

优质稻金稻919成熟胚再生体系的建立

李军玲*, 张红磊*, 李晓莹, 刘静妍, 闫双勇, 王晓静, 孙 玥, 王胜军, 苏京平#

天津市农业科学院农作物研究所, 天津市农作物遗传育种重点实验室, 天津

收稿日期: 2022年6月25日; 录用日期: 2022年7月19日; 发布日期: 2022年7月27日

摘 要

以优质食味水稻品种金稻919成熟胚为外植体, 设计4种激素配比诱导培养基和6种激素配比分化培养基, 筛选最佳方案建立金稻919成熟胚再生体系。实验结果表明, Y2激素组合(4 mg/L 2,4-D)的诱导愈伤组织效果最佳, 诱导率为77.3%; F5激素组合(4 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA)的分化成苗效果最佳, 分化率为85.0%, 成苗率为68.3%。本研究建立了金稻919成熟胚高效转基因再生体系, 为利用基因工程技术定向改良奠定基础。

关键词

金稻919, 成熟胚, 愈伤组织, 再生体系

Establishment of Mature Embryo Regeneration System of Good Quality Rice Variety Jindao919

Junling Li*, Honglei Zhang*, Xiaoying Li, Jingyan Liu, Shuangyong Yan, Xiaojing Wang,
Yue Sun, Shengjun Wang, Jingping Su#

Tianjin Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Tianjin Academy of Agricultural Sciences Crop Research
Institute, Tianjin

Received: Jun. 25th, 2022; accepted: Jul. 19th, 2022; published: Jul. 27th, 2022

Abstract

The author used the mature embryo of good quality rice variety Jindao919 as explants, and estab-

*共同第一作者。

#通讯作者。

lished the regeneration system of Jindao919 mature embryo through screening four kinds of hormone combination induction medium and six kinds of hormone combination differentiation medium. The results showed that Y2 hormone combination (4 mg/L 2,4-D) had the best callus induction effect, with the highest calli induction rate of 77.3%; and F5 hormone combination (4 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA) had the best calli differentiation effect with the highest differentiation rate of 85.0% and the seedling formation rate of 68.3%. In this study, an efficient regeneration system of Jindao919 mature embryo was established, which laid a foundation for directional improvement by genetic engineering technology.

Keywords

Jindao919, Mature Embryo, Calli, Regeneration System

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

高效的水稻再生体系是进行水稻遗传转化的基础。自 1965 年 Ameniya A H 等对水稻组织培养开始研究以来, 粳稻和籼稻的组织培养体系均日趋成熟。水稻的花粉粒、花药、幼胚均可作为外植体, 且由于操作简单、诱导率高、愈伤组织质量好而被广泛用于水稻的遗传转化、品种培育中, 但上述材料多受季节影响, 取材不便且污染率高, 现在人们更多地利用种子成熟胚作为外植体诱导高质量的愈伤组织。不同的水稻品种由于基因型差异, 难以使用统一的水稻再生体系, 需要摸索适合特定品种的诱导、分化、成苗激素组合[1]。李玉静等研究表明, 对日本晴而言使用 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 时愈伤诱导率最高, 2.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L 6-BA 时绿苗分化率和培养力最高[2]。朱克明等认为水稻基因型对水稻愈伤组织的诱导和再生起决定性作用[3]。沈秋萍等以籼稻 9311 为外植体, 用 2.5 mg/L 2,4-D 诱导愈伤组织, 2.5 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA 进行分化再生, 效果最佳[4]。

金稻 919 是粳型常规优质食味水稻品种, 具有米质优良、出米率高、抗性全面、产量出色等优点, 是天津小站稻的代表。为采用生物技术手段对金稻 919 进行改良, 进一步提高其品质和抗性, 其遗传转化及再生体系的建立尤为重要。因此为建立金稻 919 成熟胚再生体系, 参考前人研究结果[5] [6] [7] [8], 本实验设计 4 种激素配比不同的诱导培养基和 6 种激素配比不同的分化培养基, 摸索最适合诱导和分化的激素组合, 建立高效的金稻 919 成熟胚再生体系, 为利用基因工程技术定向改良奠定技术基础。

2. 材料与方方法

2.1. 材料

本研究以天津市水稻研究所自主育成的金稻 919 成熟胚为外植体。所用的 NB (货号 N492)和 MS (货号 M519)培养基及激素均购自 Phytotechnology。

2.2. 培养基

1) 愈伤组织诱导培养基 4.1 g/L NB 培养基 + 0.5 g/L L-脯氨酸 + 0.5 g/L 谷氨酰胺 + 0.3 g/L 水解酪蛋白 + 30 g/L 蔗糖 + 3.5 g/L 植物凝胶 + 不同激素组合(表 1), 调节 pH 为 5.8, 121℃ 灭菌 15 min, 倒入 90 mm 培养皿, 25 mL/皿, 冷却凝固后可用。

Table 1. Hormone combination of callus induction medium**表 1.** 愈伤组织诱导培养基中的激素组合

激素组合	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)
Y1	2	0
Y2	4	0
Y3	2	0.25
Y4	4	0.25

2) 愈伤组织分化培养基 4.43 g/L MS 培养基 + 0.5 g/L L-脯氨酸 + 0.5 g/L 谷氨酰胺 + 0.3 g/L 水解酪蛋白 + 0.1 g/L 肌醇 + 30 g/L 山梨醇 + 30 g/L 蔗糖 + 3.5 g/L 植物凝胶 + 不同激素组合(表 2), 调节 pH 为 5.8, 121℃ 灭菌 15 min, 倒入 90 mm 培养皿, 25 mL/皿, 冷却凝固后可用。

Table 2. Hormone combination of callus differentiation medium**表 2.** 愈伤组织分化培养基中的激素组合

激素组合	KT (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
F1	3	0	1
F2	4	0	1
F3	5	0	1
F4	0	3	1
F5	0	4	1
F6	0	5	1

3) 愈伤组织生根培养基 2.215 g/L MS 培养基 + 30 g/L 蔗糖 + 3.5 g/L 植物凝胶, 调节 pH 为 5.8, 121℃ 灭菌 15 min, 倒入 250 mL 培养瓶中, 冷却凝固后可用。

2.3. 方法步骤

1) 金稻 919 成熟胚愈伤组织诱导 将金稻 919 成熟种子(最好是当年新收获种子)剥离颖壳, 取适量倒入 50 ml 离心管中, 加入 75% 乙醇消毒 1 min, 倒掉乙醇, 用无菌水洗涤 1 次; 再加入 30% 次氯酸钠(有效氯 3%)消毒 20 min, 倒掉次氯酸钠溶液, 用无菌水冲洗 5~6 次; 用移液枪吸去多余的水份, 将成熟胚接种到诱导培养基中, 置于 28℃ 培养箱中, 暗培养约 8~12 d 后, 在水稻幼芽和成熟胚之间长出胚性愈伤组织, 掐芽后放入新的诱导培养基上 3~5 d 后即可进行转化, 若暂时不用就做继代培养, 每 15~20 d 继代一次。每种激素组合接种 10 皿, 每皿 30 粒。

$$\text{诱导率}(\%) = \frac{\text{出愈伤的成熟胚数量}}{\text{总的成熟胚数量}} \times 100\%$$

2) 不同激素组合对金稻 919 愈伤组织的分化培养 选取淡黄色、圆形、致密的愈伤组织转接在加入 6 种不同激素组合的分化培养基上中进行分化诱导, 每种组合接 8 皿, 每皿 10 块, 培养条件为 28℃, 16 h 光照/8 h 黑暗培养。20 d~25 d 统计分化率, 35 d~40 d 后统计成苗率。

$$\text{分化率}(\%) = \frac{\text{分化的愈伤组织数量}}{\text{总愈伤组织数量}} \times 100\%$$

$$\text{成苗率}(\%) = \frac{\text{分化的幼苗数量}}{\text{分化愈伤组织数量}} \times 100\%$$

3) 生根培养及驯化移栽 待分化出的幼苗长到 2~3 cm 左右, 去除小苗根部的愈伤组织和培养基, 转移到生根培养基上让幼苗长大, 生根培养条件 28℃, 16 h 光照/8 h 黑暗培养。培养 7~10 d 后, 幼苗长出

大量的侧根, 当小苗长至高约 10~15 cm 时, 就可以打开盖子在室外炼苗 2~3 d, 取出小苗并小心洗去根部培养基, 移栽至土中。

3. 结果与分析

3.1. 不同激素组合对诱导愈伤组织的影响

设计了 4 组不同激素比例的诱导培养基, 金稻 919 在不同激素组合培养基中的诱导率和愈伤状态有差异。实验数据表明, Y2 激素组合对愈伤组织的诱导率最高, 最高达到 77.3%, 且愈伤组织状态最好; 2,4-D 浓度较高时, 诱导率较高, Y2 (77.3%) > Y1 (66.0%), Y4 (62.7%) > Y3 (54.0%), Y2 组合愈伤状态最佳, 颜色淡黄, 结构致密, 根毛少, 芽短; 2,4-D 相同的条件下, 添加 6-BA 后诱导率低于仅添加 2,4-D 的激素组合, 即 Y1 (66.0%) > Y3 (54.0%), Y2 (77.3%) > Y4 (62.7%), 且愈伤状态不佳, 根毛较多, 芽长 (表 3 和图 1)。

Table 3. Effect of different hormone combination medium on callus induction rate

表 3. 不同激素组合下愈伤组织诱导率的影响

激素组合	接种数量	诱导率(%)	愈伤状态
Y1	300	66.0	颜色淡黄、结构致密、愈伤较小、根毛少、芽短
Y2	300	77.3	颜色淡黄、结构致密、愈伤较大、根毛少、芽短
Y3	300	54.0	颜色淡黄、愈伤小、根毛多、芽长
Y4	300	62.7	颜色淡黄、愈伤小、根毛多、芽长

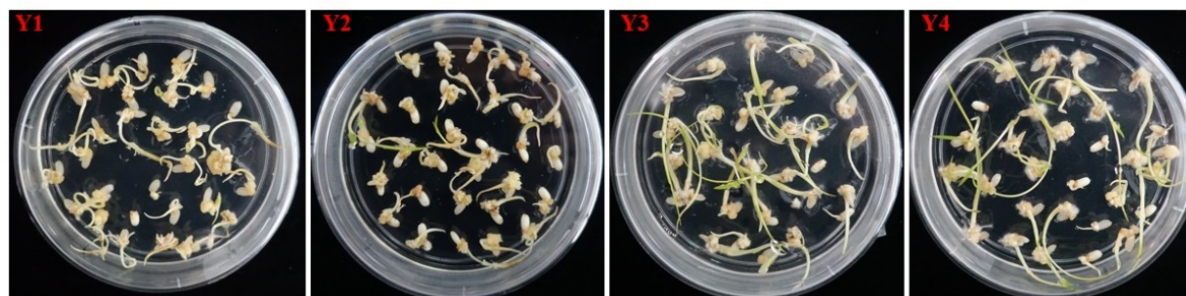


Figure 1. Callus status induced for 10 days under different hormone combination medium

图 1. 不同激素组合下诱导 10 d 愈伤组织状态

3.2. 不同激素组合对愈伤组织分化成苗的影响

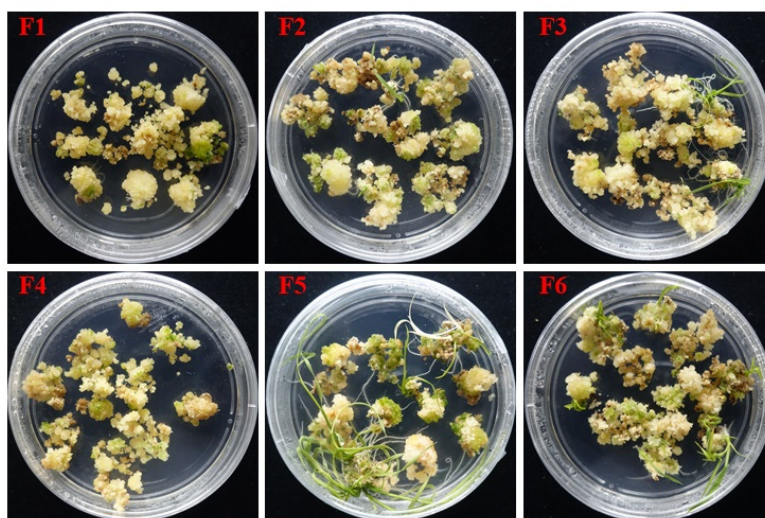
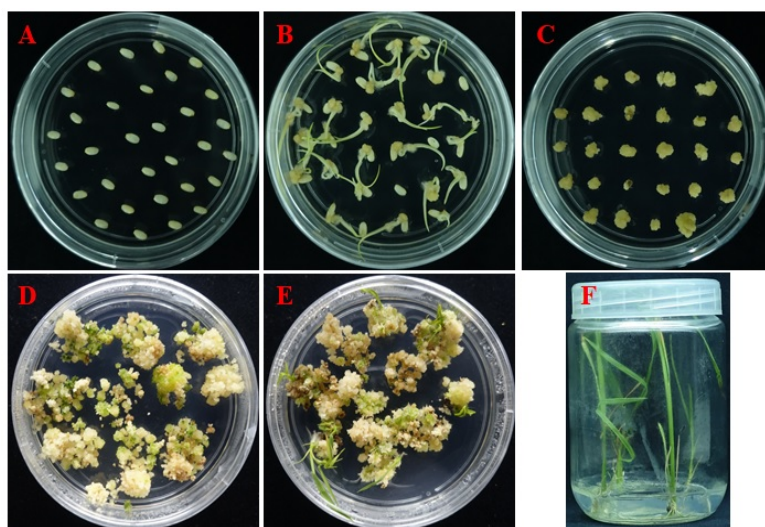
设计了 6 种不同激素组合分化培养基, 金稻 919 在不同的分化培养基中分化成苗差异明显。实验数据表明, 同样浓度的 KT 和 6-BA 分化培养基中, 6-BA 的分化率和成苗率高于 KT, 即 F1 > F4, F2 > F5, F3 > F6; 分别对比 KT 和 6-BA 组内分化率和成苗率, 发现其分化率和成苗率从高到低为 F2 > F3 > F1, F5 > F6 > F4; 综合比较 6 组实验数据, F5 激素组合分化率和成苗率最高, 分别达到 85.0% 和 68.3% (表 4 和图 2); 同时还发现随着 KT 和 6-BA 浓度的增加, 其分化成苗的时间会逐渐缩短。

3.3. 金稻 919 成熟胚完整再生过程

从将金稻 919 成熟胚置于诱导培养基开始计算约需要 10 d, 继代 5 d, 分化再生培养约需要 40 d, 生根约 8 d, 整个再生过程共计约 60 d 完成(图 3)。

Table 4. Effect of different hormone combination on callus differentiation rate and seedling rate**表 4.** 不同激素组合对愈伤组织分化率和成苗率的影响

激素组合	接种愈伤数量	分化愈伤数量	成苗数量	分化率(%)	成苗率(%)
F1	80	33	9	41.3	27.3
F2	80	64	29	80.0	45.3
F3	80	62	32	77.5	51.6
F4	80	52	15	65.0	28.8
F5	80	68	41	85.0	68.3
F6	80	65	40	81.3	61.5

**Figure 2.** Callus status after 30 days differentiation under different hormone combination**图 2.** 不同激素组合下分化 30 d 愈伤组织状态

(A) 诱导 0 d; (B) 诱导 10 d; (C) 继代 5 d; (D) 分化 15 d; (E) 分化 30 d; (F) 生根 7 d

Figure 3. Mature embryo regeneration system of Jindao919**图 3.** 金稻 919 成熟胚再生体系

4. 讨论与结论

植物再生体系应具有高效、稳定等特点。在水稻遗传转化研究中,以成熟胚为外植体具有取材方便、不受季节限制等优点,而材料基因型、培养基和外源激素的种类与浓度配比、培养条件等是影响愈伤组织形成和植株再生的主要因素;其中外源激素种类及浓度配比是愈伤组织分化再生的重要调控因子[9][10]。根据刘书梅等的研究结果,本研究直接采用了更适合粳稻种胚愈伤诱导的 NB 培养基[11]。2,4-D 是愈伤组织诱导形成的必要条件,与其它激素搭配使用后能改变诱导率的研究很多[2],本研究表明添加 6-BA 对 2,4-D 诱导愈伤组织没有明显的促进作用,甚至影响愈伤状态和降低诱导率。KT 和 6-BA 是愈伤组织分化常用的细胞分裂素,袁云香[12]和周玲艳[13]等认为添加合适浓度的 6-BA 有利于水稻愈伤组织的分化,而沈秋平等[4]研究表明添加 KT 比 6-BA 的分化效果更好,而本研究结果表明在添加 NAA 的基础上,6-BA 相比 KT 可以得到较高的分化率和成苗率。

综上,本研究选取金稻 919 成熟胚作为外植体,设计 4 种激素配比不同的诱导培养基,将金稻 919 成熟胚外植体接种在诱导培养基中诱导,观察愈伤状态并统计每组诱导率,得出最佳诱导激素组合为 Y2 激素组合(4 mg/L 2,4-D),诱导率为 77.3%;设计 6 种激素配比不同的分化培养基,将金稻 919 愈伤组织接种在分化培养基中进行分化培养,统计每组分化率和成苗率,得出最佳分化激素组合是 F5 激素组合(4 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA),其分化率和成苗率分别是 85%和 68.3%;整个再生体系从诱导到幼苗再生共需要约 60 d 时间。金稻 919 成熟胚再生体系的建立,为利用基因工程技术定向改良奠定了技术基础。

基金项目

天津市重点研发项目(21YFSNSN00150);天津市自然科学基金(19JCQNJC14000);国家体系天津试验站(CARS-01-49)。

参考文献

- [1] 黄赛麟,李东宣,甘树仙,等. 水稻成熟胚培养高效再生系统的创新[J]. 分子植物育种, 2008, 6(4): 801-806.
- [2] 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(4): 395-398, 403.
- [3] 朱克明,陶慧敏,徐硕,等. 水稻愈伤分化和再生研究进展[J]. 种子, 2016, 35(11): 55-59.
- [4] 沈秋平,严孙艺,薛宇彤,等. 籼稻 9311 成熟胚高效再生体系的建立[J]. 杂交水稻, 2019, 34(2): 49-52.
- [5] 刘永巍,田红刚,孟巧霞,等. 不同粳稻成熟胚再生体系的研究[J]. 北方水稻, 2013, 43(3): 17-20.
- [6] 段霞飞,黄婷,王玲,等. 粳稻恢复系 C418 成熟胚转基因再生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2020, 18(7): 234-240.
- [7] 张丽,王敬东,陈晓军,等. 宁夏水稻高效再生体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010(9): 47-52.
- [8] 曹含章,沈秋平,袁冰,等. 3 个粳稻品种成熟胚分化和再生适宜激素配比研究[J]. 杂交水稻, 2020, 35(4): 86-91.
- [9] 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): 34-42.
- [10] 孙建昌,杨生龙,马静,等. 宁夏水稻不同外植体再生体系的研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 94-97.
- [11] 刘书梅,王姗姗,辛晓云,等. 不同培养基对水稻胚性愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 生物学杂志, 2011, 28(4): 54-56.
- [12] 袁云香,万志刚,孙丙耀. 水稻愈伤组织再分化培养方法的优化[J]. 种子, 2008, 27(1): 13-16.
- [13] 周玲艳,秦华明,谢俊平,等. 提高水稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 种子, 2006, 25(7): 28-31.