



研究论文

Research Article

水稻休眠芽再生无性繁殖体系的构建

吕永刚¹, 甘树仙¹, 冯德党¹, 董陈文华¹, 熊海波¹, 朱骞¹, 张小玲¹, 魏振飞¹, 曹迎杰¹, 张利东¹, 伍腾飞¹, 李东宣^{1,2}, 陈丽娟^{1,2}

1. 云南农业大学稻作研究所, 昆明, 650201
2. 云南省高校滇型杂交粳稻分子育种重点实验室, 昆明, 650201

✉ 通讯作者: chenlijuan@hotmail.com; dong_east@ynu.ac.kr; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 6 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0006

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

吕永刚等, 2013, 水稻休眠芽再生无性繁殖体系的构建, 分子植物育种(online), 11(6): 1032-1041 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0006)

引用格式(英文):

lv et al., 2013, The Establishment of Asexual Propagation System Based on Rice Dormant Buds Regeneration, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(6): 1032-1041 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0006)

摘要 水稻休眠芽具有发育成完整水稻植株的潜能, 是水稻再生繁殖的基础。本研究在头季稻收获后, 截取植株地上茎节部分(含倒 1~倒 3 节点休眠芽)为实验材料, 比较通过激素处理、无激素处理、直接移栽稻桩以及种子萌发所获植株的各性状及生理指标差异。结果表明: 不论是否通过激素处理, 带有节点休眠芽离体稻秆的再生效率都极显著优于模拟再生稻而直接移栽的稻桩, 其成苗率及再生植株的叶绿素含量、叶面积、穗长、单穗谷粒数等都大幅度提高。离体稻秆通过激素处理所获植株的各性状略好于无激素处理的再生植株, 但与种子萌发的正常植株差异不显著。该研究初步建立了一套水稻休眠芽再生无性繁殖技术体系, 能基本解决特殊材料的繁育以及现有再生稻产量不稳定和生产效率普遍偏低等难题, 为丰富水稻无性繁殖技术提供了新思路。

关键词 水稻; 休眠芽; 植物激素; 再生; 无性繁殖

The Establishment of Asexual Propagation System Based on Rice Dormant Buds Regeneration

lv Yonggang¹, gan Shuxian¹, feng Dedang¹, dong Chenwenhua¹, xiong Haibo¹, zhu Qian¹, zhang Xiaoling¹, wei Zhenfei¹, cao Yingjie¹, zhang Lidong¹, wu Tenfei¹, lee Dongsun^{1,2}, chen Lijuan^{1,2}

1. Rice Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201, P.R. China
2. Key Lab of Molecular Breeding for Dian-Type Japonica Hybrid Rice of Yunnan Education Department, Kunming, 650201, P.R. China

✉ Corresponding authors, chenlijuan@hotmail.com; dong_east@ynu.ac.kr; ✉ Authors

Abstract The rice dormant bud is the basis for rice reproduction and regeneration, and it has the potential to develop into a complete plant. In this study, the rice stems including dormant buds of the last three internodes from different varieties intercepted after the first season rice harvested were used as the research material. Feasibility and superiority of asexual propagation system was analyzed based on the difference in various traits and physiological parameters were compared among seedlings derived by, hormone treatment, non hormone treatment, directly transplanted rice stubble and seeding. The result reveals that rice stems with dormant buds, regardless of hormone treatment, had significantly higher seedling regeneration efficiency than directly transplanted rice stubbles which imitate ratooning rice, and it also showed a greatly improve the seedling regeneration rate and increased chlorophyll content, leaf area, panicle length and grains per panicle in the regenerated seedlings. Hormone treatment slightly improved the performance of the plants obtained from rice stems *in vitro* than non-hormone treated control, but similar with the plants from seed

收稿日期: 2013 年 04 月 08 日

接受日期: 2013 年 04 月 11 日

发表日期: 2013 年 05 月 07 日

基金项目: 本研究由 NSFC-云南联合基金重点项目(U1136604)、国家重点基础研究 973 项目(2011CB1-00401)和云南省基金重点项目(2006C006Z)共同资助



germination. Overall results of the present study established a preliminary asexual propagation system based on rice dormant buds regeneration. It basically solves the difficult problems such as propagation of some especial materials (e.g. FS, MS, F₁), instability yield and generally low production efficiency of the existing ratoon rice et al., and provides a new insight into rice asexual propagation techniques.

Keywords Rice (*Oryza sativa* L.); Dormant buds; Plant hormones; Regeneration; Asexual propagation

研究背景

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一,其产量直接影响世界粮食安全。要保障粮食产量稳步增长,就需要通过各种途径不断发掘新的种质资源,开拓新的生产技术,寻求经济而高效的生产模式。因此实现这一目标,就需在水稻的生产链上取得新的突破。再生稻的大面积推广、单基因控制的水稻雌性不育突变材料的发现和深入研究、新杂交制种模式的探索和提出,并以此探寻的新杂交育种模式等一系列研究都为我们提供了良好的发展思路。利用水稻带有节点休眠芽的离体稻秆进行育苗培养具有材料来源广,取材简单、快捷,而且结合外源植物激素使用和散播覆土培育方法简单和操作方便等优点,因而是一种在田间进行无性繁殖较理想的实验材料。1965年,Amemiya等开始水稻组织培养,几十年来,研究者先后从水稻各部位诱导出愈伤组织和再生植株(Nishi et al., 1968),目前用于水稻组织培养的外植体主要是成熟胚(阎丽娜等, 2010; 黄赛麟等, 2008)、幼胚(Hiei and Komari, 2008)、花药(Roy and Mandal, 2005)、幼穗(Shu et al., 2000; 王亚琴等, 2004)四种。但这些外植体研究目前尚未能完全脱离实验室,真正应用于实际生产的水稻类型或者生产上主推水稻品种的研究尚不多见,利用水稻上带有节点休眠芽的离体稻秆进行大田规模化育苗培养的研究未见报道。杨开渠首先利用水稻休眠芽的再生特性,开启了国内再生稻的生产研究(杨开渠, 1958, 农业学报, 9(2): 286-329)。研究表明头季稻稻桩倒1至倒3节点上的休眠芽芽都有较强的活力,表现为存活率高,干物重大等(施能浦, 1995),具有很大的再生潜力。为了提高再生效率和产量育种科学家借助一些外源植物激素对内源激素进行调节。植物激素对于植物的生长发育起着至关重要的作用,它几乎参与了植物生长发育的所有生理过程的调节:从细胞的生长、分裂和分化,到休眠、果实发育、性别分化和衰老及抗逆性等。有研究表明,休眠芽的萌发生长与内源激素有密切关系:内源细胞分裂素促进休眠芽的萌发(李经勇和唐永群, 2002),赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)的含量和相互间的平衡也影响着休眠芽的萌发生长(禹利君 1033

等, 2008)。许多相关研究(Gubler et al., 2005; Rodríguez-Gacio et al., 2009)均指出,植物体内ABA的含量在解除休眠过程中有很大变化,cABA和fABA自由形式间存在逆反关系。当处于休眠状态时,ABA主要以自由形式(fABA)存在,而芽萌发时则多以结合形式(cABA)存在;一旦解除休眠进入生长状态以后,fABA所占的比例更少,cABA/fABA值显著增加,这可能与fABA含量的减少、某些基因开启及DNA复制加强有关。研究还表明,植物激素参与调控水稻株高、分蘖、光合生产力等生长发育过程,而这些生长发育与水稻的产量有密切的关系(蔡传杰和陈善娜, 2001)。在双子叶植物的研究中发现,生长素(IAA)和细胞分裂素(CTK)在植物侧芽的生长过程中起关键作用(Chatfield et al., 2000; Shimizu-Sato and Mori, 2001)。Leopold(1949)认为禾本科作物同样受IAA主导的顶端优势影响,IAA抑制分蘖的发生,去除或削弱IAA活性可以解除顶端优势对分蘖生长的抑制。与IAA相反,外源施用CTK可以刺激分蘖的生长。但是,IAA可以抑制CTK对分蘖生长的促进效应(Anger et al., 1973)。水稻子粒中生长素含量与其灌浆过程密切相关,子粒中生长素主要在水稻灌浆前期起作用,并在很大程度上决定着水稻的维管发育状况、叶片光合能力及子粒灌浆速率,与水稻产量形成关系密切。吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)等外源激素对水稻增产效果十分明显。综上所述,以水稻上带有节点休眠芽的离体稻秆为材料,不仅可以充分利用休眠芽的再生潜能,而且还可实现完全脱离实验室在大田进行大规模的再生育苗,再结合一些外源植物激素使用还可以大大提高生产效率。但至今此方面的研究尚少,且相关繁育技术体系应用于实际生产还有相当的距离。

水稻雄性不育(male sterility, MS)和雌性不育(female sterility, FS)的发现及利用,杂交水稻的生产和发展都是保障粮食安全的重要举措。目前,在水稻杂交育种中,主要的技术体系是三系法和两系法,虽然这些体系都已较为成熟,但仍存在一些缺陷,主要体现在以下几点:(1)父母本分行或分区种植,开花时须人工赶粉辅助授粉,收获时父母本人工分

收, 费时费工; (2)制种产量低, 不能很好解决种子混杂问题; (3)不适宜规模化、机械化操作等。基于此, 可见杂交育种过程也需要耗费巨大的物力、人力以及漫长的育种周期。随着雌性全不育隐性单基因控制的水稻雌性不育突变体材料(*fsr*) (由于胚珠和合子体分化发育异常导致完全败育, 但雄性器官花粉发育正常)发现和育种中的应用(Lee et al., 2013), 利用雄性不育(MS)和雌性不育(FS), 构建“MS+FS”的制种模式, 即制种时的花粉供体为雌性不育系(陈丽娟等, 2009), 也有望在不久后继三系和两系杂交的又一育种模式进行大规模的推广和应用。但问题在于其花粉供体是雌性不育系, 不能正常结实获得大量的父本群体。因此, 这种“MS+FS”制种模式能否得到成功应用, 取决于能否获得大量的雌性不育株。还有一些特殊稀贵材料(如单体和三体以及多倍体, 自交不亲和等材料), 由于自身的特点不能通过有性生殖的方式进行繁殖或不易繁殖。无性繁殖技术以及基因工程等是目前如何获得这些特殊材料最常用的方法途径。植物无性繁殖的方法中以组织培养在水稻中的应用最为广泛。但水稻组织培养也具有较大的局限性: 幼胚、幼穗、花粉其取材受季节和环境的限制, 取材时间严格, 过早或过晚都会导致愈伤诱导失败; 组织培养过程中容易出现死亡、白化等情况, 难以获得大量的组培苗, 且组培苗相对较弱, 移栽到大田成活率得不到保障, 同时对于大规模的生产成本高; 组织培养目前也主要局限于实验室的研究, 难以实现完全的室外生产。另一种被广泛应用的途径是利用水稻茎秆上的节点休眠芽再生进行无性繁殖, 最典型的是再生稻的研究和推广。但目前再生稻仅限于在田间直接利用稻桩简单再生, 不仅没有充分利用休眠芽, 而且产量和生产效益也普遍偏低。通过如何合理挖掘水稻休

眠芽的再生潜能, 提高休眠芽的再生率和存活率以及再生植株的产量等方面入手, 建立一套高效实用的无性繁殖体系还有待进一步深入研究。

本研究以水稻带休眠芽的离体稻秆为研究材料, 通过数轮筛选适应范围较广的适宜外源植物激素组合及配比, 对不同处理方式下获得再生植株的苗期、营养生长和生殖生长时期以及成熟期的各农艺性状和生理指标进行比较, 阐述激素诱导离体休眠芽再生繁殖的可行性与高效性。本研究旨在克服现有水稻再生产量不稳定、产量和生产效益普遍偏低, 以及特殊材料繁殖困难等生产和繁育技术难题, 初步建立了一套完整的水稻休眠芽再生无性繁殖体系, 不仅丰富了水稻无性繁殖的技术途径, 同时也为“MS+FS”制种模式的应用推广奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 适宜植物激素及组合配比筛选

1.1.1 第一轮筛选结果

(1)激素单独使用时(表1), Kinetin浓度为9mg/L时出苗率最高为36%; NAA浓度为15mg/L时出苗率达到38%, 且随着浓度的升高出苗率还有增高的趋势; 6-BA浓度为9mg/L时出苗率最高为37% (图1A)。(2)组合激素使用时(表1), DK组合: 0.1mg/L 2,4-D+(2.0~4.0) mg/L Kinetin, 其出苗率均高于40% (图1B); NB组合: 0.1 mg/L NAA+(7.0~12.0) mg/L 6-BA, 出苗率均高于40% (图1B); KN组合: 10.0 mg/L Kinetin +(1.0~6.0) mg/L NAA, 出苗率均高于40% (图1A)。结果表明, 植物激素组合使用的出苗率总体高于单独使用, 这与王冬梅等(1996)、Rueb等(1994)的研究结果一致, 部分浓度区段效果较好, 都可进一步筛选。

表1 第一轮筛选所用的激素、激素组合及浓度

Table 1 The first round of screening applied plant hormone, plant hormone combination and concentration

激素配比 Hormone combination	浓度 Concentration					
	1 mg/L	3 mg/L	6 mg/L	9 mg/L	12 mg/L	15 mg/L
Kinetin (KIN)	KIN1	KIN2	KIN3	KIN4	KIN5	KIN6
6-BA (BA)	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6
NAA (NAA)	NAA1	NAA2	NAA3	NAA4	NAA5	NAA6
0.1 mg/L NAA + Kinetin (NK)	NK1	NK2	NK3	NK4	NK5	NK6
0.1 mg/L 2,4-D+Kinetin (DK)	DK1	DK2	DK3	DK4	DK5	DK6
0.1 mg/L NAA + 6-BA (NB)	NB1	NB2	NB3	NB4	NB5	NB6
0.1 mg/L 2,4-D + 6-BA (DB)	DB1	DB2	DB3	DB4	DB5	DB6
10 mg/L Kinetin+ NAA (KN)	KN1	KN2	KN3	KN4	KN5	KN6

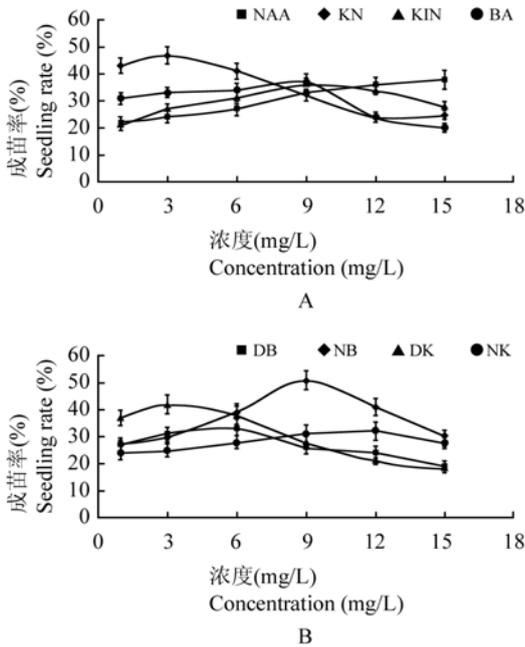


图 1 第一轮不同激素及组合溶液的不同配比对水稻材料处理的出苗率

Figure 1 The first round of screening seedling regeneration rate of the different materials treated with different concentrations of plant hormones solution

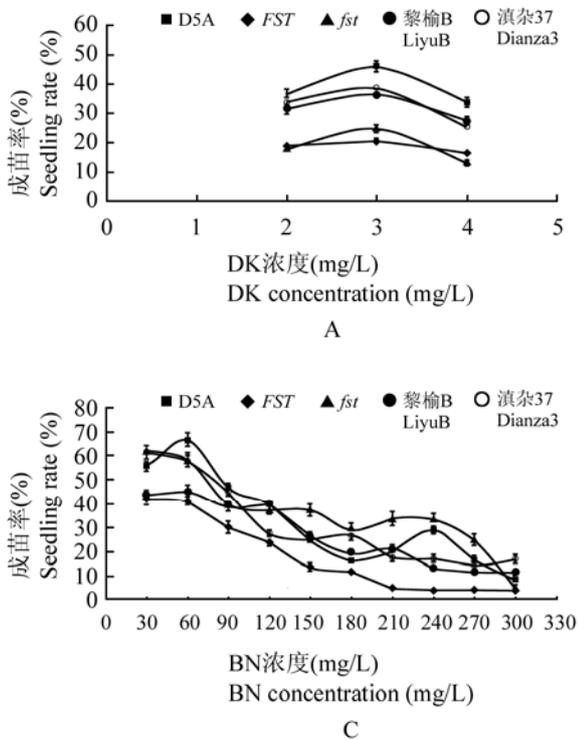


图 2 第二轮筛选 DK(A)、NB(B)、BN(C)、KN(D)溶液不同浓度处理的成苗率

Figure 2 The second round of screening seedling regeneration rate of the different materials treated with different concentrations of DK(A), NB(B), BN(C) and KN(D) solution

1.1.2 第二轮筛选结果

结果发现: DK(图 2A)组合(0.1 mg/L 2,4-D + Kinetin), 只有 Kinetin 浓度在(2.5~3.5) mg/L 时 D5A 的出苗率高于 40%,其余的出苗率都低于 40%,结果均不理想; NB(图 2B)组合(0.1 mg/L NAA + 6-BA), 当 6-BA 浓度在(10.0~12.0) mg/L 时, 各材料的出苗率均高于 40%, 为适宜的植物激素组合配比; BN(图 2C)组合(0.25 mg/L 6-BA + NAA), 当 NAA 浓度在(30.0~60.0) mg/L 时, 各材料的出苗率均高于 40%, 为适宜的植物激素组合配比; KN(图 2D)组合(10 mg/L Kinetin+NAA), 当 NAA 浓度在(2.0~5.0) mg/L 时, 各材料的出苗率均高于 40%, 为适宜的植物激素组合配比。

综合 *FST*、*fst*、D5A、黎榆 B 和滇杂 37 考虑: 0.1 mg/L NAA+(10.0~12.0) mg/L 6-BA、0.25 mg/L 6-BA+(30~60) mg/L NAA、10mg/L Kinetin+(2.0~5.0) mg/L NAA 出苗率较高, 为适宜的植物激素组合配比, 均能诱导带休眠芽的稻秆出苗, 取得出苗率在 40%~67%之间的好效果。

1.2 各材料不同处理的成苗率、干物重、穗长与穗粒数差异

总体上看(表 2),各材料的离体稻秆通过植物激素处理,其成苗率极显著低于种子直接萌发(P<0.01),与无植物激素处理相比差异不显著(P>0.05),但极显著高于稻桩(P<0.01);不同处理的各材料分蘖盛期地上部分干物重,差异基本上不显著(P>0.05),只有用种子萌发所得 D5A 显著高于无激素处理(P<0.05)。此外,结果显示(表 3)各材料通过植物激素处理的再生株穗长和穗粒数都极显著优

于稻桩再生株(P<0.01),略好于无植物激素的再生株,但差异不显著(P>0.05),和种子萌发的植株相比差异也不显著(P>0.05)。表明带休眠芽的离体稻秆通过植物激素处理的成苗率明显不如用种子萌发的效率,但略好于无激素处理,极显著优于稻桩;不论是否通过植物激素处理还是种子萌发所获得的植株,其干物重差异都不明显;通过植物激素处理获得的植株穗长和单穗谷粒数都极显著优于稻桩直接再生的植株。

表 2 各材料不同处理的成苗率和干物重

Table 2 The seedling rate and dry weight of different varieties in different treatments

处理 Treatment	成苗率(%) Seedling rate (%)				干物重(g) Dry weight (g)			
	<i>fst</i>	D5A	黎榆 B LiyuB	滇杂 37 Dianza37	<i>fst</i>	D5A	黎榆 B LiyuB	滇杂 37 Dianza37
稻桩对照 Rice stubble CK	29.5 bB	31.6 cC	25.0 cC	23.5 dBC				
激素处理 Hormone treatment	59.0 aA	62.5 bB	46.4 bB	56.0 bB	7.94 aA	9.82 abA	11.18 aA	8.36 aA
无激素对照 Non hormone CK	43.5 aAB	47.0 bcBC	40.2 bB	37.8 cBC	5.48 aA	6.76 bA	8.09 aA	6.77 aA
种子苗对照 Seeding CK		96.0 aA	93.5 aA	94.0 aA		10.22 aA	10.80 aA	9.92 aA

注: 竖栏中相同字母表示差异不显著; 不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平不同大写字母表示差异达 0.01 显著水平
 Note: Within the same column, data followed by common letters are not significantly different at 0.05 or 0.01 levels; Data followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 levels; Data followed by different uppercase letters show dramatically significant differences at 0.01 levels

表 3 各材料不同处理的穗长和穗粒数

Table 3 The panicle length and kernel number of different varieties in different treatments

处理 Treatment	穗长(cm) Panicle length (cm)				穗粒数(粒/穗) Kernel number (grains/panicle)			
	<i>fst</i>	D5A	黎榆 B LiyuB	滇杂 37 Dianza37	<i>fst</i>	D5A	黎榆 B LiyuB	滇杂 37 Dianza37
稻桩对照 Rice stubble CK	15.5 bB	18.3 bB	16.5 bA	15.5 bB	86.5 bB	106.0 bC	94.5 bB	90.0 bB
激素处理 Hormone treatment	21.5 aA	23.0 aA	21.5 aA	21.5 aA	206.5 aA	237.0 aA	201.0 aA	171.5 aA
无激素对照 Non hormone CK	20.0 aA	21.5 aAB	21.0 aA	20.0 aAB	204.0 aA	217.0 aA	187.0 aA	146.0 aA
种子苗对照 Seeding CK		21.0 aAB	19.5 aA	21.5 aA		196.5 aBC	183.5 aA	163.0 aA

注: 竖栏中相同字母表示差异不显著; 不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平不同大写字母表示差异达 0.01 显著水平
 Note; Within the same column, data followed by common letters are not significantly different at 0.05 or 0.01 levels; Data followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 levels; Data followed by different uppercase letters show dramatically significant differences at 0.01 levels



1.3 各材料不同处理的叶绿素含量和叶面积差异

值得注意的是(表 4), 各材料的离体稻秆通过植物激素处理、无植物激素处理和种子萌发所获植株, 其分蘖盛期所含的叶绿素含量和功能叶叶面积都基本上极显著优于稻桩直接再生的植株($P < 0.01$)。而通过激素处理获植株的叶绿素含量和功能叶的

叶面积都显著优于无激素处理所获植株($P < 0.05$), 却种子发芽的植株没有明显差异($P > 0.05$)。表明离体稻秆通过植物激素处理所获植株的叶绿素含量及功能叶叶面积与种子萌发的植株差异不明显, 但显著高于无激素处理所获植株和极显著高于稻桩再生植株。

表 4 各材料不同处理分蘖盛期的叶绿素含量、叶面积差异

Table 4 The leaf area and chlorophyll of different varieties in different treatments

处理 Treatment	叶绿素(mg/g) Chlorophyll (mg/g)				叶面积(cm ²) Leaf area (cm ²)			
	<i>fst</i>	D5A	黎榆 B LiyuB	滇杂 37 Dianza37	<i>fst</i>	D5A	黎榆 B LiyuB	滇杂 37 Dianza37
稻桩对照 Rice stubble CK	8.311 cB	8.154 cB	8.032 cB	8.003 cB	86.5 bB	106.0 bC	94.5 bB	90.0 bB
激素处理 Hormone treatment	10.797aA	11.264 aA	10.624 aA	10.758 aA	206.5 aA	237.0 aA	201.0 aA	171.5 aA
无激素对照 Non hormone CK	10.390bA	10.187 bA	9.655 bA	9.636 bA	204.0 aA	217.0 aA	187.0 aA	146.0 aA
种子苗对照 Seeding CK		10.971 aA	10.402 cbA	10.903 aA		196.5 aBC	183.5 aA	163.0 aA

注: 竖栏中相同字母表示差异不显著; 不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平不同大写字母表示差异达 0.01 显著水平

Note: Within the same column, data followed by common letters are not significantly different at 0.05 or 0.01 levels; Data followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 levels; Data followed by different uppercase letters show dramatically significant differences at 0.01 levels

1.4 初步建立完整的水稻休眠芽无性繁殖体系

经反复验证, 本研究已初步建立了一套完整的水稻休眠芽无性繁殖技术体系(图 3)。带有休眠芽的离体稻秆经筛选出适宜植物激素组合浸泡处理(图 3A), 之后散播于育苗棚或育苗床上覆土培育(图 3B), 待 3 叶~4 叶期移栽至大田, 同水稻常规大田栽培管理方法进行大田栽培管理就可获得大批量的再生植株(图 3C~图 3F)。表明以带休眠芽的离体稻秆为材料, 经外源植物激素处理获得再生植株的繁殖技术体系有效、可行。



图 3 水稻休眠芽无性繁殖体系图解

注: A: 植物激素处理; B: 覆土培育; C: 3 叶~4 叶期; D-F: 大田栽培

Figure 3 Illustrated diagram of the asexual propagation system based on rice dormant buds

Note: A: Exogenous plant hormone treatments; B: Overburden nurture; C: 3 to 4 leaf stage; D-F: Field cultivation

2 讨论

2.1 构建水稻休眠芽再生繁殖体系的优势

水稻组织培养的特点限制了其难以挣脱实验室的束缚, 实现大规模田间无性育苗。再生稻的发展虽然已有了相当的规模, 但还没有充分挖掘和利用水稻休眠芽的再生潜能, 且生产效率也普遍偏低。这些不仅是制约水稻再生育苗发展的瓶颈, 也是主推和特殊水稻品种再生生产效率低下的主要

限制因素之一。那么就急需找到一种适宜的室外培育材料和一套高效合理的再生繁殖技术体系。现已有不少的外植体被应用于组织培养(Mikami and Kinoshita, 1988), 但适合于实验室外进行大规模再生繁育的培育材料, 至今仍待继续探寻。植物的休眠芽作为一种优良的快繁材料在甘蔗的生产研究中应用的最为广泛也较成熟(曾吉恕, 1987, 作物杂志, 2: 32-33; 李富生等, 2000, 种子, (3): 41-45; Cheema and Hussain, 2004), 它既可以用作原材料在实验室进行组织培养, 也可以在田间直接掩埋上一季带有休眠芽的甘蔗杆来获得再生植株。在水稻研究中, 利用休眠芽特性发展起来的再生稻研究也初具规模, 但目前多局限于在田间直接利用稻桩进行简单的再生, 再生效率和产量都面临严峻挑战。虽然也有不少的研究借助于植物激素的使用来增加产量和生产效率, 但是也只是得到了小幅度的提升。因为其没有充分利用水稻不同节位上休眠芽、稻秆节点处的根发育系统、土壤养分的重复利用以及再生株生长空间狭小等。再生稻的生产利用虽然具有一定的局限性, 但同时也具有相当大的发掘潜力。本研究利用带有休眠芽的离体稻秆培育, 与稻桩直接再生相比, 不仅大大提高了各节位休眠芽的存活率和再生率, 而且穗部性状得到明显改善, 每穗谷粒数也明显增多, 因此说明若直接利用头季稻稻桩再生, 其再生植株的生根区、叶形态建成和穗部发育可能都将受到营养供应等条件的限制, 这与易镇邪等(2008)研究结果一致。

此外, 本技术体系实施过程中仅需要少量的外源植物激素, 相对于组织培养及三系和两系杂交制种大大降低了生产成本。以田间行、株距为 15cm×15cm, 每平方米单株种植 49 株为基准, 本技术体系所用 1 亩头季稻稻秆的出苗量可供 20~25 亩移栽用苗所需, 虽然相对于直接利用种子萌发移栽, 其繁殖系数仍较低, 但对于提高再生稻生产效率和一些用量较小的水稻材料繁育以及特殊材料的繁殖应用, 特别是在“MS+FS”制种模式的应用推广中, 此繁殖系数完全可以满足生产需求。因此, 本技术体系若应用到水稻实际生产中, 仍具有其可行性和高效性。

2.2 提高水稻休眠芽再生繁殖体系生产效率的关键

本研究结果表明, 将水稻休眠芽再生繁殖体系应用于生产, 主要应考虑以下几个关键问题。其

一, 生育期的调整。这可以通过选择生育期较短的品种(组合)或提早播种期等方法来解决。其二, 材料的整齐度问题。因为离体的稻秆包含不同节位的休眠芽, 可能会出现同一批取材的休眠芽出芽先后不同, 以致后期再生植株参差不齐。头季稻稻桩上不同节位干物质积累、碳水化合物和内源激素等含量存在显著差异(张桂莲等, 2005; 周文新等, 2008), 结果会出现低位芽萌发早、生长缓慢, 高位芽萌发晚但生长快, 因此可通过利用不同外源植物激素和施加不同源的肥料来调节内源激素和库源来平衡休眠芽的出芽速率。也可以采取不同节位分别培育的方法来调整整齐度。其三, 再生苗的成苗效率和成活率以及再生植株增产问题。水稻休眠芽的萌发与生长发育受植物激素的调控, 使用外源植物激素可能会对内源激素的含量产生相应的影响, 从而通过内源植物激素的变化调节休眠芽的萌发及再生植株的生长发育。本研究结果表明使用 6-BA、NAA、CTK 等不仅提高了成苗率, 还提高了叶绿素含量、叶面积、穗长、穗粒数等主要指标, 其原因可能是 6-BA、CTK 可以持续不断地刺激根芽细胞, 使细胞增殖保持在最快阶段, 促进节点处根的发育和再生苗的形成(Li et al., 2006)。然而现阶段对施用外源植物激素对内源激素的影响及与休眠芽萌发和生长关系的研究还较少, 具体的影响机理还有待继续深入研究。

为完善水稻休眠芽再生繁殖技术体系的理论和实践, 我们将继续深入研究施用外源植物激素对内源激素的影响机理; 研究探明连续多代再生是否存在遗传力衰退的情况; 实施品种配套再生繁育, 为“MS+FS”制种模式的应用推广做好基础准备。

2.3 离体节点休眠芽再生无性繁殖体系的应用前景

研究表明, 将头季稻带休眠芽的离体稻秆进行培育再生与稻桩直接再生的效果差异显著: 前者主要充分利用了各个节位的休眠芽以及各节点处的根再生系统, 且重新移栽可以通过控制移栽的密度来调控植株间的生长空间, 再结合外源植物激素的应用大大提高了生产效率, 因此该体系展现出了良好的发展潜力。在再生繁殖技术体系推广中, 就是要方法简单方便高效, 农民易接受。而本研究的技术方案不仅方法简单易懂, 且高效成本低, 因此, 在一些特殊材料的繁殖, 主推品种的再生生产以及未来杂交水稻“MS+FS”的



新型制种模式中都具有很好的应用前景, 将成为再生繁殖利用的主要途径。

3 材料与amp;方法

3.1 试验材料

经筛选, 本研究以水稻雌性核不育突变型品系(*fs*, *female sterility*)及其野生型品系(*FST*, *FEMAIE STERILITY*)、细胞质雄性不育系(滇粳优 5 号 A (D5A))、常规品种(黎榆 B)和杂种 F_1 (滇杂 37)各 1 份为试验材料。研究于 2011 年至 2012 年在云南农业大学(25.0°N, 102.7°E, 1895 masl.)和云南新平县夏洒镇(24.0°N, 101.3°E, 572 masl.)不同稻作生态试验田进行。

3.2 材料的处理与移植

头季稻收获后 7 d 以内, 截取供试材料带有倒 1~倒 3 节点休眠芽的离体稻秆; 稻秆洗净后散播在育苗床上并覆土, 按水稻常规苗床育秧方法进行育苗和管理, 或稻秆洗净后用植物激素组合浸泡 45~50 h, 再散播在育苗床上并覆土, 按水稻常规苗床育秧方法进行育苗和管理; 待再生苗 3 叶~4 叶期移栽大田, 按水稻常规大田栽培管理方法进行大田栽培管理。

3.3 适宜植物激素及组合配比筛选

3.3.1 第一轮筛选

头季稻收获后 7 d 以内, 截取供试材料带有倒 1~倒 3 节点休眠芽的离体稻秆, 洗净并等量混合各材料的稻秆, 分别用不同浓度的植物激素及组合溶液浸泡 48 h 处理; 将处理后的稻秆均匀散播在育苗床上覆土, 按水稻常规苗床育秧方法进行育苗和管理; 待再生苗 3 叶~4 叶期分别统计出苗率, 初筛出较好的激素及组合溶液配比。

3.3.2 第二轮筛选

将获得的效果较好的激素及组合, 方法同第一轮筛选, 经第二轮筛选出适宜的组合及配比。

3.4 测定项目

3.4.1 考察出苗率、干物重、穗长和穗粒数

3 叶~4 叶期统计各材料稻桩、带休眠芽的离体稻秆以及种子萌发的出苗率。分蘖盛期分别取长势相当的材料整株地上部分, 先 100℃烘箱中杀青 1 h, 然后置于 80℃烘干至恒重, 称重。成熟期考察穗长和单穗谷粒数。

3.4.2 测定叶片叶绿素

分蘖盛期分别取各材料的新鲜叶片, 去除叶脉后用电子分析天平精确称量 0.05 g, 剪碎后浸泡于装有 80%丙酮的 20 mL 容量瓶中, 做 3 次重复。密封置于 4℃冰箱中浸提叶绿素约 48 h 后, 用 80%的丙酮定容混匀, 取浸提液用紫外可见分光光度计测定波长 663 nm、646 nm 和 470 nm 浸提液吸光值, 按 Lichtenthaler (1987)的方法, 测定和计算叶片单位鲜重的叶绿素 *chl*_a、*chl*_b 和 β -Car 的含量。

3.4.3 测定叶面积

分蘖盛期分别取各材料的剑叶或倒二叶, 按陶洪斌和林杉(2006)的打孔称重法, 用孔径 5 mm 的单孔打孔器分别从距叶梢和叶柄 2 cm 处开始顺次打孔, 每片叶片共打孔 20 次, 并注意避开中心叶脉和已经枯萎的部分, 将打下的圆形叶片计数并装入纸袋烘干(75℃下烘 48 h)、称重(W_1 , 单位: g); 打孔后的叶片装入纸袋烘干、称重(W_2 , 单位: g)。计算公式为: 叶面积(cm^2)= $(W_1+W_2) \times \text{打孔数} \times r^2 \times 10^{-2} / W_1$, 其中: r 为打孔器的半径, 这里为 2.5 mm。

3.5 数据处理

数据处理和方差分析采用 Microsoft Excel 和 SPSS17.0 软件完成, 图表中数据均为各处理的平均值 \pm 平均值标准误。

作者贡献

吕永刚和李东宣是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 吕永刚完成数据分析, 论文初稿的写作; 甘树仙、冯德党、董文华、熊海波、朱骞、张小玲、魏振飞、曹迎杰、张利东、伍腾飞参与部分大田试验及实验结果分析; 陈丽娟和李东宣是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究得到了 NSFC-云南联合基金重点项目(U1136604)、国家重点基础研究 973 项目(2011CB1-00401)和云南省基金重点项目(2006C006Z)共同资助。

参考文献

- Anger R.H.M., Prasad P.C., Laude H.M., 1973, Effects of kinetin on tiller bud elongation in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Ann. Bot.*, 37(3): 565-571
- Cai C.J., and Chen S.N., 2001, Advanced in studying of plant hormone, *Yunnan Daxue Xuebao (Journal of Yunnan University)*, 23: 99-101,112 (蔡传杰, 陈善娜, 2001, 植物激素的研究进展, 云南大学学报(自然科学版), 23: 99-101, 112)

- Chatfield S.P., Stirnberg P., Forde B.G., and Leyser O., 2000, The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 24(2): 159-169
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00862.x>
 PMid:11069691
- Cheema K.L., and Hussain M., 2004, Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud, *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(2): 257-259
- Chen L.J., Lee D.S., Li C.Y., Tan X.L., Xu X.Z., and Zhu Y.Y., 2009, Method of female sterility gene *FST* for hybrid rice breeding, China Patent, 200910094988 (陈丽娟, 李东宣, 李成云, 谭学林, 徐学洙, 朱有勇, 2009, 雌性不育基因 *FST* 用于杂交水稻育种的方法, 中国专利, 200910094988)
- Gubler F., Millar A.A., and Jacobsen J.V., 2005, Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8(2): 183-187
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.011>
 PMid:15752999
- Hiei Y., and Komari T., 2008, Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed, *Nat. Protoc.*, 3(5): 824-834
<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.46>
 PMid:18451790
- Huang S.L., Lee D.S., Gan S.X., Zhu J.R., Li J., Liang J., and Chen L.J., 2008, Innovation of high effective regeneration system for matured embryo *in vitro* culture of rice, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(4): 801-806 (黄赛麟, 李东宣, 甘树仙, 朱建荣, 李娟, 梁晶, 陈丽娟, 2008, 水稻成熟胚培养高效再生系统的创新, *分子植物育种*, 6(4): 801-806)
- Lee D.S., Chen L.J., Li C.Y., Liu Y.S., Tan X.L., Lu B.R., Li J., Gan S.X., Kang S.G., Suh H.S., and Zhu Y.Y., 2013, The B_{sister} MADS gene *FST* determines ovule patterning and development of the zygotic embryo and endosperm, *PLoS One*, 8(3): e58748
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058748>
 PMid:23527017 PMCid:3602522
- Leopold A., 1949, The control of tillering in grasses by auxin, *American Journal of Botany*, 36(6): 437-440
<http://dx.doi.org/10.2307/2438077>
 PMid:18151120
- Li J.Y., and Tang Y.Q., 2002, Relation of change in content of plant endogenous cytokinin to germination and growth of ratooning buds in hybrid rice, *Zajiao Shuidao (Hybrid rice)*, 17(3): 50-52 (李经勇, 唐永群, 2002, 杂交水稻再生芽萌发生长与植株内源细胞分裂素含量变化的关系, 杂交水稻, 17(3): 50-52)
- Li X., Mo X.R., Shou H.X., and Wu P., 2006, Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, 47(8): 1112-1123
<http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcj082>
 PMid:16854941
- Lichtenthaler H.K., 1987, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes, In: Packer L., and Douce R. (eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, pp.350-382
- Mikami T., and Kinoshita T., 1988, Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell*, 12(3): 311-314
- Nishi T., Yamada Y., and Takahashi E., 1968, Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus, *Nature.*, 219(5153): 508-509
<http://dx.doi.org/10.1038/219508a0>
 PMid:5668441
- Rodríguez-Gacio M.C., Matilla-Vázquez M.A., and Matilla A.J., 2009, Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on, *Plant Signal. Behav.*, 4(11): 1035-1049
<http://dx.doi.org/10.4161/psb.4.11.9902>
- Roy B., and Mandal A.B., 2005, Anther culture response in *indica* rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local, *African Journal of Biotechnology*, 4(3): 235-240
- Rueb S., Leneman M., Schilperoort R.A., and Hensgens L.A.M., 1994, Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(2): 259-264
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00037729>
- Shi N.P., 1995, Research and preliminary report about early hybrid rice-ratoon features and technology, *Zajiao Shuidao (Hybrid rice)*, (1): 18-23 (施能浦, 1995, 杂交早稻-再生稻栽培特性与技术研究初报, 杂交水稻, (1): 18-23)
- Shimizu-Sato S., and Mori H., 2001, Control of outgrowth and dormancy in axillary buds, *Plant Physiol.*, 127(4): 1405-1413
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.010841>
 PMid:11743082 PMCid:1540171
- Shu L.H., Yin X.H., Ren X., and He G.C., 2000, Study on young panicle culture *in vitro* from wild rice of different genomes, *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 5(1): 119-122



<http://dx.doi.org/10.1007/BF02828326>

- Tao H.B., and Lin S., 2006, Comparison on disc method with copy method and length-width method for measuring leaf area of rice, *Zhiwu Shenglixue Tongbao (Plant Physiology Communications)*, 42(3): 496-498 (陶洪斌, 林杉, 2006, 打孔称重法与复印称重法和长宽校正法测定水稻叶面积的方法比较, *植物生理学通报*, 42(3): 496-498)
- Wang D.M., Huang X.L., and Huang S.Z., 1996, The action mechanism of cytokinins in plant tissue culture, *Zhiwu Shenglixue Tongbao (Plant Physiology Communications)*, 32(5): 373-377 (王冬梅, 黄学林, 黄上志, 1996, 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制, *植物生理学通报*, 32(5): 373-377)
- Wang Y.Q., Duan Z.G., Huang J.K., and Liang C.Y., 2004, Efficient regeneration from *in vitro* culture of young panicles of rice (*Oryza sativa* L.), *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 21(1): 52-60 (王亚琴, 段中岗, 黄江康, 梁承邺, 2004, 水稻幼穗培养高效再生系统的建立, *植物学通报*, 21(1): 52-60)
- Yan L.N., Li X., and Wu D., 2010, The comparison in tissue culture ability from mature embryo in different rice cultivars, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(6): 1127-1135 (阎丽娜, 李霞, 吴丹, 2010, 不同类型水稻材料成熟胚组织培养力的比较, *中国农业科学*, 43(6): 1127-1135)
- Yi Z.X., Wang X.H., Chen P.P., Zhou W.X., and Tu N.M., 2008, Differences in ratooning characteristics of axillary buds of hybrid rice with different ratooning types between *in vivo* and *in vitro*, *Zajiao Shuidao (Hybrid Rice)*, 23(5): 73-76 (易镇邪, 王学华, 陈平平, 周文新, 屠乃美, 2008, 不同再生类型杂交稻腋芽在母体与离体条件下的再生特性差异, *杂交水稻*, 23(5): 73-76)
- Yu L.J., Shi Y.F., Xiao Y.H., Liu F.Z., Liu Z.H., 2009, Dynamic changes of endogenous GA3 and ABA contents in tea cultivars with different phenological characters and their impact on the regulation axillary buds sprouting, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 34(2): 277-283 (禹利君, 史云峰, 肖海云, 刘富知, 刘仲华, 2008, 不同物候型茶树内源 GA3 和 ABA 的变化及其对腋芽萌发调控的影响, *作物学报*, 34(2): 277-283)
- Zhang G.L., Tu N.M., and Zhang S.T., 2005, Ratooning properties of axillary buds in hybrid rice, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 19(4): 323- 327 (张桂莲, 屠乃美, 张顺堂, 2005, 杂交水稻腋芽再生特性, *中国水稻科学*, 19(4): 323- 327)
- Zhou W.X., Yi Z.X., Wang X.H., and Tu N.M., 2008, Difference in endogenous hormone content of axillary buds from different nodes of two-line hybrid rice between *in vivo* and *in vitro*, *Zajiao Shuidao (Hybrid rice)*, 23(3): 67-71 (周文新, 易镇邪, 王学华, 屠乃美, 2008, 母体与离体条件下两系杂交水稻不同节位腋芽的内源激素含量差异, *杂交水稻*, 23(3): 67-71)