

# 微量元素对籼稻品种愈伤组织诱导和褐化的影响

王维旭 张骥诚 刘学群 王春台 刘新琼<sup>\*\*</sup>

中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室,武汉 430074

**摘要** 为了优化籼稻品种的组织培养特性,以 N<sub>6</sub>培养基为基础,分析了微量元素 3 种不同浓度处理对籼稻品种粤泰 B 在组织培养中愈伤组织诱导率及褐化率的影响。结果表明:微量元素的浓度对愈伤组织的诱导率影响不大,而对褐化的控制有明显的影响,在 1.2 倍浓度下愈伤组织的褐化率最低为 10.35%,并且愈伤组织致密、状态较好,0.8 倍次之,褐化率为 26.15%,而一般使用的 1.0 倍浓度下褐化率为 44.55%,褐化情况是最严重的,并且愈伤组织软化,状态很差。

**关键词** 微量元素;籼稻;组织培养;褐化

**中图法分类号** S 511.2<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0006-03

近年来,以组织培养技术为基础的水稻遗传工程进展多有报道<sup>[1-4]</sup>,但是主要集中在粳稻方面,这是由于籼稻和粳稻遗传背景的不同,导致二者之间组织培养特性差异很大。相对于粳稻品种而言,大部分籼稻品种的遗传转化都很困难,主要表现在愈伤组织的诱导率低,继代过程中的褐化以及愈伤组织分化频率低等,这些因素一直制约着以水稻组织培养为基础的水稻遗传工程及基因工程的发展。

在植物组织培养过程中,褐化现象普遍发生,表现为组织培养过程中愈伤组织颜色变深,呈黑褐色,并逐步扩散到整个培养基中,愈伤组织也随之死亡。一般认为是在组织培养过程中,切割愈伤组织造成的伤口分泌出酚类化合物,在有氧条件下酚类物质氧化为醌,进而产生有色物质使组织褐变,影响细胞的正常生理活动,甚至导致组织死亡<sup>[5-6]</sup>。因此,许多研究者对不同植物组织培养继代过程中褐化及抗褐化因素进行了探索,但主要集中在抗氧化剂的研究方面<sup>[7-10]</sup>,尽管取得了一些进展,但是对于部分品种效果仍不理想。

本试验中所采用的受体品种粤泰 B 是一种典型的籼稻,是水稻红莲型细胞质雄性不育系的保持系,该品种在组织培养过程中表现为愈伤组织的继代过程中总是出现严重的褐化现象。为了摸索籼稻品种粤泰 B 愈伤组织继代培养的最适条件,笔者从微量元素入手,以组织培养中常用的 N<sub>6</sub>培养基为基

本培养基,研究不同浓度配比下的微量元素对于粤泰 B 愈伤组织诱导和褐化的影响,本研究对水稻红莲型细胞质雄性不育相关基因的功能研究具有重要的意义。

## 材料与amp;方法

### 试验材料

籼稻品种粤泰 B (Yue tai B, YTB),保存于中南民族大学生命科学院生物技术国家民委重点实验室。

### 基本培养基

选用 N<sub>6</sub>为基本培养基,其主要组成为大量、微量、有机,这 3 种主要成分的配方参见文献[3]。YTB 愈伤组织的诱导和继代培养基除 N<sub>6</sub>外每升培养基还包括:水解酪蛋白 300 mg,蔗糖 30 g,脯氨酸 500 mg,2,4-D 2 mg,谷氨酰胺 500 mg 及琼脂粉 8 g,培养基 pH 值为 5.8。在以上配方基础上,按 N<sub>6</sub>微量的浓度梯度设置 3 种不同的诱导培养基,即 0.8 倍,1.0 倍和 1.2 倍,其余成分不变。

### 试验方法

将 YTB 水稻成熟种子剥去颖壳,先用无菌水冲洗 5 次,接着用 1.5% NaClO 浸泡并置于 20 摇床振荡,共 3 次,每次 20 min,然后用灭菌蒸馏水冲洗多次,取出放在带灭菌滤纸的培养皿上晾干。将处理后的成熟种子接种于愈伤诱导培养基上,26

收稿日期:2009-04-18; 修回日期:2009-09-12

\* 国家自然科学基金项目(30600400)、武汉市青年科技晨光计划(200750731302)和中南民族大学引进人才启动基金项目(YZZ05012)资助

\*\* 通讯作者。E-mail: xinqiongliu@126.com

王维旭,男,1985 年生,硕士研究生。研究方向:植物分子生物学。E-mail: www\_lurker@163.com

暗培养。培养 14 d 切下愈伤组织,挑取生长势好的愈伤组织继代,每 14 d 继代 1 次,并记录诱导情况,28 d 后记录褐化情况。试验重复 2 次。

成熟种子总数 500 粒,分 3 批统计平均诱导率;继代愈伤组织总数 300 粒,分 3 批统计平均褐化率。

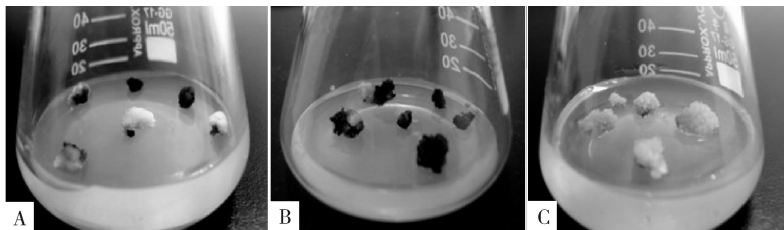
愈伤组织诱导率/ % = 长出明显愈伤种子数/接种种子总数  $\times 100$ ;

褐化率/ % = 褐化变黑愈伤数/继代愈伤总数  $\times 100$ 。

## 结果与分析

不同微量元素浓度下 愈伤组织的诱导情况

YTB 的成熟种子接种于  $N_6$  培养基 3 种不同微量元素浓度的培养基上,平均培养约 5 d 便可在种子胚芽基部观察到明显的愈伤组织,14 d 统计出愈率。结果表明,在这 3 种浓度的培养基上,YTB 的愈伤组织的形成体现了一定的差异,结果见表 1。微量元素浓度为 0.8 倍的诱导率最低为 52.3%,1.0 倍的次之,为 61.8%,1.2 倍的最高,为 76.4%。观察中发现各处理出现盾片的时间没有明显差异,并且各处理的愈伤组织均呈淡黄色、干爽,状态较好(表 1)。



A. 0.8  $\times N_6$  微量元素 0.8  $\times N_6$  trace elements; B. 1.0  $\times N_6$  微量元素 1.0  $\times N_6$  trace elements; C. 1.2  $\times N_6$  微量元素 1.2  $\times N_6$  trace elements.

图 1  $N_6$  不同微量元素浓度对籼稻 YTB 愈伤组织褐化的影响

Fig. 1 Effects of different concentration  $N_6$  trace elements on calli browning rate of YTB

## 讨论

笔者所在的课题组进行的以农杆菌介导的遗传转化试验中,YTB 愈伤组织的诱导和继代培养过程中的褐化一直是制约基因功能研究的一个难题,其影响因素是多方面的,如 YTB 的基因型、培养基成分、愈伤组织切口的大小、与培养基的接触面、农杆菌浓度和培养条件(温度、光照、湿度等)等。如何找到一种解决这一难题的方法,都将对后续分子生物学研究及遗传改良产生重大影响。笔者所在的课题组为此进行了各种尝试,如在培养基中加入抗氧

表 1  $N_6$  微量元素的不同浓度对籼稻 YTB 愈伤组织诱导和继代培养的影响

Table 1 Effects of different concentration  $N_6$  trace elements on calli of YTB inducing

浓度/倍 Concentration	成熟种子/粒 Mature seeds	诱导率/ % Inducing rate	继代愈伤/粒 Subculture callus	褐化率/ % Browning rate
0.8	500	52.33 $\pm$ 1.15	300	26.15 $\pm$ 2.65
1.0	500	61.77 $\pm$ 1.95	300	44.55 $\pm$ 2.21
1.2	500	76.43 $\pm$ 2.35	300	10.35 $\pm$ 1.74

不同微量元素浓度对 愈伤组织褐化的影响

在统计愈伤组织的诱导率之后,将 1.0 倍浓度的微量元素诱导的愈伤组织从胚部切下,接种在 3 种微量元素浓度梯度的继代培养基使其继续生长,生长 28 d 统计褐化率。从表 1 结果可以看出,在  $N_6$  培养基微量元素的不同浓度处理下,YTB 成熟种子的愈伤组织的褐化情况有较为明显的变化,在 1.2 倍浓度下的愈伤组织的褐化率最低(10.35%),0.8 倍次之(26.15%),一般使用的 1.0 倍浓度下的褐化情况反而是最严重的,褐化率为 44.55%。

进一步观察各处理愈伤组织的生长状态,结果发现 1.2 倍浓度下新的愈伤组织增殖明显,大部分愈伤组织致密、呈淡黄色、干爽,状态较好。而 0.8 倍和 1.0 倍浓度的愈伤组织颜色均呈水浸状、软化和褐化,增殖不明显,状态很差(图 1)。

化剂维生素 C 和硫代硫酸钠以减轻醌类物质的毒害,加入一定比例的活性炭吸附酚类氧化物,改变各种试验条件等,已经取得了一定的效果<sup>[11]</sup>。

植物的愈伤组织在生长的过程中,受多种因素的影响,微量元素是植物生长发育过程中必不可少的营养成分,如铁、碘、硼、锰、锌、钼、铜等,在植物生理过程中起着非常重要的作用<sup>[12-13]</sup>。研究表明微量元素对籼稻愈伤组织分化成苗有显著影响,表现为缺少碘、硼、锰、锌、钼、钴的培养基对籼稻愈伤组织分化成苗影响不大,而缺少铜和铁的培养基对籼稻愈伤组织分化成苗影响很大<sup>[14]</sup>。

本研究通过改变 N<sub>6</sub> 的微量元素浓度,分析了籼稻品种 YTB 的愈伤组织诱导率和褐化率。试验结果表明不同浓度的微量元素对于 YTB 成熟种子的愈伤组织诱导具有一定的影响但是差异不明显,说明微量元素的差异对愈伤组织的诱导影响不大,而对于褐化程度的控制有较为明显的影响。在 1.2 倍浓度的培养基上, YTB 的褐化率最低,仅 10.35%,奇怪的是褐化率最高的是 1.0 倍浓度的培养基(44.55%),0.8 倍的褐化率次之(26.15%)。随着微量元素的浓度升高, YTB 愈伤组织的褐化率先升后降,这说明本试验所用微量元素中锰、锌、硼、碘等对于愈伤组织生长最适宜的浓度并不是简单的线性关系。从现有结果看,1.2 倍微量元素浓度下 YTB 的愈伤组织生长情况较为理想,具体是哪种或者哪几种微量元素在起关键作用,以及更高和更低浓度的微量元素梯度试验,还有待进一步研究。本试验的结果对籼稻组织培养过程中愈伤褐化的控制具有一定的借鉴意义。

### 参 考 文 献

- [1] 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 J*, 1994, 6(2): 271-282.
- [2] 翟文学, 李晓兵, 田文忠, 等. 由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因 Xa21 转入我国的五个水稻品种 [J]. *中国科学: C 辑*, 2000, 30(2): 200-206.
- [3] LIN Y J, ZHANG Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 540-547.
- [4] ALVES S C, WORLAND B, THOLE V, et al. A protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21 [J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(5): 638-649.
- [5] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题 [J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(6): 501-506.
- [6] 张智乾, 何秀丽, 义鸣放. 唐菖蒲离体直接再生技术的研究 [J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(1): 110-116.
- [7] 周音, 张智奇, 张建军, 等. 3 种抗氧化剂对茶条槭 (*Acer ginnala* Maxim) 组织培养污染及褐化的影响 [J]. *上海农业学报*, 2007, 23(1): 38-42.
- [8] 胡凯, 祝顺琴, 谈锋, 等. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2004, 29(4): 659-663.
- [9] 李丽, 何康, 王祥荣, 等. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制 [J]. *复旦大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(6): 702-707.
- [10] 郝红云, 义鸣放. 唐菖蒲花茎愈伤植株再生途径的优化 [J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(2): 246-250.
- [11] 周杰, 胡文, 陈为, 等. 籼稻粤泰 B 成熟胚愈伤组织诱导培养条件初探 [J]. *湖北农业科学*, 2008, 47(11): 1224-1227.
- [12] 李合生. 现代植物生理学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [13] 郝建军, 康宗利. 植物生理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] 崔广荣, 梁静, 张子学, 等. 微量元素对籼稻愈伤组织分化成苗的影响 [J]. *生物学杂志*, 2006, 23(1): 22-25.

## Effects of Trace Elements on the Inducing and Browning of Indica Cultivar Calli

WANG Wei-xu ZHANG Ji-cheng LIU Xue-qun WANG Chun-tai LIU Xin-qiong

Key Laboratory for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission/ College of Life Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

**Abstract** In order to optimize the tissue culture conditions of Indica rice, the effects of trace elements on calli inducing and browning rate of Indica Yuetai B (YTB) were studied based on N<sub>6</sub> culture medium. The results showed that inducing rate of calli wasn't affected significantly by the concentration of minor elements, whereas the browning rate was the strongly affected. The browning rate was the lowest, which was 10.35%, on the 1.2 × concentration of trace elements medium. More importantly, the status of calli was compact with good viability. The browning rate of 0.8 × concentration was intermediate with 26.15%, whereas that of 1.0 × concentration treat was the highest with 44.55%.

**Key words** trace elements; Indica rice; tissue culture; browning

(责任编辑: 陆文昌)