

水稻单倍体幼穗切块的离体培养

胡 忠 庄承纪 梁汉兴

(中国科学院昆明植物研究所)

摘 要

长0.5—4厘米的水稻单倍体幼穗,剪切成1毫米左右的碎块,培养在附加2.4-D 1mg/l的 N_6 培养基上,切块容易被诱导生成愈伤组织。愈伤组织转移到附加NAA 0.5+KT 2mg/l的培养基上培养,约30%分化出苗。由单个幼穗的全部切块平均可得30丛绿苗。幼穗切块培养在附加NAA 1+KT 2mg/l的培养基上,切块上颖花不孕稃片与内外稃之间的表皮和皮层细胞被诱导分裂并形成芽和根。通过这种直接出苗方式,每个幼穗的全部切块平均出苗12丛。由上述二种途径再生的小苗中,白化苗均低于2%。98%的再生植株仍为单倍体。用含有2%二甲基亚砷和200mg/l秋水仙碱的培养液浸泡愈伤组24小时(26℃),再生的植株中,能育二倍体植株达50%。

60年代以来,从水稻二倍体植株的各种体细胞组织和器官,通过离体培养形成愈伤组织途径,再生植株的方法已经很好地建立(参见Yamada 1977评论^[11], Henk等1978^[8], 蔡以欣等1979^[6])。其中,成熟种子胚的培养,由于取材方便,愈伤组织容易诱导和分化,已被应用于水稻遗传变异和突变体筛选的研究^{[10][7]}。近年来,杂交水稻的幼穗离体培养成功地展开^[1]。然而,对于水稻单倍体细胞组织的离体培养,目前尚少研究。庄承纪(1981)报道从单倍体幼穗培养再生植株^[2]。由于种子胚培养显然不适用于单倍体,从单倍体幼穗再生植株的途径值得进一步研究。本文报道的试验表明,从水稻幼穗切块培养,既可以通过愈伤组织途径,也可以直接出芽方式高频率地再生绿苗,白苗率很低。用含有二甲基亚砷的秋水仙碱溶液处理愈伤组织,可以诱导50%再生植株为二倍体。这一培养方法不仅提供一种经济有效的单倍体加倍方法,而且可能用于单倍体体细胞的诱变和突变体筛选试验。

材 料 与 方 法

供培养的材料来自粳稻品种和杂种通过花药培养产生的单倍体植株。当花粉植株抽穗后,将明确显示为单倍体的植株的分蘖进行分栽,再生出多丛而来源同一的单倍体植株。当生长到拔节期,旗叶尖开始显见时,摘取稻苞,用75%酒精作表面灭菌后,在无菌条件下剥出幼穗。幼穗的长度以0.5—4厘米为宜,此时幼穗处于颖花分化后期至花粉母细胞形成期。用剪刀将幼穗剪成1毫米左右的碎块进行培养。培养基为 N_6 ,蔗糖3%,

附加水解干酪素500mg/l, 诱导愈伤组织的培养基再附加2.4-D 1 mg/l, 分化培养基附加 NAA0.5 + KT2mg/l, 直接出苗培养基附加 NAA1-2 + KT2mg/l。幼穗剪块的方式是任意的, 因此切块可能包含有枝梗和颖花的各不同部分。诱导愈伤组织的培养置于暗中。愈伤组织分化和直接出苗培养均置于每天10小时约2千勒克司日光灯光照下。

秋水仙碱先用70%酒精配成2%的母液, 存放于暗冷处。使用时, 定量地取秋水仙碱母液加到已经经过热压灭菌的诱导愈伤组织的培养液中, 同时加入2%二甲基亚砷(V/V)。将由幼穗诱导的生长中的愈伤组织浸泡于上述溶液中, 26°C, 6—24小时。此后, 愈伤组织经无秋水仙碱的培养液冲洗二次, 再转到分化培养上培养出苗。

为观察培养切块上芽的发生, 将培养不同时间的切块用FAA固定液固定, 经酒精逐级脱水, 石蜡包埋, 切片, 苏木精—亮绿染色, 作成永久制片观察。

将每块转移愈伤组织上分化的绿苗为单位(丛)移栽土中生长成植株, 根据长成植株穗部性状和结实情况判断其倍数性^[5]。

试验结果

1. 通过愈伤组织途径再生植株

幼穗切块在附加2.4-D 1 mg/l的固体或液体培养基上, 26°C培养10—15天即可100%诱导成愈伤组织(图1, 1、2)。较幼嫩的切块上的组织可全部愈伤组织化, 而较老切块上的子房部分很难愈伤组织化(图1, 4)。长5厘米以上的单倍体幼穗切块已难以诱导成愈伤组织。一个切块可能包括数个碎片, 因此可以散裂成数块愈伤组织。将愈伤组织转到分化培养基约5天左右即开始出现芽点, 而后生长成苗, 由一块愈伤组织往往长出数苗(图1, 3)。

表1是单倍体幼穗通过上述途径再生植株的频率。由于幼穗之间差异和剪切操作上的差异, 由每个幼穗的全部切块所再生的苗数较难准确计数。以长3厘米的单个幼穗为例, 诱导并转到分化培养基上的愈伤组织数可达120块, 其中有23%分化出小苗, 因此由一个幼穗的切块培养可得28丛绿苗。较幼小的幼穗切块所产生的愈伤组织, 分化频率较高, 但因切块数少, 以单个幼穗计, 所产生的植株数不多。白化苗甚少出现, 平均仅占苗数的1%左右。

表1 水稻单倍体幼穗切块培养中从单个幼穗所产生的愈伤组织数及其分化频率

幼穗长度 (cm)	愈伤组织数 (自每个幼穗)	愈 伤 组 织 的 分 化 频 率					
		绿 芽 点 ¹⁾		绿 苗		白 苗	
		数	%	数	%	数	%
0.5	30	12	40.0	5	16.7	0	0
1.0	60	28	46.0	18	30.0	0	0
1.5	80	34	42.5	19	23.8	1	1.7
3.0	120	55	45.8	28	23.3	0	0

1) 绿芽点数包括绿苗数。

从幼穗切块所诱导的愈伤组织, 分化根比分化芽容易。有些愈伤组织所分化的根过份生长, 绿芽点不能正常展开成苗。从表 1 可知, 这种畸形分化愈伤组织约占 20%。对此, 可施行手术操作, 将愈伤组织上过份生长的根剪去, 将带有绿芽点的愈伤组织转到新的分化培养基继续培养, 这样将近一半愈伤组织上的绿芽点能生长成正常的苗(表 2)。这可能是手术处理使根的生长受损伤, 芽点容易展开。这样做可以使每个幼穗切块所能再生的苗数平均达到 30 丛。

表 2 愈伤组织上不能正常展开的绿芽点经手术处理后转到新培养基上再生植株的频率

新培养基附加成分 (mg/l) ¹⁾	处理的愈伤组织数	长出正常小苗的愈伤组织	
		数	%
NAA 1 + KT 2	60	27	45.0
NAA 2 + KT 1	68	32	47.2
CM 15%	156	48	30.8

1) 基本培养基 N₆, KT 激动素, CM 椰子乳。

2. 由幼穗切块直接再生出苗

幼穗切块培养在附加 NAA 1 + KT 2 mg/l 培养基上, 于 26°C 在光照下培养 15 天左右, 未见愈伤组织形成, 但出现乳白色的芽及根(图 1, 6), 培养 25—30 天即长成苗(图 1, 7)。芽多发生在带有颖花的切块, 其发生的部位是颖花的基部(图 1, 9、11), 颖花本身未见出芽。子房即使膨大, 也未见有芽发生(图 1, 8)。偶而也见在没有颖花的切块上发生, 其发生部位也是原来颖花生长的基部(图 1, 10)。从纵横切片看(图 2, 1、2)芽发生的部位是在不孕稃和内外稃之间^[3], 这一区域的表皮和其内的皮层细胞被诱导分裂, 形成芽原基。同时, 在芽的附近, 从皮层深处起源形成根(图 2, 3、4)。在一个诱导区可以发生数个芽。上述再生苗的方式不是愈伤组织分化, 不是胚状体发生, 也不是该区域原来就有芽原基的展开。

应当指出, 在上述培养条件下, 也有愈伤组织发生, 其发生部位是切块的切端(图 2, 5)。有些愈伤组织以后不经转移也能分化出苗。将培养基中 NAA 用量增加, 激动素的用量减少, 这种情况也增加。当激动素 2 mg/l 时, 将 NAA 减到 0.5 mg/l 以下, 则直接出苗和愈伤组织发生都很难。KT 0.5 mg/l 时, NAA 用量超过 2 mg/l, 则诱导较多愈伤组织。

图 3 是不同长度幼穗的切块直接再生苗的效率。由于幼穗之间差异和剪切操作的差异, 即使同样长度的幼穗, 再生的苗数也相差甚大。长 6 厘米以上的幼穗, 已很难诱导直接出苗。长 0.5 厘米以下的幼穗, 由于切块数少, 出苗也不多。以长 0.5—4 厘米的幼穗为宜, 在此范围内从每个幼穗切块平均可出苗 18 丛。从图 3 结果看, 最合适的幼穗长度是 1—3 厘米。显然, 幼穗培养对幼穗的发育时期在一定范围内无严格要求。

在再生苗中, 白化苗和具条斑叶片的小苗仅占 2%, 而且白苗一般与绿苗在同一丛中出现。

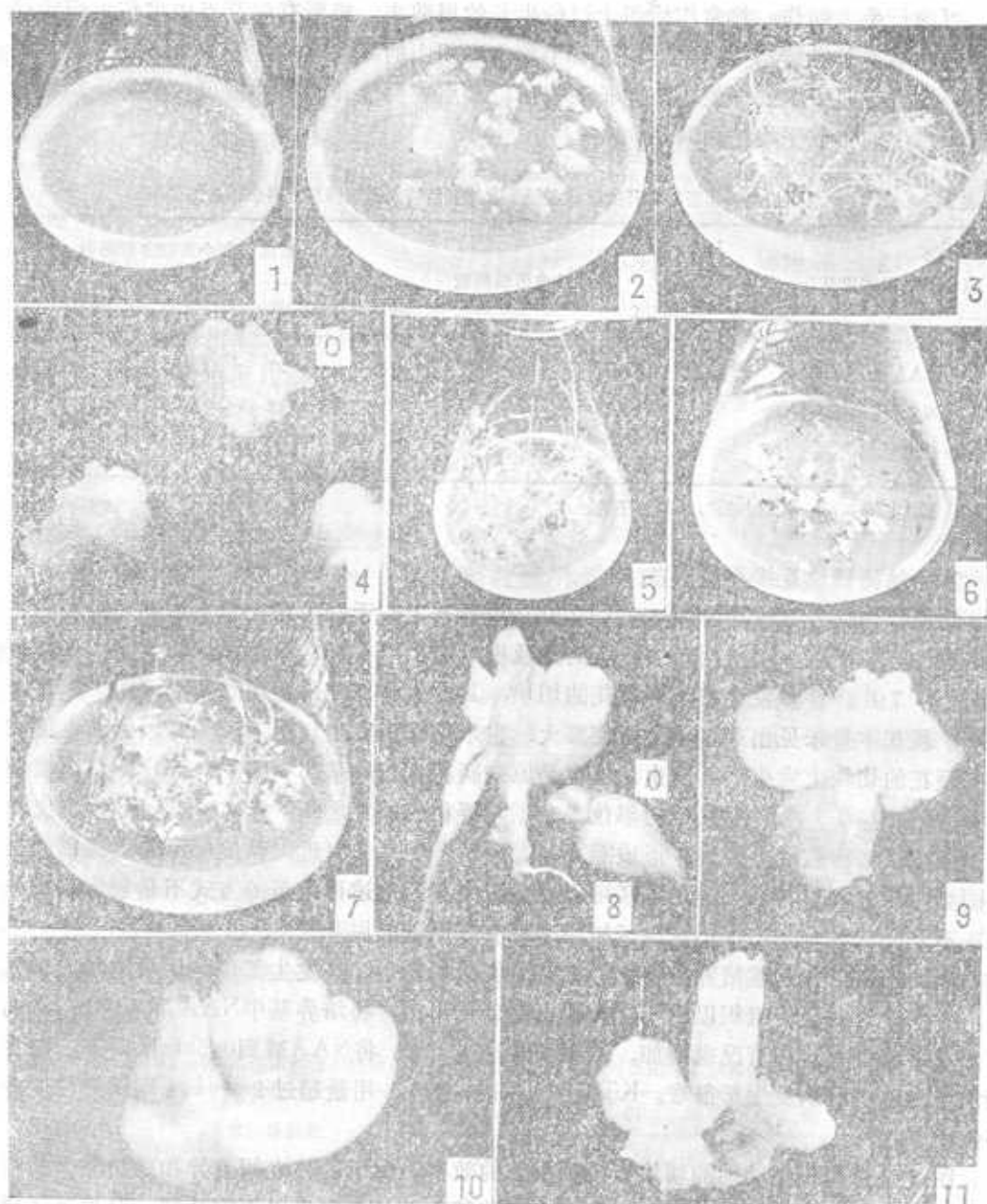


图1 1. 培养的幼穗切块; 2. 在附加2,4-D的培养基上被诱导成愈伤组织; 3. 愈伤组织在分化培养基上分化出苗; 4. 较老幼穗切块上子房(O)不愈伤组织化; 5. 芽点不能展开的愈伤组织经手术处理后再生出正常苗; 6. 培养在附加NAA+KT的培养基上18天的切块, 直接产生乳白色芽; 7. 芽发育成苗; 8. 子房(O)不能产生芽, 芽从颖花基部发生; 9. 由颖花基部长出芽; 10. 芽从枝梗除去颖花的切块发生; 11. 在一个诱导区长出三个芽。



图2 1、2.芽原基(S)由不孕稃片和稃片之间区域的表皮发生; 3、4.在芽原基(S)的邻近和相对处皮层深处发生不定根(R); 5.幼穗切块培养在附加NAA+KT的培养基上其切端处形成愈伤组织; 6.单倍体幼穗切块培养所再生的植株, 98%仍为不孕的单倍体; 7.愈伤组织经秋水仙碱溶液处理后所再生的植株中50%是能孕二倍体。

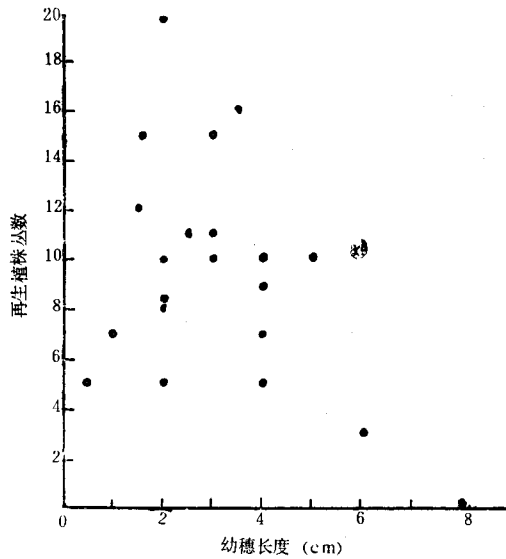


图3 水稻单倍体幼穗切块培养中自每一个幼穗直接再生出苗的苗数和幼穗长度之间的关系。
培养基: $N_6 + NAA 1 + KT 2 \text{ mg/l}$ 。

3. 再生植株的倍数性和加倍方法

对单倍体幼穗切块培养所再生的约300丛长成植株的倍数性作了统计, 结果见表3。由愈伤组织途径和直接出苗途径所再生植株的倍数性分布相同, 加倍结实的二倍体很少, 仅占2%, 多倍体未见, 98%仍为不育的单倍体(图2, 6)。

用加有2%二甲基亚砷的秋水仙碱溶液浸泡生长中的愈伤组织, 对诱导单倍体加倍有明显效果。由表4结果可见, 用200mg/l的秋水仙碱于26°C浸泡愈伤组织24小时, 尔后再生的植株中二倍体占50%(图2, 7)。在表4所试验的浓度和浸泡时间内, 随秋水仙碱剂量增加加倍频率也增加。多倍体甚少。秋水仙碱处理使愈伤组织的分化时间推迟约8天, 但在本试验的处理条件下, 愈伤组织的分化频率未见明显变化, 白苗发生率未见增加。

在自发或秋水仙碱诱发加倍的同一丛植株中, 可见到单倍体穗和二倍体穗同时出现的情况, 其发生频率为15%左右。但在同一丛二倍化的植株中, 未见出现二种质量性状不同的稻穗。

表3 水稻单倍体幼穗切块培养中再生植株的倍数性

再生途径	植株丛数	单 倍 体		二 倍 体		多 倍 体	
		数	%	数	%	数	%
直接出苗	156	154	98.7	2	1.3	0	0
通过愈伤组织	139	136	97.8	3	2.2	0	0

表 4 含有 2% 二甲基亚砜的秋水仙碱水溶液处理愈伤组织诱导染色体加倍的效果

处 理 条 件		愈 伤 组 织 的 分 化					再 生 植 株 的 倍 性			
剂 量	时 间	处 理	分 化 绿 苗		分 化 白 苗		植 株	单 倍 体	二 倍 体	多 倍 体
(mg/l)	(小时)	数	数	%	数	%	丛 数	%	%	%
200 ¹⁾	6	74	56	76	1	1	44	66	32	2
200	12	72	40	56	0	0	40	60	40	0
200	24	46	42	91	0	0	42	50	50	0
200	6	12	4	33	0	0	3	67	33	0
400	6	20	7	35	0	0	5	60	40	0
600	6	32	16	50	0	0	16	56	44	0

1) 第一组试验中分化率高是因为具绿芽点的愈伤组织经手术处理切割转移到新培养基后长出较多苗。

讨 论

迄今报道的水稻体细胞组织培养都是通过愈伤组织再生植株的。与水稻二倍体幼穗培养的结果一样^[1], 用 2,4-D 容易诱发单倍体幼穗愈伤组织化, 愈伤组织的分化率也高, 因此可得到大量绿苗。本试验观察到, 用 NAA 和激动素适当配合, 可以诱发幼穗切块直接出苗, 芽原基发生的部位是在不孕稃片和内外稃之间的表皮和少数皮层细胞, 未见通过愈伤组织阶段, 也不是通过胚状体形成的方式。该部位的细胞为什么容易被诱导形成芽值得进一步研究。

用加有二甲基亚砜的秋水仙碱水溶液浸泡幼苗根和分蘖节诱发染色体加倍有很好效果。这早有报导 (见 Jensen 1974 评论^[9])。本试验中, 用加有二甲基亚砜的秋水仙碱水溶液浸泡水稻愈伤组织对诱发单倍体染色体加倍也有显著效果。这一加倍方法, 与用秋水仙碱处理植株的分蘖节、根和茎生长点和培养花药方法相比^[5], 用药量少, 操作方便, 引起损伤小。由于从一个幼穗可以再生出 20 丛以上绿苗, 其中 50% 可诱发为二倍体, 用一个幼穗的切块培养就一定能够得到二倍体植株。

目前, 水稻花粉单倍体培养作为产生纯合体的方法, 在水稻杂交育种中应用已取得成功。但是对水稻单倍体培养作为一种诱变系统尚很少注意。水稻单倍体培养有二种系统。一是配子培养如花药或花粉培养和子房培养, 目前试验已表明, 花粉培养的诱导率较低, 化学诱变剂处理会引起白化苗发生率显著增加, 尚无有效解决方法^[4]。二是单倍体体细胞培养。本文所述的单倍体幼穗培养, 取材容易, 操作简便, 再生绿苗的频率高, 培养物的单倍性比较稳定, 虽然还远远不是单细胞培养, 仍有可能进一步发展为适用于诱变和突变体筛选的单倍体体细胞培养系统。

参 考 文 献

- [1] 汤又悦、孙宗修, 1979: 植物生理学报, 5:95—97。
- [2] 庄承纪, 1981: 云南植物研究, 3:165—172。
- [3] 李杨汉, 1979: 禾本科植物的形态和解剖。上海科学技术出版社, 第165—176页。
- [4] 胡 忠等, 1980: 云南植物研究, 2:188—193。
- [5] 胡 忠、梁汉兴, 1979: 遗传, 1:37—38。
- [6] 蔡以欣等, 1979: 实验生物学报, 12:341—348。
- [7] Chaeff, R. S and P. C. Carlson, 1975, in: Modification of the information content of plant cell. ed. by R. Markham et al. North-Holland, New York, Pp. 197—214.
- [8] Henke, R. R et al, 1978: *Physiol. Plant.*, 44:11—14.
- [9] Jensen, C. J. 1974; in: Haploid in higher plants. ed. by K. J. Kasha. Univ. Guelph pub. Pp. 153—190.
- [10] Oono, K. 1977; in: Proceeding of symposium on methods of crop breeding. *Japan Min. of Agri. and Forestry*, Pp. 109—120.
- [11] Yamada, Y. 1977; in: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. ed. by J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Pp. 145—159.

IN VITRO CULTURE OF HAPLOID YOUNG PANICLE FRAGMENTS OF RICE

Hu Zhong, Zhuang Chengji and Liang Hanxing

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

Abstract

Rice haploid young panicles (0.5—4 cm length) were cut into fragments in 1 mm size and cultured on a N_6 medium with addition of 2,4-D 1 mg/l at 26°C for 15 days. The fragments were easy to be induced into calli. About 30% of calli transferred on a medium with addition of NAA 0.5+KT 2 mg/l differentiated into plantlets. About 30 clusters of green plantlets were obtained from the fragments of one panicle on average. Plantlets also regenerated directly, not through callus, from the fragments cultured on a N_6 medium with addition of NAA 1 +KT 2 mg/l. The shoot buds were initiated from the epidermis cells and cortex cells adjacent to them at the region between the sterile lemma and the fertile lemma of a spikelet on a fragment. About 12 clusters of plantlets were obtained from the fragments of one panicle by this way. In both cases, albino plantlets were less than 2% in regenerated plantlets. 98% of regenerated plants were haploids. However, treating the calli with the colchicine at 200 mg/l in a 2% dimethyl sulphonate(DMSO) aqueous solution resulted in production of 50% fertile diploids in regenerated plants without decreasing the differentiation frequency of calli.