

山梨醇对籼稻愈伤组织培养的效应

何琼英 王润华

(农学系)

摘要 以6个籼稻品种为供试材料, 研究结果肯定了培养基中附加成分山梨醇在愈伤组织继代培养中, 具有促进愈伤组织生长及提高其分化潜力的效果; 籼稻亚种中的不同品种, 愈伤组织的生长及再生植株能力, 在继代培养的后期表现出明显的品种特异性; 分化培养基中加入不同浓度配比激素, 对诱导器官分化的效果有明显差别, 激动素(KT)与萘乙酸(NAA)的比例为5:1有利于取得根、芽生长的同步性。

关键词 籼稻; 组织培养; 多次继代; 山梨醇; 品种特异性

植物愈伤组织经长期继代培养常丧失再生植株能力。这将对细胞悬浮培养系的建立、原生质体培养以及体细胞突变体的筛选等一系列研究工作的开展造成限制。据报导, 水稻愈伤组织经2~3次继代培养通常会丧失再生植株能力^[8]。有关报导还表明, 水稻愈伤组织培养物的器官发生能力有随周期性培养而下降的趋势, 同愈伤组织培养物的生长速度、形态与组织学特征的变化相对应^[6]。实际上, 具有潜在再生性的非液泡化的致密组织, 仅占愈伤组织总量的1%~10%^[9]。因此, 为提高再生性组织在愈伤组织总量中的比率、保持与提高愈伤培养物在继代培养中的器官发生能力而寻找最佳培养条件, 一直为国内、外研究者所关注。

前田英三(1967)的研究结果表明, 较大的培养物在培养前期虽然较易获得良好的细胞增殖, 但经40 d后, 不同大小的培养物的培养效果不再表现显著差异^[5]。这说明, 在一定范围内, 培养物大小的差异不具实质性意义。

每次继代所历日龄的长短是影响愈伤组织器官发生能力的重要因素。Кучеренко(1984)报导, 从第一次转移起, 10日龄培养物比30日龄培养物的再生植株多一倍^[9]。蔡以欣等(1982)以粳型杂交稻所作的试验也获得近似结果, 当培养日龄从15 d增至30 d, 绿苗分化率由97.7%降至52%^[4]。

Kavi Keshor 和 Reddy (1986) 以一个籼稻品种 Bala 的种胚和7日龄的幼根作外植体, 在3%的山梨醇或甘露醇的作用下经多次继代, 总日龄达600 d仍可获49%~61%的再生植株^[7]。可见, 为保持培养物的再生能力及促进离体条件下的形态发生, 培养基中某种特殊的附加成分具有特别重要意义。

前田英三(1971)以T. T. P、湖南籼及银坊主3个品种为材料, 经16~17次继代, 总日龄达600 d, 发现不同品种愈伤组织培养物的生长速度及变化趋向有明显差别^[6]。Кучеренко(1984)也认为, 水稻愈伤组织的形成, 特别是器官形成具有品种的特异性; 并认为, 最适宜的培养基的营养成分在所研究的各个品种中是不相同的^[9]。

1990年7月14日收稿

在所见到的有关报导中,研究材料多属粳稻,极少涉及籼稻。一般认为,籼、粳稻两个亚种在组织培养中的表现具有显著的特异性。本研究以6个不同类型的籼稻品种为材料,经多次继代培养,总日龄达330 d,进而诱导再生植株,以探讨籼稻不同品种愈伤组织在长期继代培养条件下,保持分化潜力及提高培养物的器官发生能力的适宜条件。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试早籼品种有 IR₂₄、IR₅₀、IR₅₂、外选₃₅、三桂占₆₉及三黄占₂₉共6个。其中 IR₅₀及 IR₅₂由华南植物研究所提供,其余4个品种由广东省农业科学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 以 LS 和 MS 为基本培养基,分别配制如下不同用途的培养基。(表1)

表1 愈伤组织的诱导、继代和分化的培养基成分(单位:mg/l)*

培养基代号	成 分	用 途
LS-1	LS+2.4-D2.5+蔗糖 3 000	诱导、继代
LS-2	LS+2.4-D2.5+蔗糖 2 000+山梨醇 3 000	继代
MS-1	MS+6-BA0.5+NAA0.05+蔗糖 3 000	分化
MS-2	MS+KT1.0+NAA0.2+蔗糖 3 000	分化

* pH 5.7, 用 0.8% 的琼脂固化。

1.2.2 接种方法 成熟种子去壳后于75%酒精中浸泡几秒钟,再用0.2% HgCl₂溶液浸泡20 min,然后用无菌水冲洗3次,置于滤纸上吸干水分。接种在LS-1培养基上诱导愈伤组织。每品种接种30瓶,每瓶接5粒种子。培养条件为25℃左右。

1.2.3 愈伤组织的继代培养 接种3周后,从种子胚轴基部长出愈伤组织。将愈伤组织分别转入LS-1和LS-2继代培养。每3~4周继代一次。

1.2.4 分化培养

1.2.4.1 取以LS-1和LS-2继代培养基上各品种的愈伤组织于MS-1分化培养。

1.2.4.2 取以LS-2继代培养基上各品种的愈伤组织分别于MS-1和MS-2分化培养。

1.2.5 分化率的计算

$$\text{分化率}(\%) = (\text{出苗的愈伤组织块数} / \text{总愈伤组织块数}) \times 100$$

2 试验结果

2.1 不同品种的愈伤组织在不同继代培养基上的生长情况比较

2.1.1 在第3次继代培养以前,6个品种的愈伤组织在LS-1和LS-2两种培养基上均能正常生长,愈伤块增殖很快;愈伤块表现为鲜明的白色或浅黄色的生长旺盛样相。不同品种的愈伤组织在不同继代培养基上的表现无明显差异。

2.1.2 经6次至7次继代,不同继代培养基的培养效果表现出明显差异。在LS-1培养基上,6个品种的愈伤组织均表现为质地疏松的非胚性特征,颜色逐渐变为暗淡,进而褐化,最终死亡。但在附加山梨醇的LS-2培养基上,仍然保持富有生机的鲜黄、乳白色,组织致密粒状,表现出胚性愈伤组织的基本特征。

2.1.3 经8~11次继代培养,在LS-1培养基上培养200 d的愈伤组织出现严重褐化。而在LS-2培养基上培养330 d的愈伤组织,粗看起来,6个品种均表现正常无褐化。但仔细观察,却也能看出品种间的差异:IR₅₀、IR₅₂及三桂占₁₉三个品种的愈伤组织逐渐变为湿润、颜色暗淡且出现玻璃化,鲜黄致密的愈伤组织数量上明显减少,非胚性愈伤组织数量上相对增加;而IR₂₄、外选₃₅及三黄占₂₉3个品种的愈伤组织仍鲜明白色,未出现玻璃化,大多数表现出胚性愈伤组织的基本特征。(表2)

表2 6个籼稻品种在两种培养基上继代的愈伤组织生长状况*

培养基	品种 继代(次)						
		IR ₂₄	IR ₅₀	IR ₅₂	三桂占 ₁₉	外选 ₃₅	三黄占 ₂₉
LS-1	2-3	0	0	0	0	0	0
	6-7	+	+	+	+	+	+
	8-11	++	++	++	++	++	++
LS-2	2-3	0	0	0	0	0	0
	6-7	0	0	0	0	0	0
	8-11	0△	0	0	0	0△	0△

* 生长状况: 0 为生长正常; △ 为胚性愈伤组织; + 为轻度褐化; ++ 为严重褐化。

由此可见,在继代次数较少(如2~3次),培养总日龄不太长的条件下,通常的LS-1培养基也能维持愈伤组织的正常生长,但若增加继代次数,延长培养总日龄,作为培养基的附加成分山梨醇则起着关键作用;同样在LS-2培养基条件下,不同品种愈伤组织生长状况的差异只有在一定的继代次数,达到较长的培养日龄后才明显地表现出来。换句话说,品种的特异性难以在早期继代中作出判断。

2.2 不同品种在两种继代培养基中获得的愈伤组织转入MS-1分化培养的效果比较

表2可见,在LS-1培养基上,随着继代次数的增加,各品种的愈伤组织出现严重褐化,最后死亡。取以LS-1培养基上继代2次的6个品种的愈伤组织,转入MS-1分化培养。结果是:只有IR₂₄能分化再生植株,分化率为40%,平均每块愈伤组织出苗12条。其余5个品种都没有分化成苗。

而以LS-2继代培养11次,总日龄为330 d的愈伤块转入同样的MS-1分化培养后,6个品种的愈伤组织均具不同程度的分化能力。分化力的大小,不同品种表现出

一定差异。其中, 外选₃₅的分化成苗率最高, 达 60%; 其次是 IR₂₄和三黄占₂₉, 分化芽原基各 30%, 再次是三桂占₆₉, 分化芽原基为 10%; IR₅₀和 IR₅₂两品种只有 10%~20% 根的分化。

2.3 不同品种的愈伤组织对不同分化培养基的反应

为探讨不同品种的愈伤组织在不同分化培养基上的培养效果, 取以 LS-2 培养基上继代 58, 84 及 330 d 的 6 个品种的愈伤组织, 分别置于 MS-1 和 MS-2 分化培养基上, 经 60 d 分化培养。结果是: (1) IR₅₀和外选₃₅两个品种只在 MS-1 中能分化。分化率分别为 50% 和 60%, 平均每块愈伤组织出苗分别为 16 条和 24.3 条。(2) IR₅₂和三黄占₂₉只在 MS-2 中能分化。分化率分别为 20% 和 40%, 平均每块愈伤组织出苗分别为 15 条和 23 条。(3) IR₂₄和三桂占₆₉在 MS-1 及 MS-2 两种培养基上都能分化。其中 IR₂₄分化率分别为 70% 和 30%, 平均每块愈伤组织出苗分别为 13.1 条和 5.3 条; 三桂占₆₉分化率分别为 66.6% 和 40%, 平均每块愈伤组织出苗分别为 14.4 条和 12 条。

在 MS-1 培养基上诱导分化成功的 IR₅₀、外选₃₅、IR₂₄及三桂占₆₉ 4 个品种, 均表现为易长芽丛而较难长根 (图版 1, 2, 3, 4); 而在 MS-2 培养基上诱导分化成功的 IR₅₂、三黄占₂₉、IR₂₄及三桂占₆₉ 4 个品种, 再生植株的根、芽表现出良好的同步性 (图版 5, 6, 7, 8)。

以上结果说明, 籼稻不同品种最适分化培养基的组成是不大相同的。分化培养基中附加成分激动素 (KT) 与萘乙酸 (NAA) 按 5:1 的比例似乎较易取得再生植株根、芽生长良好的同步性; 当上述比例为 10:1 时, 则多长芽丛而不利根的分化、生长。陈云昭等 (1984) 以大豆所作的试验, 也获得近似结果^[2]。

3 讨 论

3.1 关于继代培养基中附加成分山梨醇的作用 Kavi Kishor 和 Yeddy (1986) 认为, 轻度的渗透胁迫有助于增进愈伤组织的生长和修缔形态建成^[7]。这使愈伤组织的分化潜力在继代中得以保持和提高。凌定厚等 (1987) 认为, 6% 蔗糖有利于胚性愈伤组织的诱导; 3% 的蔗糖有利于胚性结构的保持及植株分化^[3]。蔗糖的作用, 除了作为培养物的碳源外, 适当浓度的蔗糖恐怕还具有调节细胞渗透压的效果。本试验中, 在继代培养的早期 (总日龄 58~84 d), 山梨醇的作用均极显著, 6 个供试品种的愈伤组织均能分化出完整植株。至继代培养后期 (总日龄 330 d) 虽然 6 个供试品种的愈伤组织均能生长增殖, 并未出现褐化, 但仅有外选₃₅能在分化培养基中分化出完整植株, 其余 5 个品种仅能分化出根或芽原基。这可能是不同品种的细胞对山梨醇的透性存在固有差异, 也可能是随着继代总日龄的增加, 不同品种细胞透性的变化存在方向, 程度上的差异。对此作深入的探讨, 也许有助于加深对品种特异性的认识, 进而为各别品种寻找最适培养基组成提供某些理论依据。

3.2 关于细胞分裂素和生长素不同浓度对比对器官分化的影响 Skoog 和 Miller (1957) 以烟草为材料所作的研究结果认为, 形成器官的类型受培养基中两种激素相对浓度的控制, 较高浓度的生长素利于根的形成而抑制芽的形成; 较高浓度的激动素则

促进芽的形成而抑制根的形成^[1]。本试验以 MS 为分化的基本培养基, 选定 BA、KT 及 NAA 三种激素的不同配比都能分化成功。但不同激素浓度配比对不同品种的诱导效果不同。与其他植物相比, 籼稻亚种中不同品种所表现的差异更为明显, 这显然给籼稻组织培养技术增加了复杂性; 恐怕也是籼稻原生质体培养难度较大的因素之一。

3.3 植物愈伤组织在分化培养基上常发育成绿色生长点状物, 这种绿点实际上很难发育成完整植株而多在继代中逐渐死亡。凌定厚等 (1987) 为促进这种绿点分化而设计了多种培养基, 但均未能得到任何改善^[3]。本试验供试的 6 个籼稻品种中, 有 3 个品种的愈伤组织在分化培养中也出现被称为芽原基的绿点, 而其余品种并未发现这种绿点。这是否也是品种特异性的一种表现? 值得进一步研究。

致谢 朝鲜平壤农业大学金在福副教授及本校植物遗传育种专业刘高东、翁冬文、陈黛、甘铨、宋群、保罗等同学参加部分工作。

参 考 文 献

- 1 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译. 植物组织和细胞培养. 上海: 科学技术出版社, 1979. 171
- 2 陈云昭, 王玉国. 激动素和萘乙酸不同浓度配比对大豆组织培养器官分化的影响. 大豆科学, 1984, 3 (4): 339~343
- 3 凌定厚, 吉田昌一. 影响籼稻体细胞胚胎发生几个因素的研究. 植物学报, 1987, 29 (1): 1~8
- 4 蔡以欣等. 梗型杂交水稻胚芽愈伤组织的诱导与植株再生 (简报), 实验生物学报, 1982, 15 (3): 387~390
- 5 前田英三. 游离细胞培养によイネ細胞の増殖に関する研究. 日本作物学会紀事, 1969, 38: 535~546
- 6 前田英三. 継代培養条件におけるイネ胚起源カルスの生長. 日本作物学会紀事, 1971, 40: 141~149
- 7 Kavi Kishor. P. B and G. M. Reddy. Regeneration of rice plants from long-term root and embryo-derived callus cultures. Current Science. 1986, 55 (14): 664~665
- 8 Волъне. А. П., Р. А. Прхорчик Изменение Содержания флавоноидов в хлоропластах при Обработке растений желтого люпина 2. 4—Д и Тха. физиология растения, 1979, 26 (2): 259~264
- 9 Кучеренко. Л. А., Условия получения растений — ратенерантов в культуре Тканей риса. Сельскохозяйственная Биология, 1984, 4: 70~72

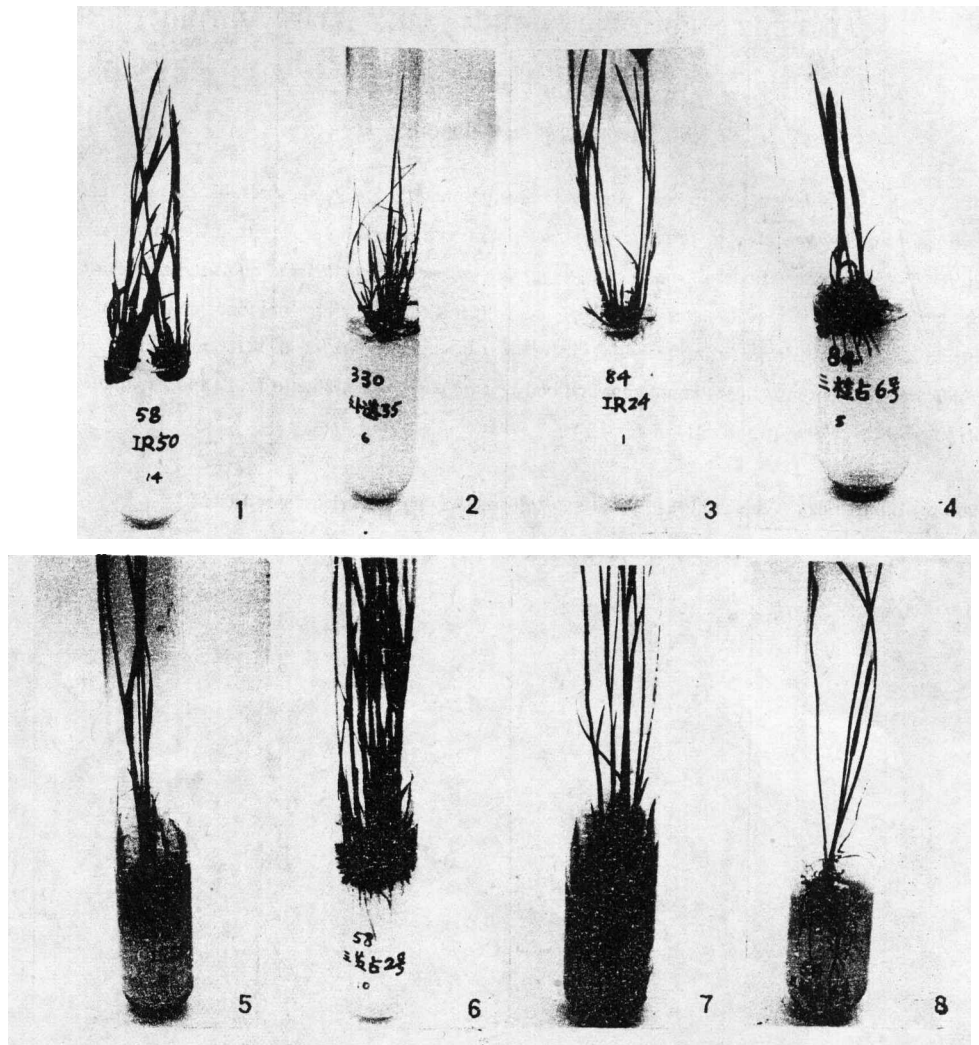
EFFECTS OF SORBITOL ON INDICA RICE CALLUS CULTURE

He Qiongying Wang Runhua

(Department of Agronomy)

Abstract Using six varieties of indica rice as experimental materials, the study results indicated that sorbitol added to Ls medium was able to promote the growing of callus and improve its differentiation in serial subcultures. For different varieties of indica rice the growing capacity of callus and plant regeneration displayed evident varietal specificities in later stages of subcultures. After adding phytohormone with different concentrations into the differentiating medium, there were obvious disparities in differentiation effects on the organ indicated. Synchronized growing of root and bud was favoured when kinetin (KT) and naphthalene acetic acid (NAA) were present in the ratio of 5 : 1.

Key words Indica rice; Tissue culture; Serial subculture; Sorbitol; Varietal specificity



图版 1, 2, 3, 4 为 IR₅₀、外选₃₅、IR₂₄、三桂占₆₁₃在 MS-1 培养基中表现易长芽而较难长根。
5, 6, 7, 8 为 IR₅₂、三黄占₂₁₃、IR₂₄、三桂占₆₁₃在 MS-2 培养基中表现根、芽生长同步。