

影响粳籼稻杂交 F_1 花药培养效果的因素分析

施利利¹, 张 欣¹, 郭玉华², 王松文¹, 张 磊¹

(1. 天津农学院 农学系, 天津 300384, 2. 沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 100161)

摘要:以津稻 291/IRBB60 粳籼杂交 F_1 、反交 F_1 及其亲本的花药为外植体, 对诱导和分化培养基、激素配比及有机附加物和高温预培养时间等影响花药培养效果的因素进行研究。结果表明, 在 SK_3 基本培养基中添加 2 mg/L 2, 4-D, 1 mg/L NAA 和 1 mg/L KT 比只添加 2 mg/L 2, 4-D 的愈伤诱导率高 0.67~2.78 个百分点; 在诱导培养基中添加水解酪蛋白能明显提高正交 F_1 的愈伤诱导率; MS+1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT 分化培养基得到了较高的绿苗分化率; 正交 F_1 的愈伤诱导率、绿苗分化率和花培力显著高于反交 F_1 ; 30℃ 高温预培养 36 h, 正交 F_1 花培力达到最高值。

关键词: 水稻; 花药培养; 愈伤诱导率; 绿苗分化率

中图分类号: S511.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0158-04

Studies on Effects of Factors on F_1 Anther Culture from *Japonica/Indica* Hybrid Rice

SHI Li-li¹, ZHANG Xin¹, GUO Yu-hua², WANG Song-wen¹, ZHANG Lei¹

(1. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The anther of Jindao291/IRBB60 and their parents were used to induce the calli in the different medium supplemented with different concentrations and combinations of phytohormones and organic nutriments and different high temperature pre-culture treatments. The results showed that the frequency of the callus induction in the SK_3 medium supplemented with 2 mg/L 2, 4-D, 1 mg/L NAA and 1 mg/L KT was 0.67%–2.78% higher than that with 2 mg/L 2, 4-D. The induction rate could be increased in this medium added with hydrolyzed casein. It could be obtained the highest plant regeneration rate in the MS medium added with NAA (1 mg/L), 6-BA (2 mg/L) and KT (0.5 mg/L). The frequency of the callus induction and green plantlet differentiation and anther culture ability of the cross F_1 is significantly higher than that reverse F_1 . Anther culture ability may be the highest when anthers were pre-cultured with 30℃ for 36 h.

Key words: Rice; Anther culture; Callus induction rate; Frequency of green plant regeneration

津稻 291 是具有高产潜力和优良品质的粳型水稻品种, 但感白叶枯病, IRBB60 是国际水稻所培育的抗白叶枯病籼稻品种。导入 IRBB60 的抗病基因是提高津稻 291 对白叶枯病抗性的有效途径。但是亚种间杂交后代往往分离严重, 需经多代选择与鉴定才能稳定, 育种周期长。用花药培养育种技术产生双单倍体能够使目标性状迅速纯合, 缩短育种周期, 加快育种进程。

在水稻花药培养中, 粳稻的绿苗率一般仅 1% 左右, 粳籼杂交 F_1 本身的育性低, 且有一半来源于粳稻的遗传物质, 绿苗率更低, 采用花药培养建立一

个双单倍体群体往往比较困难^[1]。为了解决这一难题, 本研究以津稻 291/IRBB60 正反交 F_1 及其亲本为试验材料, 研究了不同培养基、激素配比、有机附加物和高温预培养时间对花药愈伤组织诱导和分化的影响, 拟寻找最佳组合, 建立粳籼杂交 F_1 花药培养技术体系。

1 材料和方法

1.1 外植体采集

供试材料为本课题组育成的粳稻品种津稻 291、籼稻品种 IRBB60 以及津稻 291/IRBB60 正交 F_1

收稿日期: 2007-03-20

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (013606611)

作者简介: 施利利 (1976-), 女, 天津人, 实验师, 硕士, 主要从事水稻遗传育种研究。

及反交 F₁。在剑叶的叶枕距为 5~ 7 cm 时, 采集稻穗并保留顶部 2 片叶, 用 75% 的酒精擦拭稻穗表面后用湿纱布包裹, 外面以塑料布密封, 8~ 10℃ 下放置 7~ 10 d。选取花粉母细胞处于单核靠边期的小穗, 75% 酒精处理 30 s, 然后用 0. 1% 升汞处理 10 min, 无菌水冲洗后无菌滤纸吸干, 备用。

1.2 培养基

愈伤组织诱导培养基: N₆^[2], SK₃^[3] 和 M₈^[4] 基本培养基中加入 0. 5 g/L 谷氨酰胺、脯氨酸 0. 5 g/L、30 g/L 蔗糖, 用 0. 7% 的琼脂固化。用于愈伤组织分化的培养基为 MS^[5]。各培养基中激素配比情况见表 1。

表 1 诱导和分化培养基中激素配比设计

Tab. 1 Phytohormone components in callus induction and differentiation media

培养基及代号 Medium and code		激素成分和浓度/(mg/L) Phytohormone components and concentrations			
		2, 4-D	NAA	KT	6-BA
诱导培养基	SK ₃ -1	2	—	—	—
Induction	SK ₃ -2	2	1	1	—
medium	N ₆ -1	2	—	—	—
	M ₈ -1	2	—	—	—
分化培养基	MS-1	—	1	2	0. 5
Differentiate	MS-2	—	1	0. 5	2
-on medium	MS-3	—	1	2	2

1.3 愈伤组织诱导

1.3.1 不同诱导培养基对愈伤诱导率的影响 将供试材料的花药分别接种到 SK₃-1、N₆-1 和 M₈-1 诱导培养基上进行培养。每种诱导培养基接种 20 瓶, 每瓶接种花药 80 枚, 26~ 28℃ 黑暗培养。接种 60 d 后统计产生愈伤组织花药数。

1.3.2 不同激素比对愈伤诱导率的影响 以只添加 2 mg/L 2, 4-D 的 SK₃-1 诱导培养基做为对照, 比较添加 2 mg/L 2, 4-D、1 mg/L NAA 和 1 mg/L KT 的 SK₃-2 诱导培养基对愈伤组织诱导的影响。

1.3.3 有机附加物对愈伤诱导率的影响 在 SK₃-2 诱导培养基中添加水解酪蛋白(CH) 和酵母提取物(YE), 研究其对花药愈伤组织诱导的影响。共设 4 个处理: (1) SK₃-2 (不添加有机物); (2) SK₃-2+ CH (0. 3 g/L); (3) SK₃-2+ YE (0. 3 g/L); (4) SK₃-2+ CY (0. 15 g/L CH+ 0. 15 g/L YE)。

1.4 不同激素比对绿苗分化率的影响

绿苗分化培养以 MS 为基本培养基, 加入不同浓度的 6-BA、NAA 和 KT, 设 3 个配比处理(表 1)。取来源于 SK₃-2+ CH 培养基的致密的愈伤组织接种, 每处理接种 300 块左右愈伤, 50 d 后统计绿苗和白苗丛数。

1.5 高温预培养对花药培养效果的影响

将正交 F₁ 花药接种到 SK₃-2+ CH 诱导培养基后, 一部分材料直接在 26℃ 黑暗培养, 另一部分先在 30℃ 下分别培养 24、36、48 和 72 h 后, 再转移至 26℃ 培养。诱导出的愈伤转移至 MS-2 分化培养基上进行再分化培养。比较不同高温预培养时间对愈伤诱导率、绿苗分化率及花培力的影响。

1.6 频率统计和数据处理

愈伤诱导率 = (愈伤组织块数/接种花药数) × 100%。

绿苗分化率 = (绿苗丛数/愈伤组织数) × 100%。

花培力(%) = 出愈率 × 绿苗分化率。

用 Minitab14 软件对数据进行方差分析, 多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对花药愈伤诱导率的影响

从表 2 可以看出, 不同诱导培养基对不同品种的花药愈伤诱导率表现出显著的差异。津稻 291 在 N₆-1 上愈伤诱导率最高, 在 SK₃-1 上的愈伤诱导率略低于 N₆-1, 但无显著差异。IRBB60 的花药愈伤诱导难度较大, 仅在 M₈-1 培养基上得到了最高诱导率, 而在 N₆-1 上未能诱导出愈伤。对于正、反交 F₁ 的花药培养, 均以 SK₃-1 的出愈率最高, 分别达到 9. 56% 和 5. 33%。试验结果表明, SK₃-1 培养基对于供试材料的花药愈伤诱导具有较广的适应性。

表 2 不同培养基对花药愈伤诱导率的影响

Tab. 2 Influence of different induction medium

诱导培养基 Induction medium	on anther callus induction %			
	品种(组合) Varieties(Combination)			
	津稻 291 Jindao 291	IRBB60	正交 F ₁ Cross F ₁	反交 F ₁ Reverse cross F ₁
N ₆ -1	10. 02a	—	7. 32b	1. 18c
SK ₃ -1	9. 98a	0. 98b	9. 56a	5. 33a
M ₈ -1	4. 32b	2. 09a	0. 85c	2. 98b

表 3 不同激素比对愈伤诱导率的影响

Tab. 3 Effect of different phytohormone components

诱导培养基 Induction medium	on callus inducing rate %			
	品种(组合) Varieties(Combination)			
	津稻 291 Jindao 291	IRBB60	正交 F ₁ Cross F ₁	反交 F ₁ Reverse cross F ₁
SK ₃ -1	10. 00b	0. 96b	9. 56b	5. 33b
SK ₃ -2	12. 44a	1. 57a	12. 34a	6. 84a

2.2 不同激素比对花药愈伤诱导率的影响

由表 3 可以看出, 添加了 2 mg/L 2, 4-D、1 mg/L

NAA 和 1 mg/L KT 的 SK₃-2 培养基的愈伤诱导率显著高于只添加 2 mg/L 2, 4-D 的 SK₃-1。试验中发现, 由 SK₃-2 培养基诱导的愈伤组织外形致密, 呈颗粒状, 易于分化, 从而绿苗分化率高。

2.3 添加水解酪蛋白和酵母提取物对花药愈伤诱导率的影响

在 SK₃-2 诱导培养基中添加水解酪蛋白和酵母提取物, 无论是添加一种还是两种均对粳稻品种津稻 291 的愈伤诱导没有明显影响。单独添加水解酪蛋白可显著提高正、反交 F₁ 的花药愈伤诱导率, 但单独添加酵母提取物或同时混合添加这两种有机物均不能提高正、反交 F₁ 的花药愈伤诱导率。

表 4 水解酪蛋白和酵母提取物对愈伤诱导率的影响
Tab. 4 Effect of supplemented hydrolyze casein and yeast extract in SK₃-2 medium %

诱导培养基 Induction medium	品种(组合) Varieties(Combination)		
	津稻 291 Jindao291	正交 F ₁ Cross F ₁	反交 F ₁ Reverse cross F ₁
SK ₃ -2	12.50a	12.35b	6.84b
SK ₃ -2-CH	12.65a	15.46a	9.00a
SK ₃ -2-YE	12.54a	12.46a	6.94b
SK ₃ -2-CY	12.70a	12.33b	6.70b

2.4 不同激素对比对绿苗分化率的影响

由图 1 可见, 津稻 291、正交 F₁ 和反交 F₁ 在 MS-2 分化培养基上的绿苗分化率均高于 MS-1 和 MS-3 培养基。MS-2 中以 2 mg/L 的 6-BA 代替 MS-1 中的 2 mg/L KT, 绿苗分化率可提高 1.36~5.24 百分点。但在含有 2 mg/L 的 6-BA 的 MS 培养基中加入 2 mg/L KT (MS-3), 绿苗分化率反而下降。结果表明, 1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT 是提高绿苗分化率的最好激素配比。

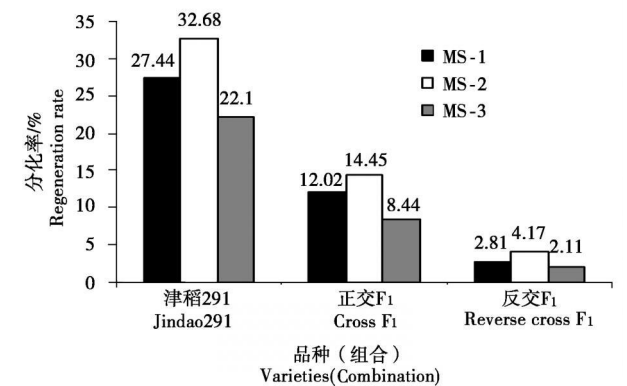


图 1 不同激素对比对绿苗分化率的影响
Fig. 1 Effect of different phytohormone components on regeneration rate of calli

2.5 高温预培养时间对花药培养效果的影响

从图 2 可以看出, 花药接种后高温预培养 48 h 内, 可提高出愈率, 但达到 72 h 后, 出愈率下降。高

温预培养 36 h 绿苗分化率时达到最高(17.1%), 随着培养时间延长, 绿苗分化率呈下降趋势。高温预培养 36 h 时, 花培力最高, 但在随后的培养过程中, 由于白苗分化率呈上升趋势, 花培力开始下降。

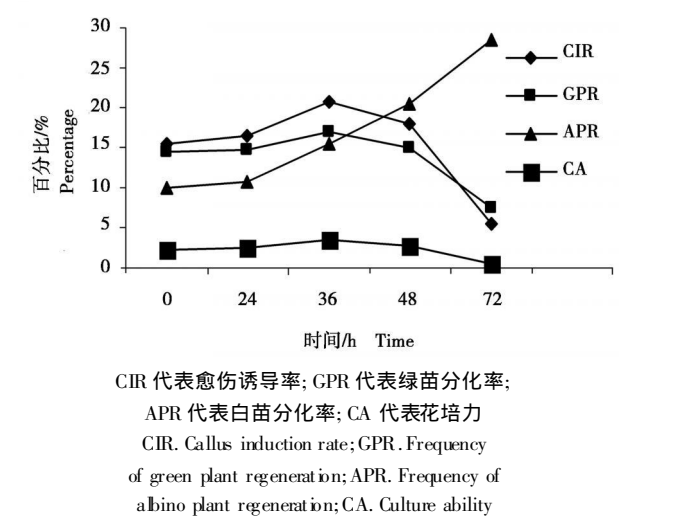


图 2 高温预培养对正交 F₁ 花药培养效果的影响
Fig. 2 Effect of pre-culture with high temperature on anther culture from cross F₁

2.6 正、反交 F₁ 的花药培养效果比较

将花药愈伤组织转入 MS-1 培养基中进行分化培养, 结果见表 5。从培养反应看, 正交 F₁ 的愈伤诱导率、绿苗分化率、花培力都超过了反交 F₁。与双亲最适培养基上的培养反应相比较, 正反交组合都分别趋向于各自的母本, 表明母本细胞质对杂种 F₁ 的培养力有较大影响。因此, 选择对花培反应好的津稻 291 作母本进行配组, 可以提高 F₁ 的花药培养力。

表 5 正、反交 F₁ 的花药培养效果比较
Tab. 5 Comparison on effect of anther culture between cross F₁ and reverse cross F₁

品种(组合) Varieties (Combination)	诱导培养基 Induction medium	愈伤诱导 率/% Frequency of callus induction	绿苗分化 率/% Frequency of green plant differentiation	花培力 /% Anther culture ability
津稻 291 Jindao291	N ₆ -1	10.02	28.33	2.84
IRBB60	M ₈ -1	1.11	4.50	0.05
正交 F ₁ Cross F ₁	SK ₃ -1	7.32	12.02	0.88
反交 F ₁ Reverse cross F ₁	SK ₃ -1	5.33	2.81	0.15

3 讨论

影响花药培养的因素很多, 本试验主要在以下几个方面采取措施提高花培效率。

大多数禾本科作物, 如水稻^[6]、小麦^[7]的花药培

养中, 2, 4-D 是启动小孢子细胞分裂形成愈伤组织的必要条件, KT 具有促进愈伤组织形成茎叶的作用, 6-BA 对植株再生具有数量和质量上的双重影响, 使用适宜浓度 6-BA 可获得质量较好的再生植株^[8]。许多研究表明^[9-11], 单一激素成分培养的效果较差, 合理的激素配比是保证组培效果的基础。本研究对 SK₃ 诱导培养基中两种不同激素配比组合的愈伤诱导率进行比较试验, 结果表明, 合理添加 2, 4-D、NAA 和 KT 激素配比的培养基, 其愈伤组织诱导率显著高于只添加 2 mg/L 2, 4-D 的培养基, 而且愈伤质量好, 易于分化。在分化培养中, 细胞分裂素 KT 与 6-BA 的作用效果是不同的, KT+ NAA 有利于植株的根茎叶分化一步完成, BA+ NAA 有利于出芽, 愈伤组织的分化关键就在于芽的分化^[8]。本试验在分化培养基中适当提高 6-BA 的用量, 减少了 KT 用量时, 使绿苗分化率提高了 1.36~ 5.24 百分点, 表明 6-BA 对分化的效果优于 KT。在含有 2 mg/L 的 6-BA 的 MS 培养基中加入 2 mg/L KT (MS-3), 绿苗分化率反而下降, 可能是 KT 和 6-BA 同时大量存在破坏了细胞分裂素和生长素的平衡, 而对再生苗的分化产生抑制作用。

许多研究表明, 在培养基中添加水稻乳蛋白、酵母汁、脯氨酸、水解酪蛋白等多种有机物对提高水稻培养力有明显效果^[6, 12-14]。本试验中, 添加水解酪蛋白可以显著提高正、反交 F₁ 的愈伤诱导率, 但添加酵母提取物对愈伤诱导率无明显影响, 与郭书巧等^[6]添加酵母提取物可提高愈伤诱导率的研究结果不一致, 可能与水稻材料或培养基有关。

朱永生等^[15]、何涛等^[16]认为在水稻的花药培养过程中, 采用一定时间的高温预培养能够提高籼粳杂交 F₁ 和籼爪杂交后代的花培力。本试验也得到了同样的结果。研究表明, 30℃ 高温预培养 36 h 有利于提高籼/粳杂交 F₁ 的花培力, 但处理时间过长时白苗率显著增加, 花培力反而下降。

参考文献:

[1] 程式华, 毛传藻, 占小登, 等. 籼粳交 DH 群体和 RL 群体的构建及籼粳分化[J]. 中国水稻科学, 2001, 5(4):

257- 260.

- [2] 朱至清, 王敬驹, 孙敬三, 等. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基[J]. 中国科学, 1975(5): 484- 490.
- [3] 陈英, 左秋仙, 王瑞丰, 等. 应用正交试验法筛选籼粳稻杂种花药培养基[C]//花药培养学术讨论会论文集, 北京: 科学出版社, 1978: 65- 72.
- [4] 梅传生, 张金渝, 吴光南. 籼稻花培绿苗率的提高[J]. 江苏农业学报, 1988, 4(2): 45- 48.
- [5] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473- 497.
- [6] 郭书巧, 唐海娟, 王州飞, 等. 籼粳杂交 F₁ 高效花药培养技术体系的建立[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(2): 1- 5.
- [7] 海燕, 康明辉, 郭景战, 等. 稀土和基因型对小麦花培绿苗分化率的影响[J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 34- 36.
- [8] 黄慧君, 林青山, 黄道强, 等. 影响籼稻花药培养效果的综合因素研究[J]. 广东农业科学, 1998(1): 2- 5.
- [9] 冯双华, 赵森, 郭家源, 等. 不同培养基和激素对超级杂交稻花药培养力的影响[J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(4): 523- 525.
- [10] 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[J]. 作物学报, 2007, 33(1): 120- 125.
- [11] 杨跃生, 简玉瑜. 影响水稻愈伤组织再生植株数量和质量的因素[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 124- 128.
- [12] 张志雄, 向耀武, 张安中, 等. 水稻综合技术及在杂交稻育种中的应用研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(6): 76- 78.
- [13] 陆燕鹏, 万邦惠. 脯氨酸与丙氨酸对光温敏核不育水稻花药愈伤组织诱导的影响[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 12- 15.
- [14] 冯双华, 李达模, 贾凌辉, 等. 影响籼稻花药培养诱导率作用的几种因素[J]. 农业现代化研究, 1995, 16(5): 317- 210.
- [15] 朱永生, 陈葆棠, 张端品. 提高水稻籼粳交后代花药培养力的研究[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 314- 317.
- [16] 何涛, 罗科, 韩思怀, 等. 籼爪杂交后代的花药培养效率[J]. 应用环境生物学报, 2004, 10(2): 146- 149.