

稻属种间杂种(*Oryza sativa* × *O. latifolia*) 再生植株的形态与染色体变化

舒理慧 吴红雨 张希宁

(武汉大学 遗传研究室)

提 要

供试材料 种间杂种 [*O. sativa* (AA, $2n=24$) × *O. latifolia* (CCDD, $2n=48$)] F_1 的幼穗, 杂种基因型是异源三倍体(ACD) $3n=36$ 。利用幼穗诱导愈伤组织与再生植株, 经过多次继代培养后, 再生植株分为2大类型: (1) 完全不结实株, 形状与 F_1 杂种相似, 染色体数 $2n=36$ 。(2) 结有少量种子的植株, 性状介于双亲之间, 染色体数 $2n=24$ 。我们的结果表明: 幼穗培养是克服稻属种间杂种不育性的一条有效途径。

关键词 稻属, 幼穗, 再生植株, 染色体

在植物育种中, 野生优异种质的利用越来越受到人们的重视。我国在野生稻的普查与考察中, 发现了大批有利用价值的材料, 如具有抗稻瘟病、抗白叶枯病、高蛋白质含量和耐寒性极强的特性^[1, 6]。这些材料为水稻育种提供了宝贵的遗传资源。

前人在开展稻属种间杂种的研究中, 主要是阐明稻属植物的种间关系及进化的意义, 一般是从细胞学的角度来进行研究的^[8, 11]。目前仅有国际水稻所正在探讨育种中的应用。水稻育种工作中, 种间杂种的利用, 遇到的关键问题是如何克服杂种的不孕性与不育性。我们采用 *Oryza sativa* × *O. latifolia* F_1 的幼穗进行离体培养, 成功地获得了可结实的杂种植株, 并繁殖了第二代与第三代。广东省农科院1958年也曾获得了与我们相同组合的杂种, 至今未收到一粒种子, 用无性繁殖法保存着^[2]。本文首次报导 *O. sativa* × *O. latifolia* 种间杂种经幼穗培养分化出可结实的再生植株。实验结果表明: 幼穗的组织培养在实践上加快了无性繁殖系的快速繁殖。并且又是克服稻属种间杂种不育性的一条有效途径。

材 料 与 方 法

供试材料中母本为栽培稻(*O. sativa*, AA, $2n=24$ 品种: 鄂晚3号), 父本为宽叶野生稻(*O. latifolia*, CCDD, $2n=48$)。杂种胚置于 $1/2MS + 1.5\%$ 蔗糖的培养基上离体培养而获得染色体基因型为 ACD, $3n=36$ 的异源三倍体, 然后将不同发育时期的幼穗进行离体培养。幼穗的发育划分7个时期: 1. 第一苞分化期; 2. 第一枝梗原基分化期; 3. 第二枝梗原基与颖花原基分化期; 4. 雌雄蕊分化期; 5. 花粉母细胞分化期; 6. 花粉母细胞减数分

裂期; 7. 花粉粒形成期。鉴定花粉母细胞减数分裂期是将材料用乳酚棉兰染液染色, 压片后进行显微观察。

幼穗培养的方法是接种前选好材料, 用 70% 酒精进行表面消毒, 后用 0.1% 升汞浸泡 10 分钟, 再用无菌水冲洗 3-5 次。用镊子与解剖针剥离出幼穗, 接种于培养基上(每一试管接一个幼穗, 平放)。诱导愈伤组织所采用的培养基为 N_6+2 , 4-D 2 毫克/升+蔗糖 4.5%。诱导愈伤组织分化成绿苗采用了 MS+ 激动素 2 毫克/升+茶乙酸 0.5 毫克/升+蔗糖 3%。培养材料放在室温 25—30℃ 室内补充光照或散射光下静置培养。

再生植株根尖染色体检查采用去壁火焰干燥法^[5, 9]。

表 1 不同发育时期的幼穗的诱导率与分化率

Table 1 The frequencies of calluses and plantlets differentiation from culture of young panicles at different developmental stages

发育时期 Developmental stage	接种幼穗数(个) No. of panicles inoculated	愈伤组织数(块) No. of callus	诱导率(%) Induction frequency(%)	转移愈伤组织数(块) NO. of callus transplanted	绿苗数(丛) No. of green plantlets	分化率(%) Differentiation frequency(%)
1	10	0	0	0	0	0
2	38	10	26.3	10	2	20.0
3	38	38	100	38	25	65.8
4	30	30	100	30	15	50.0
5	39	24	61.5	24	8	33.3
6	20	8	40.0	8	0	0
7	10	0	0	0	0	0

结果与分析

一 愈伤组织的诱导与植株再生

将种间杂种的幼穗接种于培养基上, 7-10 天后显著膨大, 20 天后在颖花表面逐渐增大形成愈伤组织(图版 1)。呈现的愈伤组织有两种状况, 一种是质地呈粘稠状, 含水份较多的愈伤组织(分化能力很差); 另一种是形成乳白色结构紧密的愈伤组织, 培养时间过长会不断增殖形成一团胚性细胞团, 与凌定厚报道的相类似^[2]。绿苗的形成可以通过两种方式: 即通过愈伤组织与不通过愈伤组织阶段都可形成绿苗(图版 4)。绿苗分化率的高峰在第 3 期。白化苗比例很高为 22%。愈伤组织诱导率与绿苗分化率如表 1 所示。总共获得 50 株绿苗, 1983 年冬在海南岛冬繁(20 株中存活了 10 株)。1984 年夏天生长在武汉自然日照下, 其中只利用了一株幼穗再进行培养, 将分化出来的 12 株于 1984 年冬天在湖北农科院温室越冬, 此时发现有二株结有少量种子(约 20 粒), 在培养基上发芽生根的有 10 粒, 余下有的只长根不发芽, 有的根、芽都没有。1985—1986 年观察了杂种第二代与第三代的植物学性状。来源与染色体数目变化如表 2 所示。

二 种间杂种与再生植株的形态特点

两种不同的染色体组型(AA × CCDD) 杂交后得到的杂种(ACD) 通过胚培养得到了异源三倍体(图版 2, 3, 5), 性状界于双亲之间, 完全不结实, 生长旺盛, 分蘖能力强, 穗

表 2 种间杂种的来源及后代染色体数目的变化
 Table 2 Origin of interspecific hybrid and changes of chromosome number in their progenies

年 份 year	亲本与后代 parents and progenies	种植地点 place
1982, 冬天与夏天 Summer, winter	<p><i>O. sativa</i> × <i>O. latifolia</i> AA, 2n=24 × CCDD, 2n=48 品种: 鄂晚 3号 宽叶野生稻</p> <p>↓ 胚培养</p>	武汉大学与汤池温室
1983, 夏天 summer	<p>F₁ ACD (异源三倍体) 3n=36</p> <p>↓ 幼穗培养</p>	武汉大学
1983, 冬天 winter	<p>F₁ ACD 3n=36</p> <p>↓ 幼穗培养</p>	海南岛
1984 夏天 summer	<p>F₁ ACD 3n=36</p>	武汉大学
1984, 冬天 winter	<p>F₁ 不结实株 2n=36 101, 103, 105, 108</p> <p>F₁(SC₁) 结实株 2n=24 AO4 A64</p> <p>↓</p> <p>F₂(SC₂)</p>	湖北农科院温室
1985, 夏天 summer	<p>A₅, A₆, A₆₃, A₉₃ A₄₄, A₄₆, A₆₃ A₇₉, A₈₀, A₈₁</p> <p>↓</p> <p>F₃(SC₃) 2n=24</p>	武汉大学
1986, 夏天 summer	<p>A₄₄ A₄₆ A₇₉ A₈₀ A₆₃ A₈₁</p>	武汉大学

表3 种间杂种F₁与亲本性状的比较Table 3. Comparison of character of interspecific hybrid F₁ and their parents

特性 Character	父本 Male parent <i>O. latifolia</i>	母本 Female parent <i>O. sativa</i>	杂种 F ₁ Hybrid F ₁
穗型 Panicle branches	散开 Sparse	密集 Dense	散开 Sparse
芒 Awn	长芒 Long	无芒 Awnless	长芒 Long
颖尖色 Apicle color	紫色 Purple	秆黄色 Straw-yellow	紫红色 Purple-red
内外颖色 Glum color	紫色 Purple	秆黄色 Straw-yellow	秆黄色 Straw-yellow
柱头色 Stigma color	紫色 Purple	白色 White	紫红色 Purple-red
株高(厘米) Plant height (cm)	160	105.5	135
旗叶长(厘米) Flag leaf length (cm)	17.7	48.4	28.6
旗叶宽(厘米) Flag leaf width (cm)	2.3	1.7	3.3
穗长(厘米) Panicle length (cm)	30.8	21.5	25.4
颖花长度(分米) Spikelet length (mm)	5.2	6.6	5.3
颖花宽度(分米) Spikelet width (mm)	2.2	3.2	2.3
每穗粒数 Spikelet/panicle	129	135	179
结实率(%) Seed fertility (%)	30.5	81.5	0

部性状偏于野生亲本,呈疏散状态,只具有一级枝梗,紫红色颖尖,红色柱头,红芒,开花后小穗很快脱落,感光性界于双亲之间,如表3所示。

1983年经幼穗多次继代培养后的再生植株出现了2大类型:(1)完全不结实株:性状与杂种第一代相似,用稻菟无性繁殖保存下来。(2)结有少量种子:性状界于两亲本之间(图版8),穗子只具一级枝梗(图版6)。F₂(SC₂)各株系间差异很显著,不仅有结实率较高的A₇₉、A₆₃而且还有结实率很低的A₉₃,株型偏于父本,整个穗子只结一粒种子(这粒种子发芽长到二片叶时死掉了)。A₄₄结有二粒种子,其中一粒的后代植株株型紧凑,籽粒饱满,抗白叶枯病,有可能育成有希望的品系。

A₉₁抽穗期明显的分成2个时期:早期抽出的穗子呈金黄色,晚期抽出的穗子为黄绿色,穗部性状一般只具一级枝梗呈疏散状态(与父本相同)。F₃(SC₃)的各株系间抽穗期与母本比

表 4 再生植株 F₁(SC₁)与 F₂(SC₂) 的性状比较
 Table 4. Character of F₁(SC₁) and F₂(SC₂) plants derived from culture

性状 Characters	F ₂ (SC ₂)						
	A04	A93	A44	A63	A79	A81	
穗型 Panicle branches	密集 dense	散开 Sparse	密集 dense	密集 dense	密集 dense	密集 dense	密集 dense
芒 Awn	无芒 awnless	无芒 awnless	短芒 short awns	长芒 long awns	短芒 short awns	长芒 long awns	长芒 long awns
颖尖色 Apicle color	红色 red	紫红色 purplishred	白色 white	杆黄色 straw-yellow	金黄色 golden-yellow	紫红色与杆黄色 purplish-red and straw-yellow	杆黄色 straw-yellow
内外颖色 Clume color	杆黄色 straw-yellow	杆黄色 straw-yellow	杆黄色 straw-yellow	杆黄色与金黄色 straw and golden yellow	杆黄色与金黄色 straw and golden yellow	杆黄色 straw-yellow	杆黄色 straw-yellow
柱头色 Stigma color	紫色 purple	白色 whith	白色 white	白色 white	白色 white	白色 white	白色 white
株高(厘米) Plant height (cm)	119	78	100	139.3	145.0	136.7	136.7
旗叶长(厘米) Length of flag (cm)	15.0	18.3	30.2	40.2	38.9	31.5	31.5
旗叶宽(厘米) Width of flag (cm)	2.2	1.4	3.4	2.6	2.2	2.2	2.2
穗长(厘米) Length of panicles (cm)	25.7	20.5	24.5	33.4	25.7	22.9	22.9
每穗粒数 Spikelet/panicle	154	115	235	259	136	159	159
结实率(%) Seed fertility (%)	6.4	0.8	0.8	62.5	44.2	11.5	11.5

较表现出弱的光敏感性。穗长等方面出现了一系列的差异,后代性状大量超亲,有的穗子最高达 500 多粒(图版 7)、穗长达 40.20cm。这些植株的特性与性状为表 4 所示。

三 染色体数目的变化

种间杂种减数分裂过程紊乱,染色体配对与分裂行为异常,中期 I 能形成 0—6 个二价体,形成三价体频率很低,还出现未配对的单价体。杂种幼穗经培养后出现(1)不结种子植株,基本上与原来的杂种(异源三倍体)相同,染色体数 $2n=36$, (2)结实株,染色体数 $2n=24$ (图版 9), 并且还分别检查了 F_2 不同株系的根尖细胞的染色体数, $2n$ 都为 24。 A_{44} 为混倍体,大多数根尖细胞为 24,少数为 12,所繁殖的后代(二株)一株结实,一株不结实。

由我们的实验可以看出,能结实的材料,染色体数目为 $2n=24$,不能结实的材料 $2n=36$,其中 A_{44} 的后代中出现了叶青子黄,抽穗期耐寒,易脱粒不易落粒,分蘖力旺盛,成穗率高,籽粒饱满的高抗白叶枯病的稳定粳型品系。在选择过程,只有从 F_2 结实率低的株系中,才可以选择到稳定品系,如果选择结实率较高的株系,后代则分离,不易稳定。我们对这些材料进一步研究,很可能产生某些有价值的育种材料。

四 花粉粒的发育

异源三倍体的花粉粒之间大小差异显著(图版 11),绝大部份都是无生活力的,有的花粉具有芽孢(图版 10)。大量花粉粒具有二个以上甚至多达 5—6 个萌发孔,有的花粉粒无细胞内含物,仅有一个空壳,有的无细胞核仅有一些不规则物质。这些异常现象致使花粉败育造成杂种不孕。

讨 论

近年来不断发现植物离体培养中细胞染色体数目的变异、结构的变异以及有丝分裂的异常,这就有可能使组织培养逐渐发展为遗传变异的一个新的来源。因此,远缘杂种的组织培养受到普遍的重视^[3,4,10]。我们用这种方法导致了 AA×CCDD 杂交的成功,得到了可育的杂种后代。我们分析,AA 与 CCDD 组型,在正常条件下,可能大部份染色体是非同源性,但也可能存在部份同源性,因为栽培稻与野生稻都具有相同的植物学特征,分布于同样的地区且常常共存,不存在特异的生殖障碍。然而在组织培养条件下,经过多次的继代培养,使 AA 与 CCDD 组中具有同源性染色体,重组在一个细胞内。或者是培养过程中野生稻染色体发生了断裂与栽培稻重接,增加了这个远缘杂种的两个不同染色体组之间的遗传交换的机会,使野生稻染色体片段导入了栽培稻内。

许多作者已报导了在很多物种或远缘杂种的离体培养物中染色体数的变异现象^[12,13,14]。如胡萝卜、水稻、扁桃、小麦,尽管培养过程中出现了不同倍性和非整倍性的细胞,但再生的只有或大部份为二倍体,这可能表明二倍体细胞系(分生组织系)在器官发生与形态建成中有选择优势^[7]。我们的实验也证明了这点。

总之,我们的研究目的是将野生稻的优异种质,通过体细胞无性系的方式转移到栽培水稻中来,为开展两种不同的染色体组间的杂交,提供有效的方法与途径。

参 考 文 献

- [1] 全国野生稻资源考察协作组, 1984, 中国农业科学, 6, 27—34。
 [2] 凌定厚、陈婉瑛、陈梅芳、马镇荣, 1984, 遗传学报, 11(1), 26—32。

- [3] 朱至清、孙敬三、王玉秀、陈孝、杜振华、徐惠君、张文祥, 1985, 遗传学报, 12(6), 430 — 433.
- [4] 李浚明、朱涓、蔡体树, 1985, 遗传学报, 12(6), 434 — 439.
- [5] 舒理慧、邓万银、李国圃, 1985, 武汉植物学研究, 3(4), 413 — 417.
- [6] 吴妙桑、舒理慧、莫仲荣、李道远、张希宁, 中国农业科学, 20(2), 7 — 12.
- [7] D'Amado, T., 1975, The problem of genetics stability in plant tissue and cell cultures. *In: Crop Resources for Today and Tomorrow* (ed. by Frankel, O., Hawkes, J. G.), P. 333 — 348, Cambridge University Press, London.
- [8] Katayama, T., W. Onizuka, Y. B. Shin, 1981, Japan J. Genet. 56(1), 67 — 71.
- [9] Kurata, N., T. Omura, 1978, Japan, J. Genet. 53 (4), 251 — 255.
- [10] Nakamura, C., W. A. Keller, G. Fedak, 1981, Theor. Appl. Genet. 60(1), 89 — 96.
- [11] Nayar, N. M., 1973, Origin and cytogenetics of rice, *Advances in Genetics*, 17, 153 — 292.
- [12] Orton, T. J., 1980, Theor. Appl. Genet. 56(3), 101 — 112.
- [13] Shimada, T., M. Tabata, 1967, Japan. J. Genet. 42, 195 — 201.
- [14] Shimada, T., 1971, Japan, J. Genet. 46, 235 — 241.

Morphological and Chromosomal Changes of Plants Regenerated from Culture of an Interspecific Hybrid of *Oryza* (*O. sativa* × *O. latifolia*)

Shu Lihui, Wu Hongyu, Zhang Xining

(Research Laboratory of Genetics, Wuhan University)

Abstract

The experimental materials were young panicles of an interspecific hybrid F_1 [*O. sativa* (AA, $an=24$) × *O. latifolia* (CCDD) $2n=48$]. The genotype of the hybrid is an allotriploid (ACD) $3n=36$. Young panicles were used for callus induction and plant regeneration. After several cycles of subcultures regenerated plants were recovered and which could be classified into 2 categories: (1). The complete sterility plantlets having the similar botanical characters as F_1 hybrid (allotriploid), chromosome number $2n=36$. (2). Plantlets with few seeds having botanical characters of intermediate between the two parents, chromosome number $2n=24$. Our results showed that tissues of young panicles in process of culture *in vitro* is an efficient way to overcome the hybrid sterility for interspecific hybridization in *Oryza*.

Key words *Oryza*, Young panicle, Plant regeneration, Chromosome

图版说明:

1. 幼穗的愈伤组织
2. 异源三倍体染色体数 $3n=36$
3. 鄂晚 3 号的植株形态(右)F₁ 杂种(中)宽叶野生稻(左)
4. 异源三倍体的幼穗, 培养出的绿苗
5. 杂种幼胚培养出的幼苗
6. 具一级枝梗的结实穗(A04)
7. 每穗约 500 粒的穗子(A₈₁)
8. 9. 能结实的 F₁ 植株形态(A04), 染色体数 $2n=24$
10. 具芽孢的花粉粒
11. 花粉粒大小差异显著

Explanation of Plates

1. Callus developed from a young panicle.
2. Chromosome number, allotriploid of $3n=36$.
3. Morphology of CV. Ewan 3 (left), F₁ plant (centre) and *O. latifolia* (right).
4. Green plantlet from a young panicle of allotriploid.
5. Seedling development from a hybrid embryo.
6. Fertile panicle with primary branchlet only (A04).
7. Panicle with about 500 spikelets.
- 8.9. Morphology of fertile F₁ plants, chromosome number $2n=24$ (A04).
10. Pollen grain with gemma.
11. Pollen grain markedly differing in size.

舒理慧等: 稻属种间杂种 (*Oryza sativa* × *O. latifolia*)

再生植株的形态与染色体变化

Shu Lihui et al.: Morphological and Chromosomal Changes of Plants

Regenerated from Culture of an Interspecific Hybrid of *Oryza* (*O. sativa* × *O. latifolia*)

图版 I

Plate I

