

化学诱变剂对粳稻花粉愈伤组织的诱导和分化 以及花粉植株性状变异的影响

庄承纪 黄仕周 胡忠

(中国科学院昆明植物研究所)

摘 要

用甲基磺酸乙酯 (EMS)、1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍 (MNNG) 和乙烯亚胺 (EI) 在 3~4 种不同浓度 (EMS: 2.5, 3.5, 4.5 ml/l; MNNG: 25, 50, 100 mg/l; EI: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 ml/l), 不同温度 (8, 18, 27°C) 和不同时间 (2, 4, 8, 10, 20, 30 小时) 水平上处理离体培养早期的粳稻花药, 观察到诱变剂在低剂量和较低温度下处理, 明显提高花粉愈伤组织的诱导率; 随着诱变剂剂量增加和温度增高, 愈伤组织诱导率下降, 在这种情况下, 虽对愈伤组织总的分化率未见明显影响, 但白苗所占百分数显著增加。

在所诱导的 120 个花粉植株 H_2 株系中, 观察到有 6 个株系出现性状大突变, 主要是株高、成熟期和结实率的变异, 变异的性状基本是稳定的并能够遗传。未经诱变剂处理所培养的花粉植株 H_2 株系, 未见性状大突变出现。

植物细胞突变体的研究是从 70 年代开展起来的^[1-3]。作为突变研究的理想材料是植物单细胞或原生质体。但是, 目前具有重要经济价值的禾本科植物很少能由原生质体成功地培养成植株。Chaleff^[4] 虽然用水稻细胞系选择抗氨基酸类似物的方法得到了水稻突变体, 但未能分化成植株。鉴于水稻单细胞和原生质体目前还很难用于对后代进行遗传分析的突变研究, 1977 年以来, 我们用化学诱变剂处理水稻离体花药, 试图用这种方法诱发花粉突变, 通过自然加倍获得纯合二倍体突变株。现将部份结果报道如下。

材 料 和 方 法

供试材料为粳稻 (*Oryza sativa* subsp. Keng) 品种: 04-110、04-G84、768、77-32、711、西南 175 等。花药取自大田植株。

化学诱变剂是甲基磺酸乙酯 (EMS)、1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍 (MNNG) 和乙烯亚胺 (EI)。材料经表面消毒后, 取单核晚期的花药接种于 N_6 ^[6] + 2, 4-D 2 毫克/升 + 蔗糖 60 克/升的培养液表面漂浮, 置于 8°C 低温下予处理 4 天, 然后用诱变剂按我们已报导过的方法^[7] 处理花药, 不用诱变剂处理的作为对照。诱变剂处理过的花药用培养液冲洗三次后, 转入固体培养基 (N_6 + KT 0.2 毫克/升 + NAA 2 毫克/升 + 蔗糖 30 克/升 + 琼脂 7 克/升) 诱导愈伤组织, 最后再把愈伤组织转移到分化培养基 (N_6 + KT 2 毫克/升 + NAA 0.5 毫克/升 + 蔗糖 30 克/升 + 琼脂 7 克/升) 上分化苗。花粉绿苗盆栽于温室, 获得自然加倍的花粉植株。花粉植株第二代 (H_2)、第三代 (H_3) 均按株系在正常季节单苗栽于大田, 并观察它们的性状变异。愈伤组织诱导率是指产生愈伤组织的花药占培

养花药的百分数，分化率是指分化白苗和绿苗的愈伤组织占转移的愈伤组织的百分数。

用 EMS 进行的处理，是依正交试验法按 $L_9(3^4)$ 正交表^[8]设计的，见表 1 和表 2。

表 1 正交试验的因素与水平

| 水 平 | 因 素 | | |
|-----|----------|---------|---------|
| | 浓度(ml/l) | 时 间(hr) | 温 度(°C) |
| 一水平 | 2.5 | 2 | 8 |
| 二水平 | 3.5 | 4 | 18 |
| 三水平 | 4.5 | 8 | 27 |

结果与分析

1. 诱变剂对愈伤组织诱导的影响

EMS 对水稻离体花药愈伤组织诱导率的影响，见表 2 和表 3。

表 3 是表示 EMS 的浓度、处理时间和温度对愈伤组织诱导率的影响的相对大小。各 K 值是各因素在每个水平上的平均诱导率，R 值是每列 K 值的极差。结果表明，EMS 在所试验的条件范围内，愈伤组织诱导率比对照有明显的提高。例如对照的诱导率为 30.6%，而各因素最高水平的平均诱导率分别为 66.9%、64.2%、63.2%。各因素间最佳配合，相当于表 2 中的试号 5，但供试品种不同时，所得到的结果有差异。例如 1977 年用 EMS 2.5 毫升/升、在 8°C 下处理品种西南 175 的培养花药 8 小时，愈伤组织的诱导率为 69.4%。

乙烯亚胺 (EI) 处理花药对愈伤组织诱导率的影响见表 4。从表中可见，多数处理组合的诱导率比对照有所提高，少数组合随着剂量和温度的增高，诱导率下降。由于在 27°C 下处理的有两组发生污染，因此在较高温度 (27°C) 下处理，诱导率下降的情况未能得出明确的结果。但在另一批试验中，EI 的浓度为 0, 0.25, 1.0 毫升/升，在 8°C

表 2 $L_9(3^4)$ 正交表。EMS 对水稻离体花药愈伤组织诱导率和分化率的影响 品种: 04-110

| 试 号 | 列 号 | | | 培养花药数 | 愈伤组织诱导率(%) | 愈伤组织分化率(%) | |
|-----|---------------|-------------|-------------|-------|------------|------------|------|
| | 1 浓度(ml/l) | 2 时间(hr) | 3 温度(°C) | | | 绿 苗 | 白 苗 |
| 1 | 2.5 | 2 | 8 | 683 | 53.7 | 8.7 | 4.6 |
| 2 | 2.5 | 4 | 18 | 708 | 62.9 | 8.3 | 6.5 |
| 3 | 2.5 | 8 | 27 | 711 | 55.5 | 7.3 | 6.3 |
| 4 | 3.5 | 2 | 18 | 815 | 63.9 | 6.1 | 3.8 |
| 5 | 3.5 | 4 | 27 | 532 | 76.3 | 7.9 | 7.4 |
| 6 | 3.5 | 8 | 8 | 437 | 60.4 | 7.2 | 4.5 |
| 7 | 4.5 | 2 | 27 | 199 | 57.8 | 5.2 | 6.1 |
| 8 | 4.5 | 4 | 8 | 1014 | 53.5 | 7.7 | 4.8 |
| 9 | 4.5 | 8 | 18 | 591 | 39.3 | 3.0 | 12.9 |
| 对照 | 0 | 8 | 8 | 589 | 30.6 | 5.6 | 6.1 |

下处理培养花药15小时, 都不同程度提高了诱导率。而在27°C下, 在相同浓度和时间下处理, 诱导率明显下降(数据从略, 品种768)。这表明温度对 EI 处理水稻离体花药的诱导率是有明显影响的。

亚硝基胍(MNNG)处理水稻培养花药对愈伤组织诱导率的影响见表5。从表中可以看到, 愈伤组织的诱导率随处理浓度的升高而降低。用50毫克/升的浓度, 在8°C下处理15小时, 愈伤组织诱导率已只有对照的50%左右。

表3 EMS 的浓度、处理时间和温度对愈伤组织诱导率的相对作用 品种: 04-110

| K 值 | 因 素 | | |
|----------------|----------|---------|--------|
| | 浓度(ml/l) | 时 间(hr) | 温度(°C) |
| K ₁ | 57.4 | 58.5 | 55.9 |
| K ₂ | 66.9 | 64.2 | 55.4 |
| K ₃ | 50.2 | 51.7 | 63.2 |
| R | 16.7 | 12.5 | 7.8 |

表4 Ei处理水稻离体花药对愈伤组织诱导率的影响 品种: 04-G84

| 浓度(ml/l) | 时间(hr) | 温度(°C) | 培养花药数 | 愈伤组织诱导率(%) |
|----------|--------|--------|-------|------------|
| 0.25 | 10 | 8 | 345 | 27.9 |
| 0.25 | 20 | 18 | 475 | 25.5 |
| 0.25 | 30 | 27 | 污染 | — |
| 0.50 | 10 | 18 | 411 | 32.1 |
| 0.50 | 20 | 27 | 593 | 13.4 |
| 0.50 | 30 | 8 | 296 | 23.6 |
| 0.75 | 10 | 27 | 污染 | — |
| 0.75 | 20 | 8 | 648 | 36.9 |
| 0.75 | 30 | 18 | 539 | 11.3 |
| 对照 | 30 | 8 | 955 | 18.6 |

表5 MNNG对水稻离体花药愈伤组织诱导的影响

| 供试材料 | 浓度(mg/l) | 时间(hr) | 温度(°C) | 培养花药数 | 愈伤组织诱导率(%) | 为对照的百分数 |
|-------|----------|--------|--------|-------|------------|---------|
| 77-32 | 0 | 15 | 8 | 573 | 41.2 | 100.0 |
| | 25 | 15 | 8 | 711 | 23.9 | 58.0 |
| | 50 | 15 | 8 | 627 | 19.0 | 46.1 |
| | 100 | 15 | 8 | 643 | 10.7 | 26.0 |
| 5F-1 | 0 | 15 | 8 | 446 | 33.2 | 100.0 |
| | 25 | 15 | 8 | 378 | 24.6 | 74.1 |
| | 50 | 15 | 8 | 410 | 19.8 | 59.6 |
| | 100 | 15 | 8 | 330 | 6.7 | 19.5 |

2. 诱变剂对愈伤组织分化的影响

EMS 处理离体花药对愈伤组织分化的影响见表2和表6。表6表示 EMS 处理的

三个因素对绿苗分化率的相对作用。各K值分别是各因素在每个水平上的平均绿苗分化率，R值是每列K值的极差。表2的结果表明，EMS处理花药对愈伤组织的总分化率未见有明显的影响。从表6看到，理论上EMS 2.5毫升/升、处理4小时、在8°C下，绿苗分化率应较高。

表6 EMS的浓度、处理时间和温度对绿苗分化率的相对作用

品种: 04-110

| K 值 | 绿 苗 分 化 率 | | |
|----------------|-----------|---------|---------|
| | 浓度(ml/l) | 时 间(hr) | 温 度(°C) |
| K ₁ | 8.1 | 6.7 | 7.9 |
| K ₂ | 7.1 | 8.0 | 5.8 |
| K ₃ | 5.3 | 5.8 | 6.8 |
| R | 2.8 | 2.2 | 2.1 |

表7是EI和MNNG处理离体花药对愈伤组织分化的影响。从表中看到，EI处理的两个材料，绿苗分化率比对照稍低或未见明显差异，而白苗分化率增加却较明显。MNNG 100毫克/升在8°C下处理品种77-32的花药15小时，白苗的分化率显著增加，白苗占总苗的百分数由对照的57.1%提高到90.6%。

表7 EI和MNNG处理花药对愈伤组织分化的影响

| 供试水稻品种 | 诱变剂种类 | 诱变剂浓度 | 处理时间 (hr) | 温 度 (°C) | 愈伤组织数 | 愈伤组织分化率(%) | | 白苗占总苗 的百分数 |
|--------|-------|---------|--------------|-------------|-------|------------|------|---------------|
| | | | | | | 绿 苗 | 白 苗 | |
| 711 | EI | 0 | 20 | 8 | 405 | 19.0 | 9.6 | 33.6 |
| | | 0.5ml/l | 20 | 8 | 272 | 12.1 | 15.4 | 56.0 |
| 768 | EI | 0 | 15 | 8 | 69 | 14.5 | 4.5 | 23.0 |
| | | 1.0ml/l | 15 | 8 | 107 | 15.9 | 7.5 | 32.0 |
| 77-32 | MNNG | 0 | 15 | 8 | 236 | 6.3 | 8.4 | 57.1 |
| | | 25mg/l | 15 | 8 | 170 | 2.4 | 8.2 | 77.8 |
| | | 100mg/l | 15 | 8 | 69 | 1.5 | 14.5 | 90.6 |

3. 诱变剂处理培养花药对花粉植株性状变异的影响

由于花粉植株第一代在温室中盆栽，不便比较其性状变异，1978—1980年我们重点考查了水稻品种04-110、04-G84、西南175和768四个材料经诱变剂处理后的花粉植株在田间第二代、第三代的性状表现，主要观察大的性状变异。

EMS处理04-110品种所得到的34个株系中有3个株系出现显著变异。其中一个株系矮秆、籽粒较大，它的株高平均降低27厘米，千粒重明显增加，(表8和图1)。另一个株系，半矮秆，分蘖增多，结实率较高。还有一个株系晚熟10天左右，分蘖增多，植株稍矮(图2)。而对照组10个株系中未观察到突变株。表8中另一个材料是EMS处理品种西南175的离体花药，在30个株系中出现的一个早熟突变株系，突变株H₂比对照早熟20天，籽粒稍大，但抗病性较差。H₃它的早熟性及其他主要性状都表现相对稳定。

EI处理04-G84的20个H₂花粉植株株系中，出现一个早熟、矮秆、株型紧凑、

表 8 EMS处理水稻离体花药产生的一个矮秆和一个早熟突变株的一些性状

| 供试品种 | 花粉植株代数 | 诱变剂处理条件 | 性 | | | 状 | | |
|--------|----------------|---------------------------|-------------|------------|------------|---------------|------------|------------|
| | | | 全生育期 (天) | 株高 (CM) | 穗长 (CM) | 单株有效 穗 (个) | 结实率 (%) | 千粒重 (克) |
| 04-110 | H ₂ | 对照 | 175 | 110.8 | 22.5 | 3.5 | 53.5 | 20.8 |
| | | EMS, 2.5ml/l, 4小时, 18℃ | 167 | 83.7 | 19.6 | 4.0 | 82.3 | 28.5 |
| 西南175 | H ₂ | 对照 | 180 | 82.0 | 23.2 | 3.6 | 75.2 | — |
| | | EMS, 2.5ml/l, 8小时, 8℃ | 160 | 76.0 | 23.0 | 3.7 | 77.8 | — |
| 西南175 | H ₃ | 对照 | 175 | 75.0 | 20.0 | 3.5 | 60.2 | — |
| | | EMS, 2.5ml/l, 8小时, 8℃ | 150 | 70.0 | 20.2 | 3.6 | 67.9 | — |

剑叶角度小和较抗稻瘟病的突变株系。它比对照早熟15—20天, 株高比对照低20—30厘米。它的 H₃ 仍以单株栽于大田, 我们对400个单株的性状进行了调查, 结果仍表现早熟、矮秆和生长整齐等特性(表9和图3)。而对照组的花粉植株未观察到大的突变。

表 9 EI 处理水稻离体花药产生的一个早熟、矮秆突变株系的一些性状 品种: 04-G84

| 花粉植株代数 | 诱变剂及处理条件 | 性 | | | 状 | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|-------|
| | | 全生育期 (天) | 株高 (CM) | 穗长 (CM) | 单株有效穗 (个) | 结实率 (%) | 芒性 |
| H ₂ (1979) | 对照 | 180 | 115 | 21.3 | 3.4 | 49.2 | 短芒或无芒 |
| | EI, 0.5ml/l, 30小时, 8℃ | 165 | 92 | 19.4 | 4.4 | 78.6 | 无芒 |
| H ₃ (1980) | 对照 | 180 | 107.5 | 18.6 | 3.5 | 71.8 | 短芒或无芒 |
| | EI, 0.5ml/l, 30小时, 8℃ | 160 | 76 | 16.3 | 4.3 | 80.0 | 无芒 |

由试验结果可以看到上述用 EMS 处理04-110和西南175, EI处理04-G84所得到的花粉突变株, 其后代的性状基本上是稳定的, 而且突变性状可以遗传。结果又表明, 株高和成熟期是一个较易诱发突变的性状。

我们观察到材料之间对诱变剂的反应有差异, 例如品种768经诱变处理的31个 H₂ 代花粉株系中, 仅一个出现结实率比对照有提高外, 没有出现早熟和矮秆的类型。我们还看到, 伴随早熟、矮秆突变会出现穗变小或粒变少以及有的植株抗病性较差。其次, 在试验中也看到花粉突变后代的个别株系中的极少数植株的性状发生分离, 如04-G84诱变后 H₂ 代出现的一个变异株系, 穗较短, 结实率不高, 而在 H₃ 的100个单株中就出现了一个矮秆不育和两株半不育株(图4)。

我们还观察到西南175这个突变株 H₂ 在幼苗三叶期, 叶子普遍出现白色条纹和白色叶斑。幼苗期的叶条纹和叶可作为花粉植株突变效应的一种指标, 这与前人的报道也是一致的^[9]。

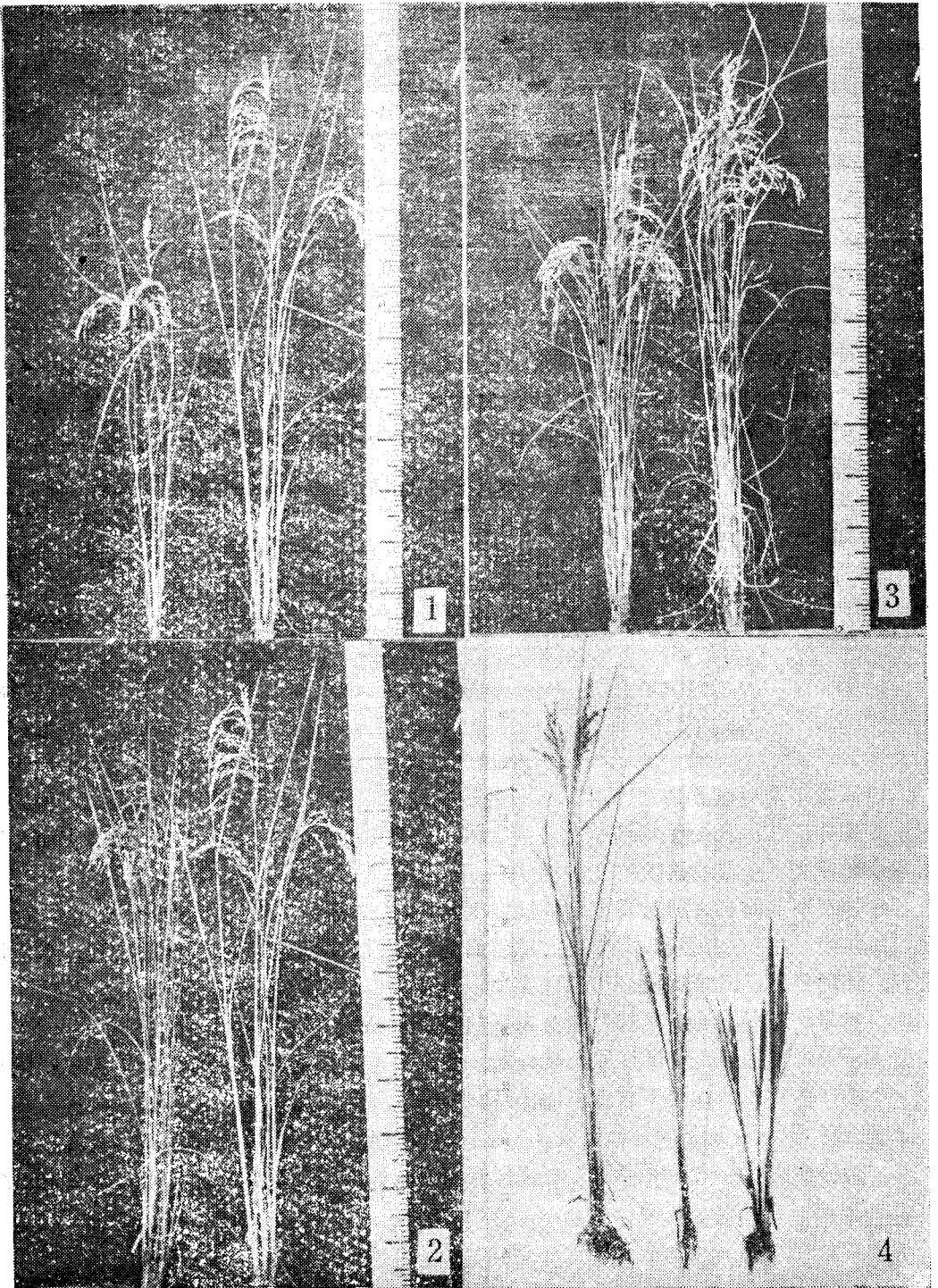


图 1 左：EMS 处理水稻品种 04-110 的花药产生的一个矮秆突变株系的一个单株。

右：对照。

图 2 左：EMS 处理水稻品种 04-110 的花药产生一个晚熟、分蘖增多的变异株系的单株。

右：对照。

图 3 左：EI 处理水稻品种 04-G84 的花药产生一个早熟矮秆突变株系的单株。

右：对照。

图 4 EI 处理水稻品种 04-G84 的花药，H₂ 有一个株系的穗子变小，结实率不高（左），而这个株系 H₃ 的 100 个单株中，出现一株矮秆不育和两株半不育株（右、中）。

讨 论

水稻花药培养及其在单倍体育种上的应用，在我国取得了一定的成绩^[5]，而把花药培养和理化因子诱变结合起来研究，也值得进行。通过单倍体进行化学诱变，可能是产生突变体的途径之一。

初步看来，化学诱变剂处理培养早期花药，可能提高突变频率。尤其是株高和成熟期是较易诱发突变的性状。当突变株一旦出现，其后代一般是稳定的。这就证明花粉单倍体细胞诱变，在性状表现上不存在显性掩盖隐性的问题。一旦发生了变异，在花粉植株的当代，一般就会表现出来，可以提高诱变育种的效率。

单倍体诱变出现的大突变，也和其他诱变一样，通常会出现一些不利的多效性，如出现早熟矮秆的同时，有的穗变小，粒变少，也有的表现抗病性较差。因此，要获得人们所需要的有益突变，仍然要有相当数量的变异体供选择，这就需要大幅度地提高花粉植株的诱导率和分化率。

在我们的诱变试验中，在低剂量和较低温度下处理培养花药，明显提高了愈伤组织的诱导率，随着剂量的增加和温度的增高，愈伤组织的诱导率下降。诱变剂处理培养花药，对愈伤组织总的分化率未见明显影响，但花粉白苗增加，在花粉植株中出现了变异株。由于所产生的变异体中，大突变少，得到的变异体数量不多。所以尚未观察到花粉植株的突变率与愈伤组织诱导率和分化率之间的相关性，这须进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Carlson, P. S. 1970, Induction isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *nicotiana tabacum*. Science, 168, pp. 487—489.
- [2] Maliga, P., 1976; Isolation of Mutants from cultured plant cells. In: Cell genetics in higher plants, ed. by Dudits, D. et al, pub. by. Akademiui Kiado, Budapest, pp. 59—74.
- [3] Widholm, J. M., 1977; Selection and characterization of biochemical mutants. In: plant tissue culture and its biotechnological application, ed. by Barz, W. et al, Springerlag Berlin, pp. 112—122.
- [4] Chaleff, R. S. and P. S. Carlson, 1975; Higher plant cell as expermental organisms. In: Modification of the information content of plant cells. Markham, R. et al (eds). New york; North-Holland, pp. 197—214.
- [5] Hu Han, 1978; Advance in anther culture investigations in China. In: Proceedings of symposium on plant tissue culture, pp. 3—10.
- [6] 朱至清、王敬驹等, 1975: 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻培养基. 中国科学, (5): 484—490.

- [7] 胡忠、黄仕周、庄承纪, 1980: 水稻花粉白苗成因的研究。I、化学诱变剂对水稻花粉白苗发生的影响。云南植物研究, 2, 188—193。
- [8] 北京大学数学力学系数学专业概率统计组, 1976: 正交设计, 214页, 人民教育出版社。
- [9] 中国科学院遗传研究所《突变育种手册》翻译组, 1973: 突变育种手册, 130—131页, 科学出版社。

EFFECTS OF CHEMICAL MUTAGENS ON THE INDUCTION AND THE DIFFERENTIATION OF POLLEN CALLUS AND CHARACTER VARIATIONS OF POLLEN-PLANTS IN RICE

Zhuang Chengji, Huang Shizhou and Hu Zhong
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

Abstract

The anthers of several rice varieties at the early stage of culture *in vitro* were treated with mutagens ethyl methane sulphonate (EMS), 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) and ethylene imide (EI) at different doses (EMS: 2.5, 3.5, 4.5, ml/l, MNNG: 25, 50, 100 mg/l, EI: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 ml/l) different temperature (8, 18, 27°C) and different duration (2, 4, 8, 10, 20, 30 hrs). It was observed that at lower dose and temperature, the mutagen treatment raised the induction frequency of callus, but it decreases rapidly with the increase of doses, temperature, and duration of mutagen treatment, and correspondingly, the percentage of albino plantlets increases with no obvious change in total differentiation frequency of calli.

Among 120 H_2 strains of pollen-plants there are 6 strains in which drastic variation in characters, mainly plant height, mature period and fertility occur, and these variations of characters are stable and heritable. The drastic variation in characters was not observed in pollen-plants of no mutagen treatment.