

水稻组织培养相关研究综述

尹祥佳, 赵慧军, 李艳玫, 郝楠
(兰州职业技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 水稻是我国的主要粮食作物, 有粳稻和籼稻两个栽培亚种, 对我国粮食生产和安全起着重要的作用。同时, 水稻作为模式植物, 在组织培养研究中取得了显著的成果, 也为开展水稻分子育种研究奠定了基础。主要从选用外植体诱导愈伤组织、基本培养基成分、激素配比等方面综述了粳稻和籼稻组织培养相关研究及存在的问题, 并提出了一些建议。

关键词: 水稻; 组织培养; 影响因素; 存在问题

中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)08-0073-05

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.06.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.06.019)

Relevant Research Review on Rice Tissue Culture

YIN Xiangjia, ZHAO Huijun, LI Yanmei, HAO Nan
(Lanzhou Vocational and Technical College, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Rice is the main food crops in China, there are two cultivation of japonica and indica rice subspecies, play an important role on China's grain production and security. At the same time, as a model plant, rice tissue culture research has obtained the remarkable results, also has laid the foundation for developing rice molecular breeding research. The article mainly from the callus induction explant selection, basic culture medium, the respect such as hormone proportion respectively the influence factors of japonica and indica rice tissue culture were reviewed and the existing problems, and puts forward some Suggestions.

Key words: Rice; Tissue culture; Influencing factors; Existing question

水稻是我国乃至世界的三大粮食作物之一。面积仅次于玉米, 占我国粮食作物播种面积的2016年, 我国水稻播种面积为3016万 hm^2 , 播种26.69%; 产量居世界第一, 约占世界水稻总产量

收稿日期: 2017-04-06

基金项目: 兰州职业技术学院2016年院内科研项目(项目编号: 2016B-2)。

作者简介: 尹祥佳(1984—), 男, 甘肃兰州人, 硕士, 农艺师, 从事作物遗传育种研究工作。E-mail: yinxiangjia@lvu.edu.cn。

- [32] 王红梅, 屠焰, 司丙文, 等. 不同配伍酶制剂处理玉米秸秆对肉用绵羊生长性能和营养物质消化率的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(24): 4806-4813.
- [33] FLORES C, CAJA G, CASALS R, *et al.* Performance of dairy ewes fed diets with a fibrolytic enzyme product included in the concentrate during the suckling period [J]. *Animal Sci. J.*, 2008, 2(6): 962-968.
- [34] BALA P, MALIK R, SRINIVAS B. Effect of fortifying concentrate supplement with fibrolytic enzymes on nutrient utilization, milk yield and composition in lactating goats[J]. *Anim. Sci. J.*, 2009, 80(3): 265-272.
- [35] 谢拥军, 阳建辉, 李旭红. 复合酶制剂对湘东黑山羊羔羊生产性能的影响[J]. 岳阳职业技术学院院报, 2009, 24(6): 79-81.
- [36] 李忠玲, 杜忍让, 武和平, 等. 复合酶制剂对陕北绒山羊增重效果的研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2014, 33(6): 4-7.
- [37] 刁其玉. 酶制剂在反刍动物日粮中应用研究进展[J]. 新饲料, 2010(3): 15-17.
- [38] 贾莉, 席旭东, 韩向敏, 等. 马铃薯淀粉渣混合青贮玉米快速饲料发酵方法研究[J]. 甘肃农业科技, 2016(4): 4-7.

(本文责编: 陈伟)

的 30%，占国内粮食总产量的 33.58%^[1-2]。粳稻和籼稻是亚洲栽培稻的两个亚种，随着我国农业种植结构调整，水稻生产逐渐向主产区集中，其中粳稻主要集中在东三省和苏皖，2015 年黑龙江和江苏两省的面积和产量占全国粳稻的 60%以上；中晚籼稻主要集中在湖南、四川、湖北和江西，2015 年 4 省中晚籼稻产量占全国的 55%以上；早籼稻主要集中在湖南、江西、广东与广西，2016 年 4 省区早籼稻种植面积占全国的 81.2%，产量占全国的 81.9%^[3]。由此可见，水稻对我国粮食生产和安全起着重要的作用。

植物组织培养是指在人工无菌操作下，利用优化培养基对离体植物器官组织细胞及原生质体进行离体培养，使其在不同培养基上再生细胞或长成完整植株的技术^[4]。1965 年，Nishi 等^[5]选用水稻根的愈伤组织分化出水稻再生植株，此后又有很多国内外学者进行了水稻组织培养研究。目前，水稻作为植物组织培养研究的模式植物，已在建立组织培养体系的基础上开展了大量遗传转化研究，创造新的种质资源，为提升我国水稻分子育种和常规育种研究水平起着重要的作用，并取得了显著成果^[6-7]。我们从选用外植体诱导愈伤组织、基本培养基成分、激素配比等方面对粳稻和籼稻组织培养相关研究及存在的问题进行如下综述，以便给相关研究者提供参考。

1 粳稻组织培养

1.1 外植体

获得理想的外植体是建立粳稻组织培养体系的前提。在前人研究中，多选用盾片、胚芽鞘、花药、幼胚和幼穗等外植体来诱导愈伤组织^[8-10]。但上述外植体的取材多受季节和环境因素的限制，不能满足高通量组织培养试验的要求。郑文静等^[11]选用 8 个粳稻品种，以成熟胚、幼胚、幼穗及花药为外植体，进行组织培养研究，结果表明，以成熟胚作为外植体时愈伤组织诱导率最高。由于成熟胚具有来源不受生长季节和环境的影响、取材比较方便、外植体灭菌容易、接种操作方便，试验重复性好等优点，越来越多的研究人员最终选用粳稻成熟种子作为外植体材料，诱导高质量的愈伤组织^[12-13]。

1.2 基本培养基

粳稻组织培养用到的基本培养基有诱导培养基、继代培养基、分化培养基和生根培养基，基本培养基的选择是粳稻组织培养成败的关键因素。近年来，各种优化的粳稻组织培养基配方不断涌现，培养方法也不断改进，使得粳稻的愈伤组织诱导和组织培养再生能力得到显著提高^[14]。Lee 等^[15]选用 3 个粳稻品种分别在 LS、MS、N6 基本培养基上添加相同量的 2,4-D，研究对粳稻胚性愈伤诱导率的影响，结果表明 N6 基本培养基的诱导率最高，而分化和生根培养基都选用了 MS 培养基。黄赛麟等^[16]用 N6 培养基和在 N6 的基础上添加了脯氨酸和水解酪蛋白的改良培养基诱导粳稻愈伤组织，得出改良的 N6 培养基在诱导效率上差异极其显著，甚至对于有些品种已经达到了 100% 的诱导效率，而且所生长出的愈伤组织质地较硬，呈淡黄色的颗粒状，而分化和生根都选用 MS 培养基。施利利等^[17]选用 5 个粳稻品种，在 N6、NB、MS 基本培养基上诱导愈伤，表明 NB 和 N6 培养基诱导的愈伤组织质量要好于 MS 培养基上的。王敬东等^[18]以 N6D、NB、B5、MS 为基本培养基，添加相同量的 2,4-D、脯氨酸、水解酪蛋白，研究愈伤组织诱导，结果在 N6D 培养基中诱导率最高，达到 100%；MS 培养基中诱导率最低，仅为 57%。因此，在粳稻的愈伤组织诱导过程中选用 N6 和 NB 作为诱导和继代的基本培养基，且不同基因型品种对培养基具有选择性。为了提高诱导愈伤组织的质量，还要加入一定量的 2,4-D、脯氨酸和水解酪蛋白。在分化和生根培养中通常选用 MS 作为基本培养基，尤其是在分化培养基中还要加入一定量的 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸)、6-BA (6-苄氨基嘌呤、细胞分裂素)、KT (6-糖基氨基嘌呤，激动素)、IAA (吲哚乙酸，生长素)、NAA (萘乙酸，植物生长调节剂)，以提高粳稻的分化率和再生率。

1.3 分化激素配比

植物激素对植物的生长发育具有重要的调节作用，植物激素通过调控细胞或组织的基因表达，从而调控一系列代谢过程，进而影响植物细胞胚性潜力维持和表达^[19]。早在 1957 年，Skoog 和

Miller 在植物组织培养中发现了生长素和细胞分裂素调控形态发生和植株发育的现象,并提出了“激素平衡”假说,之后众多学者对生长调节物质与形态发生的关系进行了大量研究^[20]。在粳稻愈伤组织分化过程中,需要在分化培养基上添加不同的激素配比,以实现粳稻的再生。张秀香^[21]以 MS 为分化培养基,添加了 0.02 mg/L IAA+0.5 mg/L NAA+2 mg/L KT,结果 3 个供试粳稻品种的分化率为 90.2%~97.2%。阎丽娜等^[22]以添加了 1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 和 1 g/L 活性炭的 MS 作为分化培养基,取得了较高的分化率。在粳稻愈伤组织培养分化过程中添加激素是愈伤组织能否分化成绿苗的关键,但不同基因型品种的愈伤组织在分化时,添加激素的水平及配比也有所不同^[23]。因此在不同粳稻品种组织培养研究过程中要根据具体情况设置激素的梯度试验,以优化分化效率。

1.4 存在的问题及建议

在粳稻组织培养过程中要有效解决好试验研究与生产实际的关系,品种基因型差异与培养基配方、激素配比的关系,少量的研究试验与规模化组织培养的关系。要带着粳稻育种和生产实际中的问题来研究粳稻生产型品种的组织培养体系,为粳稻育种服务。

1.4.1 需要调整粳稻组织培养的品种 目前,粳稻组织培养研究所涉及的品种比较少,且又多是从实验室操作的角度出发选取品种,真正针对在生产实际或者主推水稻品种的研究尚不多见。粳稻的组织培养研究要切合生产实际,这样可能会更加适应以组织培养技术为基础的粳稻分子改良,提高外源基因导入水稻的转化效率,筛选有价值的育种材料,丰富水稻的基因型,培育优质、高产、多抗水稻新品种的育种要求。

1.4.2 培养基配方研制周期长 因粳稻成熟胚组织培养时不同品种对激素的敏感性差异较大,需要在已有研究的成果上优化品种特异性的独特培养基配方,研制的试验周期很长。因此,有必要在有关科研院所或者企业的牵头下整合粳稻组织培养研究信息,建立数据库,实现相关文献信息的共享。

1.4.3 规模化组织培养体系有待建立 粳稻组织

培养是为后续的粳稻分子育种、基因功能验证、基因编辑技术研究以及常规育种服务的。因此,建立规模化的组织培养技术体系是有效实现上述目标的途径,要在粳稻组织培养试验中树立规模化研究的理念。

2 籼稻组织培养

大多数籼稻品种愈伤组织容易诱导,增殖速度快,继代培养能力强,再生率高。而栽培面积广的大多数籼稻品种具有不良的组培特性,表现为愈伤组织诱导率和再生率低,后续继代培养中容易褐化,高效、适用性广泛的籼稻组织培养体系尚未建立,极大地阻碍了籼稻分子育种研究^[24]。籼稻品种 9311 不仅在生产上有重要意义,在水稻功能基因组学研究中也是一个重要的模式品种^[25]。

2.1 外植体

籼稻组织培养研究中,可选择的外植体有成熟种子、幼胚、幼穗、花药^[26-29]。为了方便籼稻组织培养的研究,取材不受季节和环境的限制,常选用成熟的种子作为外植体。

2.2 基本培养基

选用和优化籼稻的基本培养基要解决籼稻品种基因型的差异,及其诱导、继代和分化过程中的愈伤质量和褐化问题。阎丽娜等^[30]以 9 个籼稻成熟胚为研究对象,以 M8 为基本培养基诱导愈伤组织,MS 为分化培养基研究了籼稻的组织培养。周杰等^[31]选用 N6、NB、MS 和 CC 作为基本培养基开展了籼稻 YTB 成熟胚的诱导、继代、分化研究,得出 NB 基本培养基是较适合籼稻 YTB 成熟胚组织培养再生。刘元风等^[32]建立了适合 5 个籼稻品种成熟胚的高效植株再生体系,认为 N6 基本培养基有利于籼稻愈伤组织的诱导和继代培养,N6 中的大量元素和 MS 中的微量元素有利于愈伤组织的分化。籼稻组织培养的基本培养基种类比较多,这和籼稻的基因型差异有关。

2.3 激素配比

籼稻组织培养中各类激素的生理作用虽有相对专一性,但是诱导脱分化和再分化过程不是某类激素单独作用的结果,而需要一定的激素配比^[33]。研究发现,在添加 2 mg/L 2,4-D 的诱导培养基上生长的愈伤组织比较松软,一般不易分化,

但在诱导培养基和继代培养基上添加 NAA 和 KT 后,可以改进愈伤组织的质量,愈伤组织比较致密、较硬、颗粒状结构、易于分化,能够提高籼稻的再生频率^[34]。王子斌^[35]等以培矮 64S 和盐恢 559 成熟胚为外植体,研究发现在籼稻中存在着广泛的基因型影响,不同籼稻品种诱导产生愈伤组织的 2,4-D 最佳浓度不同。继代中适当提高 2,4-D 的浓度,既可得到较多颜色鲜艳的愈伤组织又可保证得到较多高分化能力的愈伤组织,分化培养基成分为改良 MS 培养基加 2.5 mg/L KT、0.1 mg/L NAA。周永国等^[36]以 9311 成熟胚为外植体,设计了 5 类诱导培养基,结果表明,9311 在添加 2,4-D 的诱导培养基上都能诱导出愈伤组织。采用 MSDAP 培养基培养,9311 成熟胚愈伤组织诱导率达 87.5%。分化采用 MS 基本培养基,并添加 3 mg/L 6-BA、1.5 mg/L NAA,分化率为 46.7%。由此可见,在籼稻组织培养中要把激素配比与基本培养基、材料基因型的差异给予针对性的优化,得出最佳的激素配比。

2.4 存在的问题及建议

2.4.1 褐化问题 很多籼稻品种在组织培养过程中存在愈伤组织褐化而使分化率和再生率降低的问题,因此,褐化问题一直是籼稻组织培养研究的重点。已有研究者针对籼稻 9311 组织培养中的褐化问题开展了相关研究。郝建琴等^[37]研究表明,9311 在愈伤组织诱导、继代和分化 3 个阶段分别添加山梨醇 10、20 和 40 g/L,分化率可以达到 86.1%;分化阶段添加 5.5 g/L 蔗糖和 40 g/L 山梨醇,愈伤组织分化率高达 82.7%~95.2%。可见山梨醇能够使愈伤组织保持良好的状态、抑制籼稻愈伤组织褐化并提高分化率。

2.4.2 愈伤继代周期短 已有研究表明^[38],诱导 2 周的 9311 愈伤颜色为淡黄色略发白,呈球形,致密且坚硬,诱导 17 d 的 9311 愈伤植株再生能力最高。由此得知,9311 愈伤的诱导和植株再生过程均受到培养基组成成分的影响,而愈伤继代培养时间的长短又对愈伤的生理状态产生影响,这些都严重制约着籼稻愈伤植株的再生能力。因此,在籼稻组织培养再生过程中要减少继代次数,随时观察愈伤的生长状态,及时分化再生。

3 小结

目前水稻组织培养常选用的外植体有花药、幼穗、幼胚、成熟胚等,其中成熟胚取材方便,不受季节限制、操作简单,获得的愈伤组织质量较高,在水稻组织培养研究中有着较为广阔的应用前景。水稻成熟胚愈伤组织的诱导和再生是组织培养中的关键环节,影响水稻胚性愈伤组织形成和植株再生能力的因素包括基因型、外植体、基本培养基、激素配比以及培养的环境和继代时间等多个方面,其中水稻的基因型和激素配比是最重要的影响因素。

水稻品种的组织培养要结合生产实际,研究主推水稻品种的组织培养再生体系,为后续的分子育种奠定基础,获得更多的分子育种改良材料。籼稻的褐化问题还需要投入更多的研究,籼稻的再生能力研究相比较粳稻来说具有复杂性。需要针对不同的品种,从培养基的成分,激素配比,培养条件,继代周期等方面综合考虑和优化。要建立规模化的水稻的组织培养体系,为功能基因验证、分子育种、基因编辑技术研究以及获得丰富的育种材料,培育出更多的适用于不同生态环境推广的优质、高产、多抗的水稻新品种奠定基础。

参考文献:

- [1] 赵凌,赵春芳,周丽慧.我国水稻生产概况分析[J].农业科学与技术:英文,2016,17(1):78-80.
- [2] 宋幼良,钱国壬,周幸愿.早籼稻新品系绍粳 122 及其高产栽培技术[J].甘肃农业科技,2016(4):78-80.
- [3] 郑红明.2016 年我国水稻生产发展报告[J].中国粮食经济,2016(12):37-40.
- [4] 王蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2004:1-2.
- [5] NIIZEKI H, ONO K. Induction of haploid rice plants from anther culture[J]. Crop Jap. Acad., 1968, 44: 554-557.
- [6] 张欣,付亚萍,周君莉.水稻规模化转基因技术体系构建与应用[J].中国农业科学,2014,47(21):4141-4154.
- [7] 景润春,卢洪. CRISPR/Cas9 基因组定向编辑技术的发展与在作物遗传育种中的应用[J].中国农业科学,2016,49(7):1219-1229.
- [8] 王继馨.黑龙江省优质早熟水稻幼穗组织培养试验

- [J]. 中国农学通报, 2001, 17(6): 76-77.
- [9] 李艳萍. 水稻花药培养创造水稻新质源[J]. 天津农业科学, 2007, 13(3): 32-34.
- [10] 沈娟, 徐利娟, 张启军, 等. 不同接种方式对水稻成熟胚组织培养的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 67-69.
- [11] 郑文静, 张燕之, 王昌华, 等. 水稻不同外植体组织培养的差异性及其后代变异的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1368-1370.
- [12] 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.
- [13] 王芳, 王螺, 张军, 等. 高留胚率水稻辽梗294成熟胚组织培养条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(5): 1033-1036.
- [14] 李素娟, 樊秀霞, 王华, 等. 水稻不同品种组培再生和转基因频率研究[J]. 核农学报, 2013, 27(12): 1817-1827.
- [15] LEE K, HYESUNG J, Minkyun K. Optimization of a mature embryo-based in vitro culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonicarice cultivars[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002 (71): 237-244.
- [16] 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.
- [17] 施利利, 张欣, 丁博, 等. 5个水稻品种的再生能力比较[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15180-15182.
- [18] 王敬东, 马洪爱, 马洪文, 等. 宁夏优质水稻品种D10高效再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 37-42.
- [19] 吴顺, 萧浪涛, 刘清, 等. 水稻愈伤组织中内源植物激素水平与遗传转化的关系[J]. 核农学报, 2009, 23(2): 257-261.
- [20] 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(3): 238-244.
- [21] 张秀香. 水稻成熟种子组织培养体系的优化和建立[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(12): 39-42.
- [22] 阎丽娜, 李霞, 蔡庆生. 水稻武育梗3号成熟胚愈伤组织诱导及其植株再生研究[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 67-69.
- [23] 魏晓东, 李霞, 周丽慧, 等. 糯性和半糯性水稻品种成熟胚组织培养力的比较[J]. 核农学报, 2012, 26(1): 6-10.
- [24] 童普国, 欧阳解秀, 阎新, 等. 1个组培特性优良的籼稻品种的发现及其农杆菌转化体系的建立[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2016, 42(3): 225-230.
- [25] 肖媛, 李落叶, 徐孟亮, 等. 根癌农杆菌介导籼稻9311遗传转化体系的建立[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2008, 31(3): 77-82.
- [26] 姜大刚, 付晓, 柳忠玉, 等. 几个温敏不育水稻品种组织培养特性的研究[J]. 种子, 2005, 24(4): 9-11.
- [27] 李霞, 陈婷, 周月兰. 籼梗稻成熟胚愈伤组织培养力的比较[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2005, 28(4): 103-108.
- [28] 王闵霞, 张志勇, 白玉路. 高效诱导及再生能力籼型水稻品系的筛选[J]. 西南农业学报, 2012, 25(1): 6-9.
- [29] 冯双华, 侯海军, 廖江, 等. 不同因素对水稻温敏核不育系香125S花药培养的影响[J]. 农业现代化研究, 2007, 28(3): 358-360.
- [30] 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.
- [31] 周杰, 王春台, 谭艳平, 等. 籼稻YTB成熟胚愈伤组织继代培养条件试验[J]. 广东农业科学, 2011(20): 1-4.
- [32] 刘元风, 刘彦卓, 贺红, 等. 几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 319-322.
- [33] 袁云香, 张莹. 水稻组织培养的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 83-86.
- [34] 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.
- [35] 王子斌, 潘学彪, 唐克轩, 等. 提高籼稻品种组织培养效果的研究[J]. 扬州大学学报: 自然科学版, 2001, 4(2): 37-41.
- [36] 周永国, 尹中明, 沈忠伟, 等. 籼稻成熟胚再生体系[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2007, 36(4): 71-77.
- [37] 郝建琴, 许语辉, 黄敏, 等. 山梨醇对栽培稻成熟胚愈伤组织分化的影响[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(8): 983-991.
- [38] 李素娟. 水稻成熟胚组织培养能力遗传机制的相关研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.