 2 继代次数对胚性愈伤组织分化率的影响

Table 2 Effect of subculture passages on differentiation rate of embryogenic callus

继代次数 Subculture passage	分化率 Differentiation rate (%)			均值 Average (%)
	明恢 81 Minghui 81	N175	航 1 号 Hang No. 1	
0	35.5	34.5	30.9	33.6 c
1	53.6	43.6	32.7	43.3 b
3	74.5	78.2	77.3	76.7 a
5	73.6	76.4	75.5	75.2 a
7	68.2	70.9	62.7	67.3 a
9	49.1	51.8	39.1	46.7 b

本研究认为,籼稻成熟胚愈伤组织随着继代培养次数的增多,颗粒状胚性愈伤组织的形成量迅速增加。经过 3 次继代以后,愈伤组织已调节到较佳状态,此阶段的大部分愈伤组织为胚性愈伤组织,是用于遗传转化的理想受体材料。虽然继代 7 次后愈伤组织仍然保持相对较高水平的分化率,但随着继代次数的增加,水稻体细胞无性系的变异率加大,这对转基因植株后代筛选不利。

## 2.3 不同培养时间对愈伤组织分化率的影响

从表 3 可见,随着愈伤组织培养时间的延长,分化率呈降低的趋势。培养 20~30 d 的愈伤组织表面干燥,颜色淡黄,结构致密,颗粒状,分化率较高。随着培养时间的延长,愈伤组织开始变得暗淡、褐化、表面较黏,接种到分化培养基上后,部分愈伤组织变褐死亡。培养时间较长的愈伤组织分化出绿点也较迟,有的绿点不能分化成苗。

表 3 培养时间对胚性愈伤组织分化率的影响

Table 3 Effect of incubation time on differentiation rate of embryogenic callus

培养时间 Incubation time (d)	分化率 Differentiation rate (%)			均值 Average (%)
	明恢 81 Minghui 81	N175	航 1 号 Hang No. 1	
20	78.3	77.5	74.2	76.7 a
30	75.8	76.7	75.0	75.8 a
40	59.2	66.7	65.8	63.9 b
50	48.3	52.5	41.7	47.5 c
60	26.7	33.3	25.0	28.3 d

方差分析表明,基因型间的差异不显著,而不同培养时间处理间的差异则达极显著水平( $P < 0.01$ ),q 测验说明,培养 20~30 d 的愈伤组织分化率较高,与其他培养时间的愈伤组织分化率达显著差异。因此,用于遗传转化的成熟胚愈伤组织受体应选用培养 20~30 d 的较好。

## 2.4 愈伤组织部分干燥处理对分化率的影响

愈伤组织转入分化培养基前的脱水处理对不同

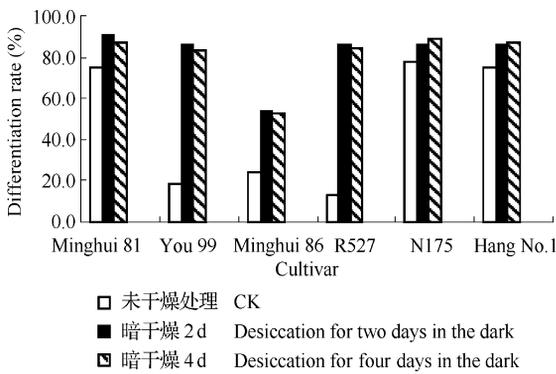


图2 愈伤组织干燥处理对分化率的影响

Fig. 2 Effect of desiccation of callus on differentiation rate

基因型成熟胚愈伤组织分化率的影响差异较大(图2)。愈伤组织脱水处理2、4 d 均能提高愈伤组织绿苗的分化频率,对难分化的品种R527、优99和明恢86效果更为明显,其分化率提高1.1~5.7倍;对未经过脱水处理就已有较高分化率的品种明恢81、N175、航1号,分化率提高10.7%~21.2%。光照或黑暗条件下愈伤组织脱水对促进愈伤组织分化的效果基本一致。经过脱水处理的愈伤组织比未脱水处理的愈伤组织较快分化出芽,长势较好,分化进度更为一致。

愈伤组织在分化过程中,部分分化出绿点,但不能分化出芽。将这部分有绿点的愈伤组织经过适当干燥处理后,移至壮苗培养基,约5~7 d就分化出芽,植株分化频率达69%~80%,比未经过脱水处理的愈伤组织植株再生频率提高21.8%~118.5%(表4)。绿点愈伤组织在培养过程中,脱水处理的愈伤组织分化出芽的时间比对照早,生长速度也较快。部分绿点愈伤组织仅分化出根,不久愈伤组织变褐,死亡。

表4 绿点愈伤组织干燥处理对分化率的影响

Table 4 Effect of desiccation of callus with green spot on differentiation rate

处理 Treatment	分化率 Differentiation rate (%)		
	优99 You 99	明恢86 Minghui 86	R527
未干燥处理 CK	65.7 ±15.1 *	31.4 ±15.7	48.6 ±10.7
干燥处理 Desiccation	80.0 ±16.3	68.6 ±10.7	77.1 ±13.8

注: \*均值 ±标准差。Note: \* Mean ±SE (standard error).

### 2.5 高频植株再生体系的验证

基因型是决定高效绿苗再生体系的内在因素,挑选生理状况良好的胚性愈伤组织、分化培养基中

添加一定浓度的ABA、分化前将愈伤组织适当干燥处理均为影响高效绿苗再生体系的重要外界因素。将这些因素综合考虑,优化实验条件,愈伤组织的分化率会大幅提高。本研究建立了明恢81、优99、R527、N175、航1号等5个籼稻品种成熟胚愈伤组织高频植株再生体系,这些品种平均诱导率、分化率和移栽成活率分别达90%、85%、95%以上(表5)。该实验已形成模式化操作程序,重复性很好,为这5个品种的外源基因遗传转化提供了良好的植株再生体系。本实验室正沿用此套植株再生体系技术开展水稻遗传转化研究。

表5 高效愈伤组织诱导率和植株再生频率

Table 5 High frequency of callus induction and plant regeneration

品种 Cultivar	诱导率 Induction rate (%)	分化率 Differentiation rate (%)	成活率 Survival rate (%)
明恢81 Minghui 81	96.7 ±4.08 *	90.8 ±9.00	97.8
优99 You 99	94.0 ±5.16	89.2 ±7.93	100.0
R527	93.3 ±5.56	88.5 ±10.3	95.8
N175	91.7 ±6.45	88.3 ±9.37	96.7
航1号 Hang No.1	92.7 ±5.63	87.5 ±8.66	96.4

注: \*均值 ±标准差。Note: \* Mean ±SE (standard error).

### 3 讨论

加入适当浓度的ABA,可促进胚性愈伤组织的形成及胚状体发生,还能促进正常胚发育,抑制胚的提早萌发及不正常胚结构的出现,提高植株再生率<sup>[4-7]</sup>。本试验表明,在分化培养基中添加适量的ABA能够提高愈伤组织的分化率,这与绝大多数学者研究结果一致<sup>[4,6,7]</sup>。有的学者认为,在诱导或继代培养基中加入低浓度的ABA对水稻胚性愈伤组织的诱导及愈伤组织胚性结构的保持有一定促进作用<sup>[5,7]</sup>。

关于继代次数对植株再生能力的影响,许多学者研究结果有一定差异。本研究结果认为,从籼稻成熟种胚诱导出的初始愈伤组织,经过3次继代培养后,愈伤组织具有较强的分化能力,随着继代次数的进一步增加,分化能力有下降趋势。这与刘传光等(2002)<sup>[8]</sup>研究结果基本一致。但是,凌定厚和吉田昌一(1987)<sup>[5]</sup>、马炳田等(2002)<sup>[9]</sup>研究报道认为,籼稻成熟胚愈伤组织继代一次分化率最高,随着继代培养时间的延长分化率降低。这种差异可能由于基因型不同所致,或者由于愈伤组织的培养条件不

同,导致非胚性愈伤组织向胚性愈伤组织转化所需继代培养时间不同。我们研究发现,愈伤组织继代3次后,颗粒状、质地坚硬的胚性愈伤组织形成量迅速增多,而初始愈伤组织和继代1~2代的愈伤组织成团,分散的颗粒状胚性愈伤组织较少。随着继代次数的增加,愈伤组织分化率随之降低。这可能因为在继代培养过程中,愈伤组织的生活力下降,具有体细胞胚发生能力的细胞比例减少,导致愈伤组织分化率的减低<sup>[9]</sup>;或者由于培养时间延长会使愈伤组织在细胞分裂进程中发生染色体变异的可能性增大,形态发生潜力减弱甚至丧失<sup>[10]</sup>;或者因为随着愈伤组织继代次数的增加,二胺(PUT)积累和较高的二胺与亚精胺(PUT/SPD)比率使细胞老化,未成熟胚向成熟胚的转变受阻<sup>[11]</sup>。

本研究结果表明,对愈伤组织的干燥处理能够明显提高愈伤组织分化能力。这与前人研究结果一致<sup>[9, 12~15]</sup>。干燥脱水程度掌握在愈伤组织脱水50%左右,此时愈伤组织表面干缩,稍微变白。愈伤组织干燥处理促进愈伤组织芽的分化,其作用机理目前尚未清楚,有待进一步研究。

## References

- [1] Abe T, Futsuhara Y. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1986, **72**:3 - 10
- [2] Mikami T, Kinoshita T. Genotype effects on the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1988, **12**:311 - 314
- [3] Hong N(洪楠), Hou J(侯军). Lectures of statistic analysis software of SAS for Windows (SAS for Windows 统计分析系统教程). Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2001. 87 - 106 (in Chinese)
- [4] Inoue M, Maeda E. Stimulation of shoot bud and plantlet formation in rice callus cultures by two-step culture method using abscisic acid and kinetin. *Japan J Crop Sci*, 1981, **50**:318 - 322
- [5] Ling D-H(凌定厚), Yosida S(吉田昌一). The study of some factors affecting somatic embryogenesis in lines of rice. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1987, **29**:1 - 8
- [6] Higuchi N, Maeda E. Enhanced plant regeneration in rice callus cultures following abscisic acid treatment. *Japan J Crop Sci*, 1990, **59**:359 - 368
- [7] Mei C-S(梅传生), Tang R-S(汤日圣), Zhang J-Y(张金渝), Wu GN(吴光南). Abscisic acid regulation on the rate of plantlet regeneration from rice calli *in vitro*. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1994, **2**(1):96 - 99
- [8] Liu C-G(刘传光), Lin Q-S(林青山), Chen Z-G(陈占宽), Jiang YJ(江弈君), Gao Y(高云), Bai S(白嵩). Establishment of high frequently regenerating system of genetic transformation in *indica* rice. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), 2002, (4):2 - 4 (in Chinese)
- [9] Ma B-T(马炳田), Li P(李平), Zhou K-D(周开达). Study on culture ability of calli of elite *indica* rice lines. *Journal of Sichuan Agricultural University* (四川农业大学学报), 2002, **20**(3):200 - 204
- [10] Li W-A(李文安). Plant cell regeneration and plantlet from tissue culture. In: Yu S-W ed. *Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学). Beijing: Science Press, 1992. 37 - 52 (in Chinese)
- [11] Bajaj S, Rajam M V. Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. *Plant Cell Rep*, 1995, **14**:717 - 720
- [12] Zhao C-Z(赵成章), Wu L-B(吴连斌), Yang C-D(杨长登), Qi X-F(戚秀芳). Effect of desiccation treatment on the regeneration of rice callus and several physiological and biochemical characters. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1997, **23**(1):39 - 43
- [13] Tian W-Z(田文忠), Rance I, Sivamani E, Fauquet C, Beachy R N. Improvement of plant regeneration frequency *in vitro* in *indica* rice. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1994, **21**(3):215 - 221
- [14] Jain R K, Jain S, Wu R. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic *indica* rice varieties. *Plant Cell Rep*, 1996, **15**:449 - 454
- [15] Rance I M, Tian W, Matthews H, de Kochko A, Beachy R, Fauquet C. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of *indica* rice. *Plant Cell Rep*, 1994, **13**:647 - 651