

高秆野生稻(*Oryza alta* L.) 叶片组织培养中通过胚状体获得再生植株倪文津^{1,2}, 程方民¹, 张建军^{3*}⁽¹⁾ 浙江大学, 杭州 310020; ⁽²⁾ 上海市闵行区农业技术服务中心, 上海 201109; ⁽³⁾ 上海市农业科学院林木果树研究所, 上海 201106)

摘要: 高秆野生稻叶片可诱导出胚性和非胚性 2 种愈伤组织。胚性愈伤组织在合适的分化培养基上可不断形成胚状体, 进而大量获得再生植株, 再生植株以绿苗为主, 未见绿白嵌合苗。源于不同脱分化培养基的胚性愈伤组织具有相似的胚状体形成和植株再生能力。诱导胚性愈伤组织以 N6 培养基添加 NAA 1 mg/L、2,4-D 2 mg/L 和 ZT 0.5 mg/L 效果最好, 形成胚状体并分化植株以 MS 培养基添加 NAA 2 mg/L 和 IAA 0.5 mg/L 为佳。

关键词: 高秆野生稻; 叶片; 愈伤组织; 胚状体; 再生植株

中图分类号: S511; S336 **文献标识码:** A

栽培稻(*Oryza sativa* L.) 中可利用的基因资源日益贫乏已引起广泛关注^[1]。野生稻作为栽培稻的近缘种对许多病虫害和不良环境有着独特的抗性和适应性, 已成为栽培稻品种改良的重要优良基因来源^[2-4]。组织培养对于保存和利用野生稻资源具有重要价值^[5], 但与栽培稻相比野生稻的组织培养明显滞后。目前, 20 多种野生稻中, 仅有几个种从它们的花药、幼穗、茎节、叶鞘和种子等器官和组织培养中得到过再生植株^[6-11]。本文报道高秆野生稻(*Oryza alta* L.) 叶片通过胚状体高效率地再生植株的研究结果。

表 1 培养基组成
Table 1 Composition of media

| 用途 Use | 编号 No. | 基本培养基 Minimal medium | 激素/mg · L ⁻¹ Hormone | | | | | | 蔗糖 g · L ⁻¹ Sucrose | 琼脂 g · L ⁻¹ Agar |
|-------------------------------|-----------|----------------------------|---------------------------------|-------|-----|-----|-----|------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| | | | NAA | 2,4-D | IAA | ZT | KT | 6-BA | | |
| 脱分化 Dedifferen- tiation | 1 | N6 | 0.5 | 2.0 | - | - | - | - | 60 | 7 |
| | 2 | N6 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 0.5 | - | - | 60 | 7 |
| | 3 | N6 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | - | - | 60 | 7 |
| | 4 | MS | 0.5 | 2.0 | - | - | - | - | 60 | 7 |
| 分化 Differen- tiation | 5 | MS | 2.0 | - | 0.5 | - | - | - | 30 | 7 |
| | 6 | MS | 2.0 | - | - | - | - | - | 30 | 7 |
| | 7 | MS | 2.0 | - | 0.5 | - | 2.0 | - | 30 | 7 |
| | 8 | MS | 2.0 | - | - | - | - | 2.0 | 30 | 7 |

1 材料与方 法

高秆野生稻(*Oryza alta* L.) 原种引自国际水稻研究所 (IRRI, Acc. No. 100161)。从温室选取拔节初期的植株, 贴泥面剪下, 10 °C 低温预处理 48 h。剪去植株外部叶片, 在超净工作台上用酒精逐层擦拭材料表面, 同时剥去叶鞘和茎秆,

取出幼嫩的叶片。将叶片剪成 0.5~0.8 cm 的小段, 接种在脱分化培养基上。脱分化培养在 (25 ± 1) °C 的黑暗条件下进行, 1 个月后将长出的愈伤组织转入分化培养基, 分化培养在 (25 ± 1) °C 的光照条件下进行, 光照强度为 3 000 lx, 时间为 10 h/d。试验所用的培养基组成见表 1。培养过程中, 观察愈伤组织的形成和植株分化, 在解剖镜下观察胚状体的形态结构与发育进程。试验结果用下列指数进行统计:

- ① 出愈率 (%) = 长出愈伤组织的外植体/接种外植体 × 100
- ② 胚性愈伤组织诱导率 (%) = 长胚性愈伤组织的外植体/接种外植体 × 100
- ③ 胚性愈伤组织率 (%) = 胚性愈伤组织数/愈伤组织总数 × 100
- ④ 分化率 (%) = 再生植株的愈伤组织数/愈伤组织总数 × 100

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

叶片于脱分化培养基上培养 5 d 后开始长出愈伤组织, 愈伤组织大多出现在外植体的切口处, 少数整个切段愈伤组织化(图 1a)。观察表明, 叶片产生的愈伤组织有 2 种类型: 一种为非胚性, 形态呈半透明的疏松糊状物, 浅棕色; 另一种为胚性, 形态上呈不透明的致密球状物, 淡黄色或白色。胚性愈伤组织经进一步培养能产生胚状体, 进而大量分化成苗; 而非胚性愈伤组织不能产生胚状体, 也不能分化成苗, 且在培养过程中死亡。

收稿日期: 2006-11-21 初稿; 2007-09-30 二改稿

作者简介: 倪文津(1960-), 男, 大学本科, 高级农艺师, 主要研究方向, 水稻推广应用。E-mail: mhnjb@sina.com; Tel: (021) 64901749

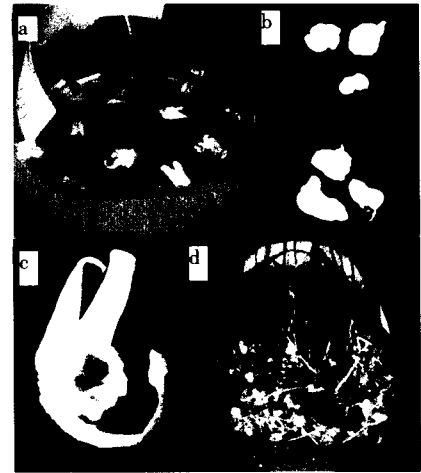
* 通讯作者, E-mail: zjjun071416@yahoo.com.cn; Tel: (021) 62207245

培养基对所形成愈伤组织的类型和愈伤组织的诱导率具有决定性的作用。表 2 表明, 胚性愈伤组织只能在特定的基本培养基(N6)、特定的激素种类组合及激素水平上产生, 而出愈率的高低与能否诱导出胚性愈伤组织似乎没有直接关系。本试验所用的 4 种脱分化培养基中, 1 号和 2 号培养基都能诱导胚性愈伤组织, 而 3 号和 4 号培养基没有胚性愈伤组织产生。其中, 从 2 号培养基上诱导产生的愈伤组织大多为胚性愈伤组织, 胚性愈伤组织率达 84.69%, 愈伤组织诱导率也最高, 为 27.37%, 因此它是诱导高秆野生稻叶片胚性愈伤组织的最佳培养基。

表 2 不同培养基对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different media on callus induction

| 培养基 编号 Medium No. | 接种外 植体数 Number of explants | 出愈外植体数 Number of explants with calli induced | 出现胚性愈伤 组织的外植体数 Number of explants with embryonic calli induced | 出愈率 % Inductivity of calli | 胚性愈伤 组织率/% Inductivity of embryonic calli |
|----------------------------|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|---|
| 1 | 1 168 | 152 | 60 | 13.01 | 39.47 |
| 2 | 358 | 98 | 83 | 27.37 | 84.69 |
| 3 | 252 | 24 | 0 | 9.52 | 0 |
| 4 | 360 | 63 | 0 | 17.50 | 0 |



a. 叶片愈伤组织 Leaf calli;
b. 胚状体 Embryoids;
c. 长出芽和根的胚状体
Embryoid with bud and root;
d. 再生植株 Regeneration plantlets

图 1 高秆野生稻叶片愈伤组织、胚状体及再生植株

Fig. 1 Calli, embryoids and plantlets in leaf culture of *Oryza alta* L.

2.2 胚状体的形成与植株再生

将胚性和非胚性愈伤组织分别转入表 1 所列的 4 种分化培养基(编号 5~8)中, 结果发现, 非胚性愈伤组织在所有分化培养基上都不能形成胚状体, 也不能再生植株。而将胚性愈伤组织转入 5 号和 8 号培养基, 3~5 d 后就可以发现, 原来呈平滑球状体状的胚性愈伤组织表面开始出现重重叠叠的小颗粒, 而后这些颗粒将从愈伤组织上脱落下来, 散布在周围培养基上。

在解剖镜下观察这些着生于胚性愈伤组织表面和散落在培养基上的颗粒, 可以清楚地看到它们是处于不同发育时期的胚状体(图 1b)。再经 5~7 d 培养, 这些胚状体将萌发出胚芽和胚根(图 1c)。胚性愈伤组织在 5 号或 8 号培养基上培养 15~20 d, 整个培养基表面就会被胚状体所再生的植株及由胚性愈伤组织增殖发育而来处于不同发育阶段的胚状体布满(图 1d)。观察表明, 高秆野生稻叶片胚状体的萌发有先长胚芽再长胚根、胚芽胚根同步生长及先长胚根再长胚芽等 3 种模式, 其中大多数胚状体萌发是先长胚芽再长胚根。在胚状体再生的植株中, 绿苗占绝大多数, 也有少量白化苗, 但未见绿白相嵌苗。

2.3 培养基对胚状体形成与发育的影响

将来源于 1 号培养基的胚性愈伤组织, 每块分成四等份, 分别转入分化培养基, 观察培养基对胚状体形成与发育的影响。结果发现, 胚性愈伤组织在 5 号和 8 号培养基上能形成大量胚状体, 并由胚状体获得大量再生绿苗, 其中又以 5 号培养基效果最好。转入 6 号和 7 号培养基的胚性愈伤组织也能再生植株, 但胚状体的形成和萌发似乎受到了抑制。在这 2 种培养基上, 胚性愈伤组织虽然可不断生长、增殖, 但胚性愈伤组织不能像转入 5 号和 8 号的培养基那样长出重重叠叠的胚状体, 而仅能分化出数量有限的再生植株, 以转移的胚性愈伤组织总数作为计数单位, 分化率均在 50% 以下。

试验结果表明, 如果将胚性愈伤组织在 5 号培养基上培养 1 周, 然后再转入 6 号培养基, 则同样能使已形成的胚状体发育, 并获得大量再生植株, 但每块胚性愈伤组织所能获得的再生植株数量, 明显少于不进行培养基转换的处理(即始终在 5 号培养基上进行分化培养的处理)。这表明 6 号培养基对胚性愈伤组织形成胚状体可能有抑制作用, 但不会抑制已形成的胚状体继续发育成再生植株。

将来源于不同脱分化培养的胚性愈伤组织分别转接于 4 种分化培养基的结果表明, 不同来源的胚性愈伤组织没有本质差异, 它们在 5 号和 8 号培养基上都能形成大量胚状体, 进而获得大量再生植株。因此对于诱导高秆野生稻叶片植株再生, 以 2 号培养基诱导胚性愈伤组织, 再用 5 号培养基诱导胚性愈伤组织分化植株, 是最佳培养组合。

3 讨 论

体细胞胚起源于单细胞, 在遗传上具有相对稳定性; 在单子叶植物的细胞及原生质体培养中, 获得胚

性细胞悬浮系是诱导植株再生的重要途径;因此国内外均对通过体细胞胚胎再生植株的途径极为重视^[12-14]。近年来有关野生稻的组织培养已有不少报道^[4-11],也发现有些带野生稻基因组的组织或器官可以通过胚状体再生植株^[15],但尚未见高秆野生稻叶片组织通过胚状体途径大量再生植株的报道。本研究为稻属野生种的胚胎学研究、利用和通过体细胞保存野生水稻资源展现了新的前景。

氮源和激素是诱导植物体细胞胚胎发生的重要因素。试验表明,高秆野生稻叶片胚性愈伤组织仅产生于 N6 培养基,而附加成份相同的 MS 培养基上未见胚性愈伤组织发生,这似乎表明从高秆野生稻叶片诱导胚性愈伤组织需要较高的硝态氮。栽培稻和其他许多物种的组织培养表明,细胞分裂素类物质是体细胞胚胎形成和发育所必需的^[12],但用高秆野生稻叶片诱导胚状体并不需要这类物质。高秆野生稻叶片胚性愈伤组织大量产生胚状体,仅在激素 NAA 与 IAA 或 NAA 与 6-BA 配合使用的情况下出现,但胚状体一旦形成以后转入其他分化培养基也能获得大量再生植株,这可能是胚性愈伤组织在 5 号培养基上短暂培养后转入 6 号培养基仍能获得大量再生植株的原因。

参 考 文 献

- [1] 江青贵,李风玲,肖 伟,等. 野生稻种质资源在水稻育种中的利用[J]. 杂交水稻,2006,21(4):7-10.
- [2] 黄运平,覃 瑞. 野生稻资源的研究与利用[J]. 湖北农业科学,2002(4):16-19.
- [3] 汤圣祥,江云球,张本敦,等. 中国稻区的生物多样性[J]. 生物多样性,1999,7(1):73-78.
- [4] Kobayshi N, Ikeda R, Vaugan DA, et al. Resistance to tungro in same wild relative of rice[J]. IRRN, 1991, 16(4):13-17.
- [5] 何光存. 细胞工程与分子生物学相结合——野生稻优异种质资源利用的有效途径[J]. 生物工程进展,1998,18(2):41-45.
- [6] 张建军,张智奇. 高秆野生稻(*Oryza alta*)叶鞘与茎培养形成植株[J]. 上海农业学报,1988,4(1):55-61.
- [7] Finch RP, Baset A, Slamet IH, et al. In vitro shoot culture of wild *Oryza* and other grass species[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 30:31-39.
- [8] 汪晓玲,袁文静,舒理慧,等. 提高疣粒野生稻(*O. meyeriana*)绿苗分化率的方法研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1996,42(生物工程专刊):32-36.
- [9] 庞汉华,舒理慧,吴妙桑,等. 普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff)花药培养研究[J]. 作物学报,1991,17(6):436-443.
- [10] 庞汉华,汤圣祥. 不同生态型普通野生稻花药培养力的研究[J]. 中国水稻科学,1995,9(3):167-171.
- [11] 丁玉梅,程在全,黄兴奇,等. 云南野生稻不同染色体组型和外植体材料的离体培养研究[J]. 西北植物学报,2003,23(11):1922-1926.
- [12] 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[J]. 植物学报,1987,29(1):1-8.
- [13] 凌定厚, Brar D S, Zapata F J. 籼稻体细胞胚胎发生的组织学及细胞学研究[J]. 植物学报,1988,30(5):485-489.
- [14] 金坚敏,张静兰,唐定台. 悬浮培养下水稻的胚状体高频诱导[J]. 植物学报,1992,34(2):114-120.
- [15] 凌定厚,陈婉英,陈梅芳,等. 三基单倍体水稻胚性细胞团诱导及植株再生的研究[J]. 遗传学报,1984,11(1):26-32.

Gaining regeneration plantlets from embryoids in leaf tissue culture of *Oryza alta* L.

NI Wen-jin^{1,2}, CHEN Fang-min¹, ZHANG Jian-jun³

(¹Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²Minhang District Agro-Technology Service Center, Shanghai 201300, China; ³Grop Forest and Fruit Tree Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: The leaves of *Oryza alta* could be induced to form embryonic and non-embryonic calli, and the embryonic calli cultured on appropriate differential media could be induced to form embryoids from which large number of regeneration plantlets could be obtained. Most of regeneration plantlets were green and there were no green-white mosaic plantlets among them. The embryonic calli from different dedifferentiation media had nearly the same ability of the embryoid formation and plantlet regeneration. The N6 medium supplemented with 1 mg/L NAA, 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L ZT had the best effect on embryonic callus formation, and the MS medium supplemented with 2 mg/L NAA and 0.5 mg/L IAA was the best for the embryoid formation and the plantlet regeneration.

Key words: *Oryza alta*; Leaf; Callus; Embryoid; Regeneration plantlet