

野生稻愈伤组织的超低温保存 和冻后再生植株的形成*

殷晓辉 舒理慧 郑从义 廖兰杰

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

提 要 对不同基因组的野生稻愈伤组织进行了超低温保存的研究,主要结果如下:①野生稻愈伤组织经过预培养→预处理→冰冻降温→液氮保存→快速解冻的超低温保存,冻后细胞存活率最高可达 87.9%。②10% DMSO+8%葡萄糖为最佳冰冻保护剂。降温程序为 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \xrightarrow{1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}} -10\text{ }^{\circ}\text{C}, 15\text{ min} \xrightarrow{1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}} -40\text{ }^{\circ}\text{C}, 60\text{ min} \rightarrow \text{液氮(LN)}$ 。③普通野生稻、宽叶野生稻、疣粒野生稻获得了冻后再生植株。④疣粒野生稻解冻后形成旺盛胚性愈伤组织,并通过体细胞胚胎发生途径再生出大量植株。

关键词 野生稻,愈伤组织,超低温保存,再生植株

稻属(*Oryza*)中有 22 个种,其中野生稻约有 20 种。野生稻资源是稻种资源的重要组成部分,它是天然的基因库,保存了栽培稻没有或已消失了的基因,并具有特殊的优良性状及高抗病虫害的特性。

当前迅速恶化的环境和不利的气候条件正在侵蚀着水稻的遗传多样性。同时野生稻又具有柱头外露、异交结实率较高、种子落粒性强的生物学特性,加上人为的砍伐与围垦使野生稻种面临灭绝的危险。因此,保护野生稻遗传多样性已经刻不容缓了。如何长期保存稻属资源成为目前人们关注的问题,科学家们正加紧研究野生稻基因的保存途径。植物组织与细胞的培养为植物的种质保存开辟了新的途径。组织培养物能迅速大量繁殖,再生植株可保持原有的遗传特性。为此目的,我们对野生稻愈伤组织的超低温保存进行了研究,首次获得了 3 种野生稻的冻后再生植株。我们的实验证明了野生稻幼穗离体培养物的超低温保存是稻属资源保存的有效途径。

1 材料与方法

1.1 供试材料

普通野生稻,基因组(AA);长雄蕊野生稻,基因组(A¹A¹);小粒野生稻,其基因组

收稿日:1995-07-03,第一作者:女,25岁,工程师(硕士)

* 国家自然科学基金和国家“八五”资助项目。

(BBCC);药用野生稻,基因组(CC);高秆野生稻,基因组(CCDD);宽叶野生稻,基因组(CCDD);疣粒野生稻,基因组尚未确定(?)。

1.2 幼穗培养方法

幼穗培养按舒理慧等^[1]方法。诱导培养基: N_6 +2,4-D 2 mg/L+蔗糖 4.5%;分化培养基:MS+6BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 3%;继代培养基:MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 3%。

1.3 超低温保存方法

(1) 预处理:选取继代培养 14 d 处于迅速生长的愈伤组织块(2~3 mm)放入 2 mL 安瓶中,在冰浴条件下逐滴加入不同种类及配比的冰冻保护剂(各种冰冻保护剂均溶于 1/2 MS 培养基中),冰冻保护剂与材料体积比为 1:1,然后于冰桶中预处理 45~60 min。

(2) 降温冰冻程序:降温冰冻在英国产的程序降温仪(KYRO 10)上进行,程序: $0\text{ }^{\circ}\text{C} \xrightarrow{1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}} -10\text{ }^{\circ}\text{C}, 15\text{ min} \xrightarrow{1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}} -40\text{ }^{\circ}\text{C}, 60\text{ min} \rightarrow \text{液氮(LN)}$ 。

(3) 化冻与洗涤:将在液氮中保存的材料,取出后投入 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中快速解冻,然后用 MS+3%蔗糖培养液洗涤 3 次,每次停留不超过 10 min。

(4) 冻后细胞存活率的测定:按照 Towill 和 Mazur 的 TTC 法^[2](氯化三苯四氮唑还原法)测试,721 分光光度计在 485 nm 波长测得的吸收值表示细胞活力。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{解冻后细胞的 TTC 值}}{\text{未冷冻细胞的 TTC 值}} \times 100\%$$

1.4 植株再生

经过超低温保存的愈伤组织块化冻洗涤后,接种于继代培养基上进行暗培养,再把恢复生长的材料转入分化培养基中于 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 光照条件下培养 30 d 后统计绿苗分化率。

2 结果与分析

2.1 不同基因组的野生稻愈伤组织与冻后细胞存活率的关系

对 7 个种野生稻 16 个编号的愈伤组织进行了超低温保存,冻后通过 TTC 法测试细胞存活率。7 种野生稻冻后细胞存活率的变异范围 33.2%~87.9%(表 1)。

冻后细胞存活率的差异不仅存在于不同的野生稻之间,而且在同种野生稻不同编号之间也有差异。这表明不同的基因型具有不同耐冻的内在因素。这一结果与 Ulrich 在栽培稻上得到的结果相印证。他对栽培稻 6 个品种的愈伤组织进行了超低温保存,发现它们的保存效果各不相同^[3]。

2.2 冰冻保护剂的作用效果

随着保存材料的不同,获得最佳保护效果的保护剂种类也不同。我们以普通野生稻(No. 5)的愈伤组织为材料,试验了几种保护剂的作用(表 2),证明冰冻保护剂是提高冻后细胞存活率的关键,而复合保护剂的保护效果比单独使用 DMSO(二甲基亚砷)要好。其中以 10%DMSO+8%葡萄糖的组合取得了最佳保存效果。这一结果与 Finkle(1979, 1982)在甘蔗和水稻细胞的超低温保存中所得的结果相一致^[4,5]。

2.3 降温方式的影响

迄今采用的降温冰冻方法主要有 3 种:快速冰冻法、慢速冰冻法及逐级冰冻法。慢速

表 1 不同野生稻愈伤组织超低温保存的效果

Table 1 Effects of cryopreservation of callus from various wild rice

野生稻 Species	基因组 Genome	产地 Origin	编号 No.	冷冻前 TTC 值 TTC value before cryopreservation	冷冻后 TTC 值 TTC value after cryopreservation	细胞存活率 Cell survival (%)
普通野生稻 <i>Oryza rufipogon</i>	AA	中国广西 Guangxi, China	1	0.440	0.162	36.8
			2	0.580	0.433	74.7
			3	0.820	0.412	50.2
			4	1.430	1.045	73.1
			5	1.605	1.165	72.6
			6	0.910	0.550	60.4
			7	0.870	0.438	50.3
			8	0.807	0.580	71.9
			9	0.510	0.390	76.5
		菲律宾 Philippines		2.100	1.436	68.4
长雄蕊野生稻 <i>O. longistaminata</i>	A ¹ A ¹	赞比亚 Zambia		0.218	0.162	74.3
小粒野生稻 <i>O. minuta</i>	BBC	菲律宾 Philippines		0.322	0.107	33.2
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	CC	中国广西 Guangxi, China		2.250	1.668	74.1
高秆野生稻 <i>O. alta</i>	CCDD	巴西 Brazil		1.950	0.990	50.8
宽叶野生稻 <i>O. latifolia</i>	CCDD	墨西哥 Mexico		0.700	0.615	87.9
疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	?	中国云南 Yunnan, China		1.300	1.035	79.6

冰冻法是采用最广泛的一种方法,它通过缓慢降温使温度从 0℃ 逐渐降到-100℃ 左右,然后投入液氮。改良慢速冷冻法则是通过缓慢降温使温度从 0℃ 降到一定的预冻温度,并停留一段时间,再投入液氮。其目的都是为了使细胞内的水有充足的时间不断流到细胞外结冰,从而使细胞内的水减少到最低限度,达到良好的脱水效应,避免细胞内结冰的不可逆性伤害。我们采用了后一种方法,在预冻温度停留一段时间是保持高存活率的关键,它能使细胞达到充分的保护性脱水,以便提高存活率(表 3)。这一结果与田永中等在光敏核不育水稻愈伤组织超低温保存中取得的结果相一致^[6]

表 2 冰冻保护剂对普通野生稻(编号 5)愈伤组织超低温保存的影响

Table 2 Effects of cryoprotectants on callus cryopreservation in *O. rufipogon* (No. 5)

冰冻保护剂 Cryoprotectant	冰冻前 TTC 测试值 TTC value before cryo-preservation	冰冻后 TTC 测试值 TTC value after cryo-preservation	细胞存活率 Cell survival (%)
对照(Control)	1.200	0.027	2.3
I. 10%DMSO	3.900	0.525	13.5
II. 10%DMSO+10%甘油(glycerol)	3.900	0.650	16.7
III. 10%DMSO+10%蔗糖(sucrose)	1.800	0.435	24.2
IV. 10%DMSO+0.5 mol/L 山梨醇(sorbitol)	1.920	0.385	20.1
V. 10%DMSO+8%葡萄糖(glucose)	1.605	1.165	72.6
VI. 5%DMSO+10%甘油(glycerol)+8%蔗糖(sucrose)	1.500	0.750	50.0

表 3 降温冰冻方法对普通野生稻细胞存活率的影响
Table 3 Effects of freezing methods on cell survival of wild rice

降温冰冻方法 Freezing methods	冰冻前 TTC 测试值 TTC value before cryo-preservation	冰冻后 TTC 测试值 TTC value after cryo-preservation	细胞存活率 Cell survival (%)
1.0℃ $\xrightarrow{1\text{C/min}}$ -40℃ \rightarrow LN	3.000	1.119	37.3
1.0℃ $\xrightarrow{1\text{C/min}}$ -40℃, 60 min \rightarrow LN	2.200	1.340	60.9
1.0℃ $\xrightarrow{1\text{C/min}}$ -10℃, 15 min $\xrightarrow{1\text{C/min}}$ -40℃, 60 min \rightarrow LN	3.300	2.430	73.6

此外,对于固体培养的愈伤组织来说,选择 10~15 d 年龄的愈伤组织作为超低温保存的材料较为适宜;细胞冷冻后的恢复生长宜在黑暗中进行,因为光氧化作用对冻后材料是有害的。我们选取再培养 14 d 的愈伤组织作为超低温保存材料,并在冻后进行暗培养,取得了较好的保存效果。

2.4 冻后再生植株的形成

在水稻细胞的超低温保存中,冰冻伤害造成了呼吸损伤,减缓了葡萄糖的吸收,细胞内钾离子损失^[7],加速了脂质的过氧化反应^[8]。尽管冰冻造成了伤害,但并非致死性的,所以在细胞恢复再生长之前有一个停滞期用来修复这些损伤。细胞的再生长才是最终检验细胞活力的唯一可靠方法。

将恢复生长的愈伤组织转入分化培养基后,有 3 种野生稻得到了冻后再生植株(表 4)。其中普通野生稻和宽叶野生稻的冻后再生率都低于对照,而疣粒野生稻的冻后再生率 91.7% 却大大超过了对照,这种促进作用的机理尚有待于进一步的研究。将它们的试管苗(图版 1:5~7)移栽后得到了结实植株(图版 1:8~10)。

表 4 野生稻超低温保存后再生植株的比较
Table 4 Comparison of regenerative plantlets after cryopreservation in different wild rices

野生稻 Species	基因组 Genome	转移愈伤组织块数 No. of callus trans-planted	白苗数 No. of Albino	白苗率 Diffe- rential frequen- cy of albino (%)	绿苗数 (丛) No. of green plantlets	绿苗率 Diffe- rential frequen- cy of green plantlets (%)
普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	AA	20	3	15.0	1	5.0
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	CC	23	0	0	4	17.4
高秆野生稻 <i>O. alta</i>	CCDD	21	0	0	0	0
宽叶野生稻 <i>O. latifolia</i>	CCDD	27	1	3.7	2	7.4
疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	?	24	0	0	22	91.7

3 讨论

超低温保存技术是近几十年来广泛采用的长期保存植物种质资源的方法。1979 年栽培稻的愈伤组织就已在液氮中保存成功^[9],我们对野生稻超低温保存的研究同样证实了它也能有效地保存野生稻资源。野生稻的幼穗直接接种于分化培养基时(不通过愈伤组织),能分化出植株,但多为单生苗,生长缓慢,没有根分化。如果将刚分化出的小绿芽进行超低温保存,冻后一周内小绿芽白化死亡。而选用幼穗接种诱导培养基上产生的愈伤组织却能大量扩增,再分化出大量绿苗。因此,选用幼穗组织培养物是超低温保存比较适宜的

材料。

水稻的组织培养在栽培稻方面已取得了相当多的进展,然而在野生稻的组织培养方面却研究得很少。随着对野生稻有利资源应用及保存的需要,野生稻的组织培养成为日益重要的课题。

外植体的选择对于愈伤组织的诱导至关重要。已经从野生稻的叶、种子和微繁殖体(Micropropagule)的基节诱导出愈伤组织,并分别建立起悬浮培养和原生质体培养体系,获得了再生植株^[10,11]。舒理慧等在栽培稻中的研究表明:幼穗的发育时期对幼穗培养具有明显影响,反应最好的时期均在第二次枝梗及颖花原基分化期到花粉母细胞形成期^[1]。我们也对野生稻的幼穗发育时期进行了研究,得到的结果也是雌雄蕊形成期具有最高诱导率,产生旺盛的愈伤组织(图版1:1~3)。它是进行超低温保存的最佳材料。

另外疣粒野生稻幼穗愈伤组织冻后开始出现为粘稠状胶状物。在黑暗条件下延长继代培养时间(40天继代一次),4个月后其表面不断长出白色紧密的小颗粒,即胚性愈伤组织,继续扩展繁殖形成了大量的胚状体(图版1:4)。通过胚状体的分化形成了365株再生植株。疣粒野生稻的组织培养再生植株一直是个难题,很少见于报道。我们采用超低温保存法,获得了大量再生绿色植株,这不能不说是一个新的探索。在水稻原生质体及长春花细胞的超低温保存中也观察到了这种现象^[12,13],随着培养时间的延长,培养基水份大量丧失,造成水份胁迫,促进愈伤组织内源ABA含量上升,而ABA对水稻胚性愈伤组织形成具有明显的作用^[14]。

Watanabe等在做薰衣草悬浮细胞冰冻保存实验时,也发现冻后细胞分化率高于冻前^[15]。而唐定台等在做水稻原生质体产生细胞团的冰冻保存实验时,也在冻后观察到了胚状体的发生^[12]。我们在疣粒野生稻上的实验表明:冰冻后促进了胚状体的发生。所以,冰冻能够诱导胚状体的发生,促进植物细胞的分化,这在细胞工程、遗传工程研究和实际应用中将具有很大的意义。至于高频率发生的胚性细胞系的筛选,及冻后再生植株的特性尚需进一步深入的研究

致谢 实验过程中,得到了屈三甫同志大力帮助;部份野生稻的材料由广西农科院品种资源研究所及武汉大学生命科学学院遗传学研究所汪向明教授、王明全副教授提供。

参 考 文 献

- 1 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
- 2 Towill L. E., Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissues. *Can. J. Bot.*, 1975, **53**:1 097~1 102
- 3 Ulrich J. M., Finkle B. J., Mackey B. E. *et al.* Responses of six rice callus cultures to deep-frozen temperatures. *Crop Sci.*, 1984, **24**:82~85
- 4 Finkle B. J., Ulrich J. M. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physl.*, 1979, **63**:598~604
- 5 Finkle B. J., Ulrich J. M. Cryoprotectant removal temperature as a factor in the survival of frozen rice and sugarcane cells. *Cryobiology*, 1982, **19**:329~335
- 6 田永中, 舒理慧, 郑从义. 光敏感核不育水稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成. 武汉大学学报(自然

- 科学版), 1994, 4: 89~94
- 7 Cella R, Colombo R, Galli M G *et al.* Freeze-preservation of rice cells; A physiological study of freeze-thawed cells. *Physl Plant*, 1982, 55: 279~284
- 8 Benson E E, Lynch P T, Jones J. The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells; Consequences for post-thaw survival. *Plant Sci*, 1992, 85: 107~114
- 9 Sala F, Cella R, Rollo F. Freeze-preservation of rice cells grown in suspension culture. *Physl Plant*, 1979, 45: 170~176
- 10 Baset A, Cocking E C, Finch R P. Regeneration of fertile plants from protoplasts of the wild rice species *Oryza granulata*. *J Plant Physl*, 1993, 141: 245~247
- 11 Baset A, Finch R P, Cocking E C. Plant regeneration from protoplasts of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 200~203
- 12 唐定台, 杨志琦, 山田康之. 水稻原生质体产生细胞团的冰冻保存和冻后再生植株形成. 植物学报, 1988, 30: 357~361
- 13 Chen T H H, Kartha K K, Leung N L *et al.* Cryopreservation of alkaloid producing cell cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physl*, 1984, 75: 726~731
- 14 梅传生, 张金渝, 汤日圣等. 琼脂浓度对水稻愈伤组织植株再生率和内源激素含量的影响. 中国水稻科学, 1993, 7(3): 148~152
- 15 Watanabe K, Yamada Y *et al.* Change of freezing resistance and retention of metabolic and differentiation potentials in cultured green *Lavandula vera* cells which survived repeated freeze-thaw procedures. *Agr Biol Chem*, 1985, 49(6): 1727~1731

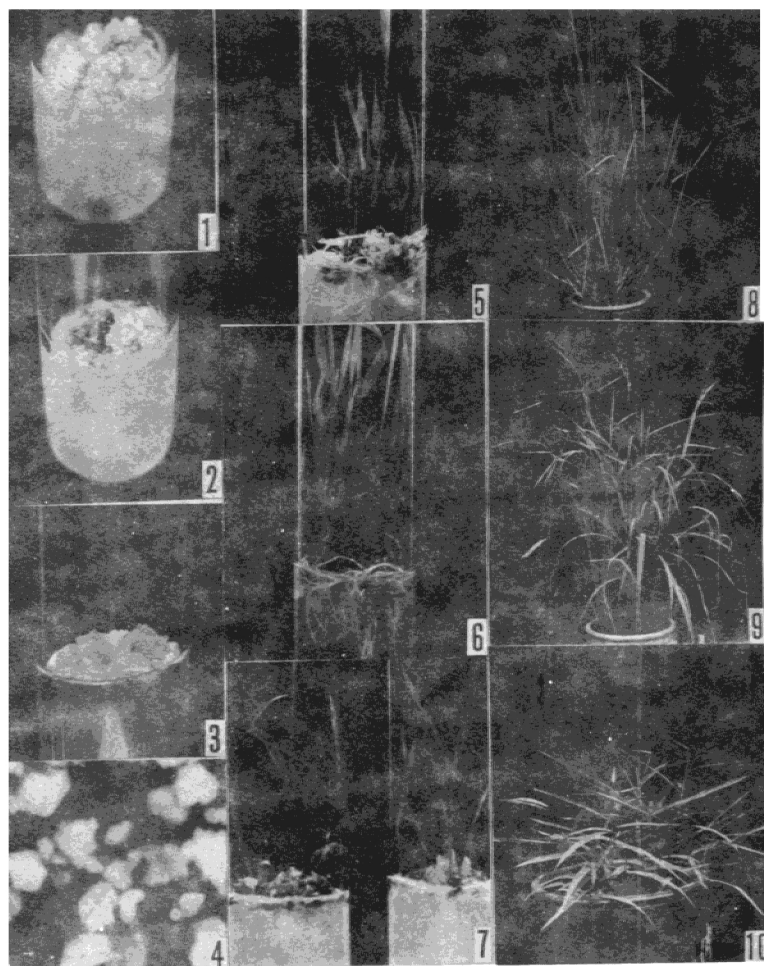
CRYOPRESERVATION AND FORMATION OF REGENERATIVE PLANTLETS OF CALLUS FROM WILD RICE

Yin Xiaohui Shu Lihui Zheng Congyi Liao Lanjie

(College of Life Sciences, Wuhan University Wuhan 430072)

Abstract The tissue culture and cryopreservation of 7 species of wild rice were studied. Main results are as follows: 1. By preculturing→pretreating→freezing→liquid nitrogen preserving→rapid thawing, the highest cell survival percentage of wild rice calli was 87.9%. 2. The best cryoprotectant was 10% DMSO plus 8% glucose for wild rice cryopreservation. And the optimal freezing procedure was: 0 C $\xrightarrow{1\text{ C/min}}$ -10 C, 15 min $\xrightarrow{1\text{ C/min}}$ -40 C, 60 min→liquid nitrogen. 3. Regenerative plantlets were obtained after cryopreservation in *Oryza rufipogon*, *O. latifolia* and *O. meyeriana*. 4. Embryogenic callus formed after cryopreservation in *O. meyeriana*. And a large number of regenerative plantlets were obtained through the somatic embryogenesis way.

Key words Wild rice, Callus, Cryopreservation, Plant regeneration



1.5.8. 普通野生稻冻后愈伤组织、再生植株、移栽成活植株; 2.6.9. 宽叶野生稻冻后愈伤组织、再生植株、移栽成活植株
3.4.7.10. 疣粒野生稻冻后愈伤组织、再生植株、移栽成活植株
1.5.8. Calli, regenerative plantlets, plants from *O. rufipogon* after cryopreservation; 2.6.9. Calli, regenerative
plantlets, plants from *O. latifolia* after cryopreservation; 3.4.7.10. Calli, regenerative plantlets, plants from *O. megeri*
ana after cryopreservation