

水稻高赖氨酸突变体离体筛选的初步研究

李朝灿*

徐洁

(福建省农科院稻麦所)

(福建省农科院中心化验室)

提要

以高浓度的赖氨酸、苏氨酸或色氨酸作为培养基添加物，对水稻体细胞和性细胞无性系进行离体筛选。获得一批耐高浓度氨基酸的抗性愈伤系并再生成绿色植株。据 T_1 代糙米氨基酸含量分析，9个突变体的17种氨基酸总量比原品种增加10.6~46.9%，7种必需氨基酸含量提高10.4~58.2%，其中赖氨酸提高7.8~42.3%。经主要农艺性状的变异系数分析，可育突变体在 T_1 ~ T_2 代性状就相对稳定。本文讨论了抗性突变体离体筛选在水稻优质育种中的应用潜力。

随着对外开放和人民生活水平的日益提高，优质育种已成为八十年代水稻育种的主攻方向之一。而现代水稻改良品种的蛋白质含量，特别是人体必需的赖氨酸含量一般都很低(1)，远远满足不了人类的需要。据报道(2, 3)，采用复合杂交、核技术、激光处理和化学诱变，已有改良稻米蛋白质和氨基酸含量的成功先例。但其育种周期较长，选择效率偏低。近年来，利用植物组织培养技术改良玉米、水稻、烟草、马铃薯和胡萝卜等作物的氨基酸含量已取得可喜进展(4, 5)。但目前尚未见有高蛋白、高赖氨酸的高产水稻品种在生产上大面积推广应用。本文报道利用细胞诱变离体筛选生物技术，获得9个水稻高赖氨酸突变体的初步研究结果。

材料和方法

供试材料包括粳稻品种公交11号、矮糯，籼稻品种桂朝2号、闽稻3号、闽稻17、红新1号等。体细胞无性系，由萌发后的种子幼芽下胚轴离体培养诱导产生愈伤组织，性细胞无性系则由花药(粉)培养诱导产生愈伤组织，并均需进行继代培养而建立。诱导和继代培养基均为N₆附加YE1000, LH500, 2, 4-D 2, KT1毫克/升, Suc 3%, Ag 0.9%, pH5.8。继代培养1~月后，对部分愈伤组织进行⁶⁰Coγ射线辐照，辐照剂量分0, 6, 8, 10kr，剂量率均为2kr/小时。

* 现调往泉州市科委工作。

承蒙稻麦所农业物理研究室辐照愈伤组织，特此致谢。

以N₆为基本培养基，分别附加0.5~4mM赖氨酸、色氨酸或苏氨酸作为外源胁迫因素，配制成筛选培养基。每个试管接种3块大小1毫米左右的愈伤组织。在筛选培养基上培养1个月，观察记载愈伤组织存活及生长情况。离体培养在筛选培养基上45~60天，挑取尚能缓慢生长的新鲜愈伤组织转入二次筛选培养基或分化培养基，历30天，统计绿苗和白苗分化率。愈伤组织的诱导、继代、筛选和分化培养，温度均控制28℃左右，每天光照8~10小时。

再生植株以单株移入温室或大田定植。成熟时，按单株收取T₁代种子，采用日立835—50型氨基酸自动分析仪分析糙米中17种氨基酸含量。

结果与分析

一、愈伤组织诱导与无性系的建立

萌发后的水稻种子幼芽在诱导培养基上培养7~10天，即在下胚轴部位产生淡黄色或淡白色的愈伤组织。花药离体培养25~30天，花药纵裂，肉眼可见形成花粉愈伤组织。愈伤组织产生后15~20天（大小1~2毫米）即转入继代培养，分别建立体细胞和性细胞无性系。在10个供试品种中，绝大多数品种的体细胞愈伤组织诱导率高达80%以上（表1）。其中以公交11号、Ⅱ培12、姬糯、闽稻17和闽稻3号的愈伤诱导率较高，而且生长速度快，愈伤质地好；而双桂1号和桂选18的愈伤诱导率较低，且愈伤质地差。

表1 不同品种种子体细胞愈伤组织诱导率比较

类 型	品 种	接 种 种 子 数	产 生 愈 伤 数	愈 伤 诱 导 率 (%)
粳 稻	公交11号	39	39	100.0
	姬 糯	34	31	96.4
	Ⅱ培12	39	39	100.0
	闽稻3号	149	144	96.6
	闽 稻 17	218	209	95.3
	桂朝2号	120	116	96.7
	桂 选 18	86	75	87.2
	红浙1号	216	182	84.3
籼 稻	双桂1号	74	60	81.1
	珍优1号	100	61	61.0

二、抗性筛选

以高浓度的赖氨酸、苏氨酸和色氨酸作为培养基添加物，进行愈伤组织离体筛选。绝大多数愈伤组织的生长受到不同程度的抑制，表现为变黑死亡、停滞不长或生长受抑制的愈伤百分率显著增高。但不同品种对不同氨基酸的反应有明显差异。⁶⁰Co γ-射线辐照增强了对愈伤组织生长的抑制效应。具体分述如下：

（一）不同浓度氨基酸对愈伤组织生长的影响 以姬糯体细胞无性系为材料，探索不同浓度氨基酸对愈伤组织生长的抑制效应。结果表明，在0.5~2mM范围内，赖氨酸随着浓度

的提高对愈伤组织生长的抑制效应明显增强。苏氨酸和色氨酸随浓度提高，对愈伤组织生长的抑制效应渐趋减弱。在同一浓度水准上，3种不同氨基酸对姬糯愈伤组织生长的抑制效应依次为色氨酸>苏氨酸>赖氨酸（表2）。

表2 不同浓度氨基酸对姬糯愈伤组织生长的影响

氨基酸浓度 (mM)	接种愈伤数	变黑愈伤组织		生长受抑制愈伤组织	
		个数	%	个数	%
对照(CK)	30	0	0.0	0	0.0
赖氨酸	0.5	36	0	31	86.1
	1	39	0	17	43.6
	2	39	0	36	92.3
苏氨酸	0.5	36	0	31	86.1
	1	39	7	26	66.7
	2	39	13	9	23.1
色氨酸	0.5	39	6	23	59.0
	1	39	15	20	51.3
	2	39	35	4	11.4

（二）不同品种的差异 比较了HP12等8个不同品种对高浓度(4mM)赖氨酸的反应，结果差异极其显著（表3）。在4mM赖氨酸的浓度下，HP12所有的愈伤组织均停滞不长；闽稻3号、闽稻17、公交11号和桂朝2号半数以上的愈伤组织生长受到明显抑制；而红新1号、双桂1号和姬糯等3个品种对高浓度的赖氨酸反应较不敏感，多数愈伤组织尚能继

表3 不同品种对赖氨酸(4mM)反应的差异

品 种	接种愈伤数	变黑及生长受抑愈伤组织	
		个数	%
HP12 S.C.	76	76	100.0
闽稻3号 S.C.	137	109	79.9
闽稻17 S.C.	80	62	77.5
桂朝2号 S.C.	52	30	57.7
红新1号 S.C.	80	24	30.0
双桂1号 S.C.	60	13	21.7
公交11号 S.C. P.C.	57	39	68.4
	30	26	86.7
姬 糯 S.C. P.C.	75	37	49.3
	75	26	34.7

S.C. 体细胞无性系 P.C. 花粉性细胞无性系

续生长。应该指出，在公交11号和姬糯这两个品种中，体细胞与性细胞无性系对赖氨酸的反应也是不同的，表现在变黑死亡或生长受抑制愈伤组织比率存在一定差异（表3）。

（三） γ -射线辐照对抗性筛选的影响 利用 ^{60}Co γ -射线，对红新1号等3个水稻品种体细胞愈伤组织无性系进行辐照。结果如表4所示， γ -射线辐照加上附加高浓度的氨基酸，使愈伤组织生长受到明显的抑制。其中以红新1号最为敏感，当辐照剂量达到6kr时，生长受抑愈伤率高达78.8~100.0%，其次是闽稻3号，当辐照剂量达到8kr时，多数处理的受抑愈伤率达到60%以上。

表4 γ -射线辐照对愈伤组织生长的影响

处 理	红 新 1 号			闽 稻 3 号		
	转移愈伤数	生长受抑愈伤组织		转移愈伤数	生长受抑愈伤组织	
	个 数	%		个 数	%	
0Kr-1	76	0	0.0	30	0	0.0
	80	2	2.5	80	9	11.3
	80	0	0.0	80	23	28.8
	80	24	30.0	80	60	75.0
6Kr-1	80	30	37.5	80	38	47.5
	80	63	78.8	76	28	36.8
	80	80	100.0	80	28	35.0
	76	76	100.0	76	76	100.0
8Kr-1	72	50	69.4	52	36	69.2
	76	44	57.9	80	53	66.3
	80	80	100.0	80	68	85.0
	76	76	100.0	76	76	100.0
10Kr-1	80	47	58.8	76	59	77.6
	80	64	80.0	76	51	67.1
	76	76	100.0	76	64	84.2
	80	80	100.0	76	76	100.0

* 1 = ck, 2 = 苏氨酸, 3 = 色氨酸, 4 = 赖氨酸

三、植株再生

将经过40~60天离体筛选尚能缓慢生长的抗性愈伤系转入分化培养，10~15天左右即可陆续再生出绿色植株。目前已获得公交11号、姬糯、闽稻3号、闽稻17、红新1号、桂朝2号和HP12等7个品种505个抗性愈伤系的再生植株。其中以红新1号的绿苗再生力最强（15.0~45.0%），闽稻17次之，而双桂1号则未能再生成苗（表5）。

在本研究中，绝大多数再生植株为绿色植株，但有5个品种的12个愈伤系出现白化苗。这些白化苗主要来自苏氨酸的抗性愈伤系，特别是花粉性细胞无性系。另一方面，就红新1号、闽稻17和闽稻3号这三个供试品种的绿苗分化力来看，在6~10kr范围内， γ -射线辐

表 5

不同品种抗性愈伤系的绿苗分化力比较

品 种	对 照 CK		苏 氨 酸		色 氨 酸		赖 氨 酸		
	转 移	绿苗愈伤组织	转 移	绿苗愈伤组织	转 移	绿苗愈伤组织	转 移	绿苗愈伤组织	
	愈伤数	个	%	愈伤数	个	%	愈伤数	个	%
红新 1 号	80	13	16.3	80	36	45.0	80	12	15.0
闽 稻 17	136	2	1.5	136	2	1.5	136	13	9.6
闽稻 3 号	60	2	3.3	60	1	1.7	60	0	0.0
桂朝 2 号	56	1	1.8	60	0	0.0	60	3	5.0
公交 11 号	114	2	1.8	174	2	1.1	153	0	0.0
姬 蕺	42	5	11.9	78	0	0.0	69	1	1.4
双桂 1 号	60	0	0.0	60	0	0.0	60	0	0.0

照对抗性愈伤系的绿苗再生没有显著影响。但应该指出，随着继代时间及筛选次数的延长，公交 11 号和姬蘖抗性愈伤系的绿苗分化力显著下降；特别是花粉性细胞无性系，经过二次筛选后（75天），两个品种均丧失了绿苗分化力。

根据中国科学院遗传所⁽⁶⁾关于水稻花粉植株倍数性的外部形态特征和结实情况，调查红新 1 号、公交 11 号、闽稻 3 号、闽稻 17 和桂朝 2 号等 5 个品种 255 个体细胞抗性愈伤系再生植株的倍数性，结果全部为二倍体。但在公交 11 号的 2 个花粉性细胞抗性愈伤系的再生植株中，就有 1 个愈伤系出现单倍体和自然加倍二倍体的混倍现象。

四、氨基酸含量分析

对桂朝 2 号、公交 11 号、闽稻 3 号和红新 1 号等 4 个品种 23 个抗性愈伤系再生植株 T₁ 代种子，进行糙米氨基酸含量分析，结果有 9 个突变体的 17 种氨基酸总量比原品种增加 10.6%~46.9%，7 种必需氨基酸含量提高 10.4~58.2%，其中赖氨酸提高 7.8~42.3%（参见表 6）。

从上述 4 个品种 23 个抗性愈伤系 T₁ 代的分析结果来看，将近 40% 的突变体的 17 种氨基酸总量比原品种显著增加，但不同品种之间差异极大。其中以桂朝 2 号和公交 11 号的诱变筛选效果最好，6 个突变体的 17 种氨基酸含量均显著增加；闽稻 3 号次之；而红新 1 号较差，15 个抗性愈伤系 T₁ 代中，只有 2 个突变体的 17 种氨基酸总量比原品种显著增加（表 7）。

五、主要农艺性状观察

对公交 11 号 2 个高氨基酸突变体 T₁~T₂ 代进行田间农艺性状观察和取样留种。经变异系数分析，发现 1 个突变体（GRK）T₁ 代株间表现整齐一致，T₂ 代则保持相对稳定不变（表 8）。而另一个突变体 GRT 在 T₁ 代出现株高、熟期、育性和粒形等性状的明显分离。但经过一次选择后，T₁ 代可育株在 T₂ 代性状就相对稳定，而高不育株仍然出现育性和粒形的分离。

表6

T₁代糙米氨基酸含量分析

氨基酸种类	桂朝2号		桂K-2		桂W-2		公交11号		GRT		GRK	
	(CK) 含量(%)	含 量 (%)	比CK ±%	含 量 (%)	比CK ±%	(CK) 含量(%)	含 量 (%)	比CK ±%	含 量 (%)	比CK ±%	含 量 (%)	比CK ±%
赖氨酸	0.3802	0.5410	+42.3	0.5163	+35.8	0.3747	0.5246	+40.0	0.4461	+19.1		
苏氨酸	0.3638	0.4713	+29.5	0.4934	+35.6	0.3621	0.4411	+21.8	0.4879	+34.7		
甲硫氨酸	0.3352	0.4402	+31.3	0.5222	+55.8	0.2365	0.3077	+30.1	0.2831	+19.7		
苯丙氨酸	0.4957	0.8309	+67.6	0.7966	+60.7	0.6072	0.7903	+30.2	0.9252	+52.4		
亮氨酸	0.8480	1.2142	+43.2	1.1983	+41.3	0.8409	0.9552	+13.6	1.1371	+35.2		
异亮氨酸	0.4428	0.6404	+44.6	0.6580	+48.6	0.4330	0.4921	+13.6	0.6317	+45.9		
缬氨酸+胱氨酸	0.4774	0.9104	+90.7	0.8958	+87.6	0.9009	1.3436	+49.1	1.4918	+65.6		
小计	3.3431	5.0484	+51.0	5.0806	+52.0	3.7553	4.8546	+29.3	5.4029	+43.9		
组氨酸	0.2245	0.3066	+36.6	0.3016	+34.3	0.1144	0.6904	+503.5	0.2614	+128.5		
精氨酸	0.8148	1.1329	+39.0	1.4161	+73.8	0.9463	0.9980	+5.5	1.1622	+22.8		
甘氨酸	0.4566	0.6049	+32.5	0.6239	+37.7	0.5093	0.5110	+0.3	0.5677	+11.5		
酪氨酸	0.5186	0.8300	+60.0	0.7973	+53.7	0.5325	0.7036	+32.1	0.8489	+59.4		
谷氨酸	1.7847	2.4388	+36.7	2.4788	+38.9	1.7056	2.1540	+26.3	2.3688	+38.9		
丙氨酸	0.6498	0.8635	+32.9	0.8871	+36.5	0.7326	0.6950	-5.13	0.7786	+6.3		
丝氨酸	0.4745	0.6471	+36.4	0.6451	+36.0	0.5235	0.6155	+17.6	0.6710	+28.2		
脯氨酸	0.4093	0.5577	+36.3	0.5525	+35.0	0.1343	0.9037	+572.9	0.5490	+308.8		
天门冬氨酸	0.8699	1.2618	+45.1	1.2330	+41.7	0.9274	1.0341	+11.5	1.1238	+21.2		
17种氨基酸总量	9.5458	13.6917	+43.4	14.0210	+46.9	9.8812	13.1599	+33.2	13.7343	+39.0		

表7

T₁代糙米氨基酸含量分析

品 种	分 析 愈 伤 组 总 数	17种氨基酸总量显著增加的突变体	
		个 数	%
桂朝2号	4	4	100.0
公交11号	2	2	100.0
闽稻3号	2	1	50.0
红新1号	15	2	13.3
合 计	23	9	39.1

讨 论

已知氨基酸的生物合成是受末端产物的反馈抑制所调控的。通过离体筛选对末端反馈抑制钝感的抗性细胞系，继而获得个体内相应氨基酸累积显著增加的高氨基酸突变体是可能的⁽⁵⁾。本研究以高浓度的氨基酸作为外源胁迫因素，在愈伤组织细胞水平上进行体细胞和性细胞无性系的离体筛选，半年左右时间即可获得耐高浓度氨基酸的抗性愈伤系，并再生成

8

T₁~T₂代主要农艺性状比较

世代	原品种 及其突变体	株高(厘米)			有效穗(个/株)			穗粒数			结实率(%)			千粒重(克)		
		\bar{X}	S	C.V. (%)	X	S	C.V. (%)	X	S	C.V. (%)	X	S	C.V. (%)	\bar{X}	S	C.V. (%)
T ₁	公交11号 CK	109.0	3.6	3.3	5.3	0.6	10.8	109.6	14.4	13.1	78.2	7.5	9.6	35.6	2.1	4.5
	GRK	94.0	2.7	2.9	12.4	3.3	26.5	94.6	21.9	23.1	80.2	6.6	8.2	36.2	0.8	2.2
T ₂	公交11号 CK	85.6	4.6	5.3	7.0	1.6	22.6	61.5	19.1	31.1	81.5	3.7	4.5	37.4	0.3	0.7
	GRK	77.8	5.2	6.7	6.6	1.3	20.3	70.5	7.9	11.3	82.9	3.5	4.2	37.3	1.3	3.4
	GRT	78.5	2.9	3.7	7.5	1.3	17.2	66.3	3.7	5.6	80.1	7.2	9.0	36.2	0.4	1.1

绿色植株。据 T₁代糙米的氨基酸含量分析，将近40%的突变体的17种氨基酸总量比原品种显著增加，特别是赖氨酸提高7.8~42.3%。虽然其 T₂代种子的氨基酸含量尚有待于进一步测定，但从 Hibberd等(1982)和 Schaeffer等(1983)获得可遗传的玉米和水稻高氨基酸突变体⁽⁵⁾来看，离体筛选所得高氨基酸突变体，有可能通过有性过程保持这一遗传变异。

应该指出，在本研究所得9个 T₁代高氨基酸突变体中，桂朝2号和公交11号等6个突变体，是未经辐射诱变而直接来源于组织培养本身的变异。许多文献^(5, 7, 8, 9, 10)曾报道，组织培养本身可以自主地诱发水稻植株形态、叶绿素缺失、株高、抽穗期、结实率和倍数性等多种变异；特别是处于去分化状态的愈伤组织本身，可能就是体细胞无性系发生变异的主要原因。最近，大野清春⁽⁸⁾指出，对水稻二倍体的种子愈伤组织的研究表明，基因突变是经常发生的；其中大约72%的再生植株带有突变性状。这就为抗性突变体离体筛选提供了丰富的变异来源和潜在的选择基础。大野清春⁽⁷⁾还认为，离体培养中体细胞的这种反复突变与慢性辐照的效应相仿，这就可能使得细胞群朝着特定的表型和基因型漂变，并应用于实际的育种工作。

另外值得指出，与公交11号原品种比较，GRK和GRT这两个农艺性状相对稳定的高氨基酸突变体，除了株高有所下降之外，其产量性状如有效穗、穗粒数、结实率和千粒重则无明显差异（参见表8）。这就说明，采用细胞诱变离体筛选生物技术，有可能在保持原品种产量水平的基础上，获得高氨基酸突变体。这对于开拓水稻高蛋白、高赖氨酸突变体试管育种新途径具有重要意义。

主要参考文献

1. Datta, 1981. Principles and practices of Rice production. U. S. A.
2. 林兆松等, 1984, 核技术改良稻米氨基酸的研究。原子能农业应用 4: 14~19。
3. 刘永胜, 1985, 水稻科技资料(四川) 1: 12~14。
4. 李朝灿, 1985, 国外农业生物工程研究进展。国外农业科技 11: 5~9。
5. 郑康乐, 1985, 水稻体细胞无性系变异和抗性细胞突变体筛选的研究进展。国外农学——水稻 1: 1~5。

6. 中国科学院遗传所三室, 1976, 水稻花粉植株的遗传学研究。遗传学报 3(4): 277~284。
7. 大野清春著(1983), 郑康乐译, 1985, 水稻细胞培养再生植株的遗传变异。国外农学——水稻 2: 11~14。
8. 大野清春著(1985), 孙宗修译, 1986, 组织培养用于水稻改良。国外农学——水稻 1: 7~10。
9. 张英南等, 1984, 栽培稻体细胞无性系及其后代的性状与染色体变异。中国农业科学 4: 14~19。
10. 赵成章等, 1984, 水稻体细胞组织培养在品种改良上的应用。中国农业科学 5: 35~39。

A PRIMARY STUDY ON SCREENING HIGH LYSINE MUTANT OF RICE IN VITRO

Li Chaocan

(Rice & Wheat Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences)

Xu Jie

(Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences)

ABSTRACT

The seed-derived calli and microspore-derived calli of rice were cultured on the medium supplemented with high concentration of lysine, threonine or tryptophane for screening in vitro. Some resistants to high concentration of amino acid calli were isolated and then regenerated into green plants. By analysing the amino acid contents of brown rice in T₁ generation, the total amount of 17 kinds of amino acid in 9 mutants was increased by 10.6~46.9%, the amount of Lys, Thr, Met, Phe, Leu, Ileu and Val plus Cys was increased by 10.4~58.2%, among them, the contents of lysine was increased by 7.8~42.3%. With counting the C. V. of main agronomic traits, the fertile mutants in T₁~T₂ were stable. The possible potential of screening resistant mutants in vitro used for rice quality breeding was discussed.