

水稻广亲和基因互作研究中 测交种的再生体系建立^{*}

李一琨, 范 云, 王金发, 刘良式
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究组织培养中水稻种子胚愈伤组织的诱导与 2, 4-D (2, 4-二氯苯氧乙酸) 质量浓度变化的关系, 结果表明 2, 4-D 质量浓度为 0.1 mg/L 时诱导愈伤组织的效率高达 88.9%, 低质量浓度及高质量浓度的 2, 4-D 则均不适宜水稻成熟胚愈伤组织的形成; 在此基础上成功建立了用于广亲和基因互作研究的受体杂交水稻 F₁ 代测交种的再生体系, 并探讨了从愈伤组织分化到再生植株形成过程中可能出现的一系列问题, 为 F₁ 代测交种的遗传转化奠定了基础.

关键词: 水稻; 广亲和基因; 测交种; 再生

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 02-0078-04

根据形态学、生理学和杂交亲和性的表现, 亚洲栽培稻可分为 2 个亚种, 即籼亚种 (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*) 和粳亚种 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*). 在籼、粳亚种之间, 虽然杂交可以进行, 但后代结实率很低, 一般为 0% ~ 30%, 这便是一般所指的籼、粳不亲和现象. 但有些“中间型”品种与籼、粳品种杂交都有正常的育性, 因此称它们为广亲和品种. 池桥宏等从 1979 年起对这种现象进行了经典的遗传学分析, 最终将广亲和品种中与育性有关的一组复等位基因定位于水稻第 6 染色体上的 S₅ 座位, 简称为 S₅, 与色素原基因 C 和糯性基因 W_x 紧密连锁.

根据池桥宏等提出的广亲和基因的单一作用模式可知存在于 S₅ 座位的复等位基因中 S₅¹ 对 S₅² 和 S₅³ 呈显性关系, 即杂合体 S₅¹/S₅² 和 S₅¹/S₅³ 均表现出广亲和性状. 这就是利用籼粳杂交 F₁ (S₅¹/S₅²) 进行广亲和基因互作研究的理论依据^[1].

但是单子叶尤其是禾本科植物的组织培养一直是个难点, 一般认为, 不论是愈伤组织的诱导还是再分化体系的建立, 单子叶植物都比双子叶植物要困难得多, 因而大大限制了水稻的遗传转化工作. 基于此, 我们曾对籼粳杂交水稻 F₁ 种子胚愈伤组织诱导及再生体系建立进行了初步研究^[2], 此后又对水稻种子 (盾片、胚芽鞘) 愈伤组织的诱导与 2, 4-D (2, 4-二氯苯氧乙酸) 质量浓度关系进行了系统研究, 以及从种子胚直接诱导

愈伤组织及再生体系建立方面的有益探索, 获得了较高的愈伤组织诱导率和再生率, 为准备进行的测交种转化工作奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 测交种种子的亲本为籼稻种 (*O. sativa* L. subsp. *indica* kato) 南京 11 号和粳稻种 (*O. sativa* L. subsp. *Keng Ting*) 黄金光、秋光及辽粳 5; 另外还用到了籼稻品种 CPslo-17 (美国, 爪哇型) 和粳稻品种台北 309, 均由广州仲凯农学院提供.

1.1.2 培养基 研究中使用的培养基种类及其成分如下:

MSD: MS 无机盐, 30 g/L 蔗糖, 500 mg/L 水解酪蛋白, 0.2 ~ 200 mg/L 2, 4-D, 8 g/L 琼脂粉, pH 5.8

D₃ (预分化培养基): N₆ 大量元素, B₅ 微量元素, B₅ 维生素, 30 g/L 蔗糖, 2 mg/L NAA, 5 mg/L ABA, 1 mg/L 6-BA, 7 g/L 琼脂粉, pH 5.8;

D₄ (再生培养基): N₆ 大量元素, B₅ 微量元素, B₅ 维生素, 30 g/L 蔗糖, 1 mg/L IAA, 1 mg/L NAA, 1 mg/L KT, 2 mg/L 6-BA, 8 g/L 琼脂粉, pH 5.8;

小苗培养基: 1/2MS 无机盐和维生素, 15

* 基金项目: 国家 863 计划资助项目 (BH-01-02-02-03)

收稿日期: 2000-03-13; 作者简介: 李一琨 (1972—), 男, 硕士研究生, 通讯联系人: 王金发.

g/L 蔗糖, 8 g/L 琼脂粉, pH 5.8.

1.2 方 法

1.2.1 水稻种子的无菌处理 健康成熟的水稻种子, 去颖壳, 蒸馏水浸泡 2 h 左右, $\varphi=75\%$ 酒精快速灭菌 90 s, 迅速用无菌水冲洗 3~4 次, 再用 $w=20\%$ NaClO 溶液, 表面灭菌 30 min, 无菌水洗涤 5 次以上后备用.

1.2.2 种子胚愈伤组织的诱导 将处理好的水稻种子胚端略向上斜插入 2, 4-D 质量浓度为 0.2~200 mg/L 的 MSD 培养基上, 26~28 °C, 暗培养. 约 2 周后从种子胚盾片部位切下直接诱导出的愈伤组织, 继代接种于相同的新鲜培养基上, 每两周继代一次, 直到愈伤组织长成 1~2 cm² 的组织块.

1.2.3 水稻再生体系的建立 将生长迅速的愈伤组织转接到预再生培养基 D₃ 上, 继续暗培养 3 周后, 再转接到再生培养基 D₄ 上光照培养, 每天光照 12 h. 3~4 周后将再生出的小苗转接到 1/2MS 小苗培养基上光照培养, 2 周后进行炼苗移栽.

2 结果与讨论

2.1 2, 4-D 质量浓度对水稻种子胚愈伤组织形成的影响

本实验的结果表明, 在水稻种子胚愈伤组织的诱导中 2, 4-D 的质量浓度至关重要. 低质量浓度及高质量浓度的 2, 4-D 都不适宜水稻成熟胚愈伤组织的形成(表 1). 低质量浓度的 2, 4-D 会降低愈伤组织的诱导率, 实验中含 0.2mg/L 2, 4-D 的培养基上萌发种子, 结果都倾向于长出幼芽或生出很小的愈伤组织; 高质量浓度的 2, 4-D 则完全抑制了种子的萌发及愈伤组织的生成, 这表明 2, 4-D 作为生长激素对于禾本科植物的愈伤组织诱导虽然是必需的, 但它的适用浓度范围较小. 另外, 表面消毒剂的选择既要考虑到除菌的强度, 又要考虑到其毒性对诱导愈伤组织的影响. 我们曾试用过 $w=1\%$ AgNO₃, 经其消毒后愈伤组织的诱导速度和诱导率都不及 $w=20\%$ NaClO 的好.

早期提出的愈伤组织理论认为愈伤组织是创伤刺激的结果, 但后来的研究表明: 植物组织培养中创伤刺激只是促使细胞增殖的原因之一, 而且在某些情况下可能不是主要原因. 导致细胞增殖的决定性因素是外植体不再受整体植株对它的

表 1 2, 4-D 质量浓度对成熟胚愈伤组织诱导的影响

Tah 1 The effect of different msaa concentration of 2, 4-D on rice callus induction			
$\rho(2, 4-D)/$ (mg·L ⁻¹)	外植体数	诱导愈伤数	诱导率/ %
0.2	21	8	38.1
1.0	20	18	88.9
2.0	20	15	75.0
3.0	11	4	36.4
20.0	20	1	5.0
200.0	20	0	0

制约, 并获得合适的营养与生长调节物质. 本实验所取得的结果对此也有所证明: ①从种子胚盾片部位诱导的愈伤组织需要经过切除脱离母体后才能快速生长; ②植物培养基中生长素 2, 4-D 的调节对愈伤组织的诱导至关重要.

2.2 籼粳杂交 F₁ 代测交种子胚愈伤组织的诱导及再生

2.2.1 测交种及愈伤诱导 S₅ⁱ, S₅^j, S₅^s 等位基因之间的互作理论表明研究广亲和基因互作模式的材料必须是 S₅ⁱ/S₅^j 基因型. 因此, 我们初步进行了此类基因型测交种的再生探索. 获得的愈伤组织诱导情况如表 2.

表 2 测交种的种子胚愈伤组织诱导情况
Tah 2 The case of nice callus induction on MSD medium

诱导愈伤	种子数	诱导愈伤	死亡	可能诱导率/ %
黄金光×南京 11	5	3	1	60
秋光×南京 11	5	4	1	80
辽粳 5×南京 11	5	4	1	80

需要说明的是, 因为籼粳杂交 F₁ 代种子数量极少(不育), 所以对其诱导率的估算只能是粗略的, 主要是表明我们的方法适用于这些测交品种的种子胚愈伤组织的诱导.

2.2.2 愈伤组织的分离及继代分化 合适的培养基上, 2 周后可以看到浅黄色或乳白色愈伤组织从种子胚端顶部长出, 而无芽的生长. 对于愈伤组织的诱导来说, 这种情况是非常理想的. 但有时在愈伤组织生长的同时亦会有芽的生长(图 1a), 此时只要将愈伤组织切下, 转接到新鲜的培养基上, 适当增加 2, 4-D 的质量浓度即可. 提高 2, 4-D 质量浓度的主要目的就是抑制芽的生长并促进愈

伤分化. 经过 2~3 次转瓶, 生长良好的愈伤组织会逐步形成不规则状的约 1~2 cm² 大小的愈伤组织块(图 1b). 其中浅黄色、块状、结构致密且不易碎的愈伤组织容易进行预再生及再生培养, 而那些由于培养时间长或转瓶不及时导致的褐色或深黄色疏松易碎的愈伤组织则难以再生, 这与 Seraj 等^[3] 的报道是相符合的.

2.2.3 预再生与再生 愈伤组织先进行暗培养, 2~3 周的预再生有利于其分生组织形成器官原基. 预再生培养基中不含有细胞分裂素 KT, 从而有利于愈伤组织细胞的再分化. 再生培养基上的愈伤组织在光的作用下, 表面会逐步形成一些小

绿点, 进而生长为绿苗(图 1c). 分析实验结果发现愈伤组织再分化的方式有 3 种: ①先产生芽, 再从芽的基部长出根, 形成植株; ②先形成根, 再从根的上部长出芽; ③从愈伤组织的不同部位分别分化出芽和根, 后形成植株. 根据我们长期从事水稻组织培养的经验来看, 第一种方式下的再生情况是最好的. 那些先有众生根, 或众生根与众生芽一起出现的情况都不利于再生而得不到高的再生率. 从整个再生过程看, 困难主要集中于愈伤组织在再生培养基上的再分化, 大部分愈伤组织会出现上述的单极生长现象或逐步褐化死亡, 这样即使转瓶意义也不大, 仅能得到很少的再生植株.

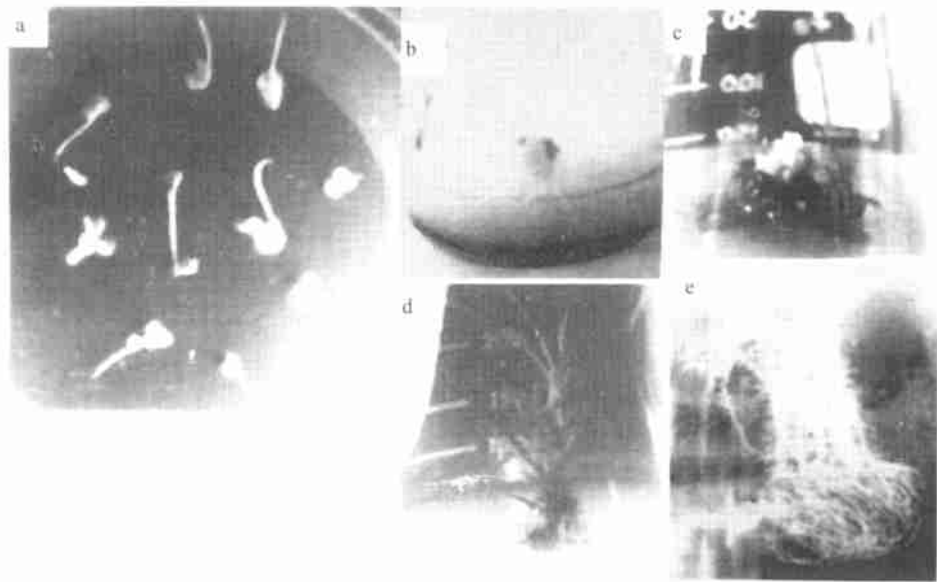


图 1 测交种种子胚愈伤组织诱导及再生体系研究图版说明

Fig. 1 The plates for rice callus induction and plant regeneration
a MSD 培养基上测交种种子胚愈伤组织的直接诱导(秋光×南京 11);
b MSD 培养基上愈伤组织的分裂增值(10 周后)(秋光×南京 11);
c 愈伤组织分化形成的再生植株(粳稻-台北 309);
d 1/2MS 培养基上生根壮苗后的再生植株(秋光×南京 11);
e 再生植株所分化出的强众生根系(台北 309)

表 3 测交种的种子胚愈伤组织再生情况
Tab 3 The case of regeneration derived from rice callus

材料	愈伤组织数	再生植株	可能再生率/%
黄金光×南京 11	3	0	0
秋光×南京 11	4	2	50
辽粳 5×南京 11	4	0	0

少, 再生率实际上是不能计算的, 但这些结果能表明我们的方法是可行的, 至少对再生体系的建立是有所裨益的, 而且我们用这种方法对粳稻台北 309 的种子进行愈伤组织的诱导和再生, 获得了较高的再生率.

2.2.4 生根壮苗 再生培养基上的再生苗生长到 2~3 cm 时, 就要移植到生根壮苗培养基上. 由于矿物质浓度较高时有利于茎叶生长, 较低时有

利于根的生长, 所以多采用 1/2MS 或 1/4MS 培养基. 再生苗在生根培养基上生长旺盛(图 1d), 3~5 周内即可长出 5~7 cm 左右的众生根(图 1e), 这时炼苗移栽出瓶极易成活.

3 结 语

愈伤组织的诱导和植株再生, 是植物组织培养中的两个关键问题. 前者的本质是外植体细胞的脱分化, 后者的本质是愈伤组织细胞的再分化. 调节培养基中的生长素和细胞分裂素的比例, 可以有效地控制这两个过程. 对于水稻而言, 很多组织或器官作为外植体均可成功地诱导愈伤组织并再生植株, 而用成熟稻株的叶片、叶鞘、茎和幼穗等主要器官组织诱导愈伤并使之分化成植株尚较困难. 但是, 要对籼粳杂交水稻有限的 F₁ 代进行转化, 必须要建立高效的愈伤组织诱导体系和再生体系, 这是极为关键的. 本文通过对生长素浓度与愈伤组织诱导、植株再分化与不同培养基类型等方面的研究, 在籼稻获得了约 89% 的愈伤组织诱导率, 较已发表的文献数据为高^[4] (糯稻 84.5%, 粳稻 72.3%, 籼稻 55.3%), 并在此基础上

从籼粳杂交 F₁ 代测交品种也获得了较高的愈伤组织诱导率, 同时在粳稻的模式转化植物台北 309 也初步获得了约 20% 的再生率, 这些都为水稻的组织培养积累了一定的经验. 更为有意义的是, 本实验的结果将与借助于根瘤农杆菌的植物转基因技术结合起来, 为后续水稻广亲和基因转化籼粳杂交测交种的工作奠定了基础.

参考文献:

[1] 李泽炳. 光敏感核不育水稻育性转换机理与应用研究 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1993.

[2] 李一琨, 范云, 王金发. 籼粳杂交水稻 F₁ 种子胚愈伤组织诱导及再生体系建立 [J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 416—419.

[3] SERAJ Z I, ISLAM Z, OMAR F M, et al. Identification of the regeneration potential of embryo derived calluses from various indica rice varieties [J]. Plant cell, Tissue and organ culture, 1997, 48: 9—13.

[4] 赵成章, 郑康乐, 戚秀芳, 等. 不同类型水稻的组织培养和细胞悬浮培养 [J]. 植物生理学报, 1981, 3: 287—290.

The Establishment of Tester Strain Regeneration System
for the Study of Wide Compatibility Gene in Rice

LI Yi-kun, FAN Yun, WANG Jin-fa, LIU Liang-shi

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The study on the callus induction of the rice tester strain with different 2, 4-D concentration is presented. Results show that the rate of callus induction can reach 88.9% when the 2, 4-D concentration in the medium is 0.1 mg/L, and much lower or higher concentration of 2, 4-D is not proper for the rice callus induction. By this means, after predifferentiation and differentiation, the regeneration system of tester strain is established successfully. Furthermore, the possible cases during the callus differentiation and the regenerated plantlet formation are discussed. This has paved the way for the study of wide compatibility gene (WCG) in rice.

Keywords: rice; wide compatibility gene (WCG); tester strain; regeneration