

培矮 64S 空间诱变突变株系花药培养条件的探讨

黄翠红, 郭涛, 刘永柱, 张建国, 陈志强, 王慧

(华南农业大学, 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:对培矮 64S 空间诱变突变株系在培养基选择、激素配比、有机添加物等方面进行了花药培养条件的优化改良。结果表明: N6 和 M8 为较适用于培矮 64S 突变株系花药培养的培养基, 激素则以 2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜; 在此基础上添加水解酪蛋白的培养效果较好, 椰汁次之。在诱导植株再生阶段, MS 的效果优于 N6, 表明植株再生需要较高浓度的氨态氮源。

关键词:水稻; 培矮 64S; 空间诱变; 突变株系; 花药培养

中图分类号: S335

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0014-04

Studies on Anther Culture Conditions of Space Mutation Lines from Peiai 64S

HUANG Cui-hong, GUO Tao, LIU Yong-zhu, ZHANG Jian-guo, CHEN Zhi-qiang, WANG Hui

(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To optimum the anther culture conditions for Peiai 64S mutants induced by space, different mediums, such as hormones and organic additives were prepared. The results show that N6 and M8 medium, which contented the combination of hormone in 2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, were suitable for the anther culture of Peiai 64S SP_2 generation. Adding casein hydrolysate in medium was the best treatment for Peiai 64S, followed by the treatment of adding coconut juice. MS medium was better than N6 medium, which indicated that anther culture materials needed more nitrogen resources in differentiation phase.

Key words: *Oryza sativa*; Peiai 64S; space mutation; mutation lines; anther culture

培矮 64S 是目前生产上大面积应用的水稻光温敏核不育系。该不育系具有亲和谱广、亲和力强、配合力高和异交特性好等特点^[1-2]。但培矮 64S 存在“温度漂移”的缺点, 提纯较难, 这主要是由于不育系本身在遗传上存在异质性^[3-4]。花药培养能较大幅度地解决光温敏不育系的遗传异质性, 缩短不育系的提纯周期和获得稳定的不育系材料^[5-6]。同时, 创建各种类型培矮 64S 育性突变种质也是选育新的优良籼型光(温)敏核不育系的有效途径之一。本研究以培矮 64S 空间诱变突变株系为材料, 从培养基选择、激素种类及配比、有机添加物等方面探讨培矮 64S

空间诱变后代材料花药培养的适宜条件, 为应用花药培养技术提纯不育系材料提供相关的参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

培矮 64S 突变株系 H1 ~ H18 (SP_2 代)。该株系为培矮 64S 干种子经“实践八号”农业卫星搭载(在轨运行 15 d, 卫星运行的近地点高度 180 km, 远地点高度 469 km, 轨道倾角 63°), 在 2007 年选出的育性变异(田间观察转育期发生变化)稳定遗传单株。

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 黄翠红(1983—), 女, 硕士; 通信作者: 王慧(1965—), 女, 副教授, E-mail: wanghui@scau.edu.cn

基金项目: 863 计划项目(2007AA100101); 国家科技支撑计划项目(2008BAD97B02); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助

1.2 方法

试验在华南农业大学教学试验场农学分场进行。供试材料于2008年3月开始种植,分3批播种,常规田间管理。于晴天田间露水干透时,取大多数花药处于单核靠边期(即小孢子发育晚期)的材料,进行7~9 d的7℃低温处理。

采用“剪颖抖药法”把花药接种在不同培养基中,培养基使用如下:①基本培养基筛选优化试验:分别选用N6、M8、SK3,均附加2,4-D 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹ + KT 0.5 mg·L⁻¹ + 水解酪蛋白1.0 g·L⁻¹ + 蔗糖 50.0 g·L⁻¹ + 琼脂 10.0 g·L⁻¹;②诱导培养基中不同激素的比较试验:一般在2,4-D、NAA、KT之间进行配比调整;③诱导培养基中不同有机添加物(水解酪蛋白1.0 g·L⁻¹、水解乳蛋白1.0 g·L⁻¹、椰汁100 mL·L⁻¹)的比较试验:诱导培养基成分统一使用N6(附加2,4-D 2.0 mg·L⁻¹、NAA 1.0 mg·L⁻¹、KT 0.5 mg·L⁻¹、50.0 g·L⁻¹蔗糖、10.0 g·L⁻¹琼脂),分化培养基为MS培养基(附加6-BA 3 mg·L⁻¹、NAA 1.0 mg·L⁻¹、蔗糖 30 g·L⁻¹、琼脂 10.0 g·L⁻¹);④2种分化培养基的对照试验:分别选用MS、N6为基本培养基,均附加

6-BA 3 mg·L⁻¹、NAA 1.0 mg·L⁻¹、蔗糖 30.0 g·L⁻¹、琼脂 10.0 g·L⁻¹。

所有培养基pH均在5.8~6.0之间。诱导阶段于26~28℃下暗培养,一般接种后30~60 d内统计愈伤组织块数;分化阶段先暗培养3 d,后转至光照培养,每天光照时间为10~12 h,光照度1 000~1 500 lx,室温保持26~28℃,45 d内统计绿苗丛数、白苗丛数等。计算愈伤组织诱导率、绿苗分化率、白苗分化率、分化率以及绿苗产率等,以确定不同花药培养条件对花药培养效果的影响。

2 结果与分析

2.1 不同诱导培养基对突变株系花药培养的影响

培矮64S的18个突变株系在3种诱导培养基上花药培养的效果列于表1。从表1中得出,培矮64S突变株系的愈伤组织诱导率表现为N6 > M8 > SK3,最高可达11.92%,最低为5.69%。绿苗分化率表现为M8 > N6 > SK3,最高为12.26%,最低为7.63%。从绿苗产率的统计数据可知,N6培养基上的值最高,为1.34%,其次是M8培养基,为1.13%,SK3上的值最低,只有0.37%。

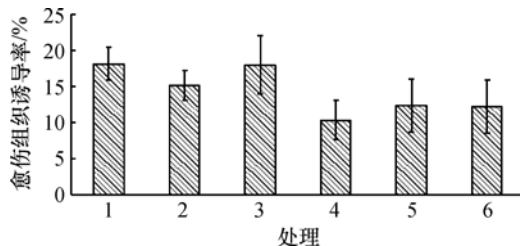
表1 不同诱导培养基对花药培养效果的影响

Tab.1 Effect of different media on anther culture

培养基	接种花药数/枚	转移愈伤块数/块	愈伤组织诱导率/%	绿苗分化率/%	绿苗产率/%
N6	15 714	1 543	11.92 ± 1.89	8.64	1.34
M8	17 047	1 211	10.27 ± 1.11	12.26	1.13
SK3	15 323	716	5.69 ± 0.10	7.63	0.37

2.2 不同激素配比对突变株系花药培养的影响

突变株系均接种于添加了6种不同激素配比的诱导培养基中,诱导结果见图1。在6个不同激素配比的处理中,主要表现为1、2、3处理上的愈伤组织诱导率高于4、5、6处理。这说明在一定范围内降低各激素浓度,可提高愈伤组织的诱导率。



1~6代表 $\rho(2,4-D) : \rho(NAA) : \rho(KT)$ 分别为:1.00:1.25:0.25、1.00:0.50:0.25、0.50:1.25:0.25、2.00:2.25:0.50、1.00:2.50:0.50、2.00:1.00:0.50,均以N6为诱导培养基,附加蔗糖50 g·L⁻¹、琼脂10 g·L⁻¹。

图1 不同激素配比对愈伤组织诱导率的影响

Fig.1 Effect of different hormone on callus induction

愈伤组织后续分化与诱导在6种不同激素配比处理下的变化不一致(表2)。突变株系在处理6上的平均绿苗分化率最高,为5.10%,处理2上的绿苗分化率仅次于前者,这表明 $\rho(2,4-D) : \rho(NAA)$ 为2.00:1.00时,较利于愈伤组织的绿苗分化。总的来说,处理6上的绿苗产率最高,为0.44%,其次为处理2(0.33%)。

2.3 诱导培养基中不同有机添加物对突变株系花药培养效果的影响

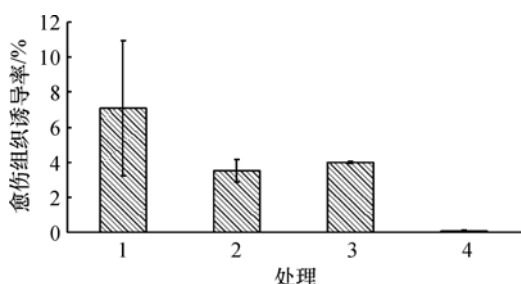
诱导培养基中有机添加物对培矮64S突变株系花药培养愈伤组织的形成有较大的促进作用,不同有机添加物其效果有所不同。从图2可知,处理1~3上愈伤组织诱导率都明显比无添加有机物处理上的值高,其中处理1上的诱导率最高,为7.09%。

愈伤组织后续分化的结果(表3)表明,在培养基中添加有机物改善了突变株系的后续分化效果,其中,椰汁对绿苗的提高和白苗的减少方面有较好的改善作用,其绿苗分化率表现较高,为7.19%,而

表2 不同激素对比对花药培养效果的影响

Tab. 2 Effect of combinations of different hormone on anther culture

处理 编号	激素配比(ρ)/(mg · L ⁻¹)			接种花药数/ 枚	转移愈伤块数/ 块	诱导率/ %	绿苗分化率/ %	绿苗产率/ %
	2,4-D	NAA	KT					
1	1.00	1.25	0.25	4 524	451	18.19 ± 2.27	1.18	0.17
2	1.00	0.50	0.25	3 732	373	15.15 ± 2.12	2.05	0.33
3	0.50	1.25	0.25	3 861	456	18.04 ± 4.13	0.93	0.15
4	2.00	2.50	0.50	3 226	205	10.38 ± 2.65	0.62	0.10
5	1.00	2.50	0.50	3 636	205	12.34 ± 3.71	1.15	0.16
6	2.00	1.00	0.50	3 992	258	12.25 ± 3.66	5.10	0.44



处理1~4分别为:添加水解酪蛋白1 g · L⁻¹、添加水解乳蛋白1 g · L⁻¹、添加椰汁100 mL · L⁻¹、无添加有机物,诱导培养基成分均为N6 + 2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + KT 0.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖50.0 g · L⁻¹ + 琼脂10.0 g · L⁻¹。

图2 不同有机添加剂对愈伤组织诱导率的影响

Fig. 2 Effect of different organic additives on frequency of callus induction

表3 不同有机添加剂对愈伤组织后续分化的影响

Tab. 3 Effect of different organic additives on differentiation of callus

处理	绿苗分化率	白苗分化率	绿苗产率
水解酪蛋白	6.91	30.69	0.47
水解乳蛋白	5.56	34.85	0.23
椰汁	7.19	24.27	0.30

白苗分化率则较低,为24.27%;另2个处理的愈伤组织虽具备较高的分化能力,却因白苗分化较为严重,从而影响分化效果。

2.4 不同分化培养基对突变株系愈伤组织分化效果的影响

将培矮64S突变株系培养出的愈伤组织接种于N6和MS培养基中进行分化,结果显示,N6分化培养基上的绿苗分化率、白苗分化率和分化率分别为17.83%、9.21%和27.04%,而MS分化培养基上则分别表现为24.69%、9.47%和34.16%。可见MS培养基更适合培矮64S突变株系愈伤组织的后续分化,其中以绿苗分化效果较好,比N6培养基上的提高了6.86%。

3 讨论

水稻花药培养技术是当今生物技术育种中较为成熟、实用、有效的育种新技术。花药培养既可用于

水稻新光温敏核不育系的选育,也可用于原光温敏核不育系的提纯^[7-8]。应用花药培养对光温敏核不育系进行提纯的技术正在日臻完善^[5]。利用光敏核不育材料进行花药离体培养虽然可以加速核不育系的选育,但是,如果培养条件不合适或花粉的败育影响愈伤组织的诱导和分化,就给花药培养在核不育系改良的实际应用上增加新的困难。因此,有必要寻找新的培养基或调整现有培养基的成分,以及确定材料的取材时期。

经过大量试验及比较,迄今已获得了多种适合各种不同水稻花药培养材料的培养基^[11]。成功筛选出适用于光温敏核不育系花药培养的主要诱导培养基,如N6、SK3、M8、通用、合5等培养基,以及用于分化的MS培养基^[9]。李兴莲等^[12]认为M8培养基的综合诱导效果优于N6和SK3培养基。在籼稻花药培养培养基的改良研究上,一般都是以N6和MS基本培养基为基础进行的^[13-14]。培养基中适宜的激素种类和恰当对比对提高水稻花药培养力影响较大^[10]。在适合范围内,降低生长素类的浓度,对水稻花药培养力有所提高;在培养基中添加脯氨酸、椰子汁等天然活性物质及水解乳蛋白、水解酪蛋白等多种有机添加剂对提高愈伤组织诱导率和绿苗分化率有明显的作用^[10]。

本试验在前人研究的基础上对培矮64S突变株系的花药培养条件进行了改良研究。结果表明,诱导培养基使用N6培养基,激素配比采用2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + KT 0.5 mg · L⁻¹,有机添加剂选用水解酪蛋白,而分化培养使用MS作为基本培养基,对培矮64S愈伤组织的诱导以及后续分化效果较好。这表明N6培养基具有较广的适应性。在一定范围内降低各激素浓度可使愈伤组织的诱导率有所提高,这与前人^[15-16]研究结果有点不同。也有研究表明2,4-D与NAA结合有联应关系^[15-16],NAA对绿苗分化有后作效应,使用适当的2,4-D与NAA配比,对绿苗分化效果影响较大,本研究结果表明,当 $\rho(2,4-D) : \rho(NAA)$ 为2.00:1.00时,愈伤组织的绿苗分化率较高,若在适当浓度范围

内,其促进效果更为显著。培养基、激素配比、有机添加物等在愈伤组织不同诱导阶段呈现不一致的影响效应,N6培养基较利于愈伤组织的形成,而M8培养基在促进绿苗分化方面效果较好;水解酪蛋白的添加对培矮64S花药培养力有较好的改善作用,椰汁在促进绿苗形成和减少白苗分化方面效果较好,同时愈伤组织在不同培养阶段所需营养也有所不同,因此如何解决各方面的矛盾并结合各方面的优点,进行培养条件的有效改良,有待于今后的进一步研究。

目前关于水稻花药培养过程中白化苗成因有说法认为白化苗的产生为基因突变所致^[17]。本试验材料的白化苗现象比较严重,培矮64S经空间诱变后,从单个性状来看,一些诱变材料的白苗分化有所改善,但综合性状表现较差。光温敏核不育材料早晚造育性的转换及植株营养水平对白苗是否还存在影响目前还不清楚。因此进一步探讨白化苗形成原因,降低白苗分化,促进绿苗形成,从而提高花药培养力是今后研究的一大重点。

参考文献:

- [1] 凌定厚,陈梅芳,马镇荣,等. 光敏感雄性不育水稻的体细胞与花药培养及再生植株性状表现研究[J]. 遗传学报,1991,18(3):244-251.
- [2] 周元昌,林荔辉,江树业,等. 花药培养遗传纯化温敏核不育系培矮645的效果初步分析[J]. 中国水稻科学,2000,14(2):119-121.
- [3] 邓启云,符习勤. 光温敏不育水稻育性稳定性研究[J]. 湖南农业大学学报,1998,24(1):8-13.
- [4] 何予卿,杨静,徐才国,等. 籼型光敏核不育水稻育性不稳定性可转换性的遗传研究[J]. 华中农业大学学报,1998,17(4):305-311.
- [5] 陈远孟,吕志仁,韦鹏霄,等. 光(温)敏核不育系花粉植株的育性转换及纯化效果的研究[J]. 广西农业科学,2002(6):286-288.
- [6] 邱东峰,马云峰,杨金松,等. 水稻籼型光敏核不育系HN5S的花药培养改良[J]. 湖北农业科学,2007,6(2):174-176.
- [7] 尹建华. 籼型光敏核不育水稻杂种花粉植株的育性表现[J]. 江西农业学报,1993,3(1):27-32.
- [8] 向跃武,张志雄,张安中,等. 水稻光敏核不育系的花药和体细胞培养选育研究[J]. 西南农业大学学报,1993,15(5):462-465.
- [9] 陈彩虹,梁曼玲. 花药培养技术在光温敏核不育系选育中的应用[J]. 广西农业科学,2001(6):323-326.
- [10] 陈英,李良材,朱进,等. 水稻花粉植株的诱导条件及其遗传学表现的研究[J]. 中国科学:A辑,1974(1):40-51.
- [11] 肖国樱. 水稻花药培养研究综述[J]. 杂交水稻,1992(2):44-46.
- [12] 李兴莲,邓锡洪,何光华,等. 光温敏不育系及广亲和恢复系花药培养效果比较[J]. 西南农业学报,1995(8):88-93.
- [13] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962(15):473-497.
- [14] SILVA T D. Indica rice anther culture: Can the impasse be surpassed [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2010, 100(1):1-11.
- [15] 田文忠. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报,1994,21(3):215-221.
- [16] 杨学荣,李学宝,汪虹,等. 水稻花培育种技术操作和无性系变异体选择[J]. 华中师范大学报:自然科学版,2000,34(3):318-321.
- [17] 崔海瑞,夏英武,高明尉. 温度对水稻突变体W1叶色及叶绿素生物合成的影响[J]. 核农学报,2001(5):269-273.
- [11] 金正勋,沈鹏,金学泳,等. 水稻籽粒淀粉合成关键酶活性与味度及RVA谱特性相关分析[J]. 西南农业学报,2005,18(5):965-971.
- [12] SMITH A M, DENYER K, MARTIN C. What controls the amount and structure of starch in store organ [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:673-677.
- [13] 彭估松,郑志仁,刘涤,等. 淀粉的生物合成及其关键酶[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):297-303.
- [14] WANG Zong-yang, WU Zhi-liang, XING Yan-yan. Molecular characterization of rice Wx gene [J]. *Science in China: Series B*, 1992, 35(5):558-561.
- [15] KIM K N, FISHER D K, GAO M, et al. Molecular cloning and characterization of the amylose-extender gene encoding starch branching enzyme II B in maize [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38:945-956.
- [16] 郭涛,韦旋,陈志强,等. 2个低直链淀粉含量籼稻突变体的遗传分析[J]. 华南农业大学学报,2009,30(1):10-13.
- [17] KATO T. Change of sucrose synthase activity in developing endosperm of rice cultivars [J]. *Crop Sci*, 1995, 35:827-839.
- [18] 李天,大衫立. 灌浆结实期弱光对水稻籽粒淀粉积累及相关酶活性的影响[J]. 中国水稻科学,2005,19(6):545-550.
- [19] 彭波,陈瑞,史冬燕,等. 云南野生稻籽粒袋奶粉合成关键酶活性测定[J]. 广西植物,2008,28(6):800-805.

【责任编辑 周志红】

【责任编辑 周志红】

(上接第13页)