

粳稻离体细胞的耐冷性变异与遗传

金润洲 王景余 侯春香

(吉林省农业科学院水稻所)

摘 要

本文根据国内外研究现状与笔者的试验结果,综述了粳稻体细胞耐冷性变异与遗传的研究进展及其在水稻育种上的应用前景。粳稻体细胞在组织培养过程中产生大量的耐冷性遗传变异。对这些变异可利用理化因素进行定向选择。笔者等利用这一技术,已培育出耐冷性极强的体细胞无性系应用于水稻育种。本文还阐明了体细胞耐冷变异的发生规律及其部分遗传特性。

近年来,利用水稻组织培养技术,已获得抗稻瘟病⁽¹⁾、抗胡麻叶斑病⁽²⁾、抗白叶枯病⁽³⁾、耐盐碱⁽⁴⁾、高氨基酸⁽⁵⁾、耐冷⁽⁶⁾等抗性突变体细胞系及其无性系。并对这些抗性在无性系后代中的表达及遗传本质进行了初步研究,取得了较大进展。但在水稻耐冷性方面,只有日本农业研究中心(1987)⁽⁶⁾、Dekeyser(1987)⁽⁷⁾、笔者(1987)⁽⁸⁾等在水稻组织培养物中,得到抗性细胞系和愈伤组织系的试验报告。至今除笔者的报道⁽¹²⁾外尚没有见到获得水稻体细胞无性系耐冷变异体及其选择技术的成功报道。

水稻冷害一直是影响水稻生产的世界性问题。因此,各国政府和科学工作者都高度重视作物冷害的试验研究⁽⁹⁾。然而,水稻的耐冷性在正常的环境下不能表现,只有在冷温条件下才能表现出来。这对水稻的耐冷育种及遗传研究带来许多困难,也阻碍了体细胞耐冷性遗传变异的研究进展。所以,至今体细胞的耐冷性仍然是植物抗性研究中的空白领域,开展本项研究的国家和单位甚少。本文根据近三年来我们的试验结果和有关文献资料,综述水稻体细胞耐冷变异体的选择技术、遗传变异及其应用研究方面的进展。

一、耐冷变异体的选择技术

目前水稻体细胞无性系耐冷变异体的选择技术主要有两种:一是在培养基上对培养物施加某种选择条件,在细胞水平上进行定向选择。这是较理想的选择方法。但必须满足下列条件:第一,选出的突变体细胞具有再生能力;第二,选择的目标性状,能稳定地遗传给再生植株后代。这种技术的优点是能够在细胞水平上进行选择,但最终还得要在整株水平上验证其无性系后代的耐冷性。第二种方法是在组织培养过程中进行不定向诱变,在再生的体细胞无性系中筛选耐冷变异体。用这种方法选的无性系后代,可直接应用于育种实践。

定向选择法,根据施加的理化因素不同,可分为冰冻选择法、冷温选择法和化学药剂选择法。

(一)定向选择技术

水稻与林木不同,不需要在整株水平上过冬。所以在水稻的一生中,主要的气象灾害是冷害,而不是冻害。从生理学角度来看,引起水稻各生育时期冷害的临界温度是10~20℃的冷温,而不是冰点以下的低温。因此,笔者认为在研究水稻孕穗期的耐冷性时不应采用冰点以下的冻温,应采用引起水稻生育障碍的临界温度。鉴于这种认识,笔者从1987年起对培养物的处理温度由-3℃改为15℃。为区别不同温度的处理方法,将冰点以下温度处理后选择

成活培养物的方法,叫冰冻选择法;在15℃温度下选择生长快的培养物的方法,叫冷温选择法。

1. 冰冻选择法

(1)前人的研究结果:在水稻上没有见到有关报道。在烟草、辣椒(Dix, 1976)^[10]、胡萝卜(Templeton, 1981)^[10]等作物中,用-3℃处理3天的方法,经多次选择获得过具有耐冷性的愈伤组织系,但没有分化出再生植株。

(2)笔者的试验结果:1986年在来自粳稻种胚的愈伤组织中,用-3℃处理15~20天的方法,经多次选择,获得过耐冷愈伤组织系,但没有分化出再生植株。

(3)国外近年的研究结果:日本农业研究中心1987年在水稻悬浮培养中,用0℃处理14天的方法,获得了耐冷细胞系,但仍然没有分化出再生植株^[6]。所以本项研究至今只进展到获得耐冷性强的培养物阶段。从这些培养物中,能否分化出再生的无性系?培养物的耐冷性能否遗传给无性系?控制耐冷性的遗传物质是什么?这些问题是今后需待研究的主要问题,也是水稻体细胞耐冷性的定向选择及其遗传特性研究的突破口。

2. 冷温选择法

Dekeyser等1987年,在11~15℃冷温下培养来自种胚的愈伤组织,获得了耐冷的愈伤组织系,但没有获得再生植株的报道^[7]。同年笔者等将来自粳稻11个品种幼穗的愈伤组织,在15℃冷温下继代培养,每隔5天调查愈伤组织块的直径,发现在15℃冷温下,第15~30天的愈伤组织净生长量(调查时直径-培养开始时直径)与供体品种孕穗期的耐冷性(可育指数)呈显著的正相关。其中第25天的相关系数最大,达到1%极显著水平(0.757**)。因此,提议在15℃冷温下培养25天的愈伤组织净生长量作为鉴定愈伤组织耐冷性的指标^[8],在15℃冷温下培养25天的方法,作为愈伤组织耐冷性的鉴定方法及选择技术。笔者用这种方法,经多次重复选择,获得了耐冷愈伤组织及其再生植株。

日本农业研究中心(1987),在0℃处理培养物的试验中,发现来自种胚的愈伤组织耐冷性和品种幼苗期(2~3叶期)耐冷性之间存在相关性^[9]。Dekeyser等也在11~15℃下培养水稻愈伤组织的过程中也发现来自种胚的愈伤组织和完整植株之间存在一种耐冷性表达的相关性^[7]。同一年在三个不同的国家用不同的水稻品种获得类似的试验结果。这表明水稻完整植株和离体培养细胞之间存在着耐冷性表达的相关性。也就是说水稻的耐冷性是相对稳定的,可传递给组织培养物的遗传性状。

3. 化学物质选择法

利用某种化学物质的毒性或利用化学物质提高培养基渗透压的方法,间接筛选耐冷培养物的方法,叫化学物质选择法。这是有待探索的新课题。因为水稻耐冷性是一种生理性状,其强弱与细胞膜的渗透压有关^[9]。为此笔者探讨了氯酸钾、聚乙二醇(PEG)、升汞等化学物质对愈伤组织生长的影响及其与品种耐冷性的关系。结果,在含有0.4%氯酸钾的培养基上4个耐冷品种的愈伤组织35天后的平均净生长量明显大于5个敏感品种的平均值,大块率(>5mm的愈伤组织块占供试总块数中的百分比)达39.3%,比敏感品种高3.7倍。说明来自耐冷品种的愈伤组织抗毒性明显高于来自敏感品种的愈伤组织。但由于供试个体数少,尚不能定论对氯酸钾的抗毒性与耐冷性的关系,需待进一步研讨。在试验过程中曾获得过生长特快的抗氯酸钾的愈伤组织系,但始终没有分化出再生绿苗,只得到2株白苗。此外,对聚乙二醇、升汞的抗性与品种耐冷性关系的试验中没有找到与耐冷性有关的任何证据。

(二)不定向选择技术

在定向选择技术尚在探索的情况下能否利用组织培养技术,获得水稻体细胞无性系的耐冷变异体?越来越多的试验证明,植物组织培养本身能够引起许多可遗传的变异^[11]。由于这类变异是不定向的,又没有特定的定向选择条件,选择无法在细胞水平上进行,只得在再生的体细胞无性系中进行。

1988年笔者对未作任何理化因子处理的培养基中获得的体细胞无性系自交二代(R2)进行了孕穗期耐冷性鉴定试验,首次获得了耐冷性明显超亲的体细胞无性系26份,首次用事实证明了组织培养本身就是一种有效的耐冷性诱变技术^[12]。1985年郑康乐报道^[13],理化诱变也能使水稻产生新的变异,这些变异的性质在某种程度上与体细胞无性系变异相似。苏联Э. И. Даволи(1983)报道^[14],水稻组织培养中的突变发生与其它方法相比有它明显的特点。理化诱变通常只有单一的或数量不多的几个性状发生突变。而在组织培养中除得到一两个性状发生变异的突变体外,还有一系列多种性状发生变异的突变体。佐佐木(1984)报道^[15], γ 射线能诱发水稻耐冷性的变异。但指出需要相当规模的群体。根据上述报道及试验体会,笔者认为组织培养诱发与其它理化诱变之间既有相同点,又有各自的特点。从诱发效果和育种效果来看,组织培养技术优于理化诱变。

二、耐冷性的遗传变异

水稻体细胞无性系变异丰富了水稻的遗传变异类型,有可能满足各类育种目标的需要。水稻抗病性及耐盐碱突变体无性系的培养成功,标志着水稻育种微观化的开端。但是,一个理想的选择技术应满足下例几点:在预定的选择条件下,能定向选出具有目标抗性的突变细胞或愈伤组织;这种抗性在继代培养中应保持稳定;这些被选细胞和愈伤组织必须具有再生植株的能力;目标的抗性能够在再生的无性系中表达,并稳定地遗传给无性系的自交后代;抗性突变体除具有目标突变性状外,应保留原亲本品种的优良性状。可是至今,在植物各种抗性突变体的筛选中,还没有得到完全符合上述条件的突变体^[12]。因此,刚刚起步的水稻体细胞耐冷性遗传研究也必须以上述内容作为关键问题,进行研讨。

1. 耐冷性的遗传稳定性

(1)愈伤组织的生长量:1987年笔者选用来自粳稻品种秋光(愈伤组织生长慢)和吉粳44号(生长快)种胚的愈伤组织,连续培养4代(每代30天)。结果无论在哪一个世代,生长快的吉粳44号愈伤组织大块率(在供试的愈伤组织总块数中,直径 $>8\text{mm}$ 的块所占的百分比)总是多于生长慢的秋光愈伤组织。在另一组试验中,在 15°C 培养温度下来自11个粳稻品种幼穗的愈伤组织生长量与供体品种孕穗期的耐冷性呈极显著的正相关。即来自耐冷品种的愈伤组织生长量明显大于来自不耐冷品种的愈伤组织生长量。说明愈伤组织生长量是与品种耐冷性有相关性的相对稳定的遗传性状^[16]。

从耐冷性强弱品种间配制的杂种后代及正反交一代的试验结果,初步认为愈伤组织生长量是受多基因控制的数量性状。

(2)绿苗分化率:据笔者的试验结果,来自幼穗的愈伤组织绿苗分化率与供体品种的孕穗期耐冷性呈显著的正相关。即品种耐冷性越强,其愈伤组织的绿苗分化率则越高。从杂种一代的绿苗分化率来看,在供试的6个杂交组合中5个组合的杂种一代绿苗分化率明显高于不耐冷亲本的绿苗分化率,相等或稍高于耐冷亲本^[16]。认为绿苗分化率是受显性基因控

制的,较稳定的遗传性状。

(3)体细胞无性系的耐冷性:在体细胞无性系中,出现许多超亲或低亲的耐冷性变异。但仍然受供体亲本品种耐冷基因型的支配。所以在耐冷性极弱的品种中产生的超亲变异体的耐冷性只能达到弱或中等程度,赶不上来自耐冷性强的品种中没有发生变异的无性系耐冷性。从没有发生变异的无性系平均耐冷性来看,与供体品种耐冷性呈高度的正相关。即来自耐冷品种的无性系平均耐冷性明显强于来自不耐冷品种的无性系平均值。说明除在组织培养过程中产生的变异体外,全部无性系仍然具有供体品种的耐冷性。也就是说,品种的耐冷性是通过愈伤组织遗传给体细胞无性系。

2. 耐冷性变异的特点

在组织培养中,不加任何选择压的条件下,产生的水稻体细胞无性系耐冷性变异,有下列特点:(1)变异是不定向的,既有超亲变异(耐冷性变强的正向变异),又有低亲变异(耐冷性变弱的负向变异);(2)变异体的出现频率高,一般达30%左右;(3)超、低亲变异体的出现频率主要受基因型的控制;(4)变异幅度大,表现变异的多样性。

3. 耐冷性变异的出现规律

在来自26个梗稻品种种胚的无性系中,孕穗期耐冷性发生变异的无性系占55%。其中耐冷性明显超亲的无性系占31%,低亲的无性系占24%,并发现品种耐冷性与其无性系中的超亲变异体率呈极显著的负相关,与低亲变异体率呈正相关。因此认为在体细胞无性系中产生耐冷性变异体的一般规律是:供体品种的耐冷性越强,耐冷变异体越少,不耐冷(敏感)变异体越多;相反则亦然^[12]。说明耐冷性变异体的出现频率高低是直接受供体品种耐冷基因型支配的遗传性状。

三、耐冷变异体的应用前景

扩大变异来源,丰富选择的遗传基础,是当前植物育种获得较大进展的关键。水稻组织培养能够引起耐冷性变异的发现,有可能使组织培养逐渐发展成为水稻耐冷性遗传变异的一个新的来源和育种手段。

1. 典型无性系的耐冷性

笔者通过三年试验,共获得耐冷性明显超亲的体细胞无性系26份^[12]。由于其中多数无性系来自耐冷性弱或较弱的品种,尽管所得到的无性系耐冷性比供体亲本强1~2级,但赶不上目前的耐冷品种。来自起点较高的耐冷品种(藤系129号等)的无性系耐冷性比亲本强1级,可与日本耐冷品种中母35号媲美。

2. 典型无性系的产量

调查耐冷性明显超亲的无性系单位面积产量结果^[12],比亲本品种增产的无性系占33%,减产的无性系占48%。其中有几个无性系的综合性状好于亲本,且具有原品种高强的抗瘟性和优良米质。如组培5号、7号、9号和12号等都比亲本增产5~10%。因此已推荐参加品种比较和区域试验,为体细胞无性系变异应用于水稻育种展现了诱人的前景。

参 考 文 献

[1] Xie, Q. J.: 通过体细胞无性系变异增进水稻抗病的潜力,《生物技术通报》,1989,2:65.

[2] 凌定厚:运用植物毒素离体筛选水稻抗胡麻叶斑病种质的研究,《遗传学报》,1986,13(3):194~200.

发展某种程度上讲只是少数熟悉本学科的科学家的工作和兴趣的结果。

(三)研究经费投入过少,实验条件和设备陈旧。

(四)队伍老化,后继乏人。

五

对我国土壤微生物学科的发展战略设想。

(一)有益土壤微生物资源的开发研究。土壤是微生物的贮藏库,种类多,数量大,有报告指出,土壤中的微生物90%以上远不能在实验室获得纯培养。还有数量极为丰富的为人类造福的有量微生物亟待开发利用,应该重视和加强对多种固氮微生物,产生刺激素和抑制植物病原菌的新种类。工业用酶制剂新菌种,有毒污染物分解的高效菌种,VA菌根真菌等微生物资源的调查、研究和开发。

(二)土壤氮素损失的微生物学机理和提高氮肥利用率的有效途径。加强对土壤微域环境中氮素转化的动态研究,研究土壤中硝化和反硝化作用的动态。

(三)开展共生固氮微生物生态学及应用新技术的研究,查明限制固氮的因素和提出相应对策。同时加强非豆科固氮的基础研究。

(四)开展水旱田土壤有机质转化的微生物学研究,着重研究纤维素分解菌的动态和利用技术,为改土培肥提供依据。

(五)微生物在环境保护中的作用。加强土壤污染后微生物降解,净化作用及其动态和机理的研究,筛选高效的降解菌,并提出应用技术。

(上接第9页)

- [3]孙立华等:用组织培养法筛选水稻抗白叶枯病突变体,《遗传学报》,1986,13(3):188~193。
- [4]大野清春:作物的耐盐性,a、耐盐性的细胞选拔,(日本)《农业技术》,1986,41(7):14~18。
- [5]李朝灿:水稻抗性突变体离体筛选研究新进展,《中国农业科学》,1986,(2):93~94。
- [6]日本农业研究中心:细胞选拔による为高度ストレス耐性素材の作出,①イネ耐冷性素材の作出,バイオテク植物育种に関する综合研究,《1987年度试验研究成绩书(Ⅲ)》,农村水产技术会议事务局,1988年2月:68~69。
- [7]Dekeyser, A等:通过离体培养技术选择和鉴定耐冷和耐盐的水稻品种,《生物技术通报》,1989,(2):64。
- [8]金润洲等:水稻体细胞无性系抗寒性变异与遗传研究, I. 水稻种胚、幼穗组织培养和抗寒性,《作物遗传研究通讯》,1987,(2):27~30。
- [9]西山岩男:《イネの冷害生理学》,北海道大学图书刊行会 1985。
- [10]竹内正幸等:《植物组织培养的技术》,朝仓书店,1984,105~106。
- [11]李俊明:体细胞无性系及其变异,《遗传》,1983,5(1):41~44。
- [12]金润洲等:梗稻体细胞无性系后代的耐冷性变异,《中国水稻科学》,1991,5(1):37~40。
- [13]郑康乐:水稻体细胞无性系变异和抗性细胞突变体筛选的研究进展,《国外农学—水稻》,1985,(1):1~5。
- [14]Э. И. Давош,水稻组织培养中突变的发生及由此获得新的原始材料,《国外农学—水稻》,1985,(2):32~35。
- [15]佐佐木多喜雄:水稻冷害克服的战略—育种的立场から,《日本育种学会、作物学会北海道谈话会会报》,1984(24别号):33~50。
- [16]金润洲:イネ体细胞カルスの増殖量と耐冷性の关系,《日本育种、作物学会北海道谈话会会报》,1989,(29):46。
- [17]Ling DH...Theoretical Applied Genetics, 1987,75(1):127~131。