

水稻花药培养过程中各种影响因子的研究进展

陈红^{1,2}, 秦瑞珍²

(1. 北京城市学院生物技术学部, 北京 100094; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 水稻花培是水稻育种中重要的技术手段, 通过总结材料基因型、培养条件中的各种理化因子等水稻花药培养效率主要影响因素的相关研究进展, 认为从整体上综合优化花培各阶段不同培养方法才能大幅提高水稻花培效率, 并对存在问题进行了初步探讨。

关键词: 水稻; 花药培养; 影响因子

Main Factors Affecting Rice Anther Culture

CHEN Hong^{1,2}, QIN Rui-zhen²

(1. Department of Biology, Beijing City University, Beijing 100094; 2. Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Rice anther culture is widely used as an important technique in rice breeding. The progress of the main factors affecting the culture efficiency, such as genotype and physical-chemical factors, are reviewed in this paper. It is mentioned that optimizing the methods in different stages of the culture and the appropriate combination of the optimization on the whole could be an effective way to enhance the efficiency of anther culture. The existing problems and prospects of rice anther culture are also explored and discussed.

Key words: rice; anther culture; affecting factors

水稻花药培养是离体培养水稻单核靠边期的花药组织, 诱导愈伤, 将再生出的植株加倍成正常纯合的二倍体植株。花药培养产生的后代一般不发生性状分离, 是培育新品种和遗传育种基础研究的优良材料。我国从 20 世纪 70 年代初开始进行水稻花培的应用研究, 并于 1975 年首先育成花培品种并应用于生产。花培已成为水稻生物技术育种中较为成熟的途径, 利用该技术选育的水稻新品种有粳稻、籼稻及三系杂交水稻的恢复系和两系杂交水稻的光温敏不育系等, 其类型涉及到当前水稻育种中所有领域。对于不同的材料而言, 正确的花药培养方法是提高花培效率的前提, 本文总结了花培技术中的主要环节, 讨论了其中不同的影响因子及需进一步研究的问题。

1 品种基因型

在水稻的花药培养中, 花药培养力受多基因控制, 供体基因型对花药培养力的影响较大。一般认为粳稻培养效率较高, 籼稻杂交后代居中, 籼稻培

养力极低。但研究表明, 即使同为粳稻或籼粳杂交稻, 由于基因型的差异不同品种的花培效率也有很大区别。因此, 供体品种的选择对提高花培的培养力特别重要。1975 年我国首次育成粳稻花培品种单丰 1 号, 标志着粳稻花培育种的成功, 随后在 20 世纪 80 年代又育成多个品种, 中国农业科学院选育的中花系列品种中的中花 8 号、中花 9 号和中花 10 号等年种植面积曾达到 2 万 $\text{hm}^{2[1]}$ 。90 年代黑龙江省农业科学院水稻研究所选育出了龙粳系列品种。2000 年后又有不同的中花品种和龙粳品种被成功选育^[2]。

与粳稻相比, 籼稻的平均出愈率平均培养力只有 0.5% 左右, 一般不超过 5%, 绿苗率大多在 20% 以下, 有些材料不能诱导愈伤组织或者难以得到花粉植株。目前通过花培选育的籼稻品种不多, 至 20 世纪末通过花药培养选育的品种仅 5 个, 其中江西省农业科学院选育 4 个品种, 推广面积也不大。不同的研究者针对提高籼稻花培效率进行了研究, 其中通过对培养基进行优化, 可使不同材料的籼稻

接收日期: 2007-04-25

基金项目: 国家“863”计划项目(z16-02-01-03)资助。

作者简介: 陈红(1974-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事植物育种及生物技术研究。E-mail: chen hong@bcu.edu.cn。通讯作者秦瑞珍(1941-), 女, 研究员, 主要从事四倍体水稻生物技术育种和遗传工作。E-mail: qinrz@mail.caas.net.cn

的花药培养力有不同程度的提高^[3-6]。

籼粳杂交稻的花药培养是我国选育超高产杂交水稻的有效途径之一。以籼粳杂交 F_1 的花药作为中间型材料在花药培养技术中得到了广泛应用。总的来说, 对于含有粳稻血缘的组合, F_1 结实率高的花培后代出现结实正常且性状优良个体的机率较大。另外, 栽培稻与野生稻杂交组合中若选择培养效率高的栽培稻, 也可提高杂交后代的花培效率。目前, 籼粳中间型材料已成为花培育种研究的主体材料之一。

三系杂交稻在我国的应用已有 30 年, 长时间的使用会使主要的不育系、恢复系发生退化, 因此严格的提纯复壮措施非常必要。花培育种在不育系和恢复系的提纯上应用较多, 传统常规方法比较繁琐, 并且只能从表型上选择, 无法确定提纯后的材料遗传型是否已完全纯化和稳定。而采用花培技术则可使成对的基因高度纯合, 并具有花费少、周期短的特点。葛美芬等^[7]配套提纯了汕优 63 的三系材料珍汕 97B、珍汕 97A 和恢复系明恢 63。江苏省里下河地区农科所利用花培技术提纯复壮了野败型质源的珍汕 97A, 1988 年又提纯了矮败型不育质源的协青早 A, 1990 年又对印尼水田谷质源的不育系 II-32 花培提纯成功^[2], 以上结果都证明花培提纯的效果明显。同时利用花培技术还可对杂交稻进行纯合选优育种。实践证明, 花培可借助杂交稻丰富的遗传背景, 结合双亲优点, 分离纯合出近似 F_1 表现的株系。自 1975 年以来国内已由此途径育成数十个优良品种。将花培与多倍体, 无性系相结合还可实施固定杂种优势的方案。范昆华等^[8]用籼粳杂交 F_1 加倍后再花培产生纯合双单倍体, 可望形成永久性纯合杂合体, 从而固定亚种间杂种优势。

花培技术也是光温敏不育系选育的有效手段。常规育种方法繁琐且周期较长, 而花药培养技术可以快速稳定光温反应特性, 加快育种进程, 提高选择效率。其基本原理在于以原有的光温敏不育系与性状优良的品种(系)杂交, 用 F_1 或 F_2 花培, 淘汰 H_1 全生育期都不育的单株, H_2 代分期播种, 选出育性转换特性明显的株系, 可以用人工气候箱对再生稻作鉴定, 也可用下一代进行严格的光温生态鉴定, 最终获得不育性稳定、综合性状优良的品系。应用这一方法已选育出具有良好育性转换特性的光温敏不育系 I-IS-1、I-IS-2、1103S、H1286S、1647S、ZNDBS 和培 MS-1 等^[1]。

2 预处理

在单核靠边期进行低温预处理是有效提高花培效率的常规手段。低温预处理可使杂交稻愈伤组织发生率(出愈率)提高几倍至几十倍。研究认为, 低温处理作用机制是延缓花粉的退化、维持花粉发育的生理环境、提高内源生长素水平并降低乙烯水平、启动雄核发育等^[9]。周雄韬等^[10]认为愈伤组织诱导率及绿苗分化率均以冷处理 20 d 为最高, 如温度降低则需相应缩短处理时间。另外, 不同材料冷处理的最适时间和最适温度稍有不同。低温预处理能提高花药离体培养成活率, 促使更多花粉细胞分裂发育。研究表明, 4 个籼型杂交稻组合单核中晚期穗部在 9~11℃ 下处理 14 d, 平均出愈率为 24.1%, 绿苗率为 7.93%。张连平等^[3]却认为 10℃ 下低温预处理 8 d 效果好于 4 d, 超过 10 d 后效果下降, 而且低温+激素处理的效果并不理想。朱德瑶等^[11]的试验表明, 低温预处理存在着显著的材料间差异和材料与处理时间的综合效应。季彪俊等^[12]认为, 籼稻原产热带, 对低温较敏感, 处理时间不宜过长, 在 8~10℃ 下处理 7~10 d 为宜。其他研究所得结论并不一致。总的来说, 由于不同基因型小孢子对低温的耐受力不同, 因此所需的处理温度, 持续时间有差异, 不同材料存在不同的“温时比”。

除低温预处理外, 恒温预培养、离心、射线、势激和紫外光等预处理方法都能对诱导产生正向促进的作用, 但都表现出基因型的差异^[12]。

3 培养基

3.1 基本培养基

培养基可分为诱导培养基和分化培养基, 培养基中包含大量元素、微量元素、附加物、激素和碳源等成分, 这些成分的含量对花药培养效率有直接影响。继最初使用 Miller 培养基进行花培成功后, 通过大量实验及比较, 迄今已获得适合各种不同水稻花培材料的培养基, 如适合粳稻的 N6^[13]、籼稻的合 5^[14]、籼粳杂种的 SK3^[15]以及对籼、粳稻都有较好效果的通用^[16]和 M8^[6]培养基等。研究表明, MS、Miller、LS 等基本培养基都能用于籼稻花药培养诱导愈伤组织, 而 M8、N6、禾谷类通用培养基具有较广的适用性^[1]。对于愈伤分化而言, MS 培养基在分化培养阶段的应用相当广泛。在实际应用

时应依不同材料的基因型对培养基的各种组分进行适当调整,以获得最佳效果。

3.2 碳源

培养基中的碳源主要是为培养物提供能量并维持渗透压,其浓度与种类的变化可以引起花培效率的变化。一般认为3%~6%的蔗糖为水稻花培培养基的常规量,其中6%的浓度最有利于胚性愈伤组织发生^[12]。除蔗糖外,其他糖类也可用作碳源。孙宗修等用 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $0.17\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 麦芽糖代替蔗糖作碳源,发现对籼稻出愈和绿苗再生均有较好的效果^[17]。朱永生^[18]等的研究也获得了相同的结果,并证明混合使用蔗糖和麦芽糖(3%蔗糖+3%麦芽糖)对出愈率及培养力的改善效果更佳。与仅使用蔗糖相比,在诱导培养基中添加麦芽糖,可以改善愈伤组织的质量,使绿苗分化率显著提高。但仅用麦芽糖作碳源,白苗率也大幅度上升。使用混合碳源的效果比使用单一碳源的要好,推测是混合碳源满足了花药脱分化过程中不同发育阶段糖类代谢的不同需求。孙之荣等^[19]在水稻花培培养基成分主次因子研究中将蔗糖浓度从5%上调至9%,也使绿苗总诱导率大幅提高,最好的实验培养基使中花9号的绿苗总诱导率达到57.23%。张连平等^[3]用蔗糖、食用砂糖、麦芽糖+食用砂糖作为不同碳源,对粳稻、籼稻及粳籼杂交后代进行花培试验,结果表明,蔗糖的效果最好,食用砂糖次之,麦芽糖+食用砂糖的花培效果最差。孙宗修^[17]认为,花药对不同碳源的利用能力不同是导致愈伤组织诱导率差异的原因。其实验表明,这种差异并非由于不同碳源所造成的渗透压不同,而应归因于它们各自不同的化学结构、物理特性和生理功能,其机理有待进一步研究。

3.3 激素

外源激素的作用可促进愈伤组织的发生和分化,因此激素是花培培养基中的重要成分,通常认为在愈伤组织培养中脱分化主要使用2,4-D,而6-BA和KT则是启动分化的主要激素。一般籼稻比粳稻要求高的激素水平,对籼稻和籼粳杂交组合,诱导培养基中以 $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的2,4-D,配合 $2\sim 5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的NAA效果较好;而绿苗分化,则要求的生长素浓度更低^[1]。其他如6-BA、KT和IAA等激素也常用于花培的诱导培养基和分化培养基中,使用合理的激素组分及激素配比是影响花培效率的重要因素。李欣等^[20]以SK3为基本培养基,添加不同配比的2,4-D、6-BA、KT、NAA和IAA,研究

了不同激素组分及其不同对比对粳籼杂交组合正反交 F_1 愈伤组织诱导和分化的影响。试验结果证明,添加单一激素成分培养效果较差。源于含2,4-D、NAA、KT诱导培养基的愈伤组织,其绿苗分化率均高于起源于仅含2,4-D的诱导培养基的愈伤组织,表明采用复合启动因子诱导愈伤组织可促进培养力低的材料的愈伤诱导和绿苗分化。杨学荣等^[16]的研究结果也说明,多激素配比构成复合启动因子有利于提高籼稻花培绿苗频率。卓丽圣等^[21]研究发现,苯乙酸(PAA)在水稻花培中不影响愈伤组织诱导率,但显著提高愈伤分化率,其促进分化的效果与品种、培养基中所含的无机盐成分有关,对籼稻品种效果较好。李大林等^[22]进行了用2,4-D浸幼穗茎节的试验,发现在 $0\sim 6\text{ mg/L}$ 的浓度范围内,绿苗生产率与2,4-D浓度呈正相关,其中最高的能达到对照的5.1倍。另有报道用外源激素处理接种前的离体材料,结果证明对花药培养力没有影响^[3]。

3.4 琼脂浓度

据田文忠^[23]报道,愈伤组织经50%的干燥处理,可以明显提高植株再生频率。赵成章等^[24]用滤纸和硅胶干燥处理水稻愈伤组织,能明显提高愈伤组织的绿苗分化率。这说明降低愈伤组织的含水量可以促进愈伤培养效率。琼脂作为培养基的固化剂起固定支撑培养物的作用,而琼脂浓度则影响着培养基和培养物的水分状况,提高琼脂浓度将产生水分胁迫。罗天宽等^[25]用0.6%、0.8%、1.0%及1.2%的琼脂浓度对早稻杂交组合的花培进行研究,结果表明,提高琼脂浓度可以提高水稻花培的绿苗分化率,且不同基因型的水稻对琼脂浓度的要求各不相同。冯效华等^[26]的研究也获得类似结论。同样,陈红等^[4]对提高水稻同源四倍体花药培养愈伤诱导率的研究也证明,适当提高琼脂浓度有利于花粉愈伤诱导。有关增加琼脂浓度提高植株再生率的机理认为,增加水分胁迫能对细胞分裂素和离子的吸收产生强烈影响^[27];还有理论认为,一定的渗透压破坏了前胚期细胞的胞间连丝,使细胞间的通讯受阻,从而使细胞处于生理上的分离状态,有助于大量细胞分化^[28]。

3.5 其他成分

培养基中的氮源对花培效率影响也较大。氨态氮浓度过高明显抑制花粉愈伤组织形成。现在培养基中一般都使用硝态氮。对氨态氮与硝态氮的比例研究表明,籼稻花培材料要求较低浓度的氨态氮,

而较高质量浓度的硝态氮对籼稻和籼粳杂交材料都比较适应^[12]。朱永生等^[18]指出, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 5.3/28.0 时对提高籼粳杂交后代花药培养力的效果最好。陈英等^[15]对大量元素的研究也得到了相似结果, 认为籼粳杂交最适 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 (3.50~5.26)/28.00。较高质量浓度的其他大量元素如 H_2PO_4^- 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 能促进籼稻和籼粳杂交种愈伤组织的花培效率。培养基的附加物对愈伤诱导及分化也会产生影响, 有机添加物如马铃薯提取液、椰子汁、玉米汁、丝瓜伤流液等天然活性物质及水解乳蛋白、酵母汁、脯氨酸等多种有机添加物对提高籼稻培养力均有较明显的效果^[9]。植物生长调节剂 ABT 生根粉也能促进绿苗的分化及壮苗^[20]。另有报道丁二酸及其铵盐对提高愈伤组织诱导率有明显效果^[29]。

4 成苗方法

两步成苗或多级成苗是指先将外植体脱分化培养诱导出愈伤组织, 再从愈伤组织诱导分化出绿苗的过程。而通过诱导形成胚状体直接从外植体上形成可移栽的绿苗则称为一步成苗法。两步成苗法在新品种选育上得到了成功应用, 育成了许多生产上大面积应用的品种。一步成苗法较两步成苗法成本低, 但受材料基因型的限制。江树业等^[30]认为, 籼型品种一次成苗的绿苗率较比多级成苗的高, 而粳型品种的较低。卓丽圣等^[21]报道, PAA 能有效促使籼稻、粳稻及籼粳杂交材料花药愈伤组织直接分化成苗, 其中籼粳杂交 F_1 一次成苗幼苗再生率达 2.69%。

5 问题及展望

虽然水稻花培已成为水稻育种的成熟手段, 但仍存在不少技术难题与理论问题, 比如出愈率、分化率及绿苗得率并不完全呈正相关; 籼型稻产苗率难以满足育种群体的需要等。一般认为, 水稻花药培养力受材料遗传背景即基因型的影响最大, 不同基因型对培养基有不同要求, 同一基因型的花药在不同培养基上的诱导效果常有显著差异。这就要求一方面选择好的接种材料, 另一方面优化培养条件, 提高接种材料的花粉植株诱导率。虽有培育成功的籼稻花培品种, 但比较而言, 籼稻花药的培养力比粳稻花药的培养力低很多, 因此, 在选择籼稻供体材料时, 应对供体植株的生长条件、花粉发育状况严格把关, 使接种的花粉处于最佳状况, 为后

期的诱导提供良好的基础。在低温预处理过程中, 应视材料不同对采用的温度和处理的时间做相应调整, 并可考虑用外源激素处理材料。愈伤诱导和脱分化过程主要涉及培养基的成分与培养条件, 已有的大量实验证明, 对于粳稻与籼稻品种, 除了基本培养基的使用有一定的模式外, 相同属之间种与种的最佳培养基成分可能差异很大。因此, 对于某种特定的材料, 就需要在已有的资料中分析可能的优化组合, 尝试不同的成分配比, 特别是注意激素的正确使用往往能对培养力产生显著的促进。在培养过程中还应注意光温条件, 这对绿苗的分化及其生活力有明显的影响。在获得幼苗后, 应注意培育壮苗, 提高成苗率。总的来说, 水稻花培是一个综合的连续过程, 每一个环节都会对花药培养效率造成影响。因此综合利用已有的基础, 总结规律, 形成理论, 并尝试新的技术手段从整体上提高水稻花培效率才能从根本上拓展花培技术在水稻选育各个领域中的应用。

参 考 文 献

- [1] 姜 健, 金成海, 侯春香, 等. 水稻花药培养研究与应用进展. 中国农学通报, 2001, 17(4): 49-51.
- [2] 富吴伟, 李友发. 水稻花培育种进展. 安徽农业科学, 2005 33: 710-711.
- [3] 张连平, 张丽娟. 提高水稻花培综合效益研究. 北京农业科学, 1999, 17(4): 14-16.
- [4] 陈 红, 秦瑞珍. 提高水稻同源四倍体花药培养愈伤诱导率的研究. 作物学报, 2007, 33: 120-125.
- [5] 韩光禧, 钟秋兰, 韦鹏霄. 提高籼稻花药培养愈伤组织诱导频率的研究. 广西农学院学报, 1982, 1: 69-73.
- [6] 梅传生, 张金渝, 吴光南. 籼稻花培绿苗率的提高. 江苏农业学报, 1988, 4(2): 45-48.
- [7] 葛美芬. 花药培养在籼型野败型不育系提纯复壮上的应用. 江苏农业学报, 1985, 11: 25-32.
- [8] 范昆华, 章振华, 张建军, 等. 籼粳双单倍体的诱导及其性状遗传. 上海农业学报, 1991, 7(1): 15-22.
- [9] 肖国耀. 水稻花药培养研究. 杂交水稻, 1992, (2): 44-46.
- [10] 周雄韬, 程庆莲. 低温预处理对水稻花粉植株的诱导效应. 福建农学院学报, 1981, 11(4): 1-7.
- [11] 朱德瑶, 丁效华, 尹健华. 籼稻花药培养和育种. 江西农业学报, 1993, 5(增刊): 122-131.
- [12] 季彪俊, 陈启锋, 黄群策, 等. 水稻花药培养技术的总结与探讨. 福建农业大学学报, 2001, 30(1): 22-28.

- [13] 朱至清. 通过氮源比较实验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学, 1975, (5): 484-490.
- [14] 凌定厚, 蒺蕴兰, 曾碧霞. 介绍一种适于籼稻花药培养的培养基. 见: 胡含主编. 花药培养学术讨论会论文集. 北京: 科学出版社, 1977: 265.
- [15] 陈英, 左秋仙, 王瑞丰. 应用正交试验法筛选籼粳稻杂种花药培养基. 见: 胡含主编. 花药培养学术讨论会论文集. 北京: 科学出版社, 1977: 40-49.
- [16] 杨学荣, 王建华, 李还林, 等. 禾谷类作物通用诱导培养基提高籼稻花培绿苗频率的研究. 植物生理学报, 1988, 6(1): 67-74.
- [17] 孙宗修, 斯华敏, 程式华, 等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究. 中国水稻科学, 1993, 7(4): 227-231.
- [18] 朱永生, 陈葆棠, 张端品. 提高水稻籼粳杂交后代花药培养力的研究. 华中农业大学学报, 2001, 20: 314-317.
- [19] 孙之荣, 倪丕冲, 黄卓忠. 培养基成份影响水稻花培效率的变量分析和主次因子研究. 作物学报, 1990, 16: 123-129.
- [20] 李欣, 于恒秀, 杨成根, 等. 生根粉及植物激素在粳籼稻杂交花药培养中的应用研究. 江苏农业研究, 2001, 22(2): 1-6.
- [21] 卓丽圣, 斯华敏, 程式华, 等. 苯乙酸促进水稻花药愈伤组织的再分化和直接成苗. 中国水稻科学, 1996, 10(1): 37-42.
- [22] 李大林. 提高水稻花药培养效率分析. 农艺科学, 2004, 20(4): 128-131.
- [23] 田文忠. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究. 遗传学报, 1994, 2: 215-221.
- [24] 赵成章, 吴连斌. 干燥处理对水稻愈伤组织绿苗再生和若干生理生化特征的影响. 作物学报, 1997, 23: 39-43.
- [25] 罗天宽, 张小玲, 刘庆, 等. 琼脂浓度对水稻花药绿苗率的影响. 温州农业科技, 2003, (3): 47-48.
- [26] 冯效华, 李阳生. 琼脂浓度对水稻花培绿苗率的影响. 中国农业科学, 1998, 31(3): 86-88.
- [27] Bornman C. H1 Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine 2 induced adventitious bud formation and verification *in vitro* in piceaabies. *Plant Physiol*, 1984, 25: 505-512.
- [28] 高振宇, 黄大年. 影响籼稻幼胚愈伤组织形成和植株再生若干因素. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 113-115.
- [29] 兰陟平, 刘汉儒. 丁二酸对水稻花培的影响. 遗传, 1981, 3(5): 13-14.
- [30] 江树业, 陈启锋. 水稻花培一次成苗的研究 I. 一次成苗与多级成苗的比较. 福建农业大学学报, 1994, 23(1): 11-16.