

提高籼稻愈伤组织再生频率的研究^①

田文忠

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

Iann Rance, Elunialai Sivamani, Claude Fauquet, Roger N. Beachy

(美国 Scripps 研究所国际热带农业生物技术实验室 La Jolla CA92037)

摘要 为了提高籼稻愈伤组织的植株再生频率,研究了影响再生的各种因素,如:在诱导培养基或继代培养基中加细胞分裂素和萘乙酸(KT、BAP、玉米素或 Zip 1毫克/升),或加 Thidiazuron (0.5毫克/升),以及愈伤组织的部分干燥处理等。这些措施明显地提高籼稻愈伤组织的再生频率。结合使用这些处理可使 TN1、IR72 和 IR64 的愈伤组织再生植株频率较对照提高 5—14 倍。

关键词 籼稻,组织培养,再生植株

水稻 (*Oryza Sativa* L.) 是最重要的粮食作物之一,特别是许多发展中国家的人民都依赖于这一重要作物而生存。所以,改良水稻品种是当务之急。

人们把这个任务寄托在单个细胞、组织和器官水平的遗传操作上,希望从而可以缩短抗病、抗虫、改良品质和耐性等育种所需的时间。因此,开展外源有益基因转入水稻细胞,以及水稻愈伤组织再生植株的有效方法将是改良水稻品种最基本的研究。

籼稻和粳稻是生长在世界上不同地区的两个主要亚种。用基因枪等方法使粳稻的幼胚和愈伤组织进行转化,已成功地获得了再生植株^[1]。但是,应用同样的方法,籼稻只能得到很低的再生能力。由于籼稻品种是热带地区主要粮食来源,因而提高籼稻组织培养植株再生频率就成了当前生物技术中的重要课题。所以,我们研究了影响籼稻植株再生的各种因素。这些因素包括:在诱导培养基或继代培养基中使用不同的激素配比或附加 Thidiazuron (简称 TDZ),以及愈伤组织的部分干燥处理等。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试籼稻品种为 TN1、IR72 和 IR64。这 3 个品种的种子是由国际水稻研究所提供。

成熟的或未成熟的种子胚用来作为外植体诱导愈伤组织。种子去掉颖壳后用 70% 酒精表面消毒 1 分钟,再用 25% 漂白剂消毒 45 分钟,同时搅拌,用无菌水洗 4—5 次,然后根据实验要求放在各种不同的诱导培养基上。

1.2 培养基

1.2.1 诱导培养基和继代培养基 基本培养基是 NB 培养基^[2],即 N₆ 培养基^[2]的大

① 本文于 1993 年 12 月 2 日收到



Fonds Documentaire IRD

Cote: B*22909 Ex: ungo

量元素,加 B₅ 培养基^[11]的微量元素和有机附加物,另外辅加酶解酪蛋白 300 毫克/升,脯氨酸 500 毫克/升,2,4-D 2 毫克/升, pH5.8, 琼脂糖 4 克/升。

在诱导培养基和继代培养基中,我们曾试验过加不同浓度的激素配比,例如 2, 4-D 1-2 毫克/升, NAA 1-3 毫克/升, KT 或 BAP, 玉米素 (Zeatin), 2ip, TDZ 各 0.5-1 毫克/升。

1.2.2 分化培养基 基本培养基是 NB 培养基,加 BAP 3 毫克/升, NAA 0.05-0.5 毫克/升, pH5.8-6.0, Phytigel 2.5 克/升。我们曾试验过用 KT、玉米素、2ip 和 TDZ 代替 BAP 促进芽的分化。

1.2.3 植株生长培养基 $\frac{1}{2}$ MS 培养基^[20]的无机盐, B₅ 培养基^[11]的有机附加物, NAA 0.05 毫克/升, pH5.8, Phytigel 2.5 克/升。

1.3 培养条件及处理

1.3.1 接种材料在 26°C 下暗培养 2-3 周后,转移到分化培养基,或相同条件的继代培养基上增殖。愈伤组织在分化培养基上,在日光灯下诱导出小绿芽和根,再把它们转移到无激素培养基或只有 0.05 毫克/升 NAA 培养基上,使之长成小植株。

1.3.2 部分干燥处理 愈伤组织在转到分化培养基之前,被放在有 1-2 层滤纸的培养皿中,保持 2-6 天(根据愈伤组织大小),使愈伤组织失水大约 50% 左右,然后再转移到分化培养基上。

有些愈伤组织在分化培养基上长时间不分化或小绿芽不长大,也可经部分干燥处理,然后转移到 $\frac{1}{2}$ MS 无激素培养基上使其分化。

1.3.3 光学显微镜观察 将在不同激素配比的诱导培养基上生长的愈伤组织在 Histo-Choice 组织固定液中固定,样品经脱水、包埋、切片,用 Periodic acid-Schiff (PAS) 试剂染色^[7],然后在光学显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 在诱导培养基和继代培养基中不同激素对比对再生的影响

将仅有 2,4-D 2 毫克/升的 NB 培养基上生长的愈伤组织转移到再生培养基后,仅能得到约有 10% 以下的再生频率。但在诱导培养基和继代培养基中加上 NAA 和 KT 可以提高水稻的再生频率。这个实验以 TN1 为材料重复了 6 次,1 次是用幼胚,2 次是用成熟种子胚,3 次是继代培养的愈伤组织。6 次的结果是一致的(表 1)。用 IR72 和 IR64 也得到同样的结果。

在诱导培养基和继代培养基中加 NAA 和 KT 可以改进愈伤组织质量。从外形上看,这些愈伤组织比较致密、较硬,呈颗粒状结构较多,易于分化(图版 I, 1)。而在只有 2,4-D 2 毫克/升培养基上生长的愈伤组织比较松软,有的粘液化,有的水泡泡的,一般不易于分化(图版 I, 2)。

从组织切片可以看到在只有 2,4-D 的培养基上生长的愈伤组织有很多老化的、空的细胞,细胞质较稀薄,细胞核较小,液泡比较大(图版 I, 3)。而在加 NAA 和 KT 培养基上生长的愈伤组织细胞质较浓厚,细胞核较大,生长较旺盛,有时可以看到正在有丝分裂

表1 诱导培养基中加 KT 和 NAA 对 TN1 再生频率的影响
Table 1 Effect of supplement with KT and NAA in induction Medium on regeneration frequency in TN1

试验序 Experiment	培养基 Medium	愈伤组织来源 Resource of callus	试验愈伤组织数 No. of Tested callus	再生植株数 No. of regenerated Plant	再生植株频率(%) Regeneration frequency(%)
I	NB NBK	未成熟种子 Immature seed	11	0	0.0
			10	1	10.0
II	NB NBK	成熟种子 Mature seed	30	0	0.0
			21	8	38.1
III	NB NBK	成熟种子 Mature seed	54	0	0.0
			52	7	13.46
IV	NB NBK	继代培养 Subculture	89	0	0.0
			91	11	12.09
V	NB NBK	继代培养 Subculture	59	0	0.0
			65	6	9.23
VI	NB NBK	继代培养 Subculture	66	1	1.05
			69	18	26.09

注: 诱导培养基: NB: NB + 2, 4-D 2mg/L; NBK: NB + 2,4-D 2mg/L + KT 1mg/L + NAA 1mg/L
分化培养基: NB + BAP 3mg/L + NAA 0.5mg/L

Note: Induction medium: NB: NB + 2, 4-D 2mg/L; NBK: NB + 2, 4-D 2mg/L + KT 1mg/L + NAA 1mg/L

Regeneration medium: NB + BAP 3mg/L + NAA 0.5mg/L

的细胞(图版 I, 4)。可见, 在诱导培养基和继代培养基中附加 NAA 和 KT 可以改进愈伤组织质量, 从而提高再生频率。

随后, 我们还试验过在诱导培养基或继代培养基中加 BAP、Zeatin、2ip 和 TDZ, 都可以使 TN1、IR72 和 IR64 的植株再生频率得到不同程度的提高。以 IR64 为例, 以只加 2, 4-D 2 毫克/升培养基为对照, 比较了补加 5 种不同激素配比的培养基上所生长的愈伤组织, 转移到相同的分化培养基 (NB + BAP 3 毫克/升 + NAA 0.5 毫克/升) 后的再生频率。结果是在 NB + 2, 4-D 2 毫克/升 + NAA 1 毫克/升 + TDZ 1 毫克/升的培养基上, 生长的愈伤组织植株再生频率高达 44.64%, 是 6 种培养基中最高的, 其它加 4 种不同激素配比的培养基都比对照的再生频率高(图 1)。

TDZ 是一种苯脲代替物, 它表现强的细胞分裂素活性。TDZ 能诱导细胞分裂素的自发性, 积累乙烯产物, 在豆科^[5,16]、花生^[21]、悬钩子^[9]、天竺葵^[12]、和白蜡^[3]等组织培养中已表明。TDZ 可诱导芽的形成。在我们的实验中表明, 籼稻愈伤组织在含有 TDZ 0.5 毫克/升的培养基上, 生长一周后就分化出许多小芽和根(图版 I, 5), 被转移到无激素培养基上后很快长成小植株(图版 I, 6)。

TDZ 的进一步试验表明, 在培养基中单独使用 TDZ 比与 2, 4-D, 或 2, 4-D 和 NAA 结合使用对于籼稻的植株再生更为有利(表 2)。

David 等^[6]报道, 从未成熟胚诱导的水稻愈伤组织在 N₆ 培养基上随着 2, 4-D 浓度的提高, 植株发育被抑制。看来, 生长素和细胞分裂素必须有一定的比例, 否则会抑制胚胎的萌发。我们的实验结果也证实了这一点, 有时甚至需要提供多种细胞分裂素, 才能得

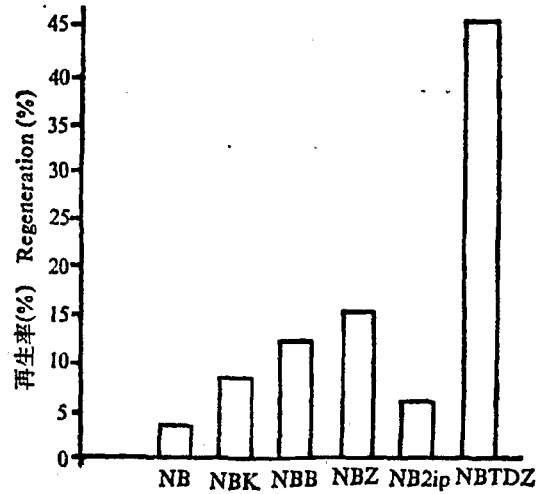


图1 诱导培养基不同激素配比对 IR64 再生频率的影响

Fig. 1 Effect of different hormone combination in induction medium on regeneration frequency in IR64

注: 诱导培养基 (Induction medium):

NB: NB + 2, 4-D 2mg/L

NBK: NB + 2, 4-D 2 mg/L + KT 1mg/L + NAA 1mg/L

NBB: NB + 2, 4-D 2mg/L + BAP 1mg/L + NAA 1mg/L

NBZ: NB + 2, 4-D 2mg/L + Zeatin 1mg/L + NAA 1mg/L

NB2: P: NB + 2, 4-D 2mg/L + 2ip 1mg/L + NAA 1mg/L

NBDTZ: NB + 2, 4-D 2mg/L + TDZ 1mg/L + NAA 1mg/L

分化培养基 (Regeneration medium):

NB + BAP 3mg/L + NAA 0.5mg/L

表2 诱导培养基中加 TDZ 的作用

Table 2 Function of TDZ in induction medium

品种 Variety	培养基 Medium	试验愈伤组织数 No. of rested callus	再生植株数 No. of regenerated plant	植株再生频率% Regeneration frequency %
TN1	1	41	2	5.13
	2	92	22	25.05
	3	75	30	39.61
	4	55	25	45.37
IR64	1	60	2	3.33
	2	64	10	15.63
	3	50	7	14.00
	4	56	12	21.43

注: 诱导培养基 (Induction medium):

1. NB + 2, 4-D 2mg/L

2. NB + 2, 4-D 2mg/L + TDZ 0.5mg/L

3. NB + 2, 4-D 2mg/L + TDZ 0.5mg/L + NAA 1mg/L

4. NB + TDZ 0.5mg/L

到更好的效果。如: TN1 在 2,4-D 2 毫克/升 + BAP 1 毫克/升 + KT 1 毫克/升 + NAA 1 毫克/升的培养基上生长的愈伤组织,被转移到分化培养基上,可得到 93.7%的再

表 3 部分干燥处理对再生的影响

Table 3 Effect of partial desiccation on regeneration

品 种 Variety	处 理 Treatment	试验愈伤组织数 No. of tested callus	再生植株数 No. of regenerated plant	植株再生频率% Regeneration frequency
TN1	未干燥处理 (CK)	520	165	31.7±15.1
	干燥处理 (Desiccation)	903	609	67.4±11.23
IR72	未干燥处理 (CK)	279	43	15.5±17.9
	干燥处理 (Desiccation)	316	193	61.1±17.2
IR64	未干燥处理 (CK)	235	44	18.7±2.9
	干燥处理 (Desiccation)	213	157	73.7±6.7

注: 诱导培养基 (Induction medium): 包括 NB、NBK 和 NBB 三种 (included NB, NBK and NBB)
分化培养基 (Regeneration medium): NB + BAP 3mg/L + NAA 0.5mg/L

生频率。

细胞分裂素同时可以促进叶绿素合成和叶绿体形成^[10]。有时我们可以得到 100% 绿色愈伤组织,但是只有很少植株形成。所以,只形成绿色愈伤组织不等于分化,或者只是分化的第一步,要使胚胎萌发,还须转入无激素培养基或经部分干燥处理等方法。

2.2 部分干燥处理对再生能力的影响

愈伤组织在转到分化培养基之前,经脱水 50% 左右的干燥处理,可以明显提高植株再生频率。我们用 TN1 重复了 8 次,用 IR72 重复了 4 次,用 IR64 重复了两次。其结果: TN1 的再生频率提高一倍多,IR72 和 IR64 的再生频率提高 3 倍(表 3)。

有些小绿芽点在分化培养基上或 $\frac{1}{2}$ MS 培养基上长时间不萌发,将它们进行部分干燥处理后,约有 70% 左右绿芽点可以长成植株。

干燥处理在葡萄^[13]、大豆^[14]、小麦^[6]、云杉^[22]和木薯^[15]上曾报道过,可以提高体细胞胚的发育。最近, Masayoshi 和 Takayasu^[17] 报道了用简单的脱水处理法促进粳稻愈伤组织的植株再生。目前,我们将此法用于籼稻同样得到有效的结果。曾报道过在较高的渗透压下植株表现较高的脱落酸 (ABA) 生物合成活性^[19,23,24], ABA 和甘露醇促进小麦的体细胞胚胎建成^[4]。然而, Masayoshi 和 Takayasu^[17] 在分化培养基实验中,在一定的浓度范围内没有观察到 ABA 和甘露醇对分化频率有明显的影响,而干燥处理的作用却是明显的。在我们的实验中也得到相似的结果。通过干燥处理不仅在一定时期内造成了水分含量降低,同时也造成了细胞的饥饿,引起了细胞生理、生化上的变化,而这些变化可能正是植株有效的再生所需要的。

2.4 在分化培养基中加不同细胞分裂素对植株分化的影响

我们用 TN1、IR72 和 IR64 3 个籼稻品种,比较了在分化培养基中加不同细胞分裂素,如: KT、BAP、2ip、玉米素,以及 TDZ 对分化的影响。此试验重复了 4 次,每次结果不尽一致。3 个品种之间也没有一定的规律。所以,我们认为,在诱导培养基或继代培养基中已加入细胞分裂素和 NAA 后,分化培养基的作用就不明显了。甚至有时只须将愈

伤组织转入 $\frac{1}{2}$ MS 无激素培养基上就可以长成植株。如果培养基中细胞分裂素浓度过高,反而会使愈伤组织变褐死亡。例如 TN1 生长在 NB + TDZ0.5 毫克/升培养基上的愈伤组织,转到 $\frac{1}{2}$ MS 无激素培养基上后 80% 可以再生成苗,而转到含有 BAP 3 毫克/升和 NAA0.5 毫克/升的分化培养基上的只有 17.8% 再生成苗。所以,只有在细胞内细胞分裂素浓度不够时,才需在分化培养基中补充一下。

3 结论

通过结合使用上述这些方法,即在诱导培养基和继代培养基中附加细胞分裂素和萘乙酸,或只加 TDZ,以改良愈伤组织质量,同时,在将愈伤组织转到分化培养基之前使用部分干燥处理方法,可使 TN1、IR72 和 IR64 的最高再生频率分别达到 93.7%、74.4% 和 79.1%,比对照分别提高 5—14 倍。同时,我们也注意到不同基因型对培养基和所需培养条件之间的差异。因此认为,对于不同品种还需进一步实验,以寻找最佳培养基和最佳处理条件。

致谢 感谢洛氏基金会和法国公共研究组织对本项工作的资助。田文忠是接受洛氏基金会资助的访问学者在美国 Scripps 研究所进行本研究工作。感谢国际水稻研究所提供的籼稻种子;感谢渠荣达博士、Helena M. 博士和 Christian S. 博士对本工作的支持和帮助。

参 考 文 献

- 1 吴传银,陈英,1987. 遗传学报,14(3): 168—174
- 2 朱至清等,1976. 中国科学,(5): 484—490
- 3 Bates S *et al*, 1992. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (31): 21—29
- 4 Brown C *et al*, 1989. *Plant Physiol.*, (133): 727—733
- 5 Capelle SC *et al*, 1983. *Plant Physiol.*, (73): 796—802
- 6 Carman J G, 1988. *Plant.*, (175): 417—424
- 7 Clark G, 1981. In: *Staining Procedures*, (Fourth Edition), Williams & Wilkins, 323—324
- 8 David S K *et al*, 1989. *Plant Physiol.*, (135): 184—190
- 9 Fiola J *et al*, 1990. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (20): 223—228
- 10 Frank B S and CWR, 1992. *Plant Physiology* (Fourth Edition), Wadsworth, Inc., 391
- 11 Gamborg O *et al*, 1968. *J. Exp. Res.*, (50): 151—158
- 12 Gill R *et al*, 1993. *Can. J. Bot.*, (71): 408—413
- 13 Gray D, 1987. *Hort Science*, (22): 810—814
- 14 Hammatt N & D M, 1987. *J. Plant Physiol.*, (128): 219—226
- 15 Li L C *et al*, 1993. *Plant Cell Reports*, (12): 250—255
- 16 Malik K & SPK, 1992. *Can. J. Bot.*, (69): 1188—1193
- 17 Masayoshi T & TH, 1992. *Plant Cell Reports*, (11): 550—553
- 18 Mathews H, *et al*, 1993. *Plant Cell Reports*, (12): 328—333
- 19 Milborrow B, 1974. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, (25): 259—307.
- 20 Murashige T & Skoog F, 1962. *Physiol. Plant*, (15): 473—497
- 21 Ozias-Akins P, 1989. *Plant Cell Reports*, (8): 217—218
- 22 Roberts D *et al*, 1991. *J. Plant Physiol.*, (138): 1—6
- 23 Wright S & Hiron R, 1970. In: *Plant Growth Substance*, Carr DJ (ed), Springer, Berlin Heidelberg New York, 291—298
- 24 Zeevaart J A D, 1980. *Plant Physiol.*, (66): 672—678

Improvement Of Plant Regeneration Frequency *in vitro* In Indica Rice^①

Tian Wenzhong

(*Institute of Genetics Academia Sinica Beijing 100101*)

Iann Rance, Elunialai Sivamani, Claude Fauquet, Roger N. Beachy

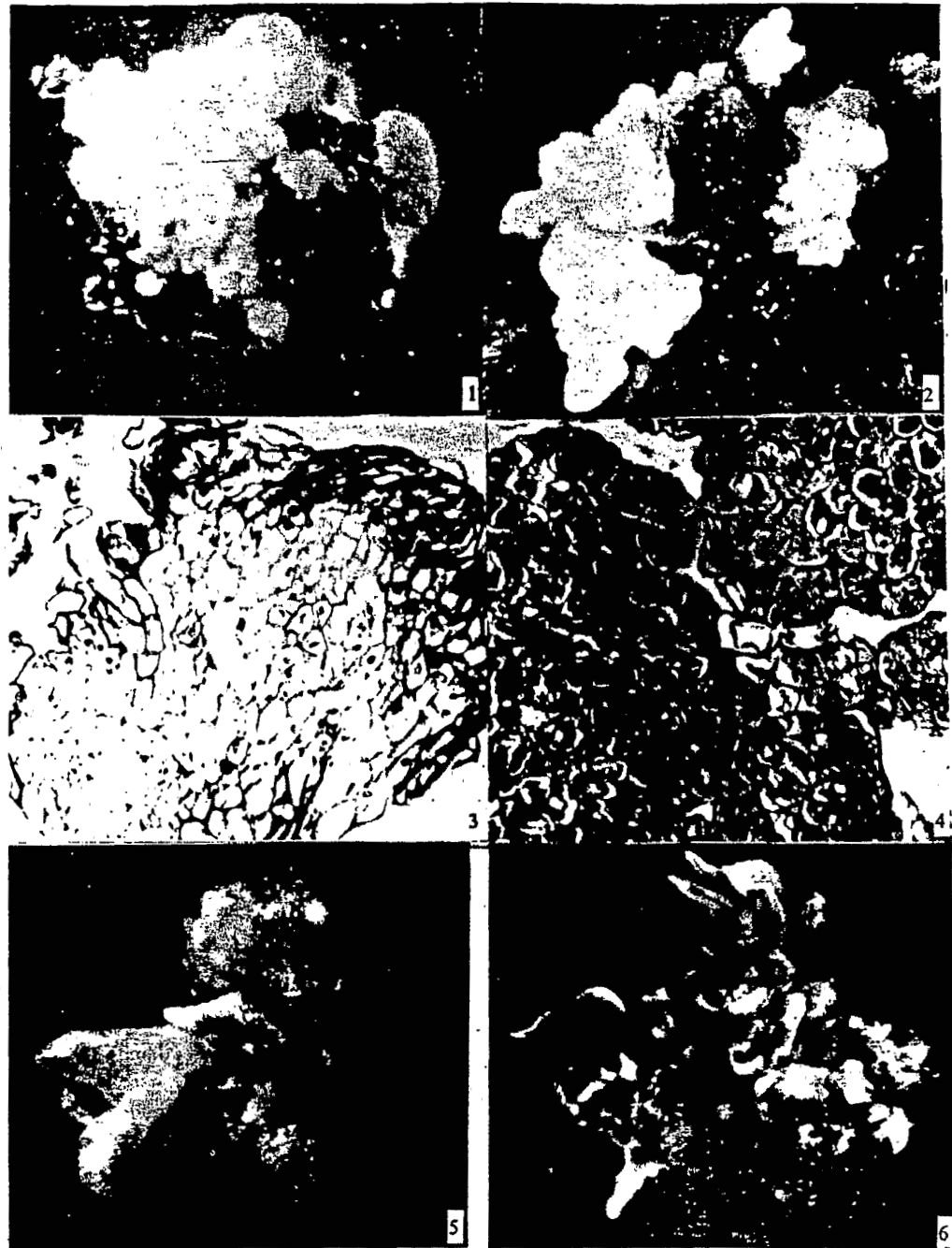
(*International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology The Scripps
Research Institute La Jolla CA 92037 USA*)

Abstract

In order to improve the frequency of plant regeneration from calli in indica rice, the influences of different factors on plant regeneration were investigated. Supplement with cytokinins (KT, BAP, Zeatin or Zip, 1 mg/l) and NAA (1 mg/l), or supplement with thidiazuron (TDZ, 0.5 mg/l) in the induction medium or subculture medium; and partial desiccation of callus before transfer to regeneration medium have been found significantly increase the frequency of plant regeneration in indica rice. 5—14 folds more plants were obtained than untreated control by the combination of these treatments with indica varieties TN1, IR72 and IR64.

Key words Indica rice, Tissue culture, Regeneration plant

① Received December 2, 1993



1. 生长在 NB 培养基(+2,4-D 2 毫克/升)上的 TN1 愈伤组织,质地松软; 2. 生长在 NBK 培养基(+2,4-D 2 毫克/升+NAA 1 毫克/升+KT 1 毫克/升)上的 TN1 愈伤组织,质地致密; 3. 生长在 NB 培养基上的 TN1 愈伤组织切片,空的、老的细胞较多(10×40); 4. 生长在 NBK 培养基上的 TN1 愈伤组织切片,细胞质较浓厚,核较大,生长较旺盛(10×40); 5. 生长在 NB + TDZ 0.5 毫克/升培养基上一周后的 TN1 愈伤组织分化出小芽; 6. 生长在 NB + TDZ 0.5mg/L 培养基上的 TN1 愈伤组织转入 1/2 MS 培养基上后长出芽和根

1. The callus grown on NB medium (+2, 4-D 2mg/L), showing more soft callus; 2. The callus grown on NBK medium(+2, 4-D 2mg/L + KT 1mg/L + NAA 1mg/L), showing more embryogenic, granular, and compact structure; 3. Light micrograph of the callus grown on NB medium, showing many old empty cells (10 × 40); 4. Light micrograph of the callus on NBK medium, showing many vigorous cells (10 × 40); 5. The callus grown on NB medium contained TDZ 0.5 mg/L after one week differentiated small shoot; 6. The callus grown on NB medium contained TDZ 0.5mg/L after one week transferred to 1/2 MS cytokinin-free medium was grown up plantlet