

李朝炜,刘颖,朱昀,等. 旱稻成熟胚愈伤组织诱导的影响因素[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):52-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.015

旱稻成熟胚愈伤组织诱导的影响因素

李朝炜,刘颖,朱昀,刘青,贾慧敏

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

摘要:以旱稻品种鲲早 1 号的种子为材料,研究了不同培养基成分及不同浓度的激素对愈伤组织诱导效率的影响。结果表明,NB 培养基较 MS 培养基更加有利于旱稻愈伤组织的诱导和继代培养;当 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时的愈伤组织出愈率最高;添加脯氨酸不利于鲲早 1 号愈伤组织的形成和生长;选用麦芽糖作为碳源可明显提高愈伤组织的诱导率。

关键词:旱稻;愈伤组织;成熟胚;诱导

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0052-03

旱稻是适于在旱地种植的栽培稻,属于水稻的变异型,栽培历史悠久,可追溯至数千年前,目前在世界范围内种植面积大约占到稻米总种植面积的 12%。旱稻具有耐瘠、耐旱、适应性广的特点,在我国水资源短缺及耕地面积不断减少的严峻形势下具有明显的发展优势。干旱缺水已成为制约我国粮食生产的关键性因素^[1],我国人均占有水资源量只有世界人均占有量的四分之一。水稻作为我国重要的粮食作物,其用水量巨大,加之现有选育和推广的栽培稻品种普遍存在不抗旱的不足,因而水资源短缺已经成为严重影响水稻产量的原因之一。在此形势之下,加快选育旱稻新品种,能够节约

大量农业用水,扩大稻谷种植面积,增加粮食产出渠道,提高农业生产的经济效益^[2]。大力发展旱稻品种选育,获得抗逆、优质、高产的旱稻品种,既可以克服干旱对农业生产的危害,又为培育优质的稻类新品种提供重要的基础。通过基因工程的方法对其进行改良是目前的研究热点^[3-8]。胚性愈伤组织作为遗传转化体系的最常用受体材料,其诱导条件成为稻类组织培养研究的重要方面。本研究以粳水稻、粳旱稻、爪哇稻进行三杂交育种得到的耐旱高产的粳旱稻品种——鲲早 1 号的成熟种子作为材料,研究在不同培养基成分及不同外源激素浓度配比情况下,旱稻愈伤组织的生长状态及诱导效率的差异,以期获得大量适于遗传转化的优质愈伤组织,并为进一步建立稳定高效的旱稻转化体系奠定基础。

收稿日期:2014-03-17

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号:2011ZX08001-003)。

作者简介:李朝炜(1979—),女,河北衡水人,博士,讲师,从事植物基因工程与分子生物学研究。Tel:(0311)81668495;E-mail:lizhaowei79@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

旱稻品种鲲早 1 号(由河北鲲鹏种业提供)的成熟种子作为愈伤组织诱导的材料。

温度在 20℃ 时最适合木薯胚性愈伤组织保存的结论。蔗糖是影响木薯胚性愈伤组织生长的关键因素,提高蔗糖浓度可增加培养基的渗透压,使愈伤组织对水分和养分的吸收受阻,从而延缓离体保存材料的生长速度,但在保存后期却能加剧愈伤组织的褐变,不利于愈伤组织稳定保存,因此在保存过程中不宜采用增加蔗糖浓度的方法。本试验结果表明,蔗糖浓度在 30 g/L 时有利于木薯胚性愈伤组织的保存。

参考文献:

- [1]沈光. 广西木薯产业的发展前景与对策[J]. 热带农业科学, 2001(2):24-27,39.
- [2]方佳,濮文辉,张慧坚. 国内外木薯产业发展近况[J]. 中国农学通报,2010,26(16):353-361.
- [3]杨青. 果树种质离体保存[J]. 福建果树,2005(4):26-29.
- [4]梁忠锋,李茂富,李绍鹏. 果树种质资源离体保存研究进展[J]. 广西农业科学,2007,38(4):375-378.
- [5]白宝璋. 玉米根系活力 TTC 测定法的改良[J]. 玉米科学,1994

- (4):44-47.
- [6]王梓清. 荔枝种质资源离体保存的研究[D]. 福州:福建农林大学,2006:30.
- [7]冯大领,孟祥书,王艳辉,等. 植物生长调节剂在植物体细胞胚发生中的适用[J]. 核农学报,2007,21(3):256-260.
- [8]何亚文,韩美丽,贺红,等. 中国木薯栽培种通过器官发生再生植株研究[J]. 实验生物学报,1998,31(1):79-85.
- [9]覃艳,夏秀忠. 木薯愈伤组织诱导培养初步研究[J]. 广西农业科学,2005,36(3):196-198.
- [10]席世丽,冯斗,潘潞华. 木薯花药愈伤组织诱导初步研究[J]. 广西农业科学,2009,40(2):124-127.
- [11]付传明,黄宁珍,赵志国,等. 广西地不容种质离体保存技术研究[J]. 广西科学,2007,14(2):155-159.
- [12]Negash A, Krens F, Schaart J, et al. *In vitro* conservation of onset under slow-growth conditions[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2001,66(2):107-111.
- [13]洪森荣,郭连金. 离体保存技术在植物种质资源保存中的应用[J]. 上饶师范学院学报:自然科学版,2006,26(3):92-97.

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导培养基配制 愈伤组织的诱导培养基以 NB 培养基(N6 大量元素、B5 微量元素、有机元素、铁盐)和 MS 培养基作为基本培养基,再添加一定浓度的激素及适量谷氨酰胺、水解酪蛋白、脯氨酸和蔗糖或麦芽糖等成分。将培养基的 pH 值调至 5.8,灭菌后倒入无菌培养皿,待凝固后备用。

1.2.2 种子灭菌 选取适量籽粒饱满、干净无霉变的早稻种子,脱去颖壳,放置在干净离心管中,先用清水洗 2 遍,随后在超净台上操作,加入适量 75% 的乙醇振荡消毒 1 min,然后弃去液体,再加入有效氯浓度为 5% 的次氯酸钠溶液和几滴吐温 20,灭菌 2 次,每次 20 min,期间不断剧烈振荡,随后弃去液体,用无菌水清洗 5~6 次,转入无菌的三角瓶中浸泡 20~30 min,再用无菌水清洗 3~5 次,将种子捞出,置于放有无菌滤纸的培养皿中吸干水分。

1.2.3 愈伤组织的诱导及继代 待种子基本干燥之后,用灭菌的小勺或镊子将种子均匀分布在不同成分的诱导培养基上,每一个培养皿放置 15~20 粒,用封口膜将培养皿封好,置于 28℃ 培养箱中暗培养。培养 3~4 d 后种子变得松软,可见愈伤组织明显形成,此时可将胚乳部分切去。待培养至 7~10 d 时,愈伤组织长至绿豆粒大小,此时将长出的芽切去,再继续培养至 30 d 左右。

1.2.4 试验结果分析统计 接种后每隔 3~4 d 观察 1 次,如有污染的种子及时清除。培养 30 d 后统计出愈率:出愈率=(产生愈伤组织的种子粒数/接种的种子粒数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同培养基成分对早稻愈伤组织诱导效率的影响

早稻品种 皖早 1 号愈伤组织的诱导培养分别采用 NB 和 MS 培养基作为基础,采用麦芽糖作为碳源并添加适量激素。结果显示,这 2 种培养基在接种 4~5 d 后均有愈伤组织开始长出,但诱导效率存在明显差异,以 NB 培养基作为基础时,早稻的愈伤诱导效率要高于以 MS 培养基作为基础时的愈伤诱导效率(表 1)。此外,这 2 种培养基所诱导出的愈伤组织的状态也存在差异。NB 培养基上的愈伤组织颜色淡黄,颗粒较为致密且形态圆润,继代之后生长状态良好;MS 培养基上生长的愈伤组织颜色较为暗淡,颗粒松散干瘪,且继代之后容易褐化。由试验结果可见,在使用相同外源激素的情况下,培养基对 皖早 1 号的愈伤组织出愈率及生长状态的影响较大。

表 1 早稻在不同培养基上愈伤组织的诱导率

培养基	种子数 (粒)	出愈数 (块)	出愈率 (%)
NB(D2B0)	150	116	77.3
MS(D2B0)	150	79	52.7

注:NB(D2B0)表示在 NB 作为基础的培养基中,添加的 2,4-D 的质量浓度为 2.0 mg/L,6-BA 的质量浓度为 0 mg/L,其余类推。下表同。

2.2 不同质量浓度激素对早稻愈伤组织诱导率的影响

在诱导植物组织或器官产生愈伤的过程中,植物激素是影响诱导效率的重要因素^[4]。本研究分别试验了在培养基中添加不同浓度的 2,4-D 和 6-BA,结果(表 2)显示,在 NB

作为基础成分的培养基上,2,4-D 浓度为 2.0 mg/L、6-BA 浓度为 0 mg/L 时 皖早 1 号成熟种子诱导愈伤组织的效率最高,达到 77.3%;而 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L、6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时出愈率最低,为 36%。将 2,4-D 的浓度提高到 4.0 mg/L 时,愈伤诱导率仍然较高,但愈伤组织的结构变得较为细碎,不适于后续的转化试验(结果未显示),因此在本研究中 2,4-D 使用浓度以 2 mg/L 为宜,浓度过高或过低都不利于早稻愈伤组织的诱导与生长。此外,从表 2 可以看出,2,4-D 是诱导早稻愈伤所必需的因子,而添加 6-BA 对于 皖早 1 号的愈伤诱导并无明显促进作用,当浓度较大时反而有一定的抑制效果。

表 2 早稻在不同激素条件下愈伤组织的诱导率

处理	种子数 (粒)	出愈数 (块)	出愈率 (%)
NBD1B0	150	91	60.7
NBD1B1	150	54	36.0
NBD2B0	150	116	77.3
NBD2B0.5	150	107	71.3
NBD2B1	150	88	58.7
NBD2B1.5	150	63	42.0
NBD4B0	150	113	75.3
NBD4B1	150	102	68.0

2.3 脯氨酸对愈伤组织诱导效果的影响

据文献报道,在一些植物进行组织培养时添加脯氨酸可提高愈伤的出愈率和生长速率并减少褐化^[9-11]。因此在本研究中以 NB 培养基作为基础,分别添加不同浓度的外源脯氨酸,每种处理接入 100 粒种子,27℃ 暗培养 30 d 后统计愈伤的诱导率及生长状况。随后每种处理再分别接入 50 块愈伤进行继代培养,10 d 和 20 d 后分别统计褐化率,结果(表 3)显示,在进行愈伤诱导时添加较低浓度的脯氨酸(500 mg/L)并没有明显改善早稻愈伤的诱导率和褐化率,当脯氨酸添加浓度达到 1 000 mg/L 及以上时,反而对愈伤组织的生长造成不利影响。不添加脯氨酸时愈伤组织为淡黄色,颗粒致密,生长状况良好,而添加较高浓度脯氨酸时诱导出的愈伤组织颜色呈现土黄色,且继代后容易褐化。

表 3 脯氨酸对早稻愈伤组织的影响

脯氨酸质量浓度 (mg/L)	30 d 时出愈率 (%)	继代 10 d 后 褐化率(%)	继代 20 d 后 褐化率(%)
0(对照)	76	12	64
500	75	10	60
1 000	63	42	86
2 000	51	60	98

2.4 不同碳源对愈伤组织诱导效果的影响

糖类作为植物组织培养的常用碳源,具有调节代谢、促进生长的重要作用^[12]。其中蔗糖一直被广泛应用于多种植物的组织培养,随着研究领域的不断拓展,其他糖类对植物组织培养的效应引起广泛关注。研究表明不同植物对不同糖类的反应有所差异,蔗糖并不是针对所有植物材料组织培养的最佳碳源。

近年来,利用麦芽糖作为碳源对植物组织培养的影响效果受到重视。本研究以 NB 培养基作为基础,比较了蔗糖和麦芽

糖分别作为碳源时愈伤的生长状态,结果见表 4。当以蔗糖作为碳源时,诱导出的愈伤出愈率较低,颜色较为暗淡,将碳源换为麦芽糖时,出愈率较高,愈伤为淡黄色且状态良好。

表 4 不同碳源对早稻愈伤诱导率的影响

碳源	种子数 (个)	出愈数 (块)	出愈率 (%)
麦芽糖	150	116	77.3
蔗糖	150	98	65.3

3 结论与讨论

3.1 激素对比对早稻愈伤组织诱导率的影响

不同稻类的基因型差异是影响其愈伤诱导和遗传转化效率的重要因素^[5],以往研究结果显示,不同早稻品种的愈伤诱导体系和效率差异较大^[11,13-15],并且由于针对早稻的研究成果较少,与水稻相比试验难度较大。为获得状态良好的愈伤组织,为今后进一步建立高效遗传转化体系建立基础,本研究针对甬早 1 号成熟种子的适宜愈伤诱导条件进行了摸索。结果显示,NB 培养基较 MS 培养基更为适宜早稻的愈伤诱导,2,4-D 作为生长素的一种类似物,是用于诱导植物形成愈伤组织的常用激素,其使用浓度过低或过高均不利于愈伤生成,本研究发现现在培养基中添加 2.0 mg/L 的 2,4-D 即可使愈伤组织的诱导率达到最高;6-BA 作为第一个人工合成的细胞分裂素,具有多种生理作用,相关研究证实其在诱导愈伤组织时常与 2,4-D 配比使用,具有一定的效果,其使用浓度一般多为 0.5 mg/L 至 1.5 mg/L^[15-17],本研究结果显示添加 0.5 mg/L 的 6-BA 对于甬早 1 号的愈伤诱导并无明显促进作用,当浓度较大时(1.0~1.5 mg/L)反而有一定的抑制效果。

3.2 脯氨酸对早稻愈伤组织的影响

有研究显示脯氨酸在植株生理代谢及细胞渗透调节过程中起重要作用,在诱导培养基中添加适量浓度的脯氨酸能够增强愈伤组织的代谢活力,促进愈伤组织的生长^[9-11]。而本研究发现当培养基中添加一定浓度脯氨酸时,对早稻的愈伤诱导和抑制褐化并未有明显的改善效果,并且加入脯氨酸后形成的愈伤组织为土黄色,质地较为细碎干瘪且容易褐化,不适于后续的遗传转化,分析其原因,可能与早稻和水稻在细胞内源性游离脯氨酸含量、细胞膜通透性等方面的差异有关^[18]。脯氨酸在组织培养体系中的具体作用原理尚不十分明确,它对植物愈伤组织生长的促进效应是否具有普遍性还有待进一步研究。

3.3 不同碳源对早稻愈伤组织的影响

碳源是培养基中不可缺少的必要成分,以糖类作为碳源,不仅能够为细胞提供能量,还可以调节培养基的渗透压,因此被广泛应用于植物组织培养。不同的糖类其具体生理效应也不相同,选择合适的糖类作为碳源,能够更好地促进培养物生长,是植物组织培养体系的重要影响因素之一^[19-20]。

麦芽糖与蔗糖分子量相同,均为二糖,是植物组织培养体系常用碳源。在针对甬早 1 号的愈伤诱导研究中,麦芽糖作为碳源,对愈伤组织的诱导效果要优于蔗糖,其原因可能是多

方面的,例如其分解速度慢于蔗糖,可使培养物保持相对稳定的渗透压;也有可能是早稻组织细胞对麦芽糖的利用能力要好于蔗糖。总之,不同植物进行组织培养时最适用的糖类并不相同,在具体研究中需要进行针对性的探索。

参考文献:

[1] 罗良国,任爱胜,王瑞梅,等. 我国农业可持续发展的水危机及广泛开展节水农业前景初探[J]. 节水灌溉,2000(5):6-9,12.

[2] 曹启章,孙兴国,李恒蓉,等. 我国早稻生产的发展趋势与前景[J]. 农业科技通讯,2008(12):5-7.

[3] 王景余,林秀云,李明生. 水稻遗传转化研究进展[J]. 生物技术通报,2002(1):20-25.

[4] 刘元凤,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.

[5] 王兰,田华. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(30):14594-14596,14628.

[6] Christou P, Tameria L F, Kofron I M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important *indica* and *japonica* varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos[J]. Nature Biotechnology, 1991,9:957-962.

[7] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. Plant Journal, 1994,6(2):271-282.

[8] Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice[J]. Plant Cell Reports, 1996,15(10):727-730.

[9] 陆燕鹏,万邦惠. 脯氨酸与丙氨酸对光温敏核不育水稻花药愈伤组织诱导的影响[J]. 华南农业大学学报,1997,18(4):15-18.

[10] 陈克贵,朱庆麟. 脯氨酸对小麦愈伤组织生长的促进效应[J]. 西北植物学报,1991,11(2):134-137.

[11] 叶松青,储成才,曹守云,等. 提高水稻转化效率几个主要因素的研究[J]. 遗传学报,2001,28(10):933-938.

[12] 吕芝香. 碳源种类和浓度对愈伤组织生长的影响[J]. 植物生理学通讯,1981(6):1-5.

[13] 腊桂柱,王化琪,黄大年,等. 抗除草剂基因导入早稻(*Oryza sativa*)栽培品种[J]. 农业生物技术学报,2003,11(3):227-232.

[14] 翟伟,胡小荣,周红立,等. 早稻的抗旱性及遗传改良研究现状[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):394-398.

[15] 郭晓丽. 早稻愈伤组织培养研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(2):271-273.

[16] 高振宇,黄大年. 影响籼稻幼胚愈伤组织形成和植株再生的若干因素[J]. 植物生理学通讯,1999,35(2):113-115.

[17] 王萍,李杰,王恩旭,等. 水稻成熟胚愈伤组织的诱导与增殖研究[J]. 种子,2008,27(5):17-19.

[18] 李冠,石雪梅,冉雪琴,等. 陆稻抗旱性与某些生理生化特性的关系[J]. 新疆大学学报:自然科学版,1990(1):65-67.

[19] 孙宗修,斯华敏,程式华,等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究[J]. 中国水稻科学,1993,7(4):227-231.

[20] 魏日风. 蔗糖与麦芽糖质量浓度及添加成分对水稻成熟胚培养的效应[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2006,35(6):565-568.