

# 水稻单倍体不定芽超低温保存和植株再生 及其遗传稳定性研究<sup>\*</sup>

章志宏 胡中立

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

**提 要** 通过水稻单倍体幼穗离体培养, 诱导形成了大量的不定芽。将 3 mm 左右的不定芽转入半固体继代培养基继代培养 7 d, 而后转入 1.8 mL 的安瓿瓶中, 冰浴条件下加入预冻了的冰冻保护剂淹没材料, 在冰上平衡 45 ~ 60 min 后, 转入程序降温仪, 以 1.0 /min 的速率从 4 降至 - 40 , 在 - 40 停留 1 h 后, 投入液氮保存。将液氮保存 30 d 左右的不定芽于 38 ~ 40 的水浴中快速解冻, 随即转入半固体的再生培养基, 以待恢复生长并再生植株。结果显示: 经继代培养的不定芽超低温保存后的成活率为 21% ~ 29%, 再生出苗率为 14% ~ 18%, 而未经继代培养的不定芽超低温保存后的成活率仅为 8%, 且均不能再生成苗。继代培养基 MS+ 蔗糖 3% + 山梨醇 4% 或马铃薯提取液 20% 均具有良好的继代培养效果, 有效的冰冻保护剂为 10% DMSO+ 0.5 mol/L 山梨醇。对不定芽经液氮超低温保存的再生植株进行染色体镜检及 RAPD 分析, 结果表明再生植株在染色体倍性及 DNA 水平上仍具有较好的遗传稳定性。

**关键词** 水稻, 单倍体, 不定芽, 超低温保存, 再生植株

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2000)03-0169-05

## REGENERATING PLANTS FROM CRYOPRESERVED ADVENTITIOUS BUDS OF HAPLOIDS AND THEIR GENETIC STABILITY IN RICE

Zhang Zhihong Hu Zhongli

(College of Life Sciences, Wuhan University Wuhan 430072)

**Abstract** A large number of adventitious buds were induced from *in vitro* cultured young panicles of haploids of rice. The adventitious buds subcultured on solidified subculture media at 26 for 7 days were loaded into 1.8 mL plastic cryotubes with enough cryoprotectant and kept on ice for 45 ~ 60 min. After cooled at a rate of 1.0 /min down to - 40 , the samples were plunged into liquid nitrogen. The adventitious buds cryopreserved for about 30 days

收稿日: 1999-04-29, 修回日: 1999-07-16。第一作者: 男, 1963 年 10 月出生, 副教授(硕士), 主要从事植物遗传学研究。

<sup>\*</sup> 湖北省自然科学基金资助课题(编号: 97J041)。

were thawed rapidly in 38~40 °C water and then plated on solidified MS medium containing 3% sucrose, 0.5 mg/L NAA and 2.0 mg/L kinetin. After plated, 21%~29% of adventitious buds resumed growth and 14%~18% regenerated plantlets. The results of this work indicated that selecting adventitious buds derived from *in vitro* cultured young panicles is a critical factor for the success and subculturing adventitious buds on MS medium containing 3% sucrose and 4% sorbitol or 20% potato extract is essential to the procedure. The effective cryoprotectant is 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) + 0.5 mol/L sorbitol. Chromosome identifying of root tip cell and RAPD analysis of regenerating plants indicated that the regenerating plants have good genetic stability.

**Key words** *Oryza sativa* L., Haploid, Adventitious bud, Cryopreservation, Regenerating plant

植物组织与细胞超低温保存技术的发展,为植物种质的长期保存提供了新的手段,自70年代初 Nag 和 Street<sup>[1]</sup>用液氮超低温保存胡萝卜悬浮培养细胞获得成功以来,迄今通过超低温保存获得成功的植物材料已达百余种<sup>[2,3]</sup>。对于不能通过种子繁殖来保存的水稻(*Oryza sativa* L.)单倍体,一方面,由于其愈伤组织及培养细胞在离体培养条件下倍性极不稳定<sup>[4]</sup>,因此,不宜通过愈伤组织或培养细胞来进行超低温保存;另一方面,尽管马铃薯、花生、豌豆、石竹等植物的茎尖及梨树、桑树、苹果等树木的冬芽超低温保存的成功事例<sup>[5,6]</sup>表明,植物茎尖或芽的分生组织具有高度的遗传稳定性和较强的形态发生能力,是植物种质保存中最有价值的选材之一,但由于水稻茎尖分生组织体积小、生理状态脆弱,因此至今未见有水稻茎尖超低温保存的成功报道。本研究通过对水稻单倍体幼穗培养诱导的不定芽进行超低温保存的研究,以建立水稻单倍体长期保存的有效方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻品种农垦 58 花药培养获得的单倍体单株,经分蘖繁殖后获得的无性系(通过稻菀保存)。

### 1.2 方法

1.2.1 幼穗培养诱导不定芽 参照凌定厚等<sup>[7]</sup>、舒理慧等<sup>[8]</sup>的方法,取第2次枝梗及颖花原基分化期到雌雄蕊形成期(幼穗长3~10 mm)的幼穗,接种到固体诱导培养基上,26 °C 光照培养,诱导不定芽。

诱导培养基: MS+ 蔗糖 3%+ NAA 2 mg/L+ Kinetin 2 mg/L。

1.2.2 不定芽继代培养 将3 mm左右的不定芽从培养的幼穗上分离出来,转入半固体继代培养基继代培养7 d。

继代培养基: . MS+ 蔗糖 3%+ 山梨醇 4%; . MS+ 蔗糖 3%+ 马铃薯提取液 20%; . MS+ 蔗糖 3%+ 马铃薯提取液 30%。

1.2.3 不定芽的超低温保存 将继代培养后的不定芽转入1.8 mL的安瓿瓶中,冰浴条件下加入预冻了的冰冻保护剂淹没材料,盖上瓶盖,于冰上平衡45~60 min。

冰冻保护剂: . 10% DMSO (二甲基亚砷)+ 0.5 mol/L 山梨醇; . 10% DMSO+ 0.5 mol/L 甘露醇; . 10% DMSO+ 10% 甘油。

冰冻降温程序: 将在冰浴上平衡后的安瓿瓶转入程序降温仪, 以 1.0 /min 的速率从 4 降至- 40 , 在- 40 停留 1 h 后, 投入液氮保存。

1. 2. 4 不定芽的解冻与再培养 将液氮保存 30 d 左右的不定芽从液氮中取出, 迅速投入 38~40 的水浴中快速解冻, 并用 MS+ 3% 蔗糖的培养液洗涤 3 次, 随即转入半固体的再生培养基于 26 暗培养 7~10 d 后, 再行光照培养。

再生培养基: MS+ 蔗糖 3%+ NAA 0. 5 mg/L+ Kinetin 2 mg/L。

1. 2. 5 RAPD 分析 将不定芽超低温保存后的再生苗移栽到室外, 成活并形成较多分蘖后, 随机取 3 株分别取幼叶采用 CTAB 法<sup>[9]</sup>抽提总 DNA。RAPD 分析参照 Parminder 等<sup>[10]</sup>方法进行, 单个反应体积为 25  $\mu$ L, 其中含模板 DNA 10 ng, 随机引物 0. 2  $\mu$ mol/L, dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 200  $\mu$ mol/L, *Tag* 酶 0. 5 个单位, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8. 3), 50 mmol/L KCl, 1. 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0. 01% 明胶, 反应液表面用一滴矿物油覆盖; 扩增反应前先在 95 预变性 3 min, 再按 94 1 min、36 1 min、72 1. 5 min 循环 35 个周期, 而后在 72 链延伸 7 min; 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 经 EB (ethidium bromide) 染色后在紫外灯下观察。

## 2 结果与分析

### 2. 1 不定芽的诱导

单倍体幼穗接种到诱导培养基上培养 15~20 d, 即可通过器官发生途径形成大量的不定芽, 对 68 个幼穗的出芽情况的统计表明, 每幼穗出芽数 4~13 个, 平均 7. 3 个。将不定芽转移到再生培养基继续培养 10~15 d, 可迅速再生成小植株。

### 2. 2 继代培养对不定芽超低温保存成活率的影响

表1的结果表明, 经继代培养的不定芽超低温保存后的成活率为 21%~29%、再生出苗率为 14%~18%, 而未经继代培养的不定芽超低温保存后的成活率仅为 8%, 且不能再生成苗。从不同继代

表 1 不同的继代培养基对不定芽超低温保存成活率的影响\*  
Table 1 Effects of different subculture media on the surviving rate of cryopreserved adventitious buds\*

继代培养基 Subculture media	保存的不定芽数 No. of buds cryopreserved	恢复活力的不定芽 Growth-resumed buds		再生成苗的不定芽 Plant-regenerating buds	
		个数 No.	%	个数 No.	%
CK**	165	45	27***	26	16
	95	28	29***	17	18
	84	18	21***	12	14
	75	6	8	0	0

\* 表中结果为 3 次重复实验合计数。该项比较实验中, 使用的冰冻保护剂均为 10% DM SO+ 0. 5 mol/L 山梨醇。 \*\* 未继代培养的为对照。 \*\*\* 与对照相比达到 1% 水平极显著差异水平(1% 水平)。

\* The results in the table were derived from three experiments. Cryoprotectant (10% DM SO+ 0. 5mol/L sorbitol) was used in this experiment. \*\* The check is that of not being subcultured. \*\*\* The data are significantly different from that of CK at 1% level.

培养基作用效果的比较来看, 继代培养基 、 均具有较好效果, 不定芽超低温保存的成活率和再生出苗率分别为 27%~29% 和 16%~18% 。

### 2. 3 不同冰冻保护剂作用效果的比较

不同冰冻保护剂的作用效果明显不同(表2), 冰冻保护剂 (10% DM SO+ 0. 5 mol/L

山梨醇) 的效果最好, 不定芽超低温保存的成活率和再生成苗率分别达到 27% 和 16%。冰冻保护剂 、 也有一定的保护效果, 但明显较冰冻保护剂 的效果要差。

2.4 超低温保存再生植株的遗传稳定性

将部分超低温保存后的再生小植株移栽到室外盆中, 成活后随机取 10 株分别对其根尖进行染色体数鉴定, 结果染色体数均为 12

(图 1: 2)。该结果表明, 水稻单倍体幼穗离体培养诱导的不定芽, 经超低温保存后的再生植株, 其染色体倍性仍保持稳定。

RAPD 分析结果(图 1: 3) 显示, 对不定芽超低温保存的再生植株每单株分别用 30 个随机引物各扩增出 138 条带, 其带型均与原始的单倍体植株完全一致, 说明水稻单倍体幼穗离体培养诱导的不定芽, 经超低温保存后的再生植株在 DNA 水平上仍具有较好的遗传稳定性。

3 讨论

选材于水稻单倍体幼穗离体培养诱导的不定芽是本项研究获得成功的关键因素之一。水稻幼穗离体培养诱导的不

定芽, 其分生组织起源于体细胞器官发生途径<sup>[7]</sup>, 同茎尖的分生组织一样, 具有高度的遗传稳定性和较强的形态发生能力, 因此, 是进行超低温长期保存的优良选材。

在超低温保存之前, 对不定芽进行继代培养, 对提高不定芽超低温保存的成活率和再生出苗率是必要的。经过了继代培养的不定芽, 组织水分含量降低, 细胞质变稠, 结构更致

表 2 不同冰冻保护剂对不定芽超低温保存成活率的影响\*  
Table 2 Effects of different cryoprotectants on the surviving ability of cryopreserved adventitious buds\*

冰冻保护剂 Cryoprotectants	保存的不定芽数 No. of buds cryopreserved	恢复活力的不定芽 Growth-resumed buds		再生成苗的不定芽 Plant-regenerating buds	
		个数 No.	%	个数 No.	%
	165	45	27	26	16
	85	16	19	8	9
	80	10	13	5	6

\* 表中结果为 3 次重复实验合计数。该项比较实验中, 使用的继代培养基均为 MS+ 蔗糖 3%+ 山梨醇 4%。  
\* The results in the table were derived from three experiments. Subculture medium used in this experiment was number (MS+ 3% sucrose+ 4% sorbitol).



1. 单倍体不定芽超低温保存后再生成小植株; 2. 单倍体不定芽超低温保存后再生植株根尖细胞的染色体数仍为 12; 3. 对超低温保存后再生植株的 RAPD 分析结果: 泳道 1~3 为超低温保存后的再生植株; 泳道 4 为作对照的未经超低温保存的原始单倍体植株(此图中用于扩增的随机引物为 RG42, 其序列为 CCGGACTGAG)。  
1. Plantlets regenerated from cryopreserved adventitious buds of haploids; 2. The chromosome number of root tips of plant regenerated from cryopreserved adventitious buds of haploid is 12; 3. The RAPD analysis of plants regenerated from cryopreserved adventitious buds of haploid: Lane 1~3 are that of individual plants regenerated from cryopreserved adventitious buds; Lane 4 is that of original haploid plant as check (here, random primer RG42, CCGGACTGAG, was used)

图 1 水稻单倍体不定芽超低温保存后再生植株及其染色体鉴定与 RAPD 分析  
Fig. 1 Regenerating plant from cryopreserved adventitious buds of haploids and its genetic stability in rice

密,因而具有较强的抗冰冻能力。这一点与梨树、桑树、苹果等树木的冬芽超低温保存易获成功的机理一致<sup>[2,3]</sup>。不同的继代培养基其继代培养效果不同,其中,继代培养基 (MS+蔗糖 3%+山梨醇 4%)的继代培养效果较好,且配制简单、性能稳定;继代培养基 (MS+蔗糖 3%+马铃薯提取液 20%)的继代培养效果更佳,应用潜力更大,其缺点是马铃薯提取液成分复杂,其性能易受马铃薯生理状态的影响而不稳定。

参 考 文 献

- 1 Nag K K, Street H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 1973, **245**: 270 ~ 272
- 2 Brian W W. Genetic preservation *in vitro*. In: Evans D A ed. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology —— Proceedings of the 10th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam: Elsevier Press, 1990. 13 ~ 22
- 3 Kartha K K. Cryopreservation of Plant Cell and Organs. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc. 1985.
- 4 T say S S, T say H S, Chao C Y. Cytochemical studies of callus development from microspore in cultured anther of rice. *Plant Cell Reports*, 1986, **5**: 119 ~ 123
- 5 Fukai S, Goi M, Tanaka M. Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. *Euphytica*, 1991, **56** (2): 149 ~ 153
- 6 Matsumoto T, Sakai A, Yamada K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 1994, **13**(8): 442 ~ 446
- 7 凌定厚, 陈琬英, 陈梅等. 水稻幼胚培养直接出芽的研究. *植物学报*, 1985, **27**(4): 435 ~ 438
- 8 舒理慧, 张廷璧, 周明杰. 水稻不同倍性的幼穗在离体培养中的反应. *科学通报*, 1985, **3**: 221 ~ 224
- 9 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**: 4 321 ~ 4 325
- 10 Parminder S V, Brian V F, Michael T J *et al*. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, 1995, **74**: 170 ~ 179