

不同因素对水稻愈伤组织形成的影响

王玉洋, 蒋柳青, 董雪梅, 孙冬梅

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:以垦鉴稻 10 号为试验材料, 消毒液选用 75% 的酒精、0.1% 的升汞及 5% 次氯酸钠, 研究不同消毒液、不同处理时间对成熟胚愈伤组织诱导的效果。利用试验筛选的最佳消毒条件, 以 MS、B₅、N₆ 以及 NMB 为筛选培养基, 研究垦鉴稻 10 号种子诱导愈伤的最佳培养基质。结果表明: 诱导愈伤的最佳消毒处理组合为 75% 酒精 1 min + 0.1% 升汞 10 min + 10% 次氯酸钠 4 min; 经过方差分析 B₅ 培养基对该品种愈伤组织的诱导效果明显优于其它基质, B₅ 培养基上平均每个培养皿愈伤组织形成率高于其它培养基质, 且诱导的愈伤组织大而新鲜。

关键词:水稻; 愈伤组织; 影响因素

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)01-0011-03

水稻 (*Oryza sativa* L.) 已有 14 000 ~ 18 000 a 的栽培历史, 因其富含碳水化合物、蛋白质和脂肪等大量生理有益成分^[1], 成为重要的粮食作物。近年来, 随着世界人口的增加和环境条件的恶劣, 如何提高水稻产量, 改善稻米品质以提高水稻品种的抗逆性等, 对于解决世界性的粮食危机意义重大。分子生物学和分子遗传学的进一步发展, 使得基因工程手段成为遗传改良水稻品种, 获得优良性状的高效手段之一, 目前已将分离到的有益基因如抗病、抗虫和抗除草剂等基因引入到现有水稻品种, 且取得了一定成效。因此, 基因手段越来越受到育种学家、生物工程学家的重视^[2]。组织培养技术是生物技术的重要组成部分之一, 在水稻遗传转化和品种改良中被广泛应用。外植体的遗传保守性是建立种质库、快速繁殖无性系的重要保证, 同时也为基因工程手段的应用提供了受体平台^[3]。因此水稻转基因技术得以顺利开展, 并对水稻的生产和育种起重大的推动作用^[4]。

诱导水稻愈伤组织的外植体来源广泛, 如未成熟胚、原生质体和成熟胚等, 成熟种子因经表面消毒后污染较小而成为常用的外植体, 且成熟种胚取材不受生长季节限制、离体再生频率高, 是进行遗传操作的理想材料, 但不同品种水稻的愈伤

诱导率差别却很大^[5]。随着科技的发展, 在国内外学者的共同努力下, 水稻成熟种胚的培养技术已日趋完善^[6]。

该试验选取垦鉴稻 10 号种子, 以成熟的水稻种子为试验材料, 研究了不同消毒处理时间及不同培养基配方对水稻形成愈伤组织的影响, 从而为提高愈伤组织形成率, 进一步改良水稻品质及提高水稻遗传转化效率提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 供试水稻品种为垦鉴稻 10 号, 由黑龙江八一农垦大学水稻研究室提供。

1.1.2 培养基 MS 培养基、B₅ 培养基、N₆ 培养基、NMB 培养基 (N₆ 大量元素, MS 微量元素, B₅ 有机物)、0.5 mg·mL⁻¹ KT 溶液、2 mg·mL⁻¹ 2,4-D 溶液、1 mg·mL⁻¹ NAA 溶液、FeCl₂ 溶液、酸水解酪蛋白和蔗糖等。

1.1.3 试剂 75% 酒精、0.1% 升汞、5% 次氯酸钠。

1.1.4 试剂配制与用具 配制诱导愈伤组织所需的 MS、N₆、B₅、NMB 培养基, 之后, 连同试验所需的用具放入压力蒸汽灭菌锅 (121℃, 0.1 MPa) 进行高压蒸汽灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 成熟水稻种子的消毒处理 水稻成熟种子经人工脱去颖壳, 注意不伤及种胚。去掉有斑点的、无胚的以及背部有褐纹及胚不完整或发黑的种子; 挑选粒大、有胚的饱满种子。之后进行消毒处理, 处理方法见表 1, 处理完毕后, 用无菌水

收稿日期: 2012-10-09

基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目 (1152G023)

第一作者简介: 王玉洋 (1989-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 在读学士, 从事组织培养方面研究。

通讯作者: 孙冬梅 (1970-), 女, 黑龙江省大庆市人, 博士, 教授, 从事生物肥料与生物农药的研究与开发。E-mail: 1030124389@qq.com。

冲洗 3~5 次,再用已灭菌的吸水纸将种子表面水分吸干,待用。

表 1 消毒处理不同组合

Table 1 Different combinations of sterilization

处理 Treatment	消毒时间/min Sterilization time		
	75%酒精 75% alcohol	0.1%升汞 0.1% mercuric chloride	5%次氯酸钠 5% NaClO
1	0.5	8	6
2	0.5	10	0
3	0.5	10	4
4	1.0	8	6
5	1.0	10	0
6	1.0	10	4
7	3.0	8	6
8	3.0	10	0
9	3.0	10	4

1.2.2 水稻愈伤组织的诱导 将已灭菌的培养基在无菌操作台中分装,分别倒入平皿中,每个培养皿 20 mL 左右,待培养基冷却凝固后,在无菌操作台中将已处理完的种子放到培养基上,每个培养皿内放 20 粒种子,摆放完毕后,用封口膜将培养皿包好,做好标记并放入已用甲醛熏蒸灭菌过的恒温箱中培养 14 d,温度设定在 27℃。

由第一批愈伤组织的诱导试验得出最佳消毒处理的组合,用作第二批诱导愈伤组织的处理条件。再将分别配制完成的 4 种培养基分别倒入平皿中,冷却凝固后,将最佳处理条件下的水稻成熟种子摆放在平皿中,每个培养皿内放 20 粒种子,摆放完毕后,用封口膜将培养皿包好,做好标记并放入已用甲醛熏蒸灭菌过的恒温箱中培养,温度设定在 27℃。

1.2.3 记录数据 培养 14 d 后,用数码相机拍下水稻种子愈伤组织的生长情况,并记录愈伤组织形成的出愈率及染菌率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理所得愈伤组织

将种子消毒处理后接种到培养基上,培养 14 d 后可观察到有愈伤组织长出。由表 2 可知 6 号处理,即 75%酒精 1 min+0.1%升汞 10 min+5%次氯酸钠 4 min 为最佳的消毒处理组合,出愈率达到 73%,而且染菌率为 0(见图 1)。由于表面消毒剂均具有一定的毒性,且作用时间过长会对种胚产生毒性作用,从而降低种胚的活力,进而影响到愈伤组织的形成。因此,75%的酒精处理

时间过长会影响到种胚的出愈率,而 5%的次氯酸钠和 0.1%的升汞对种子的消毒程度产生影响。



图 1 最佳消毒处理组合得到的愈伤组织

Fig. 1 The callus on best sterilization combination

表 2 不同消毒处理所得愈伤组织

Table 2 The callus of different sterilization treatment

处理 Treatment	种胚数/个 Embryo	愈伤数/个 Callus	出愈率/% Callus growth rate	染菌率/% Contamination rate
1	200	108	54	10
2	200	110	55	30
3	200	116	58	20
4	200	120	60	0
5	200	128	64	20
6	200	146	73	0
7	200	112	56	0
8	200	98	49	10
9	200	74	37	0

2.2 不同培养基中的愈伤组织

将种子按第一批消毒处理的最佳组合消毒后,接种到 4 种培养基上,在添加相同激素的前提下培养 11 d 后可观察到有愈伤组织长出。

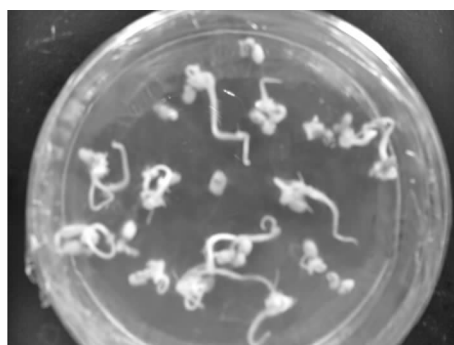


图 2 B₅培养基中的愈伤组织

Fig. 2 Callus on B₅ medium

由表 3 可知,不同培养基对愈伤组织的出愈率有不同影响。B₅培养基与其它培养基相比出愈率最高,达到 70%,染菌率也比其它培养基低,且愈伤组织呈块状,新鲜致密(见图 2)。

表 3 不同培养基中的愈伤组织
Table 3 The callus of different medium

培养基 Medium	种胚数/个 Embryo	愈伤数/个 Callus	出愈率/% Callus growth rate	染菌率/% Contamination rate
B ₅	200	140	70.0	0
MS	200	123	61.5	10
NMB	200	126	63.0	20
N ₆	200	118	59.0	10

3 结论与讨论

水稻遗传转化中的重要环节就是水稻胚性愈伤组织的诱导。且胚性愈伤的状态对遗传转化频率产生直接的影响。因而提高良好生长状态的胚性愈伤率是提高转化频率的关键^[7-11]。不同基因型的成熟胚在相同的培养基中愈伤组织的诱导率不同,同时相同基因型的成熟胚在不同的培养基上愈伤组织的诱导率也不同,所以在成熟胚离体培养时要注意培养基的选择。

试验中发现,不同灭菌剂处理和同一处理不同作用时间,均不同程度影响种胚的灭菌效果及愈伤组织的诱导率。研究表明,浓度为 75%的酒精在消毒的同时,还具有消除种胚表面气泡的功效,有利于 5%次氯酸钠和 0.1%升汞与种胚充分接触,从而提高消毒效果。而升汞尽管灭菌效果好,但却对种胚有毒害作用,如果作用时间太短会产生灭菌不彻底的现象,但作用时间过长又会对种胚产生毒性作用,进而影响愈伤组织的诱导。故在试验中追求最佳灭菌效果的同时,应保证愈伤组织的诱导率和质量,所以,试验选出了处理 6 为最佳消毒处理组合。

此外,在试验过程中,还发现部分愈伤组织出现褐变现象。能够导致植物组织培养褐变的因子是非常复杂的,如植物的种类、基因型、外植体部位及生理状态等,随着条件的改变,褐变程度也会有所不同。有报道指出,在培养基中添加适量的 VC、活性炭、GA₃ 和 ABA 等物质,能有效减轻褐变的程度,提高诱导的愈伤组织质量^[12-14]。特别是 ABA 的加入,在很大程度上对酚类物质的活性具有抑制作用,且可提供生长调节物质和碳源^[15],因而在今后的试验中会考虑如何降低褐变

率的发生,进一步完善垦鉴稻 10 号水稻遗传转化体系。

参考文献:

[1] 蒋家焕. 转基因水稻的研究和应用[J]. 植物学通报, 2003, 20(6): 736-744.

[2] 大野清春. 组织培养用于水稻改良[J]. 国外农学——水稻, 1985(2): 11-14.

[3] 陈璋, 朱秀英. 水稻种胚离体培养有关性状的遗传研究[J]. 中国水稻科学, 1993, 15(4): 23-27.

[4] 石太渊, 陈伟. 水稻成熟胚培养及其影响因素的研究[J]. 辽宁农业科学, 1995(4): 14-16.

[5] 顾之中, 熊友发, 江绍玖. 几种抗氧化剂对水稻愈伤组织抑制褐变效应的研究[J]. 江西农业大学学报, 1994(3): 12-15.

[6] 倪玉峰. 积极发展优质稻米生产稳步实现“量”与“质”的转变[J]. 中国稻米, 2000(2): 5-9.

[7] 王兴春, 方红明, 徐惠兰. 提高粕稻优质米品种成熟胚培养力的研究[J]. 种子, 2001, 113(1): 5-8.

[8] McCouch S R, Teytelman L, Xu Yunbi, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Research, 2002, 9: 199-207.

[9] 杨跃生, 简玉瑜. 影响水稻愈伤组织再生植株数量和质量的因素[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 124-127.

[10] Kikuchi S, Saton K, Kouji T, et al. Collection, mapping and annotation of over 28 000 cDNA clones from japonica rice[J]. Science, 2003, 301: 376-379.

[11] 石太渊. 水稻组织培养与突变体筛选[J]. 辽宁农业科学, 1996(1): 38-40.

[12] 姚方印, 朱常香, 刘理梅, 等. 提高水稻成熟种胚愈伤组织诱导率及再生率的研究[J]. 山东农业科学, 2000(4): 7-9.

[13] 郑责朝, 胡事君. 提高水稻愈伤组织植株再生能力几种方法的评价[J]. 杂交水稻, 2005, 20(2): 54-57.

[14] An S, Park S, Jeong D H, et al. Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice[J]. Plant Physiology, 2003, 133(4): 2040-2047.

[15] 孙勇如, 安锡培. 植物原生质体培养[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1987: 99-105.