

文章编号: 1003-8701(2000)02-0029-04

水稻愈伤组织生长量和植株再分化率的品种间差异

许明子, 具红光, 刘宪虎, 李美善, 金永梅, 吴基日

(延边大学农学院农学系, 吉林 龙井 133400)

摘要:以延农黑1号、延农1号和通35等13个水稻品种的种子为外植体,研究了品种间愈伤组织生长量的差异,并对其中7个品种的悬浮培养愈伤组织进行了植株再分化及品种与培养时间对植株再分化的影响。结果表明:水稻品种间愈伤组织开始生长的时间、愈伤组织的直径和重量均有差异,与种皮色有关,黑米愈伤组织开始生长的时间早,直径和重量大于白米;品种间植株再分化率不同,再分化率与愈伤组织的生长量呈负相关;愈伤组织的培养时间越长,植株再分化率有下降的趋势。

关键词:水稻;愈伤组织;植株再分化;品种间差异

中图分类号:S 811.01

文献标识码:A

植物体细胞无性系变异已被大量研究证明是植物遗传变异的重要来源,它具有变异广泛、后代稳定快、基本保持原品种特性和取材方便等特点。因此,体细胞无性系变异越来越多地应用到作物新品种选育的研究上。如金润洲等利用水稻体细胞无性系耐冷变异诱导技术,培育出了组培系列水稻新品种,并已在我省水稻生产上推广应用。为了在新品种选育上更好地利用体细胞无性系变异,有必要弄清体细胞无性系变异的规律。

本文研究了水稻不同品种愈伤组织的诱导率和生长量的差异以及品种和培养时间对愈伤组织再分化率的影响,旨在寻找其规律,为无性系变异在水稻育种上的应用提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织诱导率和生长量的品种间差异(试验1)

1.1.1 试验材料

延农黑1号等4个黑米品种,延农1号、通35等9个白米品种,计13个水稻品种。

1.1.2 试验方法

将供试品种的饱满种子脱去谷壳后用70%酒精表面消毒1 min,再用1%有效浓度的次氯酸钠溶液磁力搅拌消毒30 min,然后在超净工作台上用灭菌水洗涤3~5次,接种于诱导培养基(MS+2,4-D 2 mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂)上,于25℃下培养以诱导愈伤组织。接

收稿日期:1999-06-01 修回日期:1999-12-05

作者简介:许明子(1957-),女(朝鲜族),吉林省龙井市人,延边大学农学院农学系副教授,硕士,主要从事作物遗传育种学教学和科研工作。

种后每隔 4 d 调查愈伤组织的诱导率(愈伤组织块数/接种的种子数),每隔 7 d 取 5 个生长较均匀一致的愈伤组织用万分之一电子天平称鲜重,并量取直径。

1.2 品种间植株再分化率的差异(试验 2)

1.2.1 供试材料

延农黑 1 号和通 35 等 7 个水稻品种。

1.2.2 试验方法

愈伤组织的诱导和继代悬浮培养:采用与试验 1 相同的步骤将供试品种种子脱去谷壳,消毒,接种于诱导培养基上。接种 3 周后,取出愈伤组织的生长良好的谷粒连同愈伤组织移入液体继代培养基(R_2 培养基,见表 1)中,每三角瓶中一个谷粒,进行振荡培养,建立悬浮培养系统,该悬浮培养系统每周继代 1 次,即换新鲜的 R_2 培养基,每继代 3 次(即每 3 周)碾碎过 20 目筛一次。

表 1 R_2 培养基的组成成分及含量

项 目	成 分	含量(mg/L)	项 目	成 分	含量(mg/L)
大量元素	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	312	铁 盐	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	7.45
	KNO_3	4 044		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.56
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	330	有机物	甘氨酸	2
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	247		盐酸硫胺素(VB_1)	0.5
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	147		盐酸吡哆醇(VB_6)	0.5
微量元素	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.11	附 加	烟酸	0.5
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2		肌醇	100
	H_3BO_3	2.86	2,4-D	2	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	蔗糖(g)	30	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.126			

愈伤组织的再分化:在 R_2 液体培养基中继代培养 5 个月后,进行植株再分化。具体做法为碾碎过筛 1 周后用未加激素的 P-10 液体培养基洗涤愈伤组织,然后将愈伤组织倒入培养皿中的 P-10 固体培养基(N_6 基本+山梨醇 3%+水解酪蛋白 0.2%+天冬氨酸 1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L+细胞分裂素 0.4 mg/L+ABA 0.5 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 1%)上,吸去多余的液体,进行分化前预处理 10 d。然后将愈伤组织移入再分化用培养基(N_6 基本+山梨醇 3%+水解酪蛋白 0.2%+IAA 0.2 mg/L+BA 0.5 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 1%)上,每两周继代 1 次。待分化出苗和根后,移入平底试管中的驯化培养基(N_6 基本+蔗糖 3%+Gellan Gum 2.5 g/L)上,苗长高后打开盖,待培养基干时冲洗根部的培养基,加入培养液驯化,10~15 d 后移栽到土壤中。

1.3 愈伤组织的继代培养时间对再分化率的影响(试验 3)

1.3.1 供试材料

水稻品种秋光和陆奥誉。

1.3.2 试验方法

愈伤组织诱导、继代同试验 2。取在 R_2 培养基上继代培养 5 个月和 10 个月的愈伤组织用试验 2 的再分化方法进行植株再分化。

2 结果与分析

2.1 试验 1

接种后第 3 天开始从种胚处长出愈伤组织,不同品种开始长出愈伤组织的时间有差异,延农黑 1 号、延农黑 2 号、龙锦 1 号最早长出愈伤组织,接种后第 4 天已有 75%以上种子长

出了愈伤组织,而通 35 最迟,接种后第 4 天只有 2%长出愈伤组织,其他品种在 22%~45%之间。接种 8 天后各品种均超过 30%,其中最早开始长出愈伤组织的延农黑 1 号、延农黑 2 号、龙锦 1 号已超过 80%,延农黑 1 号则超过 90%,接种 16 天后已基本长完。不同品种间愈伤组织的诱导率也不同,延农黑 1 号、延农黑 2 号、龙锦 1 号、通 211 超过 90%,陆奥誉和低直链淀粉系统只有 69%,通 35 为 76%,延农糯 2 号和延农 1 号为 80%,其他品种则在 82%~87%之间(表 2)。

表 2 不同品种接种后时间与愈伤组织诱导率的关系

%

时间 (d)	延农黑 1 号	延农黑 2 号	延农 黑糯	延农糯 2 号	延农 1 号	低直链 淀粉系统	通 35	通 211	珍富 19	龙锦 1 号	A-58	秋光	陆奥誉
4	82.22	75.56	40.00	43.33	31.11	22.22	2.22	35.56	37.78	75.56	40.00	28.89	31.11
8	91.11	84.44	62.22	56.67	46.67	33.33	42.22	71.11	68.89	84.44	66.67	77.78	40.00
12	91.11	93.33	77.78	66.67	64.44	48.89	46.67	80.00	73.33	84.44	68.89	77.78	48.89
16	95.56	97.78	82.22	73.33	71.11	57.78	73.33	88.89	77.78	88.89	84.44	82.22	60.00
20	95.56	97.78	86.67	73.33	75.56	64.44	77.77	93.33	80.00	88.89	84.44	82.22	68.89
24	95.56	97.78	86.67	80.00	77.78	68.89	80.00	93.33	80.00	93.33	84.44	82.22	68.89
28	95.56	97.78	86.67	80.00	80.00	68.89	80.00	93.33	80.00	93.33	84.44	82.22	68.89

不同品种间不仅是愈伤组织开始生长的时间和诱导率有差异,而且愈伤组织的生长量(直径和重量)也有差异。从总体上看愈伤组织的直径增长第 1 周快,第 2 周较慢,第 3 周有些品种较快,3 周后除个别品种继续增长外其余不再增长(表 3)。4 周后所有供试品种愈伤组织的直径为 4.9~8.4 mm,其中愈伤组织生长早的 3 个品种(延农黑 1 号、延农黑 2 号和龙锦 1 号)直径最大,超过 8 mm,其他品种均小于 8 mm。

表 3 不同品种接种后时间与愈伤组织直径的关系

mm

时间 (d)	延农黑 1 号	延农黑 2 号	延农 黑糯	延农糯 2 号	延农 1 号	低直链 淀粉系统	通 35	通 211	珍富 19	龙锦 1 号	A-58	秋光	陆奥誉
7	4.98	4.53	3.13	3.37	3.05	3.43	3.27	2.95	3.70	5.00	3.98	2.80	2.65
14	6.23	6.10	4.40	4.38	3.83	3.13	4.13	3.55	3.74	5.25	4.58	4.51	3.50
21	8.40	8.25	6.00	4.50	4.25	5.17	4.50	5.05	5.75	8.08	7.75	5.50	3.92
28	8.45	8.30	6.25	5.50	4.90	5.50	5.30	6.25	7.50	8.40	7.78	6.33	5.50

第 1 周愈伤组织的重量增长较慢,第 2 周加快,第 4 周多数品种快速增重,4 周后除延农黑 1 号、延农黑 2 号、延农黑糯、龙锦 1 号、延农 1 号和低直链淀粉系统等品种继续快速增重外,其他品种增重缓慢或几乎不增重。第 5 周时延农黑 1 号、延农黑 2 号、延农黑糯和龙锦 1 号等品种的单个愈伤组织重量超过 200 mg(表 4)。

表 4 不同品种接种后时间与愈伤组织重量的关系

mg

时间 (d)	延农黑 1 号	延农黑 2 号	延农 黑糯	延农糯 2 号	延农 1 号	低直链淀 粉系统	通 35	通 211	珍富 19	龙锦 1 号	A-58	秋光	陆奥誉
7	33.0	21.5	12.55	12.33	8.50	9.50	8.00	7.5	13.67	34.00	20.00	9.75	5.50
14	67.6	69.5	29.00	26.00	17.67	28.25	28.25	22.0	24.60	62.25	46.33	35.20	21.00
21	121.6	91.25	70.00	34.33	33.00	54.67	42.00	38.0	58.75	124.50	89.00	41.50	30.42
28	182.5	190.40	122.25	94.75	71.60	77.00	62.20	103.0	152.75	184.00	177.67	113.67	96.50
35	282.0	390.25	237.33	131.00	135.00	156.00	63.00	108.0	162.20	258.80	187.00	128.75	102.40

2.2 试验 2

在供试品种中各取 207 块继代培养 5 个月的愈伤组织进行再分化处理,分别得到了不同比例的再分化植株(表 5)。品种间再分化率存在很大差异,通 35 的 207 块愈伤组织中分化出了 156 个植株,其再分化率最高为 75.36%,其次为延农糯 2 号,再分化率为 70.53%,龙锦 1 号的再分化率最低为 7.73%,其他品种为 22.22%~62.32%。

在再分化出的植株中除正常的绿苗外,还有不同比例的白化苗,其频率为 0~52.11%。白化苗率最低的品种是龙锦 1 号为 0,其次是通 35 为 0.65%,而白化苗率最高的品种是低直链淀粉系统为 52.11%,其他品种为 2.8%~6.52%,也显示出品种间的差异(表 5)。

表 5 不同品种继代培养 5 个月的愈伤组织再分化率

品 种	转分化的愈 伤组织块数	分化 苗数	白化 苗数	分化率 (%)	白化苗率 (%)
延农黑 1 号	207	46	3	22.2	6.5
延农糯 2 号	207	146	8	70.5	5.5
低直链淀粉系统	207	71	37	34.3	52.1
通 35	207	156	1	75.4	0.6
龙锦 1 号	207	16	0	7.7	0.0
秋光	207	129	8	62.3	6.2
陆奥誉	207	107	3	51.7	2.8

注:表中分化率(%)=分化苗数/转分化的愈伤组织块数×100,白化苗率(%)=白化苗数/分化苗数×100

2.3 试验 3

品种秋光继代培养 5 个月的愈伤组织再分化率和白化苗率分别为 62.32%和 6.2%,而继代培养 10 个月的愈伤组织再分化率和白化苗率分别为 40.58%和 10.21%,表现出随愈伤组织培养时间的增加,再分化率下降,白化苗率提高的趋势。品种陆奥誉继代培养 5 个月的愈伤组织的再分化率和白化苗率分别为 51.69%和 2.8%,而继代培养 10 个月的愈伤组织的再分化率和白化苗率分别为 31.4%和 7.69%,同样也表现出随愈伤组织继代培养时间的增加,再分化率下降,白化苗率提高的趋势(表 6)。

表 6 同一品种不同培养时间的愈伤组织再分化率

品 种	愈伤组织继代 培养时间(月)	转分化的愈 伤组织块数	分化苗数	白化苗数	分化率 (%)	白化苗率 (%)
秋 光	5	207	129	8	62.32	6.20
秋 光	10	207	84	9	40.58	10.71
陆奥誉	5	207	107	3	51.69	2.80
陆奥誉	10	207	65	5	31.40	7.69

3 结论与讨论

3.1 稻米种皮色与愈伤组织生长量的关系

不同品种间愈伤组织开始生长的时间和愈伤组织的生长量(直径和重量)均存在很大差异,值得注意的是愈伤组织生长早,直径和重量大的延农黑 1 号、延农黑 2 号和龙锦 1 号等都是黑米品种,似乎稻米种皮色与愈伤组织的生长之间存在一定的关系,因此,稻米种皮色与愈伤组织的生长量的关系值得进一步深入探讨。

3.2 愈伤组织的生长量与植株再分化率的关系

(下转第 49 页)

(Agronomy Department of Changchun Quartermaster University, Changchun 130062 China)

Abstract: The mechanism of soybean specialized complex fertilizer contains boiling stone, humic acids, rare earth on increasing yield of rotation and continuous cropping soybean was studied in plot-experiment, field-experiment, and indoors analysis methods. The results showed that the soybean specialized complex fertilizer can distinctly improving the soil, increasing its fertilizer effect and greatly enhanced its photosynthetic efficiency and improving soybean's growth. The final outcome indicated it increased the yield of rotation and continuous cropping soybean. The synthetical effect of soybean specialized complex fertilizer on continuous cropping soybean is higher than that of rotation cropping soybean.

Key words: Soybean; Complex fertilizer; Rotation and continuous cropping; Mechanism on the increasing the yield

(上接第 32 页)品种间愈伤组织的生长量有很大差异,植物的再分化率也存在很大差异,那么两者间有何关系呢?品种通 35 愈伤组织开始生长的时间最晚,生长量(直径和重量)也小,但其再分化率却最高,达 75.36%;而品种延农黑 1 号愈伤组织生长早,生长量(直径和重量)大,但其再分化率却不高,只有 22.22%;品种龙锦 1 号也是愈伤组织生长早,生长量大,但其再分化率却最低,只有 7.73%,表明愈伤组织的生长量和再分化率可能有负相关关系。对试验 2 供试的 7 个品种进行相关分析结果,愈伤组织的再分化率与 4 周后直径的相关系数为 $-0.823 8^*$,再分化率与 5 周后愈伤组织重量的相关系数为 $-0.886 9^{**}$,说明愈伤组织的生长量与再分化率确实存在显著或极显著的负相关关系。

3.3 继代培养中的突变热点问题

多数品种的愈伤组织再分化植株中出现了不同程度的白化苗,这很可能是由于在继代培养过程中细胞质基因发生突变所致,值得注意的是其中低直链淀粉系统的白化苗率最高,达 52.11%,重复实验的结果,该系统的白化苗率仍然接近 50%,达 49.1%,这暗示着该品种中可能存在白化苗突变的热点,这方面需要从细胞学、分子生物学等角度进一步探讨。

本研究涉及的是愈伤组织及其再分化,未涉及到体细胞无性系后代。关于再分化植株及其后代的形态、染色体结构和数目、染色体联会和 DNA 分子水平等方面的变异类型及其规律,尚需今后对各世代进行进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈 璋,陈启锋·水稻离体培养及其无性系变异的研究[J].福建农学院学报,1992,21(1):10-15.
- [2] 新关稔,等·イネのソマクローナル变异に関する研究[J].平成 7 年度科学研究费补助金(一般研究 B)研究成果报告书,1996,1-11.
- [3] 大野清春·培养细胞における遗传的变异と育种への应用[J].植物组织培养,1984(1):2-7.
- [4] 金润洲,等·体细胞无性系变异遗传特性分析[J].作物研究,1991,5(3):6-10.
- [5] 赵成章,等·水稻组织培养在育种上的应用研究[J].中国水稻研究所年报,1983~1985,38-40.
- [6] 孙宗修,等·水稻体细胞无性系变异的研究[J].中国水稻研究所年报,1987,64-66.