

水稻花药培养方法改良探讨^{*}

李大林¹, 张云江¹, 刘大力²

(1. 黑龙江省农科院水稻所, 佳木斯 154026; 2. 绥化市水利工程公司, 绥化 152000)

摘要: 从花药培养存在的问题出发, 着重论述花药培养程序、提高花药培养力的途径等, 对花培各阶段不同培养方法提出最优结合, 认为提高花药培养工作效率的方法是提高接种效率和提高成苗率, 具体措施是花粉粒(花药)培养、一步成苗、人工加倍、培育壮苗并对该方法的可行性进行了简要分析。

关键词: 花药培养; 培养基; 诱导率; 愈伤组织; 胚状体

中图分类号: S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2000)02-0019-04

Discussion on Improvement of Method of Rice Anther Culture

Li Dalin, Zhang Yunjiang

(Rice Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, 154026)

Abstract: Based on the problem of anther culture, we discuss the anther culture program, the way of raising anther culture ability etc., also put forward an optimization technique about different anther culture times and method. The way of raising anther culture efficiency is raising the inoculation efficiency and the survival percent of green-plantlet. The important ways are pollen grain culture, one-step method of anther culture, artificial doubling and breeding sound seedlings. The possibility of the ways is preliminary analysed.

Key words: Anther culture; Culture medium; Induction rate; Callus; Embryoid

花培育种是生物技术育种中单倍体育种的一种方式。由于单倍体育种的诸多优势和花药培养的成功, 使这一技术在育种领域得到了广泛的应用。培养出几百种花药植株, 育成了许多品种。

1 花药培养技术及改良

现阶段花培育种在花药培养方法上仍存在着工作量大、工作效率低的矛盾。技术上仍存在花药培养力低、绿苗加倍率低、变异频率低以及后代鉴定方法贫乏, 限制了花培技术在育种中的应用。随着生物技术的快速发展, 新的技术不断被创造出来, 也为花培途径育种的应用技术提出更高要求。如何提高工作效率、加快选择效率、缩短育种周期、创新种质材料、配合其它生物技术的应用, 快速获得纯系, 充分利用花培技术在基础理论研究和育种应用研究的雄厚基础, 成为我们迫切需要解决的问题。

1.1 花药培养的一般过程 花药培养的一般过程

是采集雄核发育处于单核靠边期的幼穗, 低温预处理 10 天左右, 接种于含 2, 4-D 2mg/l 的 N₆ 培养基中诱导愈伤组织, 愈伤组织形成后, 转入含 KT2mg/l、IAA1mg/l 的 MS 培养基中再分化出绿苗。分化出的绿苗经壮苗、土培后结实获得种子。

1.2 改良培养基 培养基历经几代改良, 培养基中无机盐的含量对愈伤组织诱导率及绿苗分化率的影响, 前人已做了大量的研究, 继续在此方面的探索无明显进展。而改变有机附加物及生长物质的种类及浓度, 可大幅度改变花培绿苗的诱导率及分化率, 改变培养物的发育途径。现已表明, N₆ 培养基做诱导培养基、MS 培养基做分化培养基对水稻花药培养具有较好的效果。马铃薯简化培养基较合成培养基, 有更高的诱导率及分化率, 其原因可能是马铃薯含有丰富的营养物质(维生素、多糖等)和一些激素。研究发现, a. 马铃薯水提取液中含有较高的 ABA,

* 收稿日期: 1999-12-21

作者简介: 李大林(1971-), 男, 学士学位, 从事生物技术育种研究。

其它激素含量甚微(黄春远等);b.从水稻幼苗产生的愈伤组织,先在加有ABA 10⁻⁴mol/l继代1个月,再加到含KT培养基中,会分化出更多芽和小植株;c.花药培养早期加入乙烯利对提高组织诱导率具有有效作用^[1]。而ABA是一种生长抑制剂,乙烯利生产上用于促进果实成熟。调节激素种类及配比还可以使花药经胚状体途径一步成苗。基于苯乙酸诱导剂的改良的M₈培养基对水稻花药培养一步成苗有较好的作用^[2]。GA对诱导愈伤组织有抑制作用,对花药一步成苗是否有作用却未见报道,1997年加入GA的培养基中出现了由胚状体途径直接发育成的绿苗。因此对于一些不同功能的生长调节物质的浓度及配比,进行改良,对提高绿苗生产率或一步成苗有很大潜力。

1.3 游离花粉粒培养,降低接种强度 当前单倍体育种均采用花药培养,需要逐朵颖花取出花药进行接种,费时费力,是接种效率低下的主要因素。如果能够从游离花粉粒培养获得植株,可大大提高接种效率。而且,从花粉粒培养的植株,可以避免花药体

细胞发育成苗,更能发挥单倍体育种优势。游离花粉粒培养在水稻上已获得了绿色再生植株。采用稻穗低温预处理1015天,花药预培养34天相结合的处理,分离出的花粉粒经预培养后可以诱导产生大量的细胞团和愈伤组织,所形成的愈伤组织也具有较高的绿苗分化能力^[1]。

1.4 改两步成苗为一步成苗 水稻花药培养一般是先在含2,4-D(2mg/l)的培养基上进行脱分化培养,形成愈伤组织,然后再转入含适当比例KT、IAA(2mg/l;1mg/l)的培养基上,再分化出绿苗(可称为两步成苗),如果由花药通过诱导形成胚状体途径而直接成苗(可称为一步成苗),即花药在培养基上不需二次转移,在原培养基上即可成苗,将简化操作程序,缩短培养时间,节省人力、物力、财力,大大提高花培工作效率。由胚状体途径直接成苗在水稻上的成功报道是通过调节激素配比,每100枚粳稻花药平均可以产生25个花粉植株;中国水稻所利用苯乙酸做诱导剂获得了亚优2号直接成苗后代,幼苗再生率达2.69%^[2](见表1)。

表 1 三种不同激素对比对一次成苗效果的影响

| 激素配比(mg/l) | 突破点 | 试验单位 | 一次成苗绿苗频率(%) |
|---------------------------|--------|---------------------|---------------|
| ①2,4-D(0.01)+KT(3)+NAA(4) | | 中国水稻所 黑龙江省农科院水稻所 | 1.844.94 0 |
| ②NAA(4)+6-BA(0.5)+PAA(10) | PAA的作用 | 中国水稻所 | 0.390.92 |
| ③IAA(2)+GA(0.1)+KT(3) | GA的作用 | 黑龙江省农科院水稻所 | 0.44 |

1.5 各种有效处理方法协调统一,提高绿苗生产率 提高水稻花药培养力的关键在于启动小孢子的雄核发育。研究发现,低温处理、2,4-D浸茎节处理、热处理、干燥处理等均有提高花药培养力的效果。1998年对如何协调各处理方法的关系进行了研究,结果表明,以低温处理+热处理、低温处理+2,4-D浸茎节的双因子效应和低温处理+2,4-D浸茎节+热处理的三因子效应均好于只低温处理(CK)。其中低温处理+2,4-D处理,绿苗生产率是对照的2~3倍(见表2);低温处理+热处理试验结果如下(见表3)。

赵成章、吴连斌等报道了干燥处理对由种子产生的愈伤组织的绿苗分化率的影响^[3],发现干燥处理4天,愈伤组织失水率达50%以上,不同品种绿苗率由0提高到16%66%。由此启示我们,分化培养基中增加琼脂含量可能会提高绿苗分化率。冯双华、李阳生等的研究证实了这一点^[4]。

1.6 人工加倍,提高二倍体频率 水稻花培自然加

表 2 2,4-D (4mg/l) 浸茎节处理对绿苗生产率的影响

| 年份 | 接种组合个数 | 绿苗分化率(%) | | 绿苗生产率(%) | | 是对照的倍数 (倍数的范围) |
|------|--------|----------|------|----------|------|-------------------|
| | | 处理 | 对照 | 处理 | 对照 | |
| 1997 | 1 | 46.2 | 0 | 11.13 | 0 | |
| 1998 | 4 | 28.6 | 9.98 | 4.44 | 1.69 | 2.63(1.83.3) |
| 1999 | 6 | 43.4 | 41.4 | 9.70 | 3.40 | 2.84(0.6917.3) |

表 3 热处理对愈伤组织诱导率的影响

| 年份 | 剑叶叶鞘 | 适宜处理时间(秒) | | 是对照的倍数平均数 |
|------|------|-----------|-----|-----------|
| | | 4045℃ | 60℃ | |
| 1997 | 有 | 180240 | <10 | 2.49 |
| 1998 | 无 | 60120 | <5 | 3.1 |

倍成二倍体频率占40%以上(粳稻可达55%以上)^[1]据黑龙江省农科院水稻所25年的花培育种应用研究表明,粳稻花药培养的后代,自然加倍率与愈伤组织转移时期有密切关系(见表4)。花药接种培

养到愈伤组织转移天数在 70 天以内, 愈伤组织 1-2mm, 幼苗分化频率高, 形成绿苗自然加倍率平均不到 20%; 花药接种培养到愈伤组织转移天数在 7080 天, 愈伤组织似小豆粒大小, 幼苗分化频率较前者高, 形成绿苗自然加倍率可达 99%; 花药接种培养到愈伤组织转移天数在 80100 天, 愈伤组织似黄豆粒大小, 幼苗分化频率低, 形成绿苗全为自然加倍株。因此理论上可以用延长花药接种到愈伤组织转移天数的办法, 来提高二倍体频率。但长期以来, 由于接种愈伤组织块过大, 使绿苗分化率大幅度降低, 而限制了这一成果的应用。上述的低温处理+2, 4-D 浸茎节处理可提高绿苗生产率 12 倍, 而绿苗分化率并未显示出降低趋势。使这一成果的应用成为可行。

表 4 转移愈伤组织大小与二倍体频率的关系

| 转移天数(d) | 愈伤组织大小(mm) | | 二倍体频率(%) |
|---------|------------|-------|----------|
| < 70 | 12 | 小米粒大小 | < 20 |
| 7080 | 24 | 绿豆粒大小 | 90 左右 |
| 80100 | 46 | 黄豆粒大小 | 接近 100 |

提高二倍体频率更为有效的办法是人工加倍。单倍体的人工加倍可以在培养过程中的任一环节进行。主要有 3 种方法, a. 花培初期处理, 先将花药接种在秋水仙碱溶液中, 培养 2 天, 再转到无秋水仙碱的培养基上; b. 苗期处理, 将未拔节分蘖, 纵切小口后用秋水仙碱溶液浸 23 天; c. 单倍体幼穗切块离体培养, 即幼穗切片培养产生愈伤组织再用二甲亚砷和秋水仙碱混合液浸 24h, 转移到分化培养基培养^[1]。这三种方法虽然加倍效果较好, 但操作复杂, 不利于花培绿苗生产上的大量处理。考虑培养过程中易发生变异的因素, 认为后期进行加倍处理更为合适。1997 年采用绿苗转入壮苗培养基前两天, 用秋水仙素与二甲亚砷的混合液处理, 在以后培养中, 初步证明这种方法的有效性。至于, 加倍率及最适的处理浓度和处理时间, 以及在哪一个培养阶段处理更合适, 有待于进一步试验。

1.7 应用生长延缓剂, 培育壮苗, 提高成苗率 实践证明, 经组织培养获得的幼苗, 素质较弱, 一旦从培养基中取出, 难以适应外界环境条件, 因而成苗率较低。花药培养的幼苗也不例外。1997 年使用生长延缓剂—多效唑处理幼苗, 取得了良好效果。一般管理条件下, 以移栽超过 3cm 大小绿苗计, 一丛分成若干单株, 不进行多效唑处理的绿苗成活率不到 60%(苗较细弱、根少、温室高温难以控制), 而使

用多效唑处理的绿苗成活率可达 90% 以上(见表 5)。据观察结果, 多效唑的壮苗效应, 一方面减弱了苗的向上生长, 增强了苗的横向生长, 使苗矮壮, 叶片舒展; 另一方面促进了根的形成, 根白粗壮, 从而提高了绿苗适应不良因子的能力, 提高了绿苗成活率。多效唑对壮苗效果的影响, 可能还受到环境温度和花药遗传因素的影响。培养过程中, 形成少量类侏儒苗—叶片宽展, 根白粗壮, 株高向上生长极慢(可能温度低时多效唑对绿苗有抑制作用或存在对多效唑敏感基因型, 或与绿苗倍性有关), 成因有待于进一步研究。生产上有许多生长抑制剂, 如 B9, CCC, PP333 等, 其壮苗作用如何, 有待于试验, 以寻找一种没有副作用的更好的壮苗调节剂。

表 5 多效唑(1.52.0mg/l)处理对壮苗作用的影响

| | 苗 | | 根 | 叶 | 土培状况 | 成活率(%) |
|----|-----|----|---|------|---------------------|--------|
| 处理 | 粗矮壮 | 白粗 | 壮 | 宽色深 | 不需炼苗, 栽后苗直立, 缓苗快 | > 90 |
| 对照 | 细高弱 | 白细 | 长 | 细长色浅 | 需炼苗, 栽后多数苗弯向地面, 缓苗慢 | < 60 |

2 总结与讨论

2.1 水稻花药培养技术及改进环节(见图) 图中: 中央方框内为通常采用的花药培养程序, 左为进一步成苗, 右方框为花药培养技术改进途径、提高效率的可能技术环节。2、4、8 划“√”, 表示该技术我们已经在实际应用, 并取得良好效果; 1、3、5、6、7 划“*”, 表示该技术是前人研究成果, 我们没有进行试验(1、3、5)或我们自己试验效果较好, 由于种种原因没有得到应用(6、7), 其中 6 是由于操作复杂, 受环境影响较大; 如果转管壮苗之前, 加倍效果较好, 则没有必要进行 7 的操作; 9 是由多效唑对绿苗的不同作用受到启示, 设想增加土培绿苗二倍体数的可能方法, 如果转管壮苗之前, 加倍效果较好, 则没有必要进行此操作。

2.2 讨论 水稻花药培养是一项比较复杂的技术, 要获得较高的绿苗生产率, 除了在上述几方面加强研究外, 前人的研究经验尤为重要, 如接种前的花粉小孢子发育时期处于单核后期和低温预处理 10 天左右等。花粉小孢子发育时期既要根据形态指标(最上两叶枕间距 57cm, 颖壳由黄转绿, 花药+花丝长度处于颖壳长度的 1/31/2)鉴定, 又要进行镜检加以确定, 这是提高绿苗生产率的基础, 是关系到以后培养效率的最主要因素。

马铃薯简化培养基, 无论诱导率还是分化率, 均较合成培养基高, 但由于马铃薯来源不同, 产地不同, 贮藏方法不同等, 致使培养效果不稳定。研究发

讨。此外, 由于愈伤组织转移前的组织块大小对加倍频率影响很大, 故在诱导愈伤组织阶段对花药进行处理, 对提高加倍率可能更为有效。

图中“1. 人工加倍处理*”和“3. 理化诱变处理*” : 在脱分化培养基, 加入秋水仙碱, 不但可以明显提高花粉植株中二倍体的频率, 而且愈伤组织诱导率和分化率均有提高^[1]。用⁶⁰Co γ 射线(100-2 000伦琴)照射接种后的花药, 大部分品种可以提高愈伤组织诱导率和绿苗分化率^[1]。近几年, 诱变技术的成功应用, 为了快速获得可利用变异材料, 使人们将诱变技术与花药培养技术联系起来, 并在玉米、水稻、谷子作物上得到了应用^[6, 7, 8]。

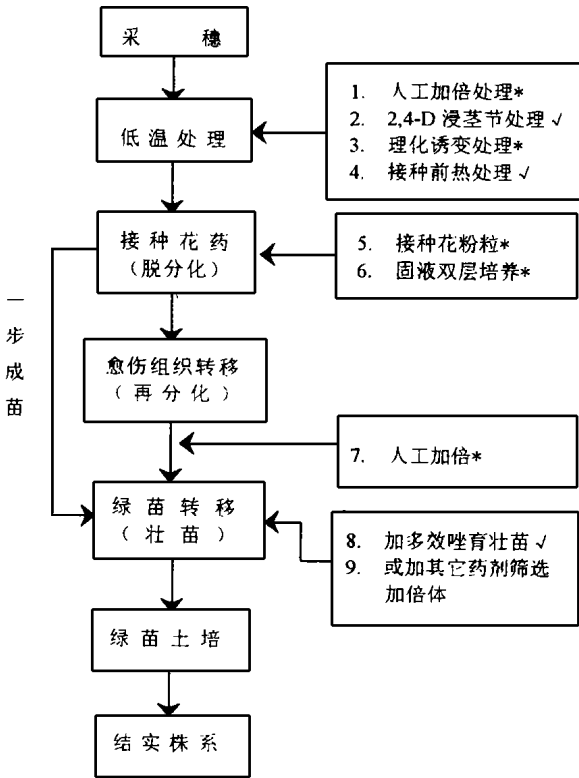


图 花药培养全过程及研究途径

现, 固液双层培养法在愈伤组织诱导率、绿苗分化率均显著高于固体培养基和液体培养基, 但操作复杂, 未能应用。花粉粒培养一步成苗是提高水稻花培效率的重要途径, 其关键在于找到一种有效的启动小孢子发育方法; 2, 4-D 浸茎节处理可使花药绿苗生产率提高 12 倍, 对花粉粒培养或者类似的方法, 用其它药剂取代 2, 4-D 处理是否有效有待于继续探

参 考 文 献

[1] 胡含、陈英等. 植物体细胞遗传与作物改良. 北京农业大学出版社, 2796

[2] 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): 3742

[3] 赵成章、吴连斌等. 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(1): 3943

[4] 冯双华、李阳生. 琼脂浓度对水稻花药绿苗率的影响. 中国农业科学, 1998, 31(3): 8688

[5] 张志雄等. 激素对水稻花药培养力的影响研究. 西南农业大学学报, 1992, 14(4): 351356

[6] 赵永亮、宋同明、马惠平. 利用花粉诱变快速创造特用玉米新种质. 作物学报, 1999, 25(2): 157161

[7] 王侯聪、邱思密、陈如铭. 水稻成熟花粉诱变育种的研究进展. 中国农业科学, 1995, 28(3): 96

[8] 董云洲、段胜军、赵连元等. 用基因枪转化花粉获得转基因谷子和玉米. 中国农业科学, 1999, 32(2): 913