



水稻译文集之四

# 水稻的组织培养

颜昌敬 赵庆华 译

上海科学技术出版社



# 水稻的组织培养

——水稻译文集之四

颜昌敬 赵庆华 译

上海科学技术出版社

水稻的组织培养

——水稻译文集之四

颜昌敬 赵庆华 译

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 无锡惠远印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印数 9,625 字数 212,000

1981年7月第1版 1981年7月第1次印刷

印数: 1—4,000

统一书号: 16149·714 定价: (科四) 0.90 元

## 编译者的话

水稻是世界上重要的粮食作物。世界各国，特别是水稻生产国，对水稻的组织培养研究工作都非常重视。水稻的组织培养自 1964 年古桥首次发表从水稻茎节诱导出愈伤组织以来，研究工作发展极快，发表的文章亦多。本书仅选译了其中有代表性的文章 33 篇，包括水稻器官和组织的全能性，愈伤组织的诱导形成、生长、营养、代谢、再分化和形态解剖学的研究。基本上反映了国外水稻组织培养研究的历史和进展。

近几年来，我国的水稻组织培养研究工作有所发展，如水稻花药培养在育种上的应用；水稻叶鞘、茎尖、枝梗、幼穗的全能性；以及组织培养在育种和快速繁殖上的应用研究等均取得一定成果。从事这方面研究工作的队伍也不断壮大。

为了给从事水稻组织培养的工作人员提供一些比较系统的科研进展情况，特编译了这本译文集。但限于编译者的水平，加上时间仓促，在搜集、选题和译文方面均可能存在不妥当甚至错误之处，请读者多加批评指正，以便今后改进。

1980 年 2 月

## 目 录

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| 稻节愈伤组织的无限生长培养·····                   | ( 1 )   |
| 水稻愈伤组织形成和单细胞分离的研究·····               | ( 4 )   |
| 离体水稻根愈伤组织的生长·····                    | ( 18 )  |
| 水稻愈伤组织细胞核形态和秋水仙碱的作用·····             | ( 29 )  |
| 水稻品种间形成愈伤组织的差异·····                  | ( 40 )  |
| 水稻愈伤组织的器官再分化和植株复原·····               | ( 48 )  |
| 花药培养诱导的粳稻单倍体植株·····                  | ( 51 )  |
| 水稻愈伤组织生长的氮源·····                     | ( 54 )  |
| 激动素对水稻胚愈伤组织分化器官的效果·····              | ( 66 )  |
| 液体培养中水稻细胞的增殖·····                    | ( 78 )  |
| 从水稻花药和子房培养诱导出不同倍性植株·····             | ( 95 )  |
| 水稻配子细胞的全能性和单倍体的产生·····               | ( 100 ) |
| 不同浓度 2, 4-D 诱导水稻不同器官的愈伤组织<br>形成····· | ( 103 ) |
| 水稻胚愈伤组织在继代培养中的生长·····                | ( 110 ) |
| 从花药培养获得的水稻籼粳杂种植株·····                | ( 118 ) |
| 从水稻胚根分离原生质体·····                     | ( 123 ) |
| 水稻矮秆品种和正常株高品种愈伤组织生长对赤<br>霉素的反应·····  | ( 126 ) |
| 水稻愈伤组织生长和分化的辅助因素——氨基酸·····           | ( 139 ) |
| 液体培养基中继代培养水稻细胞的性质和增殖·····            | ( 149 ) |
| 生长素对水稻愈伤组织分化的作用·····                 | ( 157 ) |
| 水稻愈伤组织淀粉同工酶的特性和品种间差异·····            | ( 164 ) |
| 水稻愈伤组织分化茎叶时细胞内颗粒的观察·····             | ( 178 ) |

|                                             |       |
|---------------------------------------------|-------|
| 水稻愈伤组织分化茎叶的形态学研究·····                       | (196) |
| 从水稻叶和愈伤组织分离原生质体·····                        | (210) |
| 水稻愈伤组织分化茎叶过程中水解酶的变化·····                    | (217) |
| 水稻未成熟胚乳愈伤组织的植株分化·····                       | (231) |
| 水稻盾片吸收细胞和胚根表皮细胞愈伤组织诱导<br>和 2,4-D 浓度的关系····· | (237) |
| 生长素对诱导水稻各种器官愈伤组织的影响·····                    | (240) |
| 水稻原生质体愈伤组织的分化·····                          | (256) |
| 水稻种子形成愈伤组织的组织学研究·····                       | (262) |
| 水稻中胚轴不定根和愈伤组织的形成·····                       | (279) |
| 用花药培养获得的多年生野生稻单倍体植株·····                    | (282) |
| 水稻愈伤组织的诱导和生长素的吸收、代谢·····                    | (287) |

## 稻节愈伤组织的无限生长培养

离体植物组织、器官的无限生长培养，首先由 Gautheret 和 White 试验成功以来，到目前为止，已有好多种植物可以成功地进行组织、器官的无限生长培养。可是，在这些无限生长培养成功的例子中，大部分是双子叶植物，而单子叶植物极少。即使是由禾本科植物起源的无限生长培养，目前成功的也不过只有三个例子：La Rue 等的玉米内胚乳诱导产生的愈伤组织，Robert 和 Street 的黑麦离体根的无限生长培养，以及 Norstog 的黑麦草内胚乳诱导产生的愈伤组织。因此，用禾本科植物组织、器官进行无限生长培养，是十分困难的工作。难怪 Bonner 等也叹道：“即使用禾本科植物的根，在任何培养基中进行无限生长培养，都十分困难。”

近几年来，作者等一直从事有关代谢和分化的研究。我们将供试材料接种于培养基中，却发现水稻幼苗的根和节均发生愈伤组织。为此，又进行了培养基研究，由比较单纯的组成成分逐渐进行改良，共移植 10 次以上，愈伤组织的增殖速度仍不降低。但是用肉眼观察，此种愈伤组织始终呈不分化状态。

在本报告中，将扼要报道上面所说的水稻节诱导形成愈伤组织的无限生长培养情况。另外，根愈伤组织的继代培养，准备在其他报告中论述。

实验材料是用水稻(*Oryza sativa* L.)，品种金南风，其种子是 1963 年爱知旭农业试验场生产并经 6 个月贮藏的。

将供试的种子先剥去颖壳,用 70% 酒精漂洗 4~5 秒钟,8% 的漂白粉溶液灭菌 10 分钟后,再用无菌水反复冲洗。然后将种子浸入无菌水中 30 分钟,随即接种在 Heller 的基本培养基中,在 30℃ 黑暗条件下让其发芽。发芽后第 5 天的幼苗,离根茎约 5 毫米处切取地上部,随即插入根据 White 培养基稍加改良的 FR-1 培养基中约 5 毫米,在 30℃ 黑暗条件下培养。约 10 天,诱导产生了愈伤组织(图 1(1))。FR-1 培养基,是在 Heller 培养基的无机成分中,另加甘氨酸 3ppm,DL-色氨酸 60ppm,烟酸 0.5ppm,盐酸吡哆素 0.5ppm,盐酸硫胺素 0.5ppm,2,4-D 2ppm,酵母抽提物 0.5%,蔗糖 2%,琼脂 0.6%。用 50 毫升的三角瓶,每瓶分装培养基约 15 毫升,在 1 公斤/平方厘米的高压消毒锅中消毒 15 分钟。

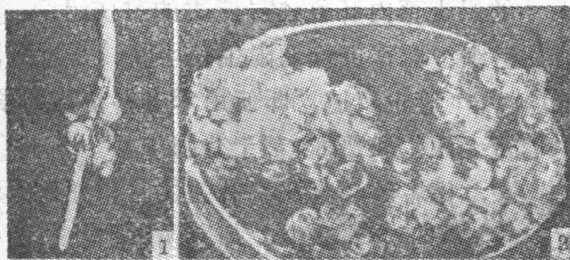


图 1 (1)在水稻节上出生的愈伤组织(地上部茎接种于 FR-1 培养基后 14 天); (2)第 11 次继代培养 14 天的愈伤组织。

将节上形成的部分愈伤组织,移植到新的 FR-1 培养基中培养,愈伤组织又旺盛生长。2 周后,再将新生出的部分愈伤组织进行移植,生长速度也并不降低,愈伤组织的鲜重在 2 周内比原来的高 50~80 倍。图 1(2)的愈伤组织是第 12 次转移继代的愈伤组织,生长速度已稍有降低,但始终未发现分化的迹象。根据以上情况,由于这种培养基能成功地将愈

伤组织进行无限生长培养,故将其命名为克隆 FR-1 培养基。

水稻节的愈伤组织,与其他植物种的愈伤组织一样,是淡黄色均质的愈伤组织,它与相同植株根上产生的愈伤组织容易混有维管束状组织比较而言,也是易碎组织。用水稻节产生愈伤组织的克隆 FR-1 培养基,也培养了胡萝卜。从胡萝卜上形成的愈伤组织,有比较坚固的细胞膜组织,但其细胞间结合力大都非常差,极易崩裂。

另外,在这个实验的培养基中,也添加了 DL-色氨酸和酵母抽提物。根据试验结果,它们是无限生长培养必不可少的物质。Street 等早已指出,色氨酸对于禾本科分生组织的生长,具有促进作用。但它的作用,开始是在高压灭菌后的培养基中看到的,在本研究中同样也证明了色氨酸的有益作用。

译自《科学》34(11):623,1964。原作者:古桥胜久,谷田沢道彦。赵庆华译。

中国科学院植物研究所

中国科学院植物研究所图书馆

中国科学院植物研究所图书馆

# 水稻愈伤组织形成和单细胞 分离的研究

植物器官、组织与细胞培养技术的发展,对于不断提高栽培植物的细胞生理、形态建成和遗传、育种的研究水平,提供了十分有效的手段。在胡萝卜及其他双子叶植物上,已经建立了愈伤组织形成、细胞培养等实验技术,但在单子叶植物上,对于愈伤组织形成和细胞培养,还是相当困难的。Reinert也说过:关于单子叶植物和裸子植物松类的组织培养,均十分困难。单子叶植物的胚培养,很早就有较多的研究成果。茎尖和根的培养,最近也有几篇报告。但是,单子叶植物愈伤组织的形成,仅有在菟蓿上成功的报告,然而至今尚未取得成果。

从以上观点出发,古桥、谷田泽在1964年用水稻成功地获得了愈伤组织并继代培养,这是值得大书特书的事情。作者继这一成果之后,更详细地观察了水稻的愈伤组织形成过程,同时用这种愈伤组织成功地进行了游离细胞的分离。这里,主要报告上述的试验结果,更详细的研究内容准备在续报中论述。

## 材料和方法

试验材料用水稻品种爱知旭和金南风的种子。将除去内颖和外颖的水稻种子,用无离子水反复冲洗数分钟,然后在

70% 酒精液中浸渍数分钟，并再次用无离子水冲洗。在 120 毫升的水中加漂白粉 10 克，取充分振荡后的过滤液，浸渍上面处理过的水稻种子 20 分钟，进行灭菌。同时，用上述漂白粉过滤液充分浸渍灭菌过的脱脂棉，并用它包住灭过菌的水稻种子。经过这样处理后，把脱脂棉连同包住的水稻种子一起带进无菌接种室，置于各种培养基上。

基本培养基如表 1 所示。它是部分改良的 Murashige 和 Skoog 培养基，主要含有较高浓度的铁和维生素。除表中所

表 1 组织及细胞培养改良的“MS”培养基成分

| 盐 类 及 有 机 成 份                                                 | 含 量     |
|---------------------------------------------------------------|---------|
| 毫克/升                                                          | 毫克分子    |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....1650.0                          | N 41.2  |
| $\text{KNO}_3$ .....1900.0                                    | 18.8    |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....440.0          | 3.0     |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....370.0          | 1.5     |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....170.0                           | 1.25    |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ .....74.6                           | Na 0.40 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....55.6           | Fe 0.20 |
|                                                               | 微克分子    |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....6.2                              | 100.0   |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....22.3           | 100.0   |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....10.6           | 30.0    |
| KI.....0.83                                                   | 5.0     |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0.25 | 1.0     |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0.025          | 0.1     |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....0.025          | 0.1     |
| 甘氨酸.....20.0                                                  | 266.4   |
| 烟酸.....5.0                                                    | 40.6    |
| 盐酸吡哆素.....5.0                                                 | 24.3    |
| 盐酸硫胺素.....1.0                                                 | 2.0     |
| 肌醇.....200.0                                                  | 1110.1  |

列的以外,加蔗糖 30 克/升。固体培养基加 8 克/升琼脂。加生长素如萘乙酸(NAA)10 微克分子( $\mu M$ ),即 1.9 毫克/升,或 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 10 微克分子,即 2.2 毫克/升。加激动素 10 微克分子,即 2.2 毫克/升,加酵母抽提物(Difco 制)5.0 克/升。

将加有上述各种物质的培养液,分装于 100 毫升的三角烧瓶中,每瓶 50 毫升,或装入直径 1.8 厘米、长 18.5 厘米的 T 型试管中,每管 10 毫升。用铝箔封口,放入高压消毒锅。在 1 公斤/厘米<sup>2</sup> 压力下,培养瓶经 30 分钟, T 型试管经 20 分钟高压灭菌。冷却后即接种。接种的培养瓶进行静置培养,接种的 T 型试管,放在旋转培养床上,以每分钟 1 转的转速,进行旋转培养。培养时的温度,均是 27°C 或 30°C,除观察和操作以外,均在黑暗中培养。进行旋转培养的愈伤组织游离出单细胞,用 Delafield 苏木精或 0.1% 的中性红或亚甲蓝染色。染色液 1 比细胞悬浮培养液 4 的比例混合染色游离细胞。在光学显微镜下进行观察。

## 实验结果和讨论

### 一、2,4-D 对形成愈伤组织的影响

在基本培养基中加激动素和酵母抽提物,并分别添加 NAA 或 2,4-D。每瓶接种 5 粒水稻种子(品种爱知旭)。

图 1 和图 2 是接种培养后 30 天的幼苗状态。图 1 左边的个体,是加有 2,4-D 培养基培养的幼苗。右边的个体,是加有 NAA 培养基上培养的幼苗。也就是说,加 NAA 的,种子形成正常的根和茎叶,并成为正常的稻苗,但不能诱导出愈伤组织。



图 1 无菌培养 30 日龄的稻苗( $\times 0.33$ )。右边的添加 NAA 为  $10\mu M$ , 左边的添加 2,4-D 为  $10\mu M$ 。培养基由激动素、酵母抽提物及基本培养成分所组成。

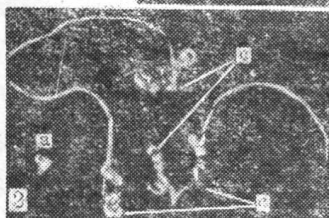


图 2 添加 2,4-D 诱导产生的稻苗愈伤组织 (C), 以及从另一株同龄稻苗上游离出来的一个愈伤组织块( $\times 0.50$ )。

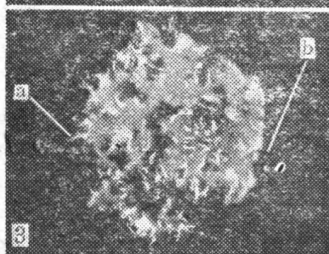


图 3 和图 4 继代培养 57 天后的巨型愈伤组织。图 3 是水平方向图 4 的侧面, 注意有许多根产生根毛(a)。



但是将水稻种子培养在含有 2,4-D 的培养基上时, 根和茎叶发现异常状态, 并在稻苗上产生 1~3 块愈伤组织 (C) (图 2)。所有的个体都可见到胚芽鞘(coleoptile), 可是也发现第 1 叶有异常形态。同时也有产生短小的根, 但愈伤组织

生长旺盛的稻苗，多数不能见到根。不同个体的胚芽鞘、叶、根、愈伤组织等的形状有显著的不同。从种子发芽状态的观察分析这个事实，认为主要由于接种时培养基与种子的接触状态，以及胚芽鞘的伸长，改变了原来接触状态而造成的。也就是说，胚在接触培养基时发现愈伤组织的旺盛形成，随后其绝大多数又发生了许多短小的根。

从母体上切离如上述情况下产生的愈伤组织，如图 2(a) 所表示的愈伤组织细胞团，转移到含有 2,4-D、激动素、酵母抽提物的新的培养基上，愈伤组织便继续生长，形成非常大的组织块。在这过程中，在愈伤组织上从初期较早形成的部分上，产生较多的细根。在根上尚能发现有大量的根毛。发生根的愈伤组织，生长便逐渐衰退，而从未长根的部分愈伤组织上，新的淡黄色的愈伤组织又旺盛生长。图 3 和图 4，是表示移植后 57 天的巨大的愈伤组织。左侧(a)可看到具有较多根的老组织，右侧(b)可看到不发根的新的愈伤组织。这个愈伤组织，直径 2.5 厘米，高 1.3 厘米。象这样巨大的愈伤组织，与从母体上切离的愈伤组织移植一样，在不切离的水稻秧苗上也能获得。

## 二、2,4-D、激动素和酵母抽提物的影响

为了明确 2,4-D、激动素和酵母抽提物对形成愈伤组织的影响，试验设计了 4 种处理，即在基本培养基中添加 2,4-D、激动素和酵母抽提物；加激动素和酵母抽提物；加 2,4-D 和酵母抽提物；以及加 2,4-D 和激动素。培养基分装于培养瓶中，每瓶接种 5 粒水稻种子(品种金南风)。

接种 5 天后，不含 2,4-D 的培养基，发现与上述实验仅加 NAA 的情况一样，并获得了伸长正常胚芽鞘和胚根的直立苗。但是，含有 2,4-D 的培养基，水稻苗均呈异常形态。这

种水稻苗在接种后 15 天,产生了一至数个直径约 2 毫米左右的愈伤组织。很明显, 2,4-D 是诱导愈伤组织必不可少的条件。接种后 30 天,含有 2,4-D 和激动素的培养基,未发现愈伤组织显著增大,但含 2,4-D 和酵母抽提物的培养基,愈伤组织极大,形成了直径 1 厘米左右的愈伤组织。这说明水稻苗上愈伤组织生长增大,在有 2,4-D 的情况下,酵母抽提物比激动素更为必要。

在表 2 中,列举了接种后 38 天,2,4-D、激动素和 2,4-D、酵母抽提物培养基中愈伤组织的直径以及形成愈伤组织的稻苗鲜重。从表中可见,含有酵母抽提物的愈伤组织鲜重,约为添加激动素的愈伤组织鲜重的 2 倍。

表 2 激动素和酵母抽提物对形成水稻幼苗愈伤组织的影响

| 添加物质        | 愈伤组织的大小和重量 |        |
|-------------|------------|--------|
|             | 直径(毫米)     | 鲜重(毫克) |
| 激动素(10微克分子) | 5.6        | 155    |
| 酵母抽提物(5克/升) | 9.0        | 302    |

注:添加激动素和酵母抽提物时,培养基的 2,4-D 浓度为 10 微克分子。培养时间 38 天。20 棵苗的平均数。

### 三、愈伤组织的形成过程

为了详细观察水稻愈伤组织的形成过程,将在基本培养基中加有 2,4-D、酵母抽提物的培养基分装于培养瓶中,每瓶接种 5 粒水稻金南风品种的种子。定时追踪愈伤组织的形成过程,其结果如图 5~12 所示。

图 5 是表示接种后 10 天的水稻苗。发现所有的个体,胚芽鞘伸长,但在右边的个体,即胚芽鞘的基部,在盾片(scutellum)附近,形成了愈伤组织(a)。有 4 个个体,在胚芽鞘的基

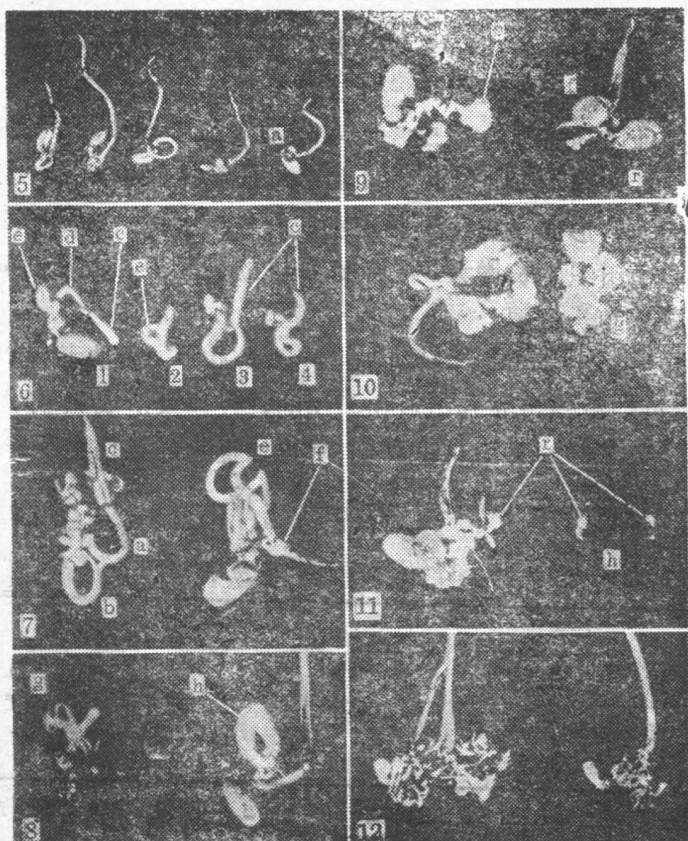


图 5~12 稻苗愈伤组织的形成过程。图 5.10 天龄稻苗 ( $\times 0.42$ )。注意愈伤组织(a)和胚芽鞘的生长。图 6.10 天龄稻苗 ( $\times 0.84$ )。注意叶片弯曲 (d 和 e)。图 7.17 天龄稻苗 ( $\times 1.02$ )。注意叶片扭曲 (a, b 和 e) 和胚芽鞘基部产生愈伤组织(f)。图 8.18 天龄稻苗 ( $\times 0.96$ )。注意叶片组织产生愈伤组织(g) 和带状的叶(h)。图 9.26 天龄稻苗 ( $\times 1.08$ )。注意叶片组织(e)和根尖(r)产生愈伤组织。图 10.27 天龄稻苗 ( $\times 1.08$ )。稻苗和巨型愈伤组织和分离出来的愈伤组织团(g)。图 11.32 天龄稻苗和从另一株同龄苗上分离出来的根切片(h)。注意根尖长出愈伤组织。图 12.33 天龄稻苗 ( $\times 0.84$ )。注意长出许多根。

部显著地发生了伸长的弯曲组织。为了详细观察这种弯曲组织，将这部分切离后的放大照相，示如图 6。这里仅切下盾片，保留它的基部。在图 6 的一个个体，盾片附近肥大，在这个部位胚芽鞘的基部(c)发现裂成二裂，弄破胚芽鞘基部的侧面，第 1 叶(d)发生了明显的弯曲。从这个第 1 叶的叶鞘，进一步在外面发现了认为是第 2 叶的组织 (e)。也就是说，有若干个体，继胚芽鞘的基部，第 1 叶即在胚芽鞘的顶端原封不动地伸长了出来。图 6(2)是切下第 1 叶基部的照相。这里第 2 叶(e)发生比较明显的弯曲。图 6(3)与(4)的个体，切下胚乳保留附近盾片的愈伤组织，在基部切下胚芽鞘(c)的照相。即使这样，我们也能发现胚芽鞘的基部从盾片脱离的过程，和第 1 叶弯曲的过程。也就是说在图 5 所见，在胚芽鞘基部有某种管状的组织，不是中胚轴(mesocotyl)，而明确是管状中的第 1 叶。其理由是分开中胚轴，不可能从中期望出现新的器官。

从以上观察，在稻苗上愈伤组织的发生部位，推测是在盾片附近，但这里究竟是盾片还是根鞘部位，说法不够严密，还有待于以后解剖学的进一步研究。在多数稻苗中，从出现胚芽鞘和第 1 叶来看，愈伤组织的产生部位，肯定不是胚芽部位。

图 7 是表示继续生长的稻苗。左边的个体，明显地看到在胚芽鞘(c)顶端弯曲的第 1 叶(a)与弯曲的第 2 叶(b)。右边的个体，发现与弯曲的叶(e)一起，胚芽鞘的基部(f)肥大，成为愈伤组织状的组织。图 8 左边个体(g)的部分，能看到从叶组织产生的愈伤组织，右边个体(h)部分，则可以看到似带状的叶。图 9 左边的个体(e)的部分，可以看到从叶产生的愈伤组织并进一步肥大的状态，右边的个体可在(r)中看到，短