

水稻抗 s-氨基半胱氨酸细胞突变体的筛选

陈璋 朱秀英 卢勤 陈启锋

(福建农学院作物遗传育种研究所, 福州 350002)

应用水稻花药培养技术, 通过对抗 s-氨基半胱氨酸(AEC)突变体的选择, 研究了细胞水平筛选高含量赖氨酸水稻种质的效果。结果表明, AEC可抑制水稻花药(粉)愈伤组织的形成与生长, 用 0.5mmol/L AEC进行诱导或继代筛选, 可获得抗性愈伤组织并再生绿苗, 但仅有少数个体自然加倍正常结实, 并保持对 AEC的抗性。经多代选择与鉴定, 获得了丰产优质突变体 A-87306, 其糙米游离赖氨酸含量 0.43%, 较对照增加 34.38%。初步认为以 AEC 为外源胁迫因子, 离体筛选水稻高赖氨酸含量的细胞突变体是有效可行的。

关键词 s-氨基半胱氨酸; 细胞突变体; 水稻

根据植物体内氨基酸代谢中反馈抑制的原理, 可以用某种氨基酸或其类似物来筛选反馈抑制不敏感, 能够过量生产与积累相应氨基酸的突变体, 以提高细胞中相应氨基酸的含量^[1]。自从 Negrutiu 等^[2]以 s-氨基半胱氨酸(AEC)选择经 EMS 诱变处理的拟南芥愈伤组织获得抗性突变体以来, 已先后得到积累游离氨基酸的水稻、烟草、胡萝卜、大麦、玉米、矮牵牛、长春花、笋笋等突变体^[3,4]。本文报道了应用籼稻花药培养, 筛选水稻赖氨酸含量高的愈伤组织并再生成株, 探讨其在水稻品质改良中应用潜力。

材料与方 法

(一) 水稻

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种为金早 4 号和 86-01。AEC 系 Sigma 公司产品, 赖氨酸 (Lys) 和苏氨酸 (Thr) 为国产分析纯。

(二) 抗性愈伤组织的诱导、选择与分化

选择小孢子单核中、晚期的水稻幼

穗, 用 75% 乙醇进行表面消毒并密封后。置于 4℃ 低温下预处理 10 天, 然后剥取幼穗浸入 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 10 分钟, 无菌水冲洗数次后, 接种于 L8^[5] + 0.5 mmol/L AEC (L8-A) 或 1.0 mmol/L Lys + 1.0 mmol/L Thr (L8-LT) 培养基上, 诱导产生抗性愈伤组织, 后转入 MS^[6] + 4.0 mg/L IAA + 2.0 mg/L KT (MS-D) 分化培养基, 诱导再生绿苗; 或经添加 0.5 mmol/L AEC (MS-A) 或 0.5 mmol/L AEC + 0.5 mmol/L Thr (MS-AT) 继代培养基^[7], 选择培养 25 天后再转入分化培养, 诱导绿苗再生。花药培养条件同参考文献 [5, 7]。再生绿苗长到 3—4 叶时, 经炼苗后移入盆钵栽培, 及时记载其生长发育情况, 并收获成熟种子。

(三) 再生个体抗性稳定性测定

将 R₁ 种子去壳后浸种 24 h, 用 0.1% HgCl₂ 消毒 15 min, 无菌水冲洗数次后, 切下成熟胚离体培养于添加 1.0 mmol/L AEC 的 MS + 2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L KT 培养基中, 每个变异株接种

本文于 1991 年 11 月 29 日收到。

福建省自然科学基金资助项目。

6瓶,每瓶5个外植体, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 黑暗条件下诱导愈伤组织形成, 30天后根据愈伤组织诱导率与增殖情况进行初选, 保留能够形成愈伤组织并能正常生长的变异体, 将余下的种子于1988年早春种植成 R_2 , 1989年早春种植 R_3 , 1990年早春种植 R_4 。每次每个株系60—100株, 成熟时随机取样10株进行考种, 3个月后按 GB 4801-84标准^[8]测定糙米游离赖氨酸和蛋白质含量, 并结合农艺性状进行选择。

结果与分析

(一) AEC筛选浓度的选择

将花药接种于含不同浓度AEC的诱导

培养基, 诱导抗性愈伤组织的形成。结果表明, 随培养基中所含AEC浓度的增加, 愈伤组织诱导率明显下降, 直至愈伤组织无法诱导产生。不同品种之间虽然临界浓度有所不同, 但有相同的变化趋势(表1), 0.5mmol/L AEC是进行金早4号与86-01两品种(系)抗性细胞突变体筛选的临界浓度。

(二) 抗性突变体的筛选

应用AEC为外源选择压力, 筛选抗性细胞突变体, 并与 Lys + Thr 筛选处理相比较。从结果可知, 86-01对AEC的反应较金早4号敏感, 在0.5mmol/L AEC选择压力下, 花药愈伤组织诱导率分别为0和0.07%。0.5 mmol/L AEC抑制花药

表1 AEC浓度对水稻花药培养愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effect of AEC concentration on callus induction rate in rice anther culture

Cultivar	Item	AEC conc. (mmol/L)							
		0	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
Jinza No.4	Number of anthers	1500	1350	1500	1500	1200	1350	1500	1350
	Number of calli	174	86	43	1	0	0	0	0
	Callus induction rate (%)	11.60	6.37	2.87	0.07	0	0	0	0
86-01	Number of anthers	1500	1500	1500	1350	1200	1500	1200	1350
	Number of calli	36	7	3	0	0	0	0	0
	Callus induction rate (%)	2.40	0.47	0.20	0	0	0	0	0

愈伤组织诱导形成的效果明显高于1.0 mmol/L Lys + 1.0 mmol/L Thr 处理。从含0.5mmol/L AEC培养基上诱导产生的愈伤组织, 外观呈淡黄色。结构致密, 绿苗分化率明显高于对照。在继代培养基中, 若同时加入0.5mmol/L AEC和0.5 mmol/L Thr, 其愈伤组织分化率达31.79%, 而单独添加0.5 mmol/L AEC的愈伤组织转分化培养3周后绝大多数变褐死亡, 余下的愈伤组织或丧失分化能力, 或产生白化苗。在诱导培养基中同时添加0.5mmol/L AEC和0.5mmol/L Thr (L8-AT), 愈伤组织诱导率也较单独添加0.5mmol/L AEC处理的高。

(三) 再生植株AEC抗性稳定性测定

从金早4号离体筛选的抗性愈伤组织中再生的253丛绿苗, 移栽成活208株, 成活率为82.21%。其中有178株表现不育(均为单倍体), 占85.58%, 30株结实正常, 占14.42%。这些正常结实的种子, 经氨基酸测定和离体胚愈伤组织抗性稳定性测定结果有10株糙米游离赖氨酸含量明显高于金早4号。入选率以L8-AT-MS-D(诱导培养基→分化培养基, 下同)处理的再生植株最高, 达38.89%, 其次是L8-AT-MS-D处理(28.57%), 而L8-A-MS-AT-MS-D(诱导培养基→继代培养基→分化培养基)处理的入选率最低

(8.33%)。

对 R_1 入选的10个单株进行跟踪考察, Lys 含量表现基本稳定(表2), 经 R_2 、

表 2 10个入选单株 R_2 、 R_3 和 R_4 的表现

Table 2 Performance of R_2 , R_3 and R_4 generation of 10 plants be selected

Plant name	Lysine content (%)		
	R_2	R_3	R_4
A-87336	0.37	0.34	—
A-87262	0.36	—	—
A-87337-2	0.37	0.37	—
A-87305	0.44	0.43	0.43
A-87306	0.35	0.31	—
A-87020-2	0.41	0.43	0.41
A-87021	0.36	—	—
A-87025-1	0.36	0.29	—
A-87394	0.35	0.33	—
A-87027-2	0.35	0.39	—
Jinzao No. 4(CK)	0.33	0.35	0.32

R_1 、 R_4 代系统观察与测定, 有 2 株表现较好, AEC 含量较高, 但 A-87020-2 农艺性状表现株间分离, 熟期较长, 谷粒明显短于金早 4 号。垩白较大; 而 A-87306 的

糙米游离赖氨酸含量高达 0.43%, 较对照增加 34.38%, 且产量较好, 基本上保持原品种米质好、早熟、矮秆的特性。用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定也表明, 突变体 A-87306 不仅其糙米赖氨酸含量比对照高 24.33%, 而且除苏氨酸与对照持平, 半胱氨酸较对照低外, 其余 14 种氨基酸含量均有不同程度的提高, 增加幅度为 9.06% (丙氨酸)—106.20% (组氨酸), 总游离氨基酸含量也较对照高 22.23%。

本研究结果与文献 [9, 10] 类似, 208 个 R_1 株仅 30 株正常结实, 获得 2 个赖氨酸含量高的株系。但只有部分愈伤组织的抗性能在再生植株的成熟种子中表达。作者认为这可以通过选择胚性愈伤组织通过增加继代选择次数, 逐步提高 AEC 的筛选浓度, 减少嵌合体出现比例, 但继代次数不宜太多, 以免筛选到的抗性愈伤组织丧失其绿苗再生能力。

参 考 文 献

- [1] Flick, C. E., Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, (eds. Evans, D.A. et al.), Macmillan Publ. Co., New York, pp.393—441, 1983.
- [2] Negrutiu, I. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 68:11—20, 1984.
- [3] 李宝健、曾庆平: 植物生物技术原理与方法。湖南科学技术出版社, 256—284, 1990.
- [4] 尹延海等: 植物学报, 32:79—82, 1990.
- [5] 卢 勤等: 福建农学院学报, 18:510—514, 1989.
- [6] Murashige, T., and Skoog, F., *Physiol. Plant.* 15:473—497, 1962.
- [7] 陈启铨等: 福建农学院学报, 18:476—483, 1989.
- [8] 国家标准局: 谷类籽粒赖氨酸测定法。中国标准出版社, 1984.
- [9] Chaleff, P.S. and Carlson, P.S., *Genetic Manipulations with Plant Material*, (ed. Ledoux, L.), Plenum Press, New York, pp.351—363, 1975.
- [10] Schaeffer, G.W. and Sharpe, F.T. Jr., *In Vitro*, 17:345—352, 1981.
- [11] 何卓培等: 植物生理学报, 6:213—219, 1980.
- [12] 罗士韦等: 中国科学B辑, (8):722—726, 1982.

Selection of Rice Mutants Resistant to Inhibition by s-(2-aminoethyl)-L-cystenine

Chen Zhang Zhu Xiuying Lu Qin Chen Qifeng

(Institute of Genetics and Crop Breeding, Fujian Agricultural College, Fuzhou 350002)

The highly lysine-containing rice mutants were selected using s-(2-aminoethyl)-l-cystenine (AEC) as the stress factor. AEC significantly inhibited the callus formation and growth from rice anther. The inhibition effect can be partially relieved by Thr. Under induction by 0.5 mmol/L AEC and screening by subculture AEC-resistant callus were selected and green rice plantlets were generated. Some of them are diploid fertile and AEC-resistant. A mutant, A-87306, with high lysine-content and high grain yield was obtained. Its brown rice contains 0.43% of lysine, and 34.38% more than control.

Key words s-(2-aminoethyl)-L-cystenine; mutant; *Oryza sativa* L.