

水稻花药培养的影响因素研究

马文东¹,李修平²,李智媛³

(1. 黑龙江省农业科学院 佳木斯水稻研究所,黑龙江 佳木斯 154026;2. 佳木斯大学 生命科学学院,黑龙江 佳木斯 154007;3. 黑龙江省农业科学院 信息中心,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为更好地研究水稻单倍体育种和转基因技术,加速水稻育种进程,以10份寒地水稻品种为试验材料,采用单因素试验方法,研究培养基的琼脂浓度、激素配比、马铃薯水提取液附加物添加及培养方式等因素对水稻花药培养愈伤组织诱导率的影响,优化寒地水稻品种花药组织培养条件。结果表明:10个品种花药组织培养,愈伤组织诱导率差异明显;在琼脂浓度为0.75%左右时,愈伤组织的诱导率达到最高;培养基中激素配比为KT(2 mg·L⁻¹)+IAA(1 mg·L⁻¹)时诱导效果最佳;培养方式研究中,在双态培养方式下花药愈伤组织诱导率最好,其次为液态培养,再次为固态培养;培养基中添加马铃薯水提取液各处理间差异不显著。

关键词:水稻;花药;琼脂浓度;激素配比;培养方式;马铃薯水提取液

中图分类号:S511.035

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)11-0001-04

水稻花药培养是单倍体育种的重要手段,对于加速育种效率具有重要意义。水稻花药培养在单倍体育种中的应用研究已有相关报道^[1-5],多种植物的花药培养也为水稻花药培养提供了参考^[6-8]。同时水稻花药培养可为转基因提供新的再生体系,为水稻分子育种提供理论依据。由于水稻花药培养中还存在愈伤组织诱导率低,分化成苗率低等问题,为提高水稻花药培养的效率,培养条件和培养方式一直是研究者们探讨的热点^[9-12],也是水稻花药培养中亟待解决的问题。

该研究以10份寒地水稻品种为试验材料,研究不同琼脂浓度、激素配比、培养方式以及马铃薯水提取液添加等因素对水稻花药组织培养的影响,优化寒地水稻品种花药组织培养条件,以期水稻单倍体育种与水稻转基因研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以龙粳20、龙粳21、龙粳24、龙粳25、龙粳29、龙粳35、龙粳37、空育131、垦稻12、龙粳香1号为试验材料,这10个品种为寒地水稻优良品种,种植面积广,品质优良,是优良亲本材料。选

择其中一份作为培养方法优化试验的试验材料。

1.2 方法

1.2.1 花药培养方法 采集雄核发育处于单核晚期至双核期的幼穗(未开花),低温(8~9℃)预处理7d左右,外植体灭菌(0.1%升汞溶液,15 min),接种于含2 mg·L⁻¹KT、1 mg·L⁻¹IAA的MS诱导培养基中诱导愈伤组织,每个三角瓶50枚花药,在温度为25℃、湿度为60%~70%的环境下暗培养。愈伤组织形成后(长到2 mm左右)统计愈伤组织的出愈率并记录。转入含2 mg·L⁻¹KT和1 mg·L⁻¹IAA的MS分化培养基中,分化培养基中大量元素、微量元素、铁盐以及维生素B₁、B₆浓度减半,补充光照9~10 h,光照强度为2 000 lx,7~10 d分化出胚状体,10~15 d再分化出绿苗。

1.2.2 不同品种花药组织培养的差异 以10个供试品种作为材料,培养方法同1.2.1,每品种3次重复,调查愈伤组织诱导率。

1.2.3 不同培养基琼脂浓度下愈伤组织诱导率的测定 培养方法同1.2.1,琼脂浓度设置4个处理,分别为0.65%、0.70%、0.75%及0.80%,每个处理3次重复。观察愈伤组织诱导率。

1.2.4 不同激素比例下愈伤组织诱导率的测定 培养方法同1.2.1,激素浓度设置为2,4-D(0.01)+KT(3)+NAA(4)、NAA(4)+6-BA(0.5)+PAA(10)、IAA(1)+KT(2)(单位为mg·L⁻¹)3个处理(配比方案参照潘国军等^[10]的研究),每个处理3次重复,诱导形成愈伤组织,统计愈伤组织诱导率。

1.2.5 马铃薯水提取液添加处理下愈伤组织诱导率的测定 培养方法同1.2.1,设置添加马铃

收稿日期:2013-08-21

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAD35B02-01-01,2012BAD04B01-01-01);佳木斯大学2011年度重点科研课题资助项目(11052)

第一作者简介:马文东(1980-),男,黑龙江省桦南县人,硕士,助理研究员,从事水稻遗传育种研究。E-mail:sdsmawendong@163.com。

通讯作者:李修平(1981-),女,山东省莱西市人,博士,副教授,从事作物遗传育种与生物技术研究。E-mail:lixuiping200@163.com。

薯水提取液浓度为 5%、10%、15% 以及不添加 4 个处理,每个梯度 3 次重复。诱导形成愈伤组织,统计愈伤组织诱导率。

1.2.6 不同培养方式下愈伤组织诱导率的测定

取单核晚期至双核期的幼穗花药,按 1.2.1 中培养方法将花药置于固体、液体和液固双态培养基上进行诱导,统计愈伤组织诱导率。

1.2.7 数据分析 愈伤组织诱导率(%)=形成愈伤组织的块数/接种花药数 \times 100。

利用 SAS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同品种的愈伤组织诱导率分析

试验对 10 个水稻品种在相同培养条件下培养,每个品种 3 次重复,统计愈伤组织诱导率并进行品种间的对比分析,并对 10 个品种间愈伤组织诱导率进行了方差分析,结果表明:不同品种间愈伤组织诱导率差异极显著(见表 1)。

表 1 不同品种愈伤组织诱导率比较

Table 1 The comparison on callus induction rate among different varieties

品种 Varieties	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate			
	I	II	III	平均值 Average
龙粳 25 Longjing25	78.4	79.2	80.7	79.4 aA
龙粳 21 Longjing21	74.8	82.4	80.2	79.1 aA
龙粳香 1 号 Longjingxiang1	57.4	59.2	57.8	58.1 bB
龙粳 37 Longjing37	45.2	49.7	49.5	48.1 cC
龙粳 35 Longjing35	35.6	37.2	40.3	37.7 dD
垦稻 12 Kendao12	38.3	34.1	40.2	37.5 dD
龙粳 20 Longjing20	34.3	31.5	27.2	31.0 eE
空育 131 Kongyul131	18.8	20.3	21.5	20.2 fF
龙粳 24 Longjing24	16.3	15.7	13.2	15.1 ghF
龙粳 29 Longjing29	7.5	9.7	8.8	8.7 hG

注:小写字母表示差异达显著水平($P\leq 0.05$);大写字母表示差异达极显著水平($P\leq 0.01$)。下同。

Note: Lowercases indicate significant difference at 0.05 level; capital letters indicate significant difference at 0.01 level. The same below.

表 3 3 种不同激素对比对愈伤组织诱导率的影响

Table 3 Effect of 3 hormone combinations on callus induction rate

激素配比/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hormone combination	接种数 Inoculation number	愈伤组织块 Callus lines	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate
2,4-D(0.01)+KT(3)+NAA(4)	300	197	65.7
NAA(4)+6-BA(0.5)+PAA(10)	300	218	72.7
KT(2)+IAA(1)	300	230	76.6

2.4 马铃薯水提液对愈伤组织诱导率的影响

以龙粳 37 为试验材料,MS 培养基为诱导培养

2.2 培养基琼脂浓度对愈伤组织诱导率的影响

由于不同品种间出愈率差异显著,去除基因型对愈伤组织诱导率的影响,各因素对花药培养的影响研究均以龙粳 37(龙粳 37 具有高产、抗病、稻米品质优良等特点,是优良的杂交亲本材料)为试验材料,对其在 4 种琼脂浓度下的愈伤组织诱导率进行比较。由表 2 可知,随着琼脂浓度的减少,愈伤组织诱导率表现不同,琼脂含量为 0.75% 时,该品种愈伤组织诱导率最高;愈伤组织诱导率在琼脂含量为 0.75% 以下时,随琼脂浓度的增加而逐渐升高,在琼脂浓度超过 0.75% 时开始降低。不同琼脂浓度下愈伤组织诱导率差异达显著或极显著水平。

表 2 不同琼脂浓度下愈伤组织诱导率比较

Table 2 Comparison of callus induction rate among different agar concentrations

琼脂浓度/% Agar concentration	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate			
	I	II	III	平均值 Average
0.65	34.5	35.2	36.4	35.4 dB
0.70	36.6	37.4	37.2	37.1 cB
0.75	43.5	43.3	42.6	43.1 aA
0.80	39.7	38.5	37.6	38.6 bB

2.3 不同激素比例对愈伤组织诱导率的影响

以龙粳 37 为试验材料,MS 培养基为基本培养基,利用潘国君^[13]研究中的 3 种配方,统计愈伤组织诱导率。

从表 3 看出,KT($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+IAA($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)激素配比条件下,花药通过诱导形成愈伤组织,其愈伤组织诱导率为 76.6%,效果最佳。

基,添加浓度为 5%、10% 及 15% 3 个梯度的马铃薯提取液,以不添加马铃薯水提取液作为对照。在相

同条件下培养,其愈伤组织诱导率见表 4。

对添加马铃薯水提取液设置的 4 个处理所得的愈伤组织诱导率进行方差分析,结果表明,各处理间差异不明显,表明添加和不添加马铃薯水提取液对该研究愈伤组织诱导率无明显效果。

表 4 马铃薯水提取液对愈伤组织诱导率的影响

Table 4 Effect of potatoes water extract on callus induction rate

马铃薯水提取液浓度/% Potatoes water extract concentration	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate			
	I	II	III	平均值 Average
5	37.40	40.40	39.50	39.10
10	38.50	41.00	39.70	39.73
15	37.70	39.10	38.40	38.40
0(CK)	38.20	38.70	40.50	39.13

2.5 不同培养方式对愈伤组织诱导率的影响

由表 5 看出,3 种培养方式中,双态培养的愈伤组织诱导率最高,平均值为 45.7%。其次为液态培养,愈伤组织诱导率平均值为 40.2%,固态培养下愈伤组织诱导率最低,平均值为 32.5%。3 种培养方式下愈伤组织诱导率差异极显著。

表 5 3 种培养方式对愈伤组织诱导率的影响

Table 5 Effect of 3 culture methods on callus induction rate

培养方式 Culture method	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate			
	I	II	III	平均值 Average
固态培养 Solid culture	34.4	32.3	30.8	32.5 cC
液态培养 Liquid culture	40.5	38.7	41.4	40.2 bB
双态培养 Double layer's medium culture	45.6	46.8	44.8	45.7 aA

3 结论与讨论

3.1 培养基琼脂浓度对愈伤组织诱导率的影响

培养基中琼脂浓度的大小对愈伤组织诱导率有一定的影响,琼脂浓度的大小决定着培养基的坚固程度,琼脂浓度高时培养基较坚固,对植株的支持能力强,便于通气观察,但不利于养分与激素的吸收以及废弃物的排出。潘国君等^[13]曾在双态双层培养法提高水稻花药培养的研究中得出,琼脂对培养梗稻花药诱导产生愈伤组织有抑制作用。郭绍华^[14]在其研究中也表示 G369 与 ZZ38 次生胚的发生都随琼脂浓度的增加而得到不同程度的抑制,而 Topas 表现相反。这说明不同琼脂浓度下,次生胚发生的频率可能也受基因型的影响。该研究结果表明,琼脂浓度在 0.75% 时愈伤组织诱导率最高。愈伤组织诱导频率在琼脂含量为 0.75% 以下时,随琼脂浓度的增加而逐渐升高,在琼脂浓度超过 0.75% 时开始降低。

3.2 不同激素的对比对愈伤组织诱导率的影响

激素对愈伤组织的诱导起到了重要作用,已被很多学者证实,只是对于不同的外植体,不同配比的激素诱导的结果不尽相同。Skoog 和 Miller 曾

观察到 IAA 与激动素相对浓度对器官分化的协同作用,此后在很多种组织培养上试验过 IAA 和激动素的相对浓度对器官分化的关系。张红宇等^[15]在其水稻单倍体植株体细胞培养诱导二倍体植株的研究表明,2,4-D 和激动素并用有利于诱导水稻单倍体植株组织形成愈伤组织。该研究结果表明激素配比为 KT(2 mg·L⁻¹)+IAA(1 mg·L⁻¹) 时,花药的愈伤组织诱导率最佳。

3.3 有机添加物对愈伤组织诱导率的影响

在培养附加物的作用方面,培养基中添加附加物对愈伤诱导及其分化会产生影响,有机添加物如马铃薯提取液、椰子法、丝瓜伤流液、玉米汁等天然物质及水解乳蛋白、酵母汁等有机添加物对提高水稻培养力具有明显效果^[16]。该研究在附加马铃薯水解物的培养基上设置了 3 个浓度梯度和不添加马铃薯水提取液 4 个处理,处理间差异不显著,试验只采用了一个品种进行马铃薯水提取液添加试验,为得出进一步研究结果,今后将采用不同品种进行深入研究。

3.4 不同培养方式对愈伤组织诱导率的影响

随着研究的深入,研究人员开始关注不同培养形态对愈伤组织诱导率的影响情况,琼脂的浓

度以及 pH 等因素决定着培养基的形态同时也影响着愈伤组织诱导率。潘国君等^[13]在其研究中指出,琼脂含量的不同决定培养基形态的不同,琼脂含量越低就越接近液体状态,由此可见,液体培养可提高花药愈伤组织诱导率与该研究所得结果相近。3 种培养方式中,双态培养的愈伤组织诱导率最高,但其在接种过程中液体培养基易粘在培养瓶壁上,造成污染;其次为液态培养,液态培养含氧量高,培养效果好;固态培养下愈伤组织诱导率最低,但固态培养接种操作简易,接种效率高。

3.5 水稻花药培养条件的优化

该文研究了水稻花药培养条件中几个因素对愈伤组织诱导率的影响,研究结果显示,适宜的培养条件为培养基中琼脂含量 0.75%,激素配比为 $KT(2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})+IAA(1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})$,培养方式为双态培养。研究只进行了一个品种的单因素试验,最佳优化条件还需进行正交试验。

参考文献:

- [1] 韩磊,汪旭东,曹春英. 水稻单倍体幼穗组织培养及再生植株的遗传分析[J]. 潍坊高等职业教育, 2007(2): 39-42.
- [2] 王光远,沈革志. 水稻游离花粉培养的高频率再生植株[J]. 实验生物学报, 1995(1): 85-93.
- [3] 而东. 水稻花粉培养新品种——花梗 45 [J]. 新农业, 1996(10): 11.
- [4] 王延玲,丰震,赵兰勇. 植物花药培养研究进展[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2006, 37(1): 149-151.
- [5] 贺梅,黄少锋,张丽萍,等. 花药培养育种在水稻育种上的应用[J]. 北方水稻, 2010, 40(1): 75-78.
- [6] 唐懿,李万宁,刘继,等. 苦瓜花药培养研究进展[J]. 长江蔬菜, 2010(24): 4-7.
- [7] 成妍,马蓉丽,焦彦生,等. 辣椒花药培养研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(22): 113-118.
- [8] 朱迎春,孙德玺,邓云,等. 西瓜花药培养中若干因素的影响[C]//中国园艺学会. 中国园艺学会 2012 年学术年会论文摘要集, 2012.
- [9] 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, 19(3): 190-199.
- [10] 罗琼,胡延玉,李平,等. 提高水稻花药培养效果的研究[J]. 四川农业大学学报, 1995, 18(4): 4-7.
- [11] 何涛,罗科,韩思怀,等. 水稻花药培养中培养力相关因素的研究[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 15-18.
- [12] 陈红,秦瑞珍. 水稻花药培养过程中各种影响因子的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(1): 52-56.
- [13] 潘国君,刘传雪,张云江,等. 双态双层培养法提高梗稻花药培养力的研究[J]. 中国农学通报, 1998, 14(6): 3-5.
- [14] 郭绍华,薛晶晶,张红宇,等. 双胚苗水稻单倍体及其杂交后代基因组 DNA 甲基化特异位点的分析及功能探讨[J]. 中国水稻科学, 2011(3): 249-255.
- [15] 张红宇. 双胚苗水稻中单倍体与二倍体表型和基因表达的差异分析[D]. 重庆: 四川农业大学, 2006.
- [16] 肖国樱. 水稻花药培养研究[J]. 杂交水稻, 1992(2): 44-46.

Study on Influencing Factors of Rice Anther Tissue Culture

MA Wen-dong¹, LI Xiu-ping², LI Zhi-yuan³

(1. Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154026; 2. College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 3. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to study rice haploid breeding and transgenic technology better and to accelerate the process of rice breeding, taking 10 rice varieties in cold region as experimental materials, single factor experiment was adopted to study the effect of agar concentration, hormone combination, potatoes water extract, culture method and other factors on callus induction rate of rice anther culture, anther tissue culture conditions of rice varieties in cold region was optimized. The results showed that 10 varieties of anther was cultured and the difference of anther callus induction rate was obvious. Agar concentration was about 0.75%, the callus induction rate reached the highest. When the hormone combination was $KT(2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})+IAA(1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})$, induction effect was the best. The callus induction rate of double layer's medium culture was the best followed by liquid culture, again for solid culture. Potatoes water extract addition showed there was no significant difference in different treatments.

Key words: rice; anthers; agar concentration; hormone combination; culture method; potatoes water extract