

水稻不同外植体组织培养的差异性及其后代变异的研究

郑文静¹, 张燕之¹, 王昌华¹, 赵家铭¹, 李 晶²

(1. 辽宁省稻作研究所, 辽宁沈阳 110161; 2. 辽宁省台安县农业技术推广中心, 辽宁鞍山 114100)

摘要 [目的] 选用适宜的外植体, 使水稻出苗率最高且最易获取有利变异。[方法] 以成熟胚、幼胚、幼穗及花药为外植体进行水稻组织培养, 考察同种培养条件下 4 种外植体的诱愈率及诱变率, 并调查各种方法所获后代的有利变异率。[结果] 以成熟胚为外植体时诱愈率最高; 以花药为外植体时获得的愈伤组织诱变率最高; 以成熟胚为外植体时获得的后代材料有利变异率最高。[结论] 该研究为水稻育种提供了参考依据。
关键词 水稻; 组织培养; 外植体; 差异性; 后代变异
中图分类号 S511.032 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)04-01368-03

Study on the Difference of Tissue Culture with Different Explants in Rice and Their Offspring Variations
ZHENG Wen-jing et al (Rice Institute of Liaoning Province, Shenyang, Liaoning 110161)
Abstract [Objective] The research aimed to select suitable explants to make the seedling emergence rate of rice highest and obtain the favorable variations most easily. [Method] Mature embryo, immature embryo, immature ear and anther were taken as explants to make tissue culture of rice. The callus induction rate and the seedling induction rate of 4 kinds of explants under the same culture conditions were investigated and the rate of favorable variations in the offspring obtained by all kinds of methods was surveyed. [Result] The callus induction rate was highest when mature embryo was taken as explant. The seedling induction rate was highest when anther was taken as explant. The rate of favorable variations was highest in the offspring obtained by taking mature embryo as explant. [Conclusion] The research provided reference basis for the breeding of rice.
Key words Rice; Tissue culture; Explants; Difference; Offspring variation

水稻是我国最主要的粮食作物之一。随着栽培技术的完善和优良品种的不断更新, 近些年来水稻的单产已经大幅度增加。但是, 目前我国水稻育种仍然处于以传统手段为主的阶段, 即采用两亲本杂交, 然后通过系谱法来选择优良后代。后代性状还是接近于两亲本, 变异来源较窄。近年来随着生物技术手段的不断发展, 组织培养技术已经广泛应用于水稻育种中, 然而目前多数育种单位选用的都是花药培养结合常规手段, 而其他培养方式相对被忽视了。事实上, 采用多种外植体进行组织培养能够获取更多的变异, 但是选用哪种外植体出苗率最高且最易获取有利变异目前还未见报导。笔者针对这一问题进行了试验研究, 以期为育种工作者提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 供试品种有辽梗 454、辽梗 294、辽盐 241、辽农

2096、辽梗 244、辽梗 207/辽梗 294、辽梗 207/农林 150、营 8433/95010。以 8 个品种的成熟胚、幼胚、幼穗及花药为外植体。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导。成熟胚、幼胚、幼穗愈伤组织诱导选用 Y2 培养基, 即 MS + 2,4-D(2.0 mg/L) + KT(1.0 mg/L) + 蔗糖(30 g/L) + 琼脂(7.5 g/L); 花药愈伤组织诱导选用 Y1 培养基, 即 N6 + 2,4-D(2.0 mg/L) + KT(1.0 mg/L) + 蔗糖(50 g/L) + 琼脂(7.5 g/L)。

1.2.2 愈伤组织分化。分化培养为 MS + 6-BA(2.0 mg/L) + NAA(0.2 mg/L) + MET(2.5 mg/L) + 蔗糖(30 g/L) + 琼脂(7.5 g/L)。

1.2.3 绿苗移栽。组培苗上叶生长至瓶口时先移入蛭石中, 新根长出后移入温室, 第 2 年春天移栽于田间。

表 1 不同材料接种外植体数及诱导出的愈伤组织数据统计
Table 1 Statistics of the callus induced from the several kinds of explants of different rice cultivars

品种 Cultivar	接种外植体数 Explants inoculated				诱导愈伤组织数 No. of callus induced			
	成熟胚 Mature embryo	幼胚 Immature embryo	幼穗 Immature inflorescence	花药 Anther	成熟胚 Mature embryo	幼胚 Immature embryo	幼穗 Immature inflorescence	花药 Anther
辽梗 454 Liaojing 454	798	260	360	785	724	125	58	52
辽梗 294 Liaojing 294	802	245	263	695	685	150	153	85
辽盐 241 Liaoyan 241	809	223	253	896	758	145	145	50
辽农 2096 Liaonong 2096	789	185	252	562	723	124	45	45
辽梗 244 Liaojing 244	800	452	330	632	653	266	236	15
辽梗 207/辽梗 294 Liaojing 207/ Liaojing 294	-	-	-	565	-	-	-	69
辽梗 207/农林 150 Liaojing 207/Nonglin 150	-	-	-	663	-	-	-	125
营 8433/95010 Ying 8433/ 95010	-	-	-	452	-	-	-	124

作者简介 郑文静(1974-), 女, 吉林公主岭人, 副研究员, 从事水稻育种方面的研究。
收稿日期 2007-10-15

1.2.4 田间选择。调查各后代品系的生长情况并与之亲本对比, 将产生变异的品系考种, 选取性状优良的进行下一年试验。

2 结果与分析

2.1 不同外植体诱导率的比较 表 1 为不同水稻材料接种外植体数及诱导出的愈伤组织数据统计。由表 2 和图 1 可知,4 种外植体中以成熟胚为外植体时诱愈率最高,达 80% 以上,幼胚和幼穗为外植体诱愈率次之,达 40% 左右;取花药为外植体时杂交组合的诱愈率稍高些,达 20% 左右,而常规品种的花药诱愈率最低,除辽梗 294 外都在 10% 以内。

表 2 不同材料 4 种外植体的诱愈率 %
Table 2 The induction ratio on the several kinds of explants of different rice cultivars

品种 Cultivar	成熟胚 Mature embryo	幼胚 Immature embryo	幼穗 Immature inflorescence	花药 Anther
辽梗 454 Liaojing 454	90.7	48.1	16.1	6.6
辽梗 294 Liaojing 294	85.4	67.2	58.2	12.2
辽盐 241 Liaoyan 241	93.7	65.0	57.3	5.6
辽农 2096 Liaonong 2096	91.6	67.0	17.9	8.0
辽梗 244 Liaojing 244	81.6	58.8	71.5	2.4
辽梗 207/辽梗 294 Liaojing 207/Liaojing 294	-	-	-	12.2
辽梗 207/农林 150 Liaojing 207/Nonglin 150	-	-	-	18.8
营 8433/95010 Ying 8433/95010	-	-	-	27.4

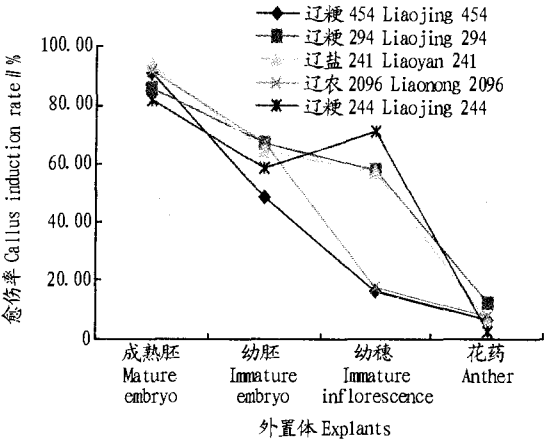


图 1 不同水稻品种(组合)不同外植体的诱愈率比较
Fig.1 The comparison of the callus induction ratio to the several cultivars

2.2 不同外植体诱苗率的比较 表 3 显示了不同水稻材料及不同外植体愈伤组织分化的绿苗数量。由图 2 可知,以成熟胚为外植体时所获愈伤组织分化率较低,除辽盐 241 略高外,其他一般只有 10% ~ 15%,最低的辽农 2096 仅有 5.3%;而以幼胚和幼穗所获愈伤组织分化率偏高一些,个别品种(如辽梗 294)可达 41.7%;分化率最为理想的是花药愈伤组织,即使是常规品种分化率也可达到 43% ~ 70%,而杂交组

表 3 不同材料及不同外植体愈伤组织分化的绿苗数据统计
Table 3 The statistics of offspring came from the explants of different rice cultivars

名称 Cultivar	诱导愈伤组织数 No. of callus induced//块				分化绿苗数 No. of green seedlings//丛			
	成熟胚 Mature embryo	幼胚 Immature embryo	幼穗 Immature inflorescence	花药 Anther	成熟胚 Mature embryo	幼胚 Immature embryo	幼穗 Immature inflorescence	花药 Anther
辽梗 454 Liaojing 454	724	125	58	52	73	23	24	32
辽梗 294 Liaojing 294	685	150	153	85	85	55	58	44
辽盐 241 Liaoyan 241	758	145	145	50	210	23	23	35
辽农 2096 Liaonong 2096	723	124	45	45	38	45	12	26
辽梗 244 Liaojing 244	653	266	236	15	125	87	101	6
辽梗 207/辽梗 294 Liaojing 207/Liaojing 294	-	-	-	69	-	-	-	60
辽梗 207/农林 150 Liaojing 207/Nonglin 150	-	-	-	125	-	-	-	115
营 8433/95010 Ying 8433/95010	-	-	-	124	-	-	-	109

合的花药愈伤组织分化率则多数达到 90% 以上。

2.3 后代材料变异率的比较 进行水稻组织培养,一方面通过体细胞诱导,以期获得可供利用的变异,另一方面通过花药培养,尽快获得所配制杂交组合的纯合后代。该试验中将经愈伤组织分化后获得组培苗后移栽于温室后,约有 90% 的组培苗成活,第 2 年春天将其移入田间,当年共获得体细胞诱导后代材料 872 份,花培后代材料 402 份。经过几个世代的田间选择,共保留了 55 份有价值的变异材料,其中 36 份来自于成熟胚培养,3 份来自于幼胚培养,2 份来自于幼穗培养,另有 14 份材料来自于花药培养,其中由 3 份成熟胚培养所获得后代材料旱培 24、旱培 5 和旱培 7 已参加国家旱稻早熟组区域试验。根据所记录的组织培养所获后代数,可计算出各种外植体所获后代的有利变异率。由表 4 可知,成熟胚培养

的后代有利变异率最高,花药培养次之。因此,除了花药培养,成熟胚培养也是获得有利变异的最有效手段之一。

表 4 不同外植体所获后代及保留后代数统计
Table 4 statistics of the offspring and the reserved offspring on the several kinds of explants

外植体 Explants	所获后代数 Progenies obtained 份	田间所保留的 有利变异后代数 Advantage variations reserved in field//份	有利变异率 Advantage variation rate// %
成熟胚 Mature embryo	531	36	6.78
幼胚 Immature embryo	233	3	1.29
幼穗 Immature inflorescence	218	2	0.92
花药 Anther	427	14	3.28

组织培养后代发生的变异有很多种。该试验结果表明,

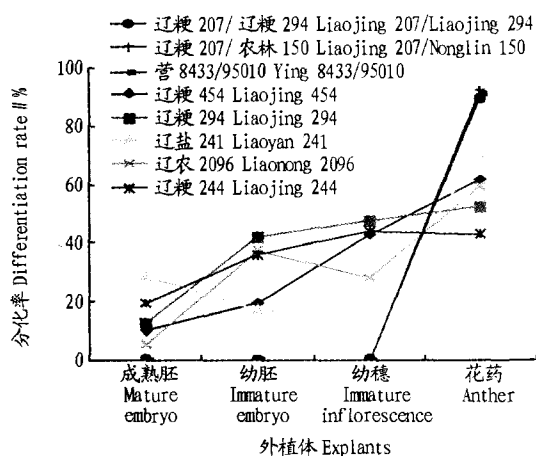


图2 不同材料不同外植体获得的愈伤组织分化率

Fig.2 The comparison of the callus differentiation ratio of the several cultivars

以成熟胚、幼胚、幼穗为外植体时发生的变异基本表现在株高、生育期和粒形3个性状上。花药培养的后代在理论上应该是整齐一致的,但在调查中则发现,约15%左右的株系仍存在分离现象。

3 结论与讨论

该试验选取了8个试验材料,对不同材料的4种外植体

进行愈伤组织诱导培养及分化培养试验。研究结果表明,以成熟胚为外植体时诱变率最高,而进行分化培养时,花药愈伤组织的分化得苗率最高,且该试验结果在参试的8个水稻品种(组合)表现基本一致。

在对组织培养后代的变异率调查中发现,以成熟胚为外植体的后代有利变异率最高。为了增加后代材料的变异率,另外设计了一个试验,目的是考察 γ 射线辐射对愈伤组织分化和后代性状的影响。结果表明,愈伤组织经过1~1.5 Gy辐射后,不仅分化率有所提高,而且后代变异率也较对照有大幅度增加。目前,采用该方法已选育出一批水、旱稻新品系。

近年来随着花药培养的技术不断完善,各育种单位都较多地采用了配制杂交组合结合花药培养选育优良后代品系的方法,而其他组织培养技术则相对被忽视了。其实,以成熟胚作为外植体进行组织培养不但具有取材方便、不受季节限制和操作简单的优点,而且所获得的愈伤组织可用变异率也较高。如果再配合 γ 射线辐射或化学诱变等,那么就能选育出一批优良水稻品种(系)。

参考文献

- [1] LI J M. Plant tissue culture[M]. Beijing: Agriculture University Press, 1989.
- [2] 韦鹏霄,岑秀芬.水稻花药培养及育种应用研究[J].广西农业生物科学,1999,18(1):79-94.

(上接第1356页)

等提出Cd使Chl含量降低^[9],很可能是重金属进入叶绿体内,在局部积累过多,与叶绿体中蛋白质的-SH结合或取代其中的 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等,破坏了叶绿体结构和功能活性所致。

(2)Cd胁迫引起桐花树细胞的内容物发生改变。结果显示,随着Cd胁迫浓度的增加,桐花树幼苗叶片可溶性总糖含量先上升后下降。可溶性糖是参与细胞渗透调节的主要物质之一。Cd胁迫下可溶性糖含量的增加有利于细胞或组织持水,防止脱水,从而使得细胞内大分子糖类的分解加强而合成受抑,直接转变成低分子量可溶的蔗糖、葡萄糖、果糖和半乳糖等,最终导致可溶性糖含量上升^[10];但Cd达到一定浓度后植物生长受到抑制,可溶性糖含量开始下降。

(3)桐花树机体具有自我调节的能力。SOD、POD和CAT是植物体内酶促防御系统中重要的膜保护酶。SOD消除 O_2^- 自由基对细胞的毒害,POD和CAT可以将SOD歧化 O_2^- 产生的 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 ,有效阻止 O_2^- 、 H_2O_2 在植物体内的积累,三者的共同作用,使植物体内自由基的产生和清除维持动态平衡,消除了活性氧的伤害^[11]。当桐花树在低浓度Cd胁迫时,植物机体为了适应环境的改变,细胞内启动了包括POD、SOD和CAT的保护酶系统,使细胞内活性氧自由基清除的速度加快,增强了机体的防御功能和抗性^[12],因此桐花树幼苗叶片POD、SOD和CAT活性均呈上升趋势。而随着Cd浓度的增加,植物体内所产生的活性氧

自由基超过了POD、SOD和CAT的清除能力极限,对植物组织细胞中的多种功能膜及酶系造成了破坏,抑制了保护酶活性的增加。桐花树幼苗叶片POD、SOD和CAT活性均下降。

(4)试验证明,红树植物桐花树对金属镉有较强的耐性。因此,可以利用桐花树植物金属镉抗性较强的生物学特性净化金属镉污染较重的水域。

参考文献

- [1] 郑逢中,林鹏,郑文教.红树植物秋茄幼苗对Cd耐性的研究[J].生态学报,1994(14):407-413.
- [2] 陈荣华,林鹏.红树幼苗对汞的吸收和净化[J].环境科学学报,1989(9):218-224.
- [3] WALSH G E, AINSWORTH K A, RIGBY R. Resistance of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings to lead, cadmium and mercury[J]. Biotropica, 1979, 11:22-27.
- [4] 沈伟其.测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法[J].植物生理学通讯,1988(3):62-64.
- [5] 毕颖,刘燕,张平,等.蒽酮比色法测定大豆乳清废水中总糖含量[J].大豆通报,2002,39(1):24-25.
- [6] 朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京人学出版社,1990:37-52.
- [7] GOTH L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range[J]. Clin Chim Acta, 1991, 196:143-152.
- [8] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiol, 1977, 53:315.
- [9] 孙赛初,王煥校,李启任.水生维管束植物受Cd污染后的生理变化及受害机制初探[J].植物生理学报,1985,11:113-121.
- [10] 赵博生,毕红卫.重金属对植物细胞的毒害作用研究进展[J].淄博学院学报,1999,1(1):86-88.
- [11] GOLDBACH H E. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: Suggestions for further research and methodological requirements[J]. Trace and Microprobe Tech, 1997, 15(1):51-91.
- [12] 张宪政,陈凤玉,王荣富.植物生理学实验技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1994:94-97.