

张银霞. 籼稻 Kra Dang Ngah 成熟胚愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 45–48.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.012

# 籼稻 Kra Dang Ngah 成熟胚愈伤组织诱导及植株再生的研究

张银霞

(宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021)

**摘要:**为了建立籼稻 Kra Dang Ngah 的再生体系, 以其成熟胚作为试验材料, 研究不同种类植物激素及其浓度配比对诱导愈伤率、愈伤组织形态学特征、分化及植株再生的影响。结果表明: 2,4-D 可诱导愈伤组织产生, 但愈伤组织诱导率极低; 2,4-D 和其他植物激素配合使用显著提高了诱导率, 在 2 mg/L 2,4-D、1 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L KN 的条件下可获得较高的愈伤组织诱导率, 为 56.3%。继代培养基中添加激素浓度为诱导培养基中的一半可获得较好的增生的胚性愈伤组织, 形态学特征为淡黄色, 比较致密、较硬、呈颗粒状结构, 没有褐化出现, 表现出很强的分化能力。再生培养中, MS 培养基中添加 0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA 和 2 mg/L KN 可获得较高的分化率(达到 75.5%)和再生率(33.3%), 表明 6-BA 和 Kn 的配合使用显著提高了分化率。

**关键词:** 籼稻; 成熟胚; 愈伤组织; 再生植株

**中图分类号:** S511.2<sup>+</sup>10.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0045-03

利用转基因技术进行遗传改良是改善籼稻品质、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。近年来, 研究者从幼穗、幼胚、花药等部位诱导出愈伤组织和再生植株, 愈伤组织诱导率高、质量好, 被广泛用于水稻的遗传转化、品种培育中<sup>[1]</sup>。但是, 上述材料多受季节限制, 取材不便, 阻碍了水稻组织培养的进一步发展。从胚性愈伤中首先获得再生植株的是在梗稻中<sup>[2]</sup>, 在籼稻中由于受到许多因素的限制, 比如品种具有倔强的对抗外来刺激的特性<sup>[3]</sup>和具有基因型专一性<sup>[4-5]</sup>, 使从成熟胚中诱导胚性愈伤组织率和植株再生率很低, 导致了籼稻遗传转化很困难。

籼稻 Kra Dang Ngah 是泰国南部的当地品种, 因营养价值很高且具有特殊香味而深受人们喜欢, 但容易遭受病虫害的危害。到目前为止没有关于籼稻 Kra Dang Ngah 再生体系的研究报道。本研究为了建立 Kra Dang Ngah 再生体系, 为遗传转化打好基础, 以成熟胚作为试验材料, 对其在不同激素及浓度配比条件下的出愈率、愈伤组织状态及再生率进行研究, 以期获得状态较好的愈伤组织, 建立高效的再生体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及种子灭菌

籼稻 Kra Dang Ngah(*Oryza sativa* L.) 种子由泰国宋卡王子大学自然资源学院提供。健康成熟的种子剥去外壳后浸入 70% 乙醇中 1 min 进行表面消毒, 然后放入 20% 次氯酸钠溶液

中, 滴入 2~3 滴 Tween20 5 min; 最后在超净工作台中用无菌蒸馏水洗 4~5 次; 再将种子放在无菌滤纸上吸干水分, 备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 愈伤组织的诱导** 灭菌的种子接种到愈伤组织诱导培养基上, 即 MS 培养基 + 3% 蔗糖 + 0.75% 琼脂糖 + 1~4 mg/L 2,4-D, pH 值调节到 5.7。愈伤组织诱导在 25~27℃、16 h 光照条件下培养 30 d 后, 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 × 100%。然后将愈伤组织转接到继代培养基继代培养。

**1.2.2 愈伤组织诱导率的提高及优化** 为了提高愈伤组织诱导率和质量, 将灭菌种子接种到经“1.2.1”节试验筛选出的较好的愈伤组织诱导培养基中, 同时加入其他激素[(1) 1 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L TDZ; (2) 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA; (3) 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KN; (4) 2 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KN; (5) 4 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KN; (6) 4 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KN] 和 1 g/L 水解酪蛋白(CH), 愈伤组织诱导的培养条件如“1.2.1”节所述。经过 30 d 培养后调查愈伤组织的大小、形态和诱导率, 然后转接到继代培养基中。

**1.2.3 愈伤组织的继代培养** 为了选取质量好的胚性愈伤组织, 将从成熟胚中诱导出的愈伤组织转接到添加激素及浓度配比与愈伤组织诱导培养基相同或减半的 MS 培养基中, 所有继代培养基中添加 1 g/L CH。培养 30 d 后记录胚性愈伤组织的诱导率和褐化率, 并在立体显微镜下鉴别胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织, 然后转接到再生培养基中。

**1.2.4 植株再生培养** 选取好的胚性愈伤组织, 转接到添加不同细胞分裂素及浓度配比的 MS 培养基中, 30 d 后调查再生情况。

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31360324)。

作者简介: 张银霞(1979—), 女, 宁夏平罗人, 博士, 讲师, 主要从事作物遗传育种学的教学与科研工作。E-mail: zyxinxia2008@126.com。

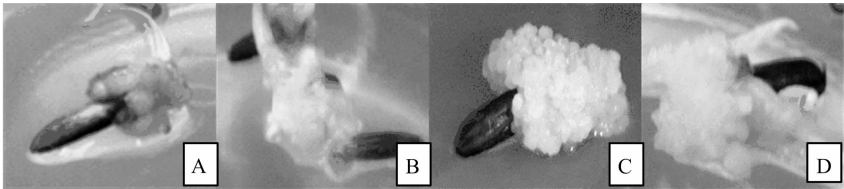
1.3 数据统计

试验数据采用 Execl 和 DPS 统计软件对愈伤组织诱导率、褐化率和分化率进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

灭菌的水稻种子接种到含 1~4 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上培养 7 d 后,种子开始膨胀,逐渐开始出现白色愈伤。30 d 后统计愈伤组织情况见表 1。结果表明,培养基中不添加 2,4-D 时,没有愈伤组织形成;当 2,4-D 的浓度从 1 mg/L 增加到 3 mg/L 时,诱导率从 20.0% 提高到 33.9%,且愈伤组织的形态也随之变化,从紧密黄褐色、紧密黄色到颗粒状微黄色;当 2,4-D 的浓度增加到 4 mg/L 时,诱导率又降低到 31.2%,且形态变为黄色松散状,有的黏液化(图 1),



A—1 mg/L 2,4-D; B—2 mg/L 2,4-D; C—3 mg/L 2,4-D; D—4 mg/L 2,4-D

图1 MS培养基中添加不同浓度2,4-D诱导愈伤组织的形态

2.2 NAA、6-BA、KN 和 TDZ 对愈伤组织诱导率的影响

灭菌的种子接种到添加不同种类激素和浓度配比的 MS 培养基上后,3~4 d 后就开始膨胀,7 d 后愈伤组织形成,这些愈伤组织随着培养时间延长不断增生,30 d 后调查愈伤组织诱导率和形态,结果(表 2)表明,培养基中加 NAA、6-BA、KN 可以显著提高诱导率,最高可以达到 56.3%;此外还可以改进愈伤组织质量。从外形上看,这些愈伤组织量大、比较致密、较硬,呈颗粒状结构较多,易于分化,在立体显微镜下观察呈胚性愈伤组织(图 2、图 3)。而在只有 2,4-D 的培养基上生长的愈伤组织比较松软,有的黏液化,有的有水泡,一般不易于分化(图 1)。当在 MS 培养基中加入 1 mg/L 2,4-D 和 1.5 mg/L TDZ 时,形成极少的愈伤组织(诱导率 23.3%),其形态特征为紧密、硬且为白色,与其他激素浓度配比诱导愈伤组织较难增生。因此,2,4-D 和 NAA 这 2 种细胞分裂素结合 6-BA 和 KN 2 种生长素可以获得最高的愈伤组织诱导率和最好质量的愈伤组织,比单独使用 2,4-D 更能有效提高愈伤组织诱导率。

表 2 不同激素种类和浓度配比对愈伤组织诱导率的影响

处理	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	KN (mg/L)	TDZ (mg/L)	诱导率 (%)
1	1	0	0	0	1.5	23.3d
2	2	1	1.0	0	0	28.9c
3	2	1	1.0	0.5	0	56.3a
4	2	0	0.5	0.5	0	35.3b
5	4	1	1.0	0.5	0	31.6c
6	4	0	0.5	0.5	0	38.9b

注:诱导率变异系数为 33.2%。

当 MS 培养基中加入 2 mg/L 2,4-D 和其他生长素、细胞分裂素时,形成大量的愈伤组织,形态学特征为致密、呈白

说明高浓度的 2,4-D 抑制愈伤组织的形成。本试验结果表明,单独使用 2,4-D 诱导愈伤组织的诱导率很低,不适宜籼稻 Kra Dong Ngah 愈伤组织的诱导。

表 1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	诱导率 (%)	愈伤组织形态
0	0b	没有愈伤组织形成
1	20.0a	黄褐色,紧密
2	25.0a	黄色,紧密
3	33.9a	微黄色,颗粒状
4	31.2a	黄色,松散
变异系数	61.3%	

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下表同。

色、带有一些绿点,这些绿点最终发育成芽,经过立体显微镜观察为胚性愈伤组织(图 2);当 MS 培养基中加入 4 mg/L 2,4-D 和其他生长素、细胞分裂素时,诱导的愈伤组织形态学特征为有些紧密、颜色从黄到白、比较小且有些褐化,只有少数的愈伤组织发展成胚性(图 3)。进一步证明,2 mg/L 2,4-D 配合其他植物激素更适合愈伤组织的诱导。因此 MS+2 mg/L 2,4-D+1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KN 是最好的愈伤组织诱导培养基。

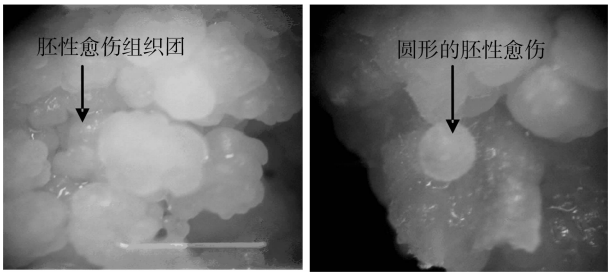
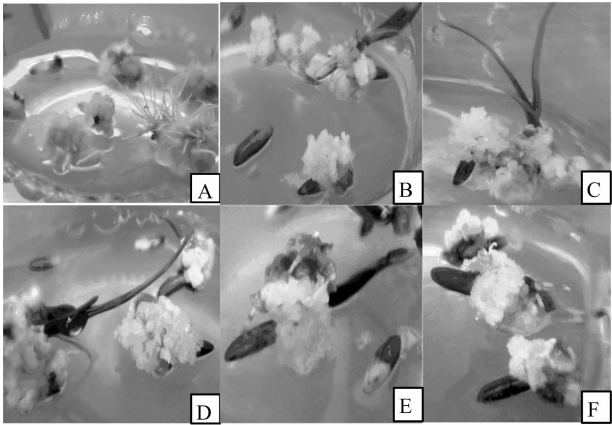


图2 胚性愈伤组织的形态学特征

2.3 不同激素浓度及对比对胚性愈伤组织的影响

继代培养 3 周后,发现诱导培养基和继代培养基对愈伤组织的褐化和胚性愈伤组织的发育影响很大。结果(表 4)表明,愈伤组织转接到只添加 2,4-D 的 MS 培养基上褐化很严重,随着 2,4-D 浓度增加,褐化率从 100% 减少到 0,但其胚性愈伤的增殖很慢,表现出分化越来越困难。培养基中添加 1 mg/L 或 2 mg/L 2,4-D 配合其他激素,褐化率比单独使用 2,4-D 低,为 0~27.2%。当培养基中添加 1 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L NAA、0.25~0.50 mg/L 6-BA 和 0.25 mg/L KN 时,愈伤组织没有褐化且出现更多绿芽(图 4),表明激素浓度减半更能促进胚性愈伤组织的发育和分化。说明 NAA、6-BA



A—1 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L TDZ; B: 2 mg/L 2,4-D+1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA;C—2 mg/L 2,4-D+1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KN;D—2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KN;E—4 mg/L 2,4-D+1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KN;F—4 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KN

图3 不同激素种类和浓度配比诱导的愈伤组织

表 4 不同激素及浓度对比对愈伤组织褐化的影响

处理	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	KN (mg/L)	褐化率 (%)
1	1	0	0	0	100
2	1	0	0	0	26.7
3	1	0.5	0.50	0	3.6
4	1	0.5	0.50	0.25	0
5	1	0	0.25	0.25	0
6	2	0	0	0	20.3
7	2	0.5	0.50	0.25	16.0
8	2	0	0.25	0.25	27.2
9	3	0	0	0	13.6
10	4	0	0	0	0

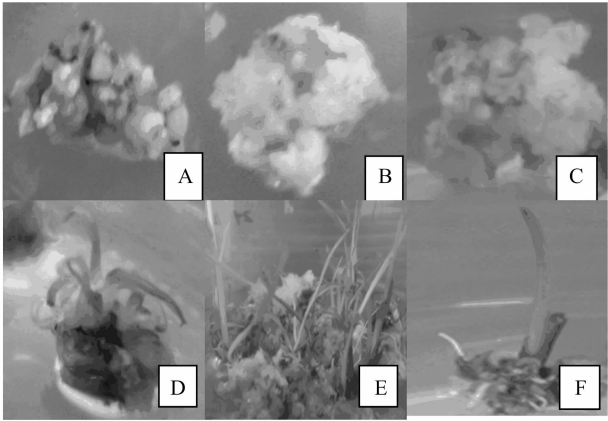
表 5 不同激素和浓度对再生的影响

处理	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	KN (mg/L)	分化率 (%)	再生率 (%)	分化时间 (d)
1	1	0	0	0	29.6c	21.5b	14
2	0	0.5	1.0	2	75.5a	33.3a	21
3	0	0.5	1.5	2	69.3a	32.1a	21
4	0	1.0	1.0	2	45.8b	20.3b	21
变异系数					22.9%	21.9%	

3 讨论与结论

水稻的组织培养因品种不同,培养条件差异较大<sup>[6]</sup>,愈伤组织的质量是影响水稻再生频率的关键因素,而 2,4-D 浓度对愈伤组织的数量及质量影响均较大。一般认为水稻愈伤组织诱导必须在培养基中添加 2,4-D,以提高内源 ABA 的水平,促进胚性能力表达<sup>[7]</sup>,但仅添加 2,4-D 往往出愈率较低,特别是籼稻。本研究结果也表明,在诱导培养基中仅使用 2,4-D 时,诱导率比较低,说明籼稻 Hom Kra Dong 具有基因型专一性。相同的结果在 2010 年被 Zuraida 等报道<sup>[8]</sup>。

田文忠在提高籼稻愈伤组织诱导率的研究中指出,在诱导培养基或继代培养基中加入 KN 和 NAA 能显著改善愈伤组织的质量,提高分化率<sup>[9]</sup>。本研究证实了这一点,当 MS 培



A、B—胚性愈伤组织的增生; C—愈伤组织的分化; D—愈伤组织在 MS+1.0 mg/L TDZ 培养基上的再生培养; E—愈伤组织在 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+2 mg/L KN 培养基上的再生植株; F—愈伤组织在 MS+0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA+2 mg/L KN 培养基上的再生植株

图4 胚性愈伤组织形成、分化和再生

和 KN 能有效抑制愈伤组织的褐化,促进胚性愈伤发育,从而提高分化能力。因此,这种培养基最适宜于愈伤组织继代和分化培养。

2.4 不同配比的生长素和细胞分裂素对植株再生的影响

当胚性愈伤组织转接到表 5 中激素配比的培养基后,其分化和再生情况如表 5 所示。结果发现,与其他激素相比,TDZ 可以加快胚性愈伤组织的分化,缩短再生时间,但分化率和再生率较低(图 4),分别为 29.6%、21.5%。NAA、6-BA 和 KN 配合使用显著提高了分化率,达 45.8%~75.5%,说明不同配比的细胞分裂素和生长素对植株再生有显著影响,当细胞分裂素高于生长素时,促进植株的再生。因此,0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA 和 2 mg/L KN 是最适宜愈伤组织分化和再生的激素配比。

培养基中加入 2,4-D 配合 NAA、6-BA 和 KN 能够显著提高诱导率和改善愈伤组织的质量,说明细胞分裂素 KN 和 6-BA 可以改善愈伤组织的质量并促其分化。因此本研究以 2 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L KN 为最适宜的愈伤组织诱导培养基。

Zuraida 等对籼稻 MR219 的研究结果表明,细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 均对籼稻的分化培养有极显著的影响<sup>[8,10]</sup>。本研究在分化培养基中加入 6-BA 浓度在 1.0~1.5 mg/L 时,能够显著提高分化率;NAA 是一种生长素,浓度过低则生长缓慢,浓度过高则在基部产生大量的愈伤组织且分化率下降,当 NAA 和 KN 配合使用时可以改进愈伤组织质量。因此,0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA 和 2 mg/L KN 浓度配比适合籼稻幼苗分化。本研究初步建立起了籼稻 Kra

王碧琴,周 华,朱 祺,等. 紫山药组织培养快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):48-50.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.013

# 紫山药组织培养快繁技术研究

王碧琴,周 华,朱 祺,刘腾云,余发新

(江西省科学院生物资源研究所,江西南昌 330029)

**摘要:**以紫山药的茎尖、茎段为材料,对茎尖、茎段诱导分化不定芽进行初步研究,结果表明,茎尖、茎段不定芽的分化率随 6-BA 浓度的增加而提高,芽苗增殖率先由低到高,再降低;MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基对不定芽有较高的分化率和增殖率;茎尖、茎段培养 20 d 为 1 个继代周期,茎段在第 2 次继代期、茎尖在第 3 次继代周期培养时,不定芽的增殖率最高;不定芽苗 2.0~3.0 cm 时从苗基部或分枝处剪下进行生根诱导,生根率在 95% 以上。

**关键词:**紫山药;茎尖;茎段;组织培养;不定芽

**中图分类号:**S632.104<sup>+</sup>.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0048-03

紫山药俗称薯蓣、脚板薯、长芋,为薯蓣科薯蓣属(*Dioscorea*)的一个地方品种,为多年生蔓性植物,块根呈块状或圆柱状,表皮和肉质因呈紫红色而得名。紫山药肥大的肉质块根细腻滑爽、口感极佳,富含黏性蛋白、紫色花青素、维生素、胆碱和薯蓣皂(天然的 DHEA)等,内含各种荷尔蒙基本物质,有促进内分泌荷尔蒙的合成等多种独特食疗价值,也称“紫人参”。据《本草纲目》记载,经常食用紫山药,不仅可以增加人体的抵抗力,降低血压、血糖,抗衰益寿等,而且还具有固肾、润肺益精、软化血管等药用滋补功能,故又享有“蔬菜之王”的美誉。病毒病是造成山药产量下降、品质退化的重要因素。紫山药由于长期使用块茎繁殖,出现病毒积累,种性退化,已危及到产品品质和产量,不但满足不了市场需求,还

严重影响和制约地方产业的发展和种植的积极性。山药感染的主要病毒有坏死花叶病毒、绿色斑驳病毒、马铃薯 Y 病毒和马铃薯卷叶病毒<sup>[1]</sup>,目前尚无有效药物可控制这些病毒病的发生或蔓延。采用现代生物技术,选取优良无病株种苗进行离体脱毒培养,以组培苗更替传统的营养繁殖可以从根本上解决病毒病的问题。有关盾叶薯蓣、惠楼山药、怀山药等组织培养与快繁的研究<sup>[2-5]</sup>已见报道,紫山药组织培养快繁技术研究还未见报道。为此,本试验开展紫山药组织培养快繁技术研究,以期对紫山药组培苗工厂化生产和应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

紫山药,由江西万载辉明有机农业科技开发有限公司提供。选择个大无病虫、表面根毛少、肉紫色的块茎,经表面消毒,在室(棚)温 15~25℃ 于盆中沙藏催芽 30 d 左右,待嫩芽生长到 20~30 cm 即可作为外植体取材。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基 初始培养基:MS;诱导分化培养基:MS+6-BA 0.1~2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;生根培养基:1/2MS+NAA 0.1~0.5 mg/L+Ac 0.2 g/L。所用培养基均

using immature embryos or calli induced from mature seed [J]. Nature Protocols, 2008, 3(5):824-834.

[6] 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.

[7] 张东向,张崇浩,李杰芬. 玉米叶片胚性愈伤组织诱导及其与内源 IAA 和 ABA 关系的初步研究[J]. 作物学报,2000,26(2):195-199.

[8] Zuraida A R, Suri R, Wan Z. Regeneration of Malaysian indica rice (*Oryza sativa*) variety MR232 via optimized somatic embryogenesis system[J]. Journal of Phytology, 2010, 2(3):30-38.

[9] 田文忠. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报, 1994, 21(3):215-221, 254.

[10] Syaiful B P, Siti N A, Maheeran A A, et al. Somatic embryogenesis from scutellar embryo of *Oryza sativa* L. var. MR 219[J]. Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science, 2009, 32(2):185-194.

收稿日期:2014-01-03

基金项目:江西省科技支撑计划(编号:2010CXA06300)。

作者简介:王碧琴(1957—),女,浙江义乌人,研究员,主要从事植物遗传育种及生物技术研究工作。E-mail: wangbiqin2005@126.com。

通信作者:余发新,博士,研究员,主要从事植物遗传育种研究工作。E-mail: fxyu2000@126.com。

Dang Ngh 的再生体系,为遗传转化奠定了基础。

## 参考文献:

[1] 郭晓丽. 水稻愈伤组织培养研究[J]. 衡水学院学报, 2009, 11(1):48-49, 70.

[2] Nishi T, Yamada Y, Takahishi E. The role of auxins in differentiation of rice tissue culture *in vitro* [J]. Botanical Magazine, 1973, 86: 183-188.

[3] Kyojuka J, Otoo E, Shimamoto K. Plant regeneration from protoplast of indica rice: genotype differences in culture response[J]. Theoretical Applied Genetics, 1988, 76:887-890.

[4] Raman R, Chahal G S, Dhaliwal H S. Screening of genotype for callus induction and plant regeneration in rice [J]. Crop Improvement, 1994, 21:1-2.

[5] Hiei Y, Komari T. Agrobacterium-mediated transformation of rice