

疣粒野生稻胚性愈伤组织诱导及分化成苗研究

秦发兰, 陈葆棠, 朱永生, 林兴华, 张端品

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 疣粒野生稻是优异的稻种资源。目前用常规方法及分子标记技术利用其有利基因还非常困难, 体细胞杂交技术是一条比较可行的途径, 但疣粒野生稻是一种典型的难培养植物, 体细胞杂交的前期研究非常重要。本研究以疣粒野生稻的成熟种子为外植体, 采用不同的培养基诱导愈伤组织, 并对愈伤组织的状态进行改造, 结果表明, NB₂ 培养基最适宜于诱导愈伤, 添加 0.1% PG 及 0.2mg/L KT 有利于愈伤状态的改造; 愈伤分化时采用 NBK₂ 培养基效果好, 绿苗分化率高; 采用 A₂ 及 NB₂ 液体培养基振荡培养, 获得了理想的疣粒野生稻胚性细胞悬浮系。

关键词: 疣粒野生稻; 胚性愈伤组织; 细胞悬浮系; 绿苗分化

中图分类号: S511.9 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2001)05-0560-04

Studies on Inducement of Embryogenic Callus from Oryza meyeriana and Plantlets Regeneration

QIN Fa-lan, CHEN Bao-tang, ZHU Yong-sheng, LIN Xing-hua, ZHANG Duan-pin

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: *Oryza meyeriana* is one of excellent germplasm s. At present, it is difficult to transfer its genes by conventional methods and molecular technologies. However, somatic fusion is one of feasible approaches. The preliminary research of somatic fusion is crucial because *O. meyeriana* is recalcitrant to regeneration. High quality embryogenic calli and green plantlets were obtained from mature seeds of wild rice *Oryza meyeriana*. The result indicated that NB medium was excellent for calli induction when 2mg/L 2, 4-D, 0.1% PG and 0.2mg/L KT were added. And NB medium with 2mg/L KT was also excellent for high ratio of green plantlet differentiation. High quality embryogenic cell suspension lines were obtained with AA₂ and NB₂ liquid media by rotating culture.

Key words: *Oryza meyeriana*; Embryogenic calli; Suspension cell; Green plantlet differentiation

疣粒野生稻(*Oryza meyeriana*)主要集中在我国的云南省及海南省。前人对云南疣粒野生稻进行多抗性鉴定, 发现其对白叶枯病接近免疫, 高抗细菌性条斑病和褐稻虱^[1], 在水稻抗性育种上具有重要的发掘潜力。疣粒野生稻属非 AA 染色体组^[2], 与栽培稻(AA 染色体组)存在有性杂交障碍, 采用常规方法利用疣粒野生稻的有利基因非常困难。而利用体细胞杂交技术将疣粒野生稻有利基因导入栽培品种并以栽培稻作轮回亲本进行回交, 结合分子标记技术提高选择效率是一条利用有利基因的可行途

径。疣粒野生稻的细胞培养比较困难^[3], 培养技术体系尚不成熟。笔者对疣粒野生稻胚性愈伤组织诱导、再生以及胚性细胞悬浮系建立等进行了研究, 以期 为疣粒野生稻与栽培稻的细胞融合、利用该优良基因库奠定基础。

1 材料与方 法

研究所用疣粒野生稻采集于云南省景洪县。以成熟种子作外植体诱导愈伤组织, 种子去颖壳后, 用 70% 乙醇表面消毒 1min, 然后用 0.1% 的升汞(Hg-

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 国家“九五”生物技术攻关计划项目(96-C01-01-06)

作者简介: 秦发兰(1967-), 女, 讲师, 主要从事水稻遗传育种研究。Tel: 027-87282104; Fax: 027-87280016; E-mail: croplab@mail.hzau.edu.cn

Cl₂) 消毒 10~15 min, 经无菌水清洗后接种于培养基, 诱导愈伤组织后进行分化, 待再生植株生长旺盛后移栽温室。

建立胚性细胞悬浮系时, 挑取生长旺盛、颜色淡黄、结构致密、结合松散的颗粒状胚性愈伤组织转入液体培养基, 在 25℃、80 r/min 黑暗的条件下振荡培养, 3~4 d 继代一次, 吸出原培养基 1/3, 再加入等量的新鲜培养基。待悬浮细胞系建成后, 吸取颗粒状悬浮细胞转到分化培养基上, 测试其再生能力。

实验所用培养基分别为: 愈伤组织诱导培养基: I NB₂, N₆ 大量元素 + B₅ 微量元素和有机成分^[4], II MS 培养基, 2, 4-D 的浓度为 2 mg/L 或 4 mg/L; 愈伤组织继代培养基: I NB₂ + 0.1% PG (PG 为本室陈葆棠博士研制的一种植物细胞抗衰老剂^[5]), II

NB₂ + 0.1% PG + 0.2 mg/L KT; 分化培养基: NBK₂, MSK₂; 液体培养基: NB₂ + 500 mg/L 脯氨酸 + 300 mg/L 水解酪蛋白; AA₂^[6] + 500 mg/L 脯氨酸 + 300 mg/L 水解酪蛋白; 繁苗培养基: MS + 1 mg/L 6-BA; 上述培养基均含 3% 的蔗糖、0.6% 的琼脂, pH 为 5.8。愈伤组织诱导培养基及继代培养基中的下标数字指 2, 4-D 的浓度; 分化培养基中的下标数字指 KT 的浓度, 单位为 mg/L。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

以成熟种子诱导愈伤组织的实验分别在 1997 年冬季和 1998 年夏季进行, 主要试验结果见表 1。

表 1 冬夏季不同培养基诱导疣粒野生稻愈伤组织

Table 1 Calli induced on different medium in winter and summer

季节 Season	培养基 Medium	接种种子数 No. of seeds	初始出愈时间 Days of calli induced (d)	出愈率 ¹⁾ Ratio of calli induced (%)
冬季 Winter	NB ₂	41	30	20
夏季 Summer	NB ₄	34	60	10
	MS ₂	27	8	14
	NB ₂	46	8	57

¹⁾ 出愈率 = (诱导愈伤数/接种种子数) × 100% Ratio of calli induced = (No. of calli / No. of seeds) × 100%

冬季试验时 NB₂ 培养基上 30d 诱导出愈伤组织, NB₄ 培养基上 2 个月才出现愈伤组织; 夏季试验在 NB₂、MS₂ 培养基上接种后 8d 首次出现愈伤组织。冬季试验, 在两种 2, 4-D 浓度的培养基上, 种子初始出愈时间和出愈率不一样, 可能是 4 mg/L 的浓度对诱导疣粒野生稻愈伤有抑制作用。夏季试验在接种后 8d 就出现了愈伤, 比冬季大大提前, 可能是夏季易于打破疣粒野生稻较强的种子休眠性, 更容易诱导出愈伤。诱导出的愈伤组织质地各不相同, 有些呈金黄色颗粒状, 有些呈果胶状。几种培养基以 NB₂ 诱导愈伤的效果最好。

当愈伤呈小米粒状时, 切除种子胚乳部分, 转至继代培养基 I 上, 愈伤组织生长旺盛, 很快增殖至 1 cm 大小, 呈黄色颗粒状、易分散, 初步表明已成功地诱导出疣粒野生稻的胚性愈伤组织。继代几次后, 愈伤开始发粘, 用愈伤继代培养基 I、II 分别培养, 继代培养基 II 上的愈伤质地变硬、颜色微黄, 表明植物抗衰老剂 PG 可能有阻止愈伤组织褐化的作用, 低浓度的 KT 可能有阻止愈伤发粘的作用, PG 与 KT 同时使用有助于改善愈伤质地。

2.2 胚性愈伤组织分化成苗研究

在分化培养基 NBK₂ 中, 愈伤增殖较快, 几天后愈伤组织外部严重褐化, 但内部未褐化的少数细胞迅速增殖, 新愈伤组织呈白色、质地致密, 50d 后分化出绿苗。新长出的愈伤组织生长快, 有的呈大块状, 直径达 1 cm 之多。这些新生愈伤组织不断增殖并分化出绿苗。一块愈伤组织最多可分化出 15 株绿苗, 愈伤组织分化成苗结果如表 2 所示。同时将愈伤组织转到分化培养基 MSK₂ 上, 约 2 个月也分化出相当数量的绿苗和极少数的白化苗, 说明疣粒野生稻愈伤分化成苗对培养基的选择性不强。

由愈伤组织分化出的绿苗根系生长良好, 将小苗直接转到繁苗培养基上壮苗, 多数小植株发生分蘖, 可进行分蘖繁殖。经统计, 由一粒疣粒野生稻种子诱导的愈伤组织, 在 10 个月后可以分化出近 200 株的绿苗。

2.3 胚性悬浮系的建立

悬浮培养初期, 悬浮细胞内液泡较大, 细胞内容物稀少, 细胞形状不规则, 呈钩状、镰刀状(图 1、2)。两个月后, 悬浮细胞生长明显加快, 其密实体积每周

表 2 愈伤组织分化成苗

Table 2 Plantlets differentiated from calli

培养基 Medium	最初分化出苗时间 Days of regeneration(d)	分化绿苗数 No. of green plantlets	分化白苗数 No. of albinos	绿苗率 ¹⁾ Ratio of green plantlet
NBK ₂	50	134	2	98.5%
MSK ₂	59	63	3	95.4%

¹⁾绿苗率= (分化绿苗数/分化总苗数)× 100%; Ratio of green plantlet= (No. of green plantlets/Total No. of plantlets)× 100%

可增加 1/3~ 1/2, 开始有一小部分细胞团形成; 处于细胞团中心的细胞, 其细胞质逐渐变浓, 而边缘的细胞细胞质仍很稀薄(图 3)。3~ 4 个月后, 处于悬浮培养后期的细胞基本变成椭圆形, 细胞质浓, 细胞膜光滑, 内含物丰富(图 4), 密实体积每周增加一倍, 表明理想的细胞悬浮系已建成, 可用于进一步的原

生质体培养研究。

将两种液体悬浮培养基建立的细胞悬浮系分别转到 NBK₂ 培养基上进行分化, 悬浮细胞在分化培养基上生长迅速, 靠近培养基的一层直接分化出绿点及小苗, 表明这两种培养基建立的疣粒野生稻悬浮系都保持一定的胚性, 具有分化成苗的能力。



图 1 开始悬浮细胞

Fig. 1 Suspension cells at initial stage

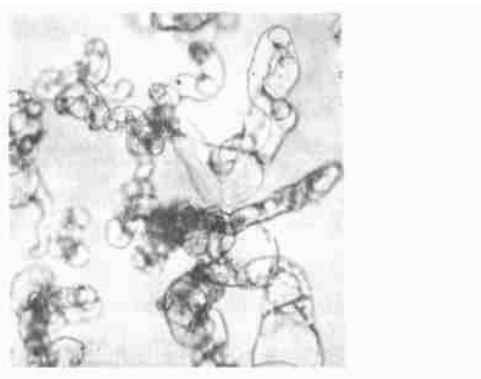


图 2 早期悬浮细胞

Fig. 2 Suspension cells at early stage

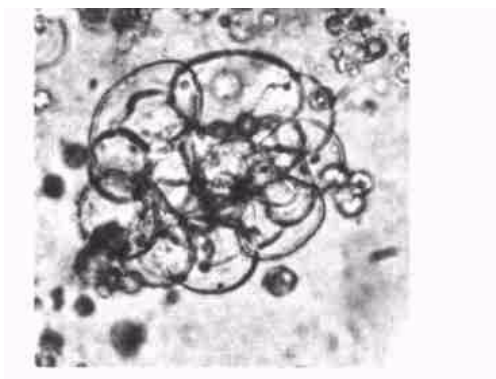


图 3 中期悬浮细胞

Fig. 3 Suspension cells at middle stage

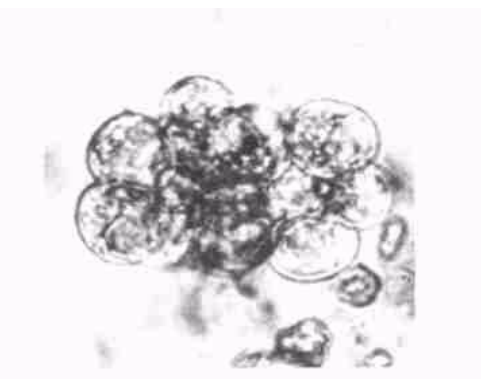


图 4 后期悬浮细胞

Fig. 4 Suspension cells at later stage

3 讨论

克服疣粒野生稻组织培养困难的关键是获得理想的胚性愈伤组织。何光存等^[31]认为, 成熟种子、幼穗都可用作外植体。本研究表明, 在继代培养基中添加 PG 及 KT, 可从成熟种子得到高质量的胚性愈

伤。建立悬浮细胞系时, 愈伤组织从固体培养基向液体培养基的过渡阶段非常关键, 在悬浮培养的初期, 细胞团生长缓慢, 继代时每次只吸出少量的原始培养基(1/3 左右), 有利于悬浮细胞快速生长, 充实细胞内容物。若每次吸出的原培养基过多, 将导致悬浮细胞生长缓慢, 细胞内容物难以充实, 以致不能建成

理想的细胞悬浮系。

References:

- [1] Ying C S. Rice Germplasm Resource in China[M], Beijing: China Agricultural Science and Technique Press, 1993: 17-28. (in Chinese)
应存山, 中国稻种资源[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993: 17-28.
- [2] Aggarwal R K, Brar D S, Khush G S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization[J]. Mol. Gen. Genet. 1997, 254: 1-12.
- [3] He G C, Shu L H, Liao L J, et al. Construction a system of cryopreservation and protoplast culture to wild rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Science in China(Series C), 1998, 28(5): 444-449. (in Chinese)
- [4] Wu C Y, Chen Y. A study on the genotypical differences in anther culture of Keng rice (*Oryza sativa* sub sp. Keng)[J]. Acta Genetica Sinica, 1987, 14(3): 168-174. (in Chinese)
吴传银, 陈英. 粳稻花药培养基基因型差异的研究[J]. 遗传学报, 1987, 14(3): 168-174.
- [5] Chen B T, Xie Y F, Zhang D P, et al. The study in the application of phytic acid in cell culture of rice (*Oryza meyeriana*) [J]. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 1996, 29(4): 331-336. (in Chinese)
陈葆荣, 谢岳峰, 张端品, 等. 植酸在细胞培养中的促进作用[J]. 实验生物学报, 1996, 29(4): 331-336.
- [6] Wakasa K, et al. Colony formation from protoplasts of nitrite reductase different rice cell lines[J]. Plant Physiol. 1984, 117: 223-231.

欢迎订购《中国农业科学》2001 年增刊

2001 年第四届北京高新技术产业国际周首次把现代农业科技专家论坛正式列入国际周内容, 表明新世纪伊始, 国家对农业与农业高新技术的重视达到了一个新的高度。这次论坛以现代生物技术、信息技术、设施农业、农业工程、21 世纪中国农业等为主题进行了讲演与交流。来自农业界、农业经济学界、农业科学技术与工程领域的专家、学者, 站在世界农业科技、经济发展的前沿, 探讨了中国农业和农业科技发展面临的机遇与挑战, 分析了我国的自身优势与不足, 发表了对中国农业发展和农业科技具有启迪意义的认识和看法, 提出了我国农业和农业科技发展战略。

为纪念这次具有历史意义和现实意义的盛会, 为使应邀在论坛上发表演讲的专家、学者的真知灼见更加广泛地传播, 我们将此次论坛的论文进行了编辑加工, 现以《中国农业科学》2001 年增刊的形式正式出版。

本期增刊收录了 31 位国内外知名专家、学者的论文, 分六个专题编辑成册, 面向社会发行。六个专题分别为: 21 世纪的中国农业、加入 WTO 与中国农业、现代生物技术与中国农业、信息技术与中国农业、农业工厂化发展前景、农业工程现状与发展前景。期望通过本刊将这次论坛上汇集的学术思想和研究成果广泛传播。

编辑部现有少量现刊, 定价 15 元/册, 需要者请直接汇款与编辑部联系邮购。

地址: 100081 北京中关村南大街 12 号 《中国农业科学》编辑部

电话: 010-68919808, 68976244 传真: 010-68976244

E-mail: zgnykx@mail.caas.net.cn