

影响水稻幼穗培养体细胞胚胎发生因素的研究

刘选明 周朴华

(湖南农业大学生物技术系 长沙 410128)

摘 要 用水稻幼穗为外植体进行组织培养,研究了影响其体细胞胚胎发生的有关因素,建立了高频率体细胞胚胎发生的培养程序。结果表明不同基因型之间体细胞胚胎发生率的差异达到 61.2%;生长素 2,4-D 对诱导水稻体细胞胚起重要的调控作用,细胞分裂素 BA 有一定的协同促进作用。干燥处理可提高愈伤组织体细胞胚胎发生率,愈伤组织含水量在 60%~80% 范围的培养效果较好;外源 DNA 溶液浸泡发育早期的心状体细胞胚,其进一步发育时异常胚的频率显著增加,成苗率降低。

关键词 水稻,幼穗培养,体细胞胚胎发生

学科分类号 Q942.1

体细胞胚用于植物的无性繁殖、遗传操作与研制人工种子等方面已广泛受到人们的重视^[1,2]。自 80 年代初以来的研究表明体细胞胚胎发生是禾本科植物离体培养再生植株的主要途径^[3]。但如何提高体细胞胚发生率,建立良好的体细胞胚无性系,仍是水稻生物技术中的重要难题之一。虽然国内外科学家在水稻组织培养中就提高绿苗分化频率作了广泛研究^[4],而提高水稻,特别是杂交水稻的体细胞胚发生率的研究较少。作者以杂交水稻新组合为主要材料研究基因型、激素和继代时间对体细胞胚胎发生的影响,并首次进行干燥处理和外源 DNA 浸泡处理对体细胞胚胎发生、发育影响的探讨,旨在为建立良好的体细胞胚无性系,结合水稻育种开展有关研究奠定前期基础,为研制杂交水稻等植物的人工种子提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

水稻材料 16 个,其组合与品种名称见表 2。以幼穗切段为外植体。

1.2 愈伤组织诱导、增殖

采取各材料 2~3cm 长的幼穗,经消毒、漂洗,在无菌条件下切成 1cm 长的切段,培养诱导愈伤组织,筛选胚性愈伤组织进行继代培养和增殖。培养条件:温度 25℃ ± 3℃,光照强度 3000lx,每天光照 10h。

1.3 体细胞悬浮系的建立

将胚性愈伤组织捣散后接入 MS + 2,4-D 2.0mg/L 的液体培养基进行悬浮振荡培

湖南省教委课题资助。

收稿日期:1997-05-26,修回日期:1998-02-17。

养,振荡速度为 120r/min,培养初期 3~5d 更换 1 次新鲜培养液,1 个月后 10d 添加 1 次新鲜培养液,除改变光照为散射光外,其余的培养条件同前。

1.4 干燥处理

将愈伤组织从固体培养基上取出,放在灭菌滤纸上让其在超静工作台风干 0、2、4、6、8h,分别测定其失水量,然后接种到体细胞胚诱导培养基上继续培养 30d,统计体细胞胚胎发生。

1.5 DNA 提取与浸泡处理

用洪亚辉的改良方法提取水稻紫香糯的 DNA^[5],经检测 $A_{260}/A_{280} = 2.03$, $A_{260}/A_{230} = 2.15$,电泳测定,DNA 相对分子量大于 5.0×10^4 个碱基对。用不同浓度 DNA 液浸泡常规稻 R288 的鱼雷型体细胞胚共培养 36h,然后用无菌水反复漂洗,加入新鲜培养液继续培养,观察体细胞胚的生长发育情况。

1.6 体细胞胚大量发生的程序

培养获得水稻大量体细胞胚胎的程序见表 1。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导与细胞悬浮系的建立

16 个水稻品种的幼穗培养在添加 2,4-D 或与 BA 配合的 3 种 MS 培养基均诱导出愈伤组织(图版 I-1)。但不同基因型间愈伤组织诱导效果的 F 值检结果均达到了显著差异水平。其中 12 号材料愈伤组织诱导率最高,3 种培养基中愈伤组织平均诱导率达 93.6%,其次分别是 6、16、9、4、3、5 号 6 个材料,其余 9 个材料的愈伤诱导率较低,以 2 号最低,其平均诱导率只有 20.6%。在愈伤组织发生时间与生长状态方面,基因型的影响不明显,主要受激素的调节。较高浓度 2,4-D 促进愈伤组织发生,产生愈伤组织时间早,一般为 6~8d,愈伤组织生长速度快,但质地较疏松;降低 2,4-D 浓度并同时添加低浓度 BA,愈伤组织发生时间延迟,一般为 10~12d,但愈伤组织质地较致密,多为胚性愈伤组织。上述结果表明:进行水稻幼穗的愈伤组织诱导应首先筛选理想的基因型。此外,应以适宜浓度 2,4-D,或与低浓度 BA 配合使用较为理想。

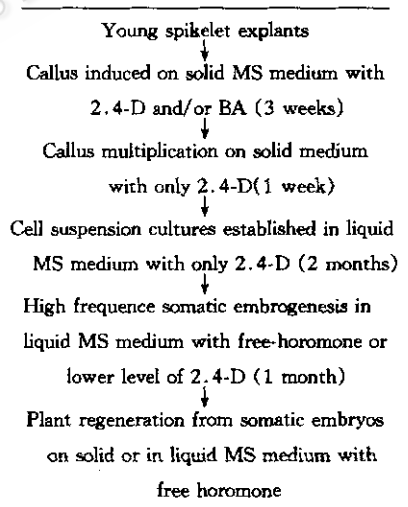
挑取胚性愈伤组织进行悬浮培养,获得了乳白色的含有大量胚性细胞的悬浮细胞系。结果发现,在 0.5-3.0mg/L 的浓度范围,悬浮培养细胞的增殖速度随 2,4-D 浓度降低而变慢,其中以添加 1.5 或 2.0mg/L 2,4-D 的 MS 培养液对建立水稻幼穗体细胞悬浮系较为适宜。16 个材料均建立了良好的悬浮细胞系。

2.2 体细胞胚胎发生

2.2.1 水稻的基因型对体细胞胚胎发生的影响:将 MS + 2.0mg/L, 2,4-D 培养基诱导

表 1 水稻体细胞胚胎大量培养程序

Table 1 Schematic diagram showing the cell culture system used to produce high yield of somatic embryos of rice (*Oryza sativa* L.)



的 16 个材料的愈伤组织分别转入 MSO 培养基上培养。结果发现,水稻基因型之间体细胞胚胎发生的差异很大,其发生率的 F 值检测达到了极显著水平(表 2)。如表中 12 号体细胞胚发生率达 83.9%,而 1 号、2 号的体细胞胚发生发生率只有 29.4%、31.6%。另外,实验发现形成的体细胞胚有单子叶形、双子叶形及畸形 3 种类型,为双子叶形时 2 片子叶一大一小,在有的体细胞胚表面又可产生胚,形成体细胞胚胎群(图版 I-2~6)。基因型对体细胞胚的发育影响不明显。

表 2 水稻基因型对体细胞胚胎发生的影响

Table 2 Effect of genotype on somatic embryogenesis in rice culture

No.	Material (combination)	Number of EC planted		Number of EC forming somatic embryos		Somatic embryogenesis /%		
		I	II	I	II	I	II	Tr
1	02428 x Cai 64-7	25	30	8	8	32.0	26.7	58.7
2	02428 x Cai 46	30	30	10	9	33.3	30.0	63.3
3	02428 x Shuiyuan 287	19	21	8	8	42.1	38.1	80.2
4	Ai CPSL 017 x 02428	25	19	17	12	65.0	63.2	128.2
5	Cai 64-7 x Linwe 422	27	25	11	10	40.1	49.0	89.0
6	Linwe 422 x Miyang 46	27	30	13	13	44.1	43.3	87.4
7	02428 x Miyang 46	26	20	15	11	57.7	55.0	112.7
8	Linwe 422 x 02428	25	20	9	5	34.4	25.0	59.4
9	(V49x02428)F2 x V35	34	15	23	9	67.6	60.0	127.6
10	(V64x02428)F2 x V8210	37	20	20	10	54.1	50.0	104.1
11	1952 x 02428	35	19	18	10	51.4	52.6	104.0
12	1952 x Eyi 115	33	30	29	24	87.9	80.0	167.9
13	Mingfu 66 x Cexuan 88	45	25	12	5	26.7	20.0	46.7
14	AnnongS-1 x zhong88-19	40	20	15	7	37.5	35.0	72.5
15	AnnongS-1 x 86 Cao 37	35	35	16	13	45.7	37.1	82.8
16	line R288	30	30	21	19	70.0	63.3	133.3
T_n						789.6	728.3	1517.8
S^2								198.39
F value				(F _{0.05} = 2.43; F _{0.01} = 3.56)				50.10

Medium: MS with free hormone; EC: embryogenic callus

The results were recoded after EC cultured on medium for 50

2.2.2 胚性愈伤组织的继代培养对体细胞胚胎发生的影响: 将 4 号、7 号、9 号、10 号、11 号和 12 号 6 个不同组合杂交水稻的胚性愈伤组织继代培养在 MS + 1.0mg/L 2, 4-D 培养基上, 20d 转移一次, 在继代培养过程中将胚性愈伤组织分别转移到 MSO 培养基上培养观察其体细胞胚胎发生, 结果看出, 9 号的胚性愈伤组织在继代培养过程中其体细胞胚的发生频率波动幅度较大, 其余组合的体细胞胚胎发生率在继代培养过程中基本保持

相对稳定(图 1)。所以,在继代培养中大多数组合的杂交水稻体细胞胚胎的发生力可以保持较长时间,这为开展实验操作与进一步应用提供了方便。

2.2.3 胚性愈伤组织干燥处理对体细胞胚发生的影响:干燥处理对不同基因型水稻体细胞胚发生率的影响有明显差异(表 3)。(1)适度干燥处理能提高水稻的体细胞胚发生率,但其因型间差异大。如表 3 中 11 号材料经干燥处理后体细胞胚发生率提高了 16.4%,而 9 号材料只提高 0.6%,其余 5 个材料的情况间于两者之间。(2)水稻愈伤组织含水量随干燥处理时间变化而改变,干燥处理 0、2、4、6、8h,愈伤组织分别失水为 0%、20.5%、39.2%、48.7%、69.8%,它们含水量则分为 100%、79.5%、60.8%、51.3%、30.2%。含水量从 100%到 60%,随着含水降低,体胚发生率升高,其中在含水量为 60%~80%之间效果较好,但含水量低于 60%以后,试验的 7 个材料的体细胞胚发生率均降低。此外,试验中发现适度干燥处理还明显降低了水稻愈伤组织产生畸形胚的频率,促进体细胞胚的发育。

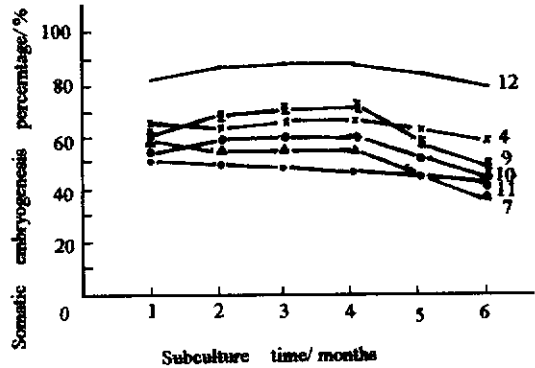


图 1 水稻愈伤组织继代培养 6 个月的体细胞胚发生率

Fig.2 Somatic embryogenesis percentage of callus of rice in subculture for 6 months

表 3 胚性愈伤组织的含水量对其体细胞胚发生的影响

Table 3 Effect of water percentage on the somatic embryogenesis frequency of rice EC

No.	Matterial (Combination)	EC/ %				
		0(100)*	2(79.5)	4(60.8)	6(51.3)	8(30.2)
4	Ai CPSL 017 x 02428	65.0	68.0	72	45.6	8.2
7	02428 x Miyang 46	57.7	71.2	57	52.0	10.0
9	(V49x02428)F2 xV35	67.6	60.0	68.2	46.1	20.0
10	(V64x02428)F2 x V8120	54.1	62.4	50	50.0	2.0
11	1952 x 02428	51.4	57.6	67.8	42.0	15.0
12	1952 x Eyi 115	87.9	89.0	81	53.5	42.1
14	AnnongS-1 x Zhong83-19	37.5	45.6	42	21.0	6.7

Medium:MS with free hormone;The results were recorded after calli were cultured on medium for 30 days

* Put out paratheses;Time/h, put in paratheses ; water/ %

2.2.4 外源 DNA 浸泡处理对体细胞胚发育与成苗的影响:经外源 DNA 溶液处理的心形体细胞胚(图版 I -7),在 MSO 培养液里振荡培养 25d,体细胞胚的发育情况见表 4。从表 4 看出,DNA 溶液处理后水稻 R288 的体细胞胚的发育与成苗均发生了一定的变化。DNA 溶液处理明显提高了双子叶形胚、畸形胚的频率,并与 DNA 的浓度呈正相关,如处

理 1 中畸形胚率达 24.5%，处理 2 中为 14.2%，而对照组只有 3.0%。经 DNA 溶液处理的体细胞胚成苗率虽较对照有所降低。但仍可达到 79.2% 以上，说明 DNA 溶液处理对水稻体细胞胚的伤害程度轻。经 DNA 处理后的试管苗移栽到大田，植株出现了广泛变异。外源 DNA 溶液处理裸露体细胞胚诱变的大田材料选育工作尚在进一步开展。

2.2.5 悬浮胚性细胞的大量体细胞胚胎发生：在悬浮胚性细胞系建立后，静置弃去上清液，加入 MSO 培养液继续振荡培养，此时的振荡速度降低为 60~80r/min，培养 40d，悬浮液里便产生了大量的胚性细胞团、体细胞胚和体细胞胚苗(图版 I -8, 9)。在 MSO 培养液中添加低于 0.1mg/L 的 2, 4-D，悬浮液的褐化程度减轻，有利于体细胞胚发生。

表 4 DNA 溶液浸泡处理对水稻 R288 的体细胞胚发育的影响

Table 4 Effect of DNA dip treatment on the development of somatic embryo of rice "R288"

No.	DNA conc. /mg·L ⁻¹	Number of somatic embryos treated	Types of somatic embryo development			Plantlets from somatic embryos	Regenerated /%
			Single cotyledon embryos	Double cotyledon embryos	Abnormal embryos		
1	46.0	783	415	176	192	680	86.4
2	23.0	500	301	128	71	396	79.2
ck	0	300	264	27	9	280	93.3

Medium: MS with free hormone; The results were recorded after somatic embryos were cultured for 25 days.

3 讨 论

Vasil 和许智宏等人对禾谷类作物作了大量的研究，发现禾谷类再生植株主要是通过体细胞胚发生途径^[3, 6]。我们的研究结果与此一致。实验发现水稻的基因型明显影响其愈伤组织诱导和体细胞胚发生，充分说明在水稻中基因型对体细胞胚胎发生的强烈制约性。因此，开展有关水稻的遗传操作研究时必须注意选用理想的研究材料，这样利于达到预期的目标。

2, 4-D 对水稻体细胞胚发生的作用同在别的很多植物上一样，它是一个重要因子，起决定作用。同 Kollenbach 提出的观点一致^[7]，但在研究中发现 BA 在水稻体细胞胚发生中与 2, 4-D 有协同促进作用。这些结果说明植物激素对不同植物体细胞胚发生的影响具有明显差异。关于水稻继代培养的愈伤组织体细胞胚胎发生力，可保持较长时间，这为实验操作与进一步应用提供了方便。

外源 DNA 溶液浸泡水稻种子可以诱导种胚植株发生广泛变异，应用于育种已选育出了新的品种^[5]。我们首次采用外源 DNA 溶液处理体细胞胚，结果发现明显影响体细胞胚的发育和成苗，并获得了广泛的大田变异植株。采用该技术提高了工作效率，可以用较少的 DNA 溶液在单位体积内处理大量的体细胞胚材料，同时又能让 DNA 溶液直接作用并导入裸露的体细胞胚，提高了诱变效果。所以，该项研究可为建立农业分子育种新技术提供技术参考。

关于干燥处理对水稻愈伤组织体细胞胚胎发生的影响研究尚未见报道。本文研究表

明在一定程度的干燥处理能较大幅度地提高其体细胞胚发生率,改善体细胞胚的发育。这可能是干燥处理后细胞失水使愈伤组织处于饥饿状态,再转入新鲜培养基后由于愈伤组织细胞膜透性的改变,利于对培养基中养料吸收和利用所致。至于这一作用的详细机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Redenbaugh K, Slade D, Viss P *et al.* Hort Science, 1987, 22:803~809
- 2 Tissa S, Bryand M K, Stephen R B. In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26:85~90
- 3 王大元. 细胞生物学杂志, 1984, 6: (1):16~20
- 4 赵成章, 吴连斌, 杨长登等, 作物学报, 1997, 23(1):39~43
- 5 洪亚辉, 董延瑜, 任春梅等, 湖南农学院学报, 1993, 19(6):527~531
- 6 许智宏、卫志明、杨丽君, 植物生理学通讯, 1983, (5):40~45
- 7 Kohlenbach H W, In: Thorpe T A (eds), Frontier of Plant Tissue Culture, Canada, 1978, pp. 1~5

Study on the Influence Factors of the Somatic Embryogenesis in Young Spikelet Culture of Rice

Liu Xuanming Zhou Puhua

(Department of Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract The results about the influence factors of somatic embryogenesis of rice by culturing the young spikelet explant from 16 varieties. The culture diagram to produce high frequency somatic embryogenesis was established. The results indicated: Genotype, hormone, subculture time, treatment of desiccation and exogenous DNA had obvious effects on the somatic embryogenesis and development of rice callus derived from spikelet. The difference of somatic embryogenesis percentage among the different varieties was up to 61.2%. Hormone 2,4-D had important role in the induction and development of somatic embryos. BA could control this process in some way. The treatment of desiccation could raise the frequency of somatic embryogenesis, and it was the best when the water percentage of callus was 60%~80%. The percentage of abnormal embryos was increased and the frequency of somatic embryos forming plantlets was decreased when the heartlike embryos were treated with exogenous DNA solution.

Key words Rice, young spikelet culture, somatic embryogenesis



1. Calli from young spikelet of rice; 2. Somatic embryo group from callus; 3. Second embryos forming on the somatic embryo. The abnormal somatic embryo; 4. Un-cotyledon somatic embryo; 5. Double-cotyledon somatic embryo; 6. Single-cotyledon somatic embryo; 7. Heartlike somatic embryo; 8. Somatic embryos in suspension culture in approximately synchronized pattern; 9. Plantlets from somatic embryos in suspension culture