

# 普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 花药培养研究

## I. 提高花粉愈伤组织诱导率和绿苗分化率的研究

庞汉华

(中国农业科学院品种资源研究所)

舒理慧

(武汉大学生物系)

吴妙燊

(广西农业科学院品种资源研究所)

孙恢鸿

(广西农业科学院植物保护研究所)

### 提 要

对79份采自广西不同地理环境的不同类型的普通野生稻进行了花药培养研究,发现不同类型材料的花培力有较大的差异,有41个编号的材料得到花粉绿苗。试验结果表明:孕穗期施复合肥料不仅提高了供体植株的营养水平,而且也明显地提高了花粉愈伤组织诱导频率。接种前稻穗用6—8℃低温预处理8—12天,愈伤组织诱导率和绿苗分化率可提高1—2倍。应用改良N6培养基和适时转移愈伤组织都有明显提高花培效率的作用。

**关键词** 花药培养, 愈伤组织, 绿苗, 诱导率, 分化率, 培养基

野生稻是水稻遗传育种工作的宝贵物质资源,在研究稻种起源、演化、分类以及分离和重组特异基因的基因工程工作中,野生稻可以起到不可代替的作用。长期以来,由于分布环境及柱头外露自然杂交率高生态生物因素,使野生稻种内类型分化复杂和杂合现象十分普遍。在利用野生稻的工作中,分离和纯化各种类型,使其特有性状得以稳定表现,就显得十分重要。通过单倍体途径然后使之纯合的花药培养技术有很高的应用价值,但在稻属的花药培养研究中,野生稻的工作比较少,大野清春<sup>[14]</sup>、Wakasa<sup>[18]</sup>等及Wu等<sup>[20]</sup>作过多年生野生稻(*Oryza perennis*)的花培实验,得到花粉植株,但诱导率很低。蔡得田对包括普通野生稻的6个野生稻种的8种类型进行过花培研究,从4个种的6种类型上得到花粉植株,但几乎全部是无利用价值的白化苗<sup>[13]</sup>。我们试图通过花药培养技术纯化野生稻,并从中筛选出抗逆性强、适应性广、米质优良的特异基因纯合体。自1983年以来进行了为提高普通野生稻花培诱导效率的系统研究,整理如下。

### 材 料 与 方 法

供试材料为普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.),系广西地区采集的、经过整理、鉴

参加部分工作的还有李植良、张希宁、章志宏、陈碧林、陈成斌、李道远、林登豪、王福新、陈永惠等。

定和评价的不同地理环境、不同类型的普通野生稻，共 79 个编号。

试验材料分别于北京、武汉、南宁 3 个试验点上进行种植和花药培养。

花药培养按水稻花培的方法进行，即选用花粉发育时期为单核靠边期的花药进行培养，稻穗采集后连同包裹的剑叶用湿纱布包扎，再用塑料袋包好，经低温预处理一定时间后，剥出幼穗，经 0.1% 升汞或 5% 次氯酸钠消毒 5—10 分钟，用无菌水冲洗 4—6 遍，然后在超净台中剥取花药接种于培养基上。

为确定低温预处理的作用，稻穗在冰箱中，经 6—10℃ 分别处理 1—20 天。

为探测供体植株的营养状况对花药培养的影响，用施肥方法，按不施肥、施尿素 10 公斤/亩和施复合肥 40 公斤/亩的方式，分别统计花培的效果。

花药培养的基本培养基选用 N6<sup>[3]</sup>、L8，通用<sup>[12]</sup>、Miller<sup>[16]</sup> 及改良 N6 5 种培养基，及在这些培养基基础上的无机盐与有机成分的某些相互组合，改良 N6 的成分为 N6 培养基的无机盐和 MS<sup>[17]</sup> 培养基的有机物结合，并提高其中甘氨酸的含量为 4 毫克/升，加用丙氨酸 2 毫克/升。诱导花粉愈伤组织时，培养其中加 2 毫克/升 2,4-D，分化植株时，培养基中的激素配比，以 IAA 和 NAA 等含量合用，按 0.1、0.2、0.5 及 2 毫克/升的不同浓度分别配比 0.5、1、2、4 毫克/升的 6-BA。所有培养基均用 0.8% 的琼脂加以固化。培养温度为 25—30℃，培养花药时采用暗培养，诱导愈伤组织分化时，采用昼夜间歇光照，每日光照 14 小时，光强为 2—4 千勒克斯。

在本试验中，愈伤组织诱导率按诱导出的愈伤组织数占总接种花药的百分数来计算，绿苗分化率为分化绿苗的愈伤组织数占总接种愈伤组织的百分数。

## 结果与讨论

### 一、花药培养效果的材料差异

在水稻花药培养研究上，由花粉愈伤组织诱导频率及最终体现在绿苗获得率的花培力，不同培养材料间的遗传差异已有很多的报告<sup>[4,7,9,6]</sup>，在本文试验的 79 个编号的普通野生稻中，获得绿苗编号 41 个，占总编号数 51.9%，有 69 个编号得到花粉愈伤组织，占全体接种编号的 87.3%。反映了培养结果上的很大材料差异。如图 1、2 所示，花粉愈伤组织的诱导频率范围为 0—11.13%，平均诱导率为 3.8%，多数材料的花粉愈伤组织诱导频率在 1—5% 范围之间。而绿苗的分化率为 0—36.36%，平均分化率为 4.95%，多数材料绿苗分化率在 4—20% 范围之间。但存在很高的白苗分化率，平均达 54.34%。上述结果反映了供体的基因型差异，但低的花粉愈伤组织诱导频率和高白苗分化率的总体培养结

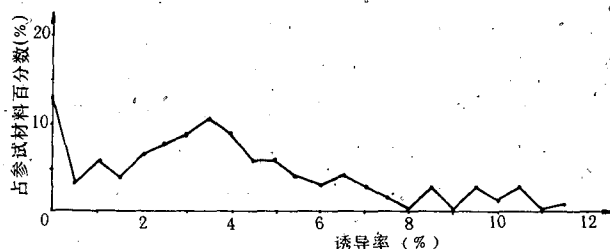


图 1 全部参试材料花粉愈伤组织诱导率分布图

Fig. 1 Distribution of induction rates of pollen callus of all materials tested

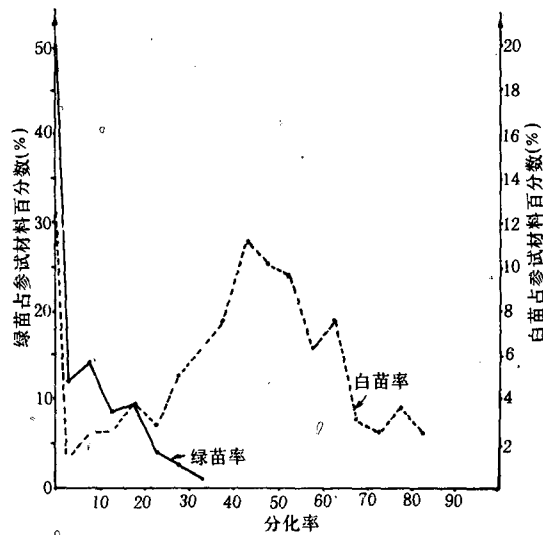


图2 全部参试材料绿苗和白苗分化率分布图

Fig. 2 Distribution of differentiation rates of green & albino plantlets of all materials tested

果和大野清春<sup>[14]</sup>、Wakasa等<sup>[18]</sup>及蔡得田<sup>[13]</sup>所得的结果是相似的,只是他们用的试验材料只有一个或几个远没有我们用的材料多而已。在本试验中我们得到了一批能获得愈伤组织和绿苗的普通野生稻编号,其中编号20号、9号、7号和14号具有较好的培养效率,它们的愈伤组织诱导率分别是11.13%、7.68%、5.69%和3.61%,绿苗分化率是26.8%、6.04%、22.81%和15.63%。9号编号的愈伤组织诱导频率虽高,但绿苗分化率却很低(1.04%),但有些材料,愈伤组织诱导率虽低,但却有很高的绿苗分化率,如编号15号的愈伤组织诱导率是1.5%,其绿苗分化率却高达36.36%。普通野生稻花粉白苗率很高的现象,这与禾本科花培中出现的高白化苗现象有共同性<sup>[1]</sup>,只是比栽培稻更高得多,其原因有待进一步研究。

## 二、提高愈伤组织诱导率和绿苗分化率的研究

几年的实验表明,普通野生稻花药培养的愈伤组织诱导率和绿苗分化率的高低除与供体的遗传基因型有关外,供体的营养状况,培养基成分,低温预处理花药,愈伤组织的转移时间和大小等有一定的关系<sup>[5]</sup>。

### 1. 供体植株营养状况对愈伤组织诱导和绿苗分化的影响

早在1976年Dunwell就报道,影响供体生理状况的环境和发育因素,对烟草花粉胚胎的诱导有明显的影响<sup>[15]</sup>,黄德珮等报告,通过施用硫酸铵,提高供体的N素营养水平,有规律地提高了2个水稻品种花粉愈伤组织诱导和绿苗分化的频率<sup>[11]</sup>。

我们的实验表明,普通野生稻的各材料在拔节后孕穗前施足肥料(每亩按40公斤复合肥、10公斤尿素),花粉愈伤组织和绿苗的分化率都有明显的提高。施肥是以施复合肥的效果较好,施尿素的次之。编号4、35、20号经施复合肥,愈伤组织诱导率分别是12.06%、10.35%、11.23%,绿苗分化率分别是30.10%、22.68%、25.51%;施尿素的愈伤组织诱导率分别是7.60%、7.57%、7.01%,绿苗分化率分别为25.00%、20.00%、21.54%;不施肥的愈伤组织诱导率分别只有5.78%、5.05%、5.14%,绿苗分化率分别

只有 20.64%、16.67%、17.18%。其中编号 2 经几年的培养从未获得过绿苗，而采取了拔节后施复合肥的措施后，就获得了绿苗(见表 1)。这可能是复合肥具有植株所需要的多种元素，有助于形成愈伤组织和分化绿苗。

表 1 施肥对供体植株诱导率和分化率的影响

Table 1 Effects of Fertilization on the induction and differentiation rates of the donors

项目 Item	不施肥(对照) No fertilizer (CK)			施尿素(10公斤/亩) Urea (10kg/mu)			施复合肥(40公斤/亩) Complex fertilizer (40kg/mu)		
	花药数 No. of anthers inoculated	愈伤组织 诱导率 % Induction rate of callus	绿苗分 化率 % Differentiation frequency of green plantlet	花药数 No. of anthers inoculated	愈伤组织 诱导率 % Induction rate of callus	绿苗分 化率 % Differentiation frequency of green plantlet	花药数 No. of anthers inoculated	愈伤组织 诱导率 % Induction rate of callus	绿苗分 化率 % Differentiation frequency of green plantlet
4	986	5.78	20.64	895	7.60	25.00	854	12.06	30.10
20	875	5.14	17.18	927	7.01	21.54	873	11.23	25.51
2	845	1.18	0	925	1.84	0	856	4.21	19.44
35	832	5.05	16.67	793	7.57	20.00	937	10.35	22.68

[注] 表中数字是87、88年实验结果的平均数

Note: The figures in the table are the means of experimental data obtained in 1987—1988

## 2. 低温预处理的作用

低温预处理对提高水稻花粉诱导的作用已有肯定的工作报告<sup>[7,2,10]</sup>，我们通过几年的实验观察，看到各编号材料经低温处理后，花粉愈伤组织诱导率和绿苗分化率都有不同程度的提高，但处理的时间、温度不同，其效果也不同。如图 3 所示，在 8℃ 时，8—12 天的处理，获得较好的花粉愈伤组织诱导效果，而处理 3—5 天变化不明显，14 天以后就显示递减，如图 4 所示，经低温 6、8、10℃ 处理 10 天，诱导率和分化率都比对照高，而

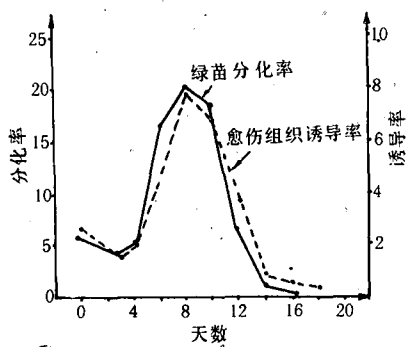


图 3 8℃ 处理不同天数、诱导率和分化率的变化

Fig. 3 Induction &amp; differentiation rates in treatments at 8°C for different number of days

注：16个编号材料的平均数

Note: The mean of 16 numbered materials

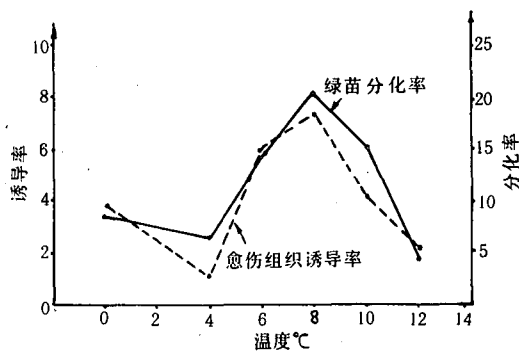


图 4 不同低温处理10天，诱导率和分化率的变化

Fig. 4 Induction &amp; differentiation rates of callus treated for 10 days at different low temperatures

注：18个编号材料的平均数

Note: The mean of 18 numbered materials

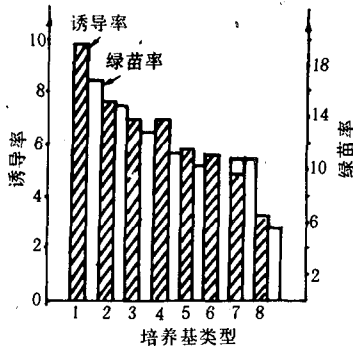


图5 16个编号材料在各培养基上的效应  
Fig.5 Effect of different materials on 16 numbered materials

注: ① 培养基类型

Notes: types of medium

1. N6 无机盐+MS 有机物(甘氨酸 4 毫克 / 升+ 丙氨酸 2 毫克 / 升+ 6-BA 0.5 毫克 / 升)
1. Inorganic salt in N6 medium + organic materials in MS medium (Glycine 4mg / l+ Alanine 2 mg / l+ 6-BA 0.5 mg / l)
2. N6 无机盐 + MS 有机物
2. Inorganic salt in N6 medium + organic materials in MS medium
3. N6 培养基
3. N6 medium
4. 通用无机盐 + MS 有机物
4. Inorganic salt in common medium + organic materials in MS medium
5. 通用培养基
5. Common medium
6. L8 无机盐 + MS 有机物
6. Inorganic salt in L8 medium + organic materials in MS medium
7. L8 培养基
7. L8 medium
8. Miller's 培养基
8. Miller's medium

② 所有培养基的 2,4-D 为 2 毫克 / 升  
Concentration of 2,4-D in all medium types was 2 mg / l

③ 16 个编号材料诱导率和分化率的平均数  
The means of induction rates and differentiation rates of 16 numbered materials

伤组织过小转移, 不仅操作难, 也不易成活; 若愈伤组织过大, 超过 30 天或超过 5 毫米再转移则易老化且易丧失分化能力, 绿苗分化率越来越低, 甚至没有绿苗分化。由此可见及时转移愈伤组织也是获得绿苗的有效措施。

促进诱导率和分化率的因素是多方面的, 必须注意多方面因子的综合培养技术, 才有可能大幅度提高其频率。

其他温度的诱导率和分化率都不理想且比对照低。因此低温  $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  处理 8—12 天是普通野生稻花培低温预处理比较适宜的温度和时间。值得注意的是, 花药的低温预处理, 还能影响由其产生的花粉愈伤组织的绿苗分化效率, 如图 3、4 所示, 花粉愈伤组织的诱导率和绿苗分化率是一致的, 具有同样的曲线趋势, 这表明低温预处理对花粉愈伤组织的质量, 并体现在绿苗分化上亦有影响。可以把低温预处理确定为提高普通野生稻花培效率的一项有效措施。

### 3. 培养基的筛选

从 1983 年以来, 我们曾以 N6、L8、通用、Miller 及 MS 等培养基为基础, 设计和试验过 20 多个培养基, 经多次反复试验, 发现以改良 N6 培养基为适用培养基, 这个培养基是 N6 培养基的无机盐, 加上 MS 培养基的有机物, 提高甘氨酸至 4 毫克 / 升, 并加丙氨酸 2 毫克 / 升和水解酪朊 400 毫克 / 升, 6-BA 0.5 毫克 / 升。我们发现在相同的激素条件下, 不同编号材料的培养效果(诱导或分化)在不同基本培养基上的反应趋势大体是一致的。图 5 综合了 16 个材料在不同基本培养基上的花粉愈伤组织诱导率和绿苗分化率的表现, 可以看出改良 N6 和 N6 的具有较好的培养效果。值得指出的是, 和一般禾本科植物的花药培养一样, 诱导花粉愈伤组织所需激素浓度大致以 2 毫克 / 升 2,4-D 为宜, 但愈伤组织分化绿苗时, 不同配比的激素状况有较大的反应差异, 在我们的试验中, 如图 6 所示, 用等量 0.5 毫克 / 升的 IAA 和 NAA 加 2 毫克 / 升的 6-BA 有较好的绿苗分化效果, 在四个同时供试的材料上反应是一致的。

### 4. 愈伤组织转移时期与绿苗分化率的关系

从实验结果看, 转移愈伤组织到分化培养基, 应掌握在用肉眼看见愈伤组织后 10 天之内(直径 2—3 毫米), 这时的愈伤组织幼嫩, 分生组织多, 细胞分裂强, 转移到分化培养基上分化快, 绿苗分化率也高(详见表 2), 愈

表2 愈伤组织转移时期与绿苗分化的关系

Table Relationship between the timing of callus transfer and green plantlet differentiation

转移时期 Timing	绿苗分化 Differentiation of green seedling	材料编号 No. of material							
		4	7	9	10	14	18	20	22
10天内转移 Transferring within 10 days	愈伤组织块数 No. of callus	47	44	46	48	38	42	35	54
	绿苗分化率 % Differentiation rates %	25.53	26.00	19.57	14.58	15.28	19.05	11.43	14.81
15—30天转移 Transferring 15—30 days	愈伤组织块数 No. of callus	42	25	27	24	34	28	31	41
	绿苗分化率 % Differentiation rates %	4.76	4.00	7.41	4.17	8.82	7.14	3.23	2.44
30天以上转移 Transferring after 30 days	愈伤组织块数 No. of callus	46	32	26	21	18	27	22	23
	绿苗分化率 % Differentiation rates %	1.17	0	0	0	0	0	0	0

注：表中数字是85、86年实验结果平均数

Note: Figures in the table are the means of experimental data obtained in 1985—1986

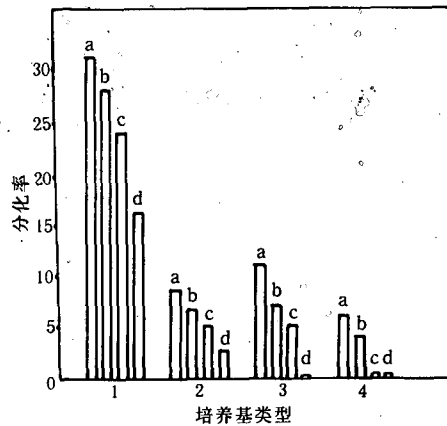


图6 生长素激素对绿苗分化率的影响

Fig.6 Effects of auxin &amp; hormone on the differentiation rates of green plantlets

培养基类型 Medium types

1. Ms+IAA0.5+NAA0.5+6-BA<sub>2</sub>      2. Ms+IAA2+NAA2+6-BA<sub>4</sub>

3. Ms+IAA0.2+NAA0.2+6-BA<sub>1</sub>      4. Ms+IAA0.1+NAA0.1+6-BA<sub>0.5</sub>

材料 Materials

a. 编号4 NO.4    b. 编号20 NO.20    c. 编号16 NO.16    d. 编号19 NO.19

此外，有些编号如编号35，在3个试点(北京、武昌、南宁)均能培养出绿苗，而有些编号，如编号1、2、11、12等在北京比在南宁易出绿苗，有些编号在北京试点能出绿苗，

而在南宁、武昌不能出绿苗。再以总体来看，武昌和南宁试点的绿苗分化率不够高，有时同样的一个编号，采用相同的培养基和培养条件，北京试点总比南宁、武昌试点绿苗分化率高，这是否与接种材料生长期、取稻穗培养期的温、光、湿等生态因子有关，有待今后进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] 王敬驹等, 1977, 花药培养学术讨论会文集, 科学出版社, 141—150.
- [2] 王敬驹等, 1974, 植物学报, 16(1), 43—52.
- [3] 朱至清等, 1975, 中国科学, (5) 489—490.
- [4] 孙天恩等, 1978, 花药培养学术讨论会文集, 科学出版社, 245.
- [5] 庞汉华, 1989, 作物品种资源, (1), 6—8.
- [6] 吴传银等, 1987, 遗传学报, 14(3), 168—174.
- [7] 陈英等, 1974, 中国科学, (1), 40—51.
- [8] 陈英等, 1981, 遗传学报, 8(2), 158—163.
- [9] 周朴华等, 1978, 花药培养学术讨论会文集, 科学出版社, 北京, 243.
- [10] 胡忠等, 1978, 花药培养学术讨论会文集, 科学出版社, 北京, 93—98.
- [11] 黄德璋等, 1985, 上海农学院学报, 3(1), 43—48.
- [12] 扬学荣等, 1980, 植物生理学报, 6(1), 67—73.
- [13] 蔡得田, 1984, 华中农学院学报, 3(1), 1—6.
- [14] 大野清春, 1975, 农技研报, D26, 139—222.
- [15] Dunwell, J.M. 1976, *Env. Exp. Bot.* 16, 109—118.
- [16] Miller, C.O., 1965, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 1052.
- [17] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, *Physiol. plant.*, 15, 473—479.
- [18] Wakasa, K., & Y. watanabe, 1979, *Jap. J. Breed.* 29, 146—150.
- [19] Woo, S.C., Mok, T., & C. Y. Huang, 1978, *Bot. Bull. Acad. Sinica*, 19, 171—178.
- [20] Wu, L. & Y. T. Kiang, 1979, *Bot. Bull. Acad. Sinica*, 20, 97—102.
- [21] Totiyama, K.; Hinata, K. 1987, *Japanese Journal of Breeding*, 37(4), 469—473.

## Studies on the Anther Culture of *Oryza rufipogon* Griff

### I. Studies on the Enhancement of the Induction Rate of Callus and the Differentiation Rate of Green Plantlet

Pang Hanhua

(Institute of Crop Germplasm Resources Chinese Academy of Agricultural Sciences)

Shu Lihui

(Department of Biology Wuhan University)

Wu Miaoxin

(Institute of Crop Germplasm Resources Guangxi Academy of Agricultural Sciences)

Sun Huihong

(Institute of plant protection Guangxi Academy of Agricultural Sciences)

#### Abstract

79 entries of *O. rufipogon*, belonging to different types, collected from various geographical environments in Guangxi Province, were studied in anther culture. The results indicated that different types of *O. rufipogon* are quite different from each other in their potentials for anther culture. Pollen green seedlings were obtained in 41 of the 79 entries used. The results also indicated that the application of complex fertilizer at booting stage could elevated not only the nutrition level of the donor plants, but also their callus induction rates. 8–12 days of lower temperature treatment, at 6–8°C, of the rice panicle before inoculation could double or even triple the callus induction rate and the green plantlet differentiation rate. Improved N6 medium and well-timed transferring of the callus could lead to apparent increase in the efficiency of anther culture.

**Key words** Anther culture, Callus, Green plantlet, Induction rate, differentiation rate, Medium