

综 述

# 花药培养在早粳种质创新中的应用

孙岩松, 潘国君, 张淑华, 张云江, 关世武

(黑龙江省农科院水稻所, 佳木斯 154026)

**摘要:** 我国粳稻花培种质创新 30年来,在培养条件不断完善优化的同时已有 20 个品种经省级审定大面积推广种植,累计种植面积在 133.7万  $\text{hm}^2$  以上。还有一大批新品系在试验试种,这些新种质由于综合性状优良,配合力、培养力、再生能力强而被广泛用于水稻品种改良。实践证明,粳稻花培具有群体规模小、稳定世代早、优异重组类型多、选择效率高的育种优势。

**关键词:** 粳稻; 花培; 种质创新; 选择效率; 超亲

**中图分类号:** S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002- 2767(2000)04- 0040- 04

自 1968年 Niizeki和 Oono通过水稻花药离体培养形成愈伤组织并分化出再生小植株开始,揭开了人类采用花药培养创造水稻新种质的序幕。至今 30年来,在培养基的改良、接种幼穗的选择与处理、培养条件的优化等方面都取得了长足的进展。N<sub>6</sub>培养基的提出大大提高了水稻花药愈伤组织诱导频率(朱至清等, 1976)<sup>[1]</sup>。用马铃薯提取液为基本成分制成的马铃薯简化培养基可以代替 Miller MS White 培养基<sup>[2- 3]</sup>。为提高愈伤组织的绿苗分化频率,在生长素、细胞激动素、氨基酸、碱基类化合物、生长阻碍剂、糖等不同配方的培养基研究中(Oono, 1975)认为,高浓度的糖和低浓度的生长素、6- 苄基腺嘌呤或酵母浸出液、酪蛋白水解物为三种重要的培养基<sup>[4]</sup>。水稻花粉发育的单核晚期是接种花药离体培养的最好时期(王敬驹等, 1974)<sup>[5]</sup>。用水稻植株生长的外部

形态指标推断花粉发育时期,可以大大减少镜检工作量,并准确选取处于最佳接种期的幼穗<sup>[6]</sup>。花粉愈伤组织出现后第 10天,转移到分化培养基上,其中 70% 的愈伤组织可再生植株<sup>[5]</sup>。液态培养基产愈率明显高于相同配方的固态培养基,但两种状态培养基上形成的愈伤组织的绿苗分化率则相反<sup>[6]</sup>。对水稻幼穗进行 8~ 10℃ 下的低温预处理 9~ 12天,可以明显提高水稻花药愈伤组织的诱导频率<sup>[6]</sup>。经 10℃ 左右低温预处理 11~ 12天,再将花药在液态培养基上漂浮预培养 4~ 7天及 10天以上,产愈率及其绿苗分化率均明显提高<sup>[7]</sup>。高浓度的 2, 4- D可以促进白苗的发生,培养温度和花粉白苗的发生频率有密切联系,温度越高白苗越多<sup>[8]</sup>。多效唑与其他激素配合使用能有效地提高水稻再生苗素质和移栽成活率,并可延长再生苗在试管的保存时间<sup>[9]</sup>。在

\* 收稿日期: 1999- 10- 14

基金项目: 国家“九五”攻关课题 96- C01- 01- 01- 04; 本文经胡含先生指导和审改,特此致谢。

作者简介: 孙岩松(1942- ),男,研究员,从事水稻育种研究。

5. 1 培育壮秧,控制播量,适期播种,提高秧苗素质

5. 2 适时插秧,稀植栽培 该品种分蘖能力较强,且穗粒数较多,可稀植栽培,以 30cm× 12~ 16cm 插秧规格为宜,穴插 3~ 4株苗,充分发挥个体优势,以优良的个体建造优良的群体,达到高产。

5. 3 该品种秆强,抗倒性能好,中等肥力水平,化肥用量: 尿素 200kg / $\text{hm}^2$  左右,按基: 蘖: 穗: 粒肥

为 4: 3: 2: 1比例施用;磷酸二铵 100kg / $\text{hm}^2$ ,以基肥一次施用;硫酸钾肥 100kg / $\text{hm}^2$ ,基施 50%,穗肥施用 50%。

5. 4 合理灌溉 水稻生育前期浅水灌溉,中后期采用浅湿干灌溉方法,后期不可过早停灌或排水。

5. 5 健身与防病 在水稻稻瘟病重发生年份,要注意防病,在水稻中后期叶面喷施磷酸二氢钾或惠满丰等健身药品,促进后期植株稳健生长。

MS N<sub>6</sub>或 C<sub>7</sub>培养基中添加 Bi-MET和 6-BA 可使水稻花培试管苗在最低水平维持生长越冬保存<sup>[10]</sup>。

由于水稻花药离体培养的技术不断改进完善,使之成为我国粳稻种质创新的成功途径,并在花培育成品种的推广应用方面领先于日本<sup>[11]</sup>。

### 1 早粳种质创新的迫切性与艰巨性

亚洲栽培稻的起源有印度、喜马拉雅山东南麓和中国华南、云贵高原、长江中、下游及长江中游-淮河上游的不同说法<sup>[12-13]</sup>。其共同之处是,亚洲栽培稻及中国栽培稻起源于 20°-30°N 左右的热带和亚热带季风气候区。即高温、短日照、湿润气候区。这与 43°23'~53°34'N 的黑龙江省寒冷地稻作区的低温、长日照气候相比形成强烈的反差。

由于远离水稻起源地,使寒地稻区的种质资源经历了漫长的驯化改造过程,由适宜区向非适宜区不断拓展,在严酷的条件下进行压力选择。上下数千年南北数千里的时空跨越,把起源地的高温短日照水稻,逐渐变成了高纬度的低温长日照水稻,然而能适应新环境的种质数量大大减少。我国保存的稻种资源有 46 832份<sup>[14]</sup>,编入全国地方品种资源目录的品种共有 46 885份<sup>[15]</sup>,其中北方 14省、市、自治区合计仅有 1 006份,平均每省只有 72份,而水稻起源地附近的南方稻区 16省、市、自治区共有 45 879份,占全国总数的 97.9%,平均每省有 2 869份。因此,北方稻区,尤其是黑龙江稻区,水稻种质资源贫乏,育种取材范围狭窄。引入材料绝大部分与寒地稻生态型差异太大,创造具有寒地水稻特定生态型的新种质就显得特别迫切和艰巨。多年育种实践发现,起源地附近的水稻生态型和高纬度水稻生态型差异极大,且前者的遗传保守性极强,后者的遗传动摇性强,两者杂交,后代猖狂分离,长达 8代也难以稳定,绝大多数特征倾晚熟一方<sup>[16]</sup>,有益变异类型极少。采用花药培养技术进行种质创新使分离世代长、选择难度大的问题得以解决。

### 2 我国粳稻花培种质创新的成就

我国水稻花培育种 30年来,最多时有 1 000个以上的单位开展<sup>[11]</sup>,后来大部分单位转入生物技术基础理论研究和应用技术开发研究,有部分单位继续开展粳稻花培新品种选育研究,操作技术水平和育成品种质量不断提高。

1976年首次育成花育 1号、花育 2号(天津农科院)、单丰 1号(黑龙江省农科院育种所等)、牡花 1号(牡丹江农科所)、合单 74-142(合江水稻所)、

舒花 1号(吉林舒兰良种场)等一批粳稻花培新品系<sup>[13,18]</sup>。因综合性状不够理想,均未能经审定大面积推广种植。其后陆续选育出一批优良粳稻花培新品种,通过省级农作物品种审定委员会审定推广,初步统计有 20个(见表)。另外还有中花 13、中花 14、中花 15(中国农科院作物所)、鄂花 3号(湖北农科院粮作所)、花 12(湖南农科院水稻中心)、花培 528(上海农科院)、H<sub>5</sub>(辽宁盐碱所)、94-7-93-2-93-10(河北稻作所)<sup>[19]</sup>、龙花 91-340(黑龙江省农科院水稻所)等一批花培新品系。上述粳稻花培新种质直接利用累计种植面积在 133.7万 hm<sup>2</sup>以上。间接利用作杂交亲本也发挥出极大的作用。

黑龙江省农科院水稻研究所 1976~1997年的 22年间,共接种 646个杂交组合的 F<sub>1</sub>代花药获得 H<sub>1</sub>代绿苗 44 688株,入选参加产量鉴定试验的花培新品系有 111个。其中经审定推广的花培育成品种有合江 21、龙粳 1 3 4 7 8号共 6个(见表)。创新构建的花培新种质材料中表现优良用作杂交亲本的材料有 37份,参与配制杂交组合共有 1 041份次,其中合江 21(合单 76-085)用作杂交亲本 168次,龙粳 1号(合单 80-036)用过 307次,龙粳 3号(龙花 83-046)用过 57次,龙粳 4号(龙花 83-079)用过 62次,龙花 84-106用过 54次,龙选 948用过 91次。用这些种质作亲本育成的品种(系)有:龙粳 2 3 4 5 6 7号、黑粳 7号、龙花 84-106、龙花 95-373、龙花 95-385、龙花 95-581、龙花 91-340、龙交 89068A、龙选 9551、龙花 95-345、龙花 95-346、龙花 95-348、龙花 97-1311、龙花 97-1400、龙花 97-1478等大批材料。

### 3 粳稻花培种质创新中的几个问题的讨论

3.1 关于粳稻花培 H<sub>1</sub>代植株的群体规模 通常常规的杂交育种每个杂交组合 F<sub>2</sub>群体规模应是 2<sup>n</sup>个体(n为互换连锁的基因对数)。水稻 12对染色体以 1/4 096的频率重组。因此,常规 F<sub>2</sub>每组合群体数从理论上计算 2<sup>2×6</sup>=4 096个体。而花培 H<sub>1</sub>只有 2<sup>6</sup>=64株就够了<sup>[17]</sup>。育种者的希望在于配合力好的组合。为合理减少选种圃面积,实际上大多数育种单位 F<sub>2</sub>群体规模控制在 2 500株左右。从实际出发,花培 H<sub>1</sub>代群体规模控制在 50株左右则可。花培群体大小不仅是占地和温室面积多少问题,而是接种规模受限,育种成本提高。黑龙江省农科院水稻所 25年花培育种实践启示是,配合力差的组合, H<sub>1</sub>群体再大也难有理想株系入选,而配合力好的组合,即使 H<sub>1</sub>群体小一点,也有优良株系入选。

表 粳稻花培育成品种统计

品种	育成单位	审定通过		种植面积 (万 hm <sup>2</sup> )		获奖情况
		年份	省、(市)	最高年	累计	
合江 21	黑龙江省农科院水稻水	1983	黑龙江	4. 1	35. 5	1987,省农业科技进步三等奖
龙粳 1号	黑龙江省农科院水稻所	1988	黑龙江	1. 3	4. 0	
龙粳 3号	黑龙江省农科院水稻所	1992	黑龙江	6. 1	32. 3	1996,省星火二等奖
龙粳 4号	黑龙江省农科院水稻所	1993	黑龙江	5. 4	12. 5	1996,国家攻关一等奖
龙粳 7号	黑龙江省农科院水稻所	1998	黑龙江	0. 3	0. 3	2000,市科技进步一等奖
龙粳 8号	黑龙江省农科院水稻所	1998	黑龙江	5. 0	6. 1	2000,省农业科技进步一等奖
中花 8号	中国农科院作物所	1985	天津北京	1. 7	5. 3	1986,部优质产品奖
中花 9号	中国农科院作物所	1985	辽宁天津	3. 8	14. 0	1985,部科技进步二等奖
中花 10号	中国农科院作物所	1987	天津	8. 0	13. 3	1989,国家攻关一等奖
中花 11	中国农科院作物所	1989	天津	1. 7	4. 5	1991,国家攻关一等奖
中花 12	中国农科院作物所	1992	天津	1. 0	5. 9	
京花 101	北京市农林院作物所	1991	北京			
京花 103	北京市农林院作物所	1992	北京			
花 87- 7	河北唐海农科所	1992	河北 (预审)			
冀粳 10号	河北省农垦所	1988	河北			
晋稻 1号	山西农科院作物所	1983	山西			
延粳 17	吉林延边农科所	1990	吉林			
宁粳 6号	宁夏农科院作物所	1984	宁夏			
宁糯 1号	宁夏农科院作物所	1986	宁夏			
宁粳 11	宁夏农科院作物所	1990	宁夏			

3. 2 关于粳稻花培后代的稳定性 在花培过程中,小孢子中的单倍染色体会自然加倍形成纯合二倍体,只用一个试管再生植株的过程就完成了常规育种 F<sub>2</sub>- 稳定后代的 3~ 5个分离世代,而且通过花药培养,易激起小孢子隐性基因的暴露,可以早代选择和淘汰<sup>[20]</sup>。有报道 98%的株系其各种性状的表现是整齐一致的<sup>[22]</sup>。多数报道都认为 H<sub>2</sub>代花粉植株的群体中,90%左右的个体,在形成 H<sub>2</sub>代株系时,株系内性状整齐一致,并能稳定遗传<sup>[17]</sup>,无分离现象出现,在粳稻花培育种实践中充分证实了这一点。当然事物的统一性和一致性是相对的,说稳定和不分离也是相对的,在黑龙江省农科院水稻研究所花培育成的龙粳 1号、龙粳 3号、龙粳 8号等品种中,在其 H<sub>2</sub>株系内均表现出各性状的整齐一致,且各组合株系内整齐一致的株系比例在 98%以上;但其后试验、推广大面积种植过程中也出现过性状相近、差异不十分明显、小于 1%比例的变异分离个体,原因是什么尚不清楚。但只要严格制种标准并不影响品种的整齐度和丰产性。从育种利用率的角度看,用 F<sub>1</sub>作药源,可以保证花培后代多样性。但无论单

交或复交材料,以 F<sub>2</sub>代抗瘟材料作药源较 F<sub>1</sub>代可获得较多的抗病株系<sup>[20]</sup>,选用 F<sub>3</sub>优良单株作药源进行花培是提高 H<sub>2</sub>绿苗育种利用率的好途径<sup>[24]</sup>。

3. 3 关于粳稻花培后代的优异重组体类型 由于花粉植株是小孢子再生植株,可以充分表现出药源杂合体减数分裂所产生的各种配子的基因型。因此只要群体规模合理,加倍单倍体形成的纯合二倍体能使各种性状得到充分表达。同时由于单倍体自然加倍过程中,没有有性授精过程中配子的竞争,加之培养过程中可能出现诱导基因突变,使花培后代的遗传类型较之常规杂交后代有可能更丰富一些,也许由于这种原因使粳稻花培育种经常出现优异重组体,有报道用 IR70/Khonoru110组合 F<sub>1</sub>代花药培养获得 21个株系,其中 DH<sub>1</sub>、DH<sub>2</sub>、DH<sub>3</sub>、DH<sub>4</sub>等品系均表现产量超双亲;花培不仅可以加速纯合体的固定,也许还促进了优异重组体的体外筛选<sup>[21]</sup>。花粉植株的多样性及其突变型(王则儒等,1981)得到肯定,每穗总粒数、结实率、粒重等经济性性状常常出现超过亲本,同时会产生特殊的类型,如特别矮小的植株(株高只有 4cm);有高节位丛生状分蘖的植株,

还有双层颖壳的植株<sup>[22]</sup>。黑龙江省农科院水稻研究所花培育成的龙粳 1号属早粳中偏矮秆偏大穗型品种,其大穗特性超过双亲。花培育成的龙粳 3号为 4亲本复合杂交后代,属早粳中偏紧穗型品种,其穗部着粒密度、茎秆强度、颖色深度均超过 4个亲本中任何一个;花培育成的龙粳 8号是 3亲本复合杂交后代,其早熟性、多穗性、优质性 3个性状均超过任何一亲本。在早熟性、优质性、抗病性、丰产性和适应性各方面龙粳 8号都表现比较突出,属多优集成早粳品种<sup>[23]</sup>,这一实践说明,花培技术可以实现水稻多亲本、多个优良性状的聚合和固定。通过花药培养(李梅芳等,1983),可以把 Tetep 及 Tadukan 的抗瘟性稳定在后代株系中,逐步累加、聚合多种优良性状<sup>[20]</sup>。而且有些新种质,如中花系列品种有很好的培养力和再生能力而被广泛利用。

3.4 关于粳稻花培种质创新的选择效果 在粳稻种质创新中,应用花培技术,可加速稳定,并可诱导出染色体代换系和染色体附加系。尤其在亚种间杂交、地理或生态远缘材料间杂交时加速纯合及早选择更为重要。从这个意义上讲提高选择效率已被许多研究证实<sup>[4,6,7,17,20]</sup>。

统计黑龙江省农科院水稻所 1976~1997 年花培共接种 646 个组合育成花培品种 6 个,占接种组合数的 0.93%,同时常规育种共配制杂交组合 2 505 个,育成常规品种 7 个,占杂交组合数的 0.28%,以组合为基数计算育成品种的选择效率,花培育种是常规育种的 3.3 倍。花培后代的选择效率比常规杂交后代的选择效率高,除上述讨论过的遗传类型丰富,优异重组体和突变类型的出现和多个优良性状聚合等原因外,还因为两种相同来源不同经历的后代材料在选择中难易程度相差甚远。在育种过程中,常规的杂交后代分离世代要在上下代间不断变异的运动中选择,其难度很大。因此,其中即便存在优良变异个体要代代准确及时入选的机率也较小,而在绝大多数的花培  $H_1$  代株系内,表现各种性状整齐一致,一目了然,株系间容易观察比较和进行特性鉴定,有利于准确选择,及时决选。

## 参考文献:

- [1] 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(B辑),1975,(5): 484~490.
- [2] 中国科学院遗传研究所,黑龙江省合江地区水稻研究所.水稻

- 培养基全过程简化基本成功[J].遗传与育种,1976,(5): 11~12.
- [3] 中国科学院遗传研究所,黑龙江省合江地区水稻研究所.粳稻花药培养马铃薯简化培养基的研究[J].遗传学报,1974,(4): 302~309.
- [4] 大野清春.水稻的组织培养与遗传工程[A].武汉大学生物系遗传研究室译.水稻生物学[M].武昌:武汉大学出版社,1988. 422~461.
- [5] 王敬驹,朱至清,孙敬三.水稻花粉植株的诱导条件及影响诱导频率的某些因素[J].植物学报,1974,(1): 43~54.
- [6] 许世寰.粳稻花粉植株诱导的研究[J].黑龙江农业科学,1985,(1): 11~17.
- [7] 陈英,左秋仙,李淑媛,等.水稻游离花粉培养诱导形成绿色植株及有关作用因素的研究[J].遗传学报,1981,(2): 158~163.
- [8] 王敬驹,孙敬三,朱至清.离体培养因素对水稻花粉白苗发生的影响[J].植物学报,1977,(3): 190~199.
- [9] 赵成章,戚秀芳,郑康乐,等.多效唑连用其它植物激素对水稻试管苗生长的影响[J].遗传学报,1992,(5): 453~458.
- [10] 王永新,刘亚琴,张启星.水稻花培苗试管保存技术的研究[J].河北农业大学学报,1998,(20): 6~9.
- [11] 岛田多喜子,中国におけるイネ・コムギ药培养现状[J].农业及び园艺,1991,(1): 19~22.
- [12] 汤圣祥.栽培稻的起源和演化[A].闵绍楷,申宗坦,熊振民.水稻育种学[M].北京:中国农业出版社,1996. 64~89.
- [13] 王象坤,张居中,陈极章,等.中国稻作起源研究上的新发现[A].王象坤,孙传清.中国栽培稻起源与演化研究专集[M].北京:中国农业大学出版社,1996. 8~13.
- [14] 应存山.稻属遗传资源的保存与研究[A].闵绍楷,申宗坦,熊振民.水稻育种学[M].北京:中国农业出版社,1996. 90~116.
- [15] 应存山.中国栽培稻种质资源的收集、整理与编目[A].应存山.中国稻种资源[M].北京:中国农业科技出版社,1993. 29~45.
- [16] 朱学鹏.水稻分蘖性状遗传和应用的研究[J].黑龙江农业科学,1984,(6): 24~28.
- [17] 孙宗修.组织培养[A].闵绍楷,申宗坦,熊振民.水稻育种学[M].北京:中国农业出版社,1996. 246~291.
- [18] 耿文良,冯瑞英.中国北方粳稻品种志[M].石家庄市:河北科学技术出版社,1995. 14~300.
- [19] 孟祥祯.水稻新品系 93-10 的特征特性及高产栽培技术[J].河北农垦科技,1998,(1): 26~30.
- [20] 李梅芳,倪丕冲,陈银全.应用花药培养选育抗稻瘟病品种的研究[J].作物学报,1983,(3): 173~179.
- [21] 马素芬.译自 IRRN,1996,(21): 1,通过花药培养生产耐寒品种[J].河北农垦科技,1997,(4): 48~49.
- [22] 王侧信,冯玉生,潘汶.水稻花粉植株遗传学的初步研究[J].遗传,1981,3(2): 19~23.
- [23] 孙岩松,潘国君,吕彬,等.从龙粳 8 号的选育看利用综合育种技术实现多优集成[J].作物品种资源,1998,(4): 6~8.
- [24] 曹华兴.提高水稻花培再生绿苗( $H_1$ )育种利用率的探讨[J].上海农业学报,1992,8(2): 15~18.