

影响水稻籼粳亚种间杂交构建回交自交系的花药培养效果的2个因素

向«朝^{1,2,3} 张楷正^{2,3} 李季航^{2,3} 李平^{2,3,*}

¹ 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; ² 四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130; ³ 四川农业大学作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 四川雅安 625014

提要 水稻籼粳亚种间杂交构建的回交自交系(BIL)的10个株系在3种诱导培养基、1种分化培养基以及样株剪叶与否处理的结果表明, 通用培养基(GM)不适合于籼粳交后代BIL的花药培养。N6和SK3都有较高的出愈率, 但N6的绿苗发生率比SK3高, 说明N6的愈伤组织质量和诱导效果更优于SK3。无论N6还是SK3, 剪去样株叶片的绿苗发生率显著下降, 显示花药培养过程中绿叶的作用很重要。完善籼粳亚种间杂交构建BIL的花药培养体系和从较多的株系中取材可保证花药培养的后代有较大的二倍体群体以供选择。

关键词 水稻籼粳杂交后代; 回交自交系; 花药培养体系

Two Factors Influencing on Anther-cultural Effect of Backcross Inbred Lines Constructed by Offspring of *Oryza sativa* ssp. *Indica*×*Japonica*

XIANG Xun-Chao^{1,2,3}, ZHANG Kai-Zheng^{2,3}, LI Ji-Hang^{2,3}, LI Ping^{2,3,*}

¹ College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China;

² Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130, China; ³ Key Laboratory of Crop Genetic Resource and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China

Abstract Ten lines of backcross inbred lines (BIL) constructed by offspring of *Oryza sativa* ssp. *Indica*×*Japonica* were treated in three induction media, a differentiation medium, cutting leaves or not of sample plants. Results showed that, general medium (GM) was not fit to anther culture of BIL. N6 and SK3 both had a high callus induction frequency, but the proportion of green plantlet differentiation of N6 was higher than that of SK3. It suggested that callus quality and induction effect of N6 was better. The proportion of green plantlet differentiations was decreased evidently when cutting leaves were done in N6 or SK3. It indicated that green leaves could have very important effect during the course of anther culture. To perfect the anther-cultural system of BIL and select more cultured materials from BIL, there would be more diploid to be selected in anther-cultural progeny.

Key words offspring of *Oryza sativa* ssp. *Indica*×*Japonica*; backcross inbred lines; anther-cultural system

在我国杂交水稻研究中, 籼稻种质资源已经得到充分发掘, 近几年育成的籼型恢复系的遗传差异较小(王松文 1997; 刘殊等 2002)。为了提高产量、品质和抗逆性, 扩大籼粳亚种间杂交的遗传差异已成为研究者必需考虑的问题。但籼粳亚种间杂交后代分离大, 稳定周期长, 出现理想单株的几率很小。周开达和汪旭东(1997)在总结籼粳亚种间杂种优势利用的经验时曾提出, 选育亚种间重穗型组合时, 粳稻在亲本遗传背景中的比例应不高于四分之一, 在杂种中的比例不高于八分之一。籼粳亚种间杂交后再回交构建回交自交系(backcross inbred lines, BIL)能够大量减少其粳型血缘, BIL再经花药培养即可显著缩短育种周期并提高选择效率。一般认为在选择花药培养的培

养基中, SK3 (陈英等 1992)和通用培养基(GM, 杨学荣等 1980) 2个培养基是适用于籼粳亚种间杂交后代或籼型水稻的花药培养。此外, 调整培养基配方以提高籼粳亚种间杂交后代花药培养效果报道较多(罗琼等 1995; 刘保申等 1996; 张跃非和张超英 1999; 朱永生等 2001; 何涛等 2002)。而关于籼粳亚种间杂交构建BIL的花药培养和如何优化其花药培养体系的报道还未见。本文选用N6、SK3和GM作为诱导培养基, 以MS作为分

收稿 2006-06-08 修定 2006-11-16

资助 国家“863”计划(2003AA212030)、教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0453)。

*通讯作者(E-mail: liping@cngk.com, Tel: 028-8274177)。

化培养基, 根据3种诱导培养基的愈伤组织质量, 选择最佳的诱导培养基。同时根据低温预处理阶段绿叶对愈伤组织质量的作用大小及其花药培养后代的自然加倍情况, 完善了籼粳亚种间杂交所构建的BIL花药培养体系。

材料与方法

水稻(*Oryza sativa* L.)的回交自交系(BIL)用‘蜀恢955’(♀)和‘Kitaake’(♂)构建。‘蜀恢955’(*Oryza sativa* ssp. *indica*)是四川农业大学水稻研究所的优良籼型恢复系, ‘Kitaake’(*O. sativa* ssp. *japonica*)是来自日本的特早熟粳稻。2000年8月在四川温江做杂交, 当年冬繁, 选1个单株与‘蜀恢955’(♂)回交得到BC₁。2001年夏季从BC₁中选1个与‘蜀恢955’相近的单株再与‘蜀恢955’(♂)回交得到BC₂。BC₂当年冬繁加代并选1个单株留种得到BC₂F₁, BC₂F₁再自交并选1个单株留种得到BC₂F₂, 在BC₂F₃构建株系, 到2004年夏季得到BC₂F₆。从BC₂F₆中选择综合性状较好的10个株系进行花药培养研究, 它们是株系153、155、179、181、226、230、234、261、271和273。

花药培养材料的小孢子处于单核靠边期时取材。取回的材料155、179和261作2种处理: 一半剪叶, 另一半留叶; 其它株系全部留叶。所有材料均用75%的酒精消毒后, 用湿纱布包裹, 然后放在7~10℃的冰箱中预处理7 d。

诱导培养基有: (1) N6: 除大量元素和微量元素I外, 还补充2 mg·L⁻¹甘氨酸、1 mg·L⁻¹ VB₁、0.5 mg·L⁻¹ VB₆、0.5 mg·L⁻¹尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、0.5 mg·L⁻¹ KT、1 mg·L⁻¹ NAA、2 mg·L⁻¹ 2,4-D、60 g·L⁻¹蔗糖和60 g·L⁻¹ Na₂SiO₃。(2) SK3: 除大量元素和微量元素I外, 还补充0.25 mg·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O、10 mg·L⁻¹甘氨酸、5 mg·L⁻¹ VB₁、2.5 mg·L⁻¹ VB₆、2.5 mg·L⁻¹ NAD、0.5 mg·L⁻¹ KT、2 mg·L⁻¹ NAA、2 mg·L⁻¹ 2,4-D、60 g·L⁻¹蔗糖和60 g·L⁻¹ Na₂SiO₃。(3) GM: 除大量元素和微量元素I外, 还补充0.025 mg·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O、0.25 mg·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O、0.025 mg·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O、2 mg·L⁻¹甘氨酸、1 mg·L⁻¹ VB₁、0.5 mg·L⁻¹ VB₆、100 mg·L⁻¹脯氨酸、300 mg·L⁻¹水解

酪蛋白(CH)、1 mg·L⁻¹ NAA、2 mg·L⁻¹ 2,4-D、60 g·L⁻¹蔗糖和60 g·L⁻¹ Na₂SiO₃。每个处理重复3次, 单因素随机设计, 采用DPS软件进行统计分析。

幼穗从预处理材料的叶鞘中取出, 用70%的酒精消毒5 min, 再用0.1% HgCl₂消毒10 min, 然后用无菌水冲洗数次, 最后取出花药放置在已灭菌的培养基斜面上, 每支试管接30枚花药。

所有愈伤组织的分化培养基均采用MS培养基。培养基中附加1 mg·L⁻¹ KT、1 mg·L⁻¹ NAA、0.2 mg·L⁻¹ IAA和60 g·L⁻¹ Na₂SiO₃。

生根培养基为1/2 MS+30 g·L⁻¹ Na₂SiO₃, 不加生长调节物质。

绿苗生长出3片以上的绿叶时, 从试管内移栽到海南陵水四川农业大学水稻所南繁站的试验田内, 移栽后的管理关键是在移栽后的半个月夜间必须注意保温。

实验结果

1 3种培养基诱导愈伤组织形成和分化的效应比较

7个株系由通用培养基(GM)诱导的出愈率为0~11.19%, 平均为4.64%, 此种愈伤组织的平均绿苗发生率为3.99%, 有5个株系的绿苗发生率为0, 说明GM诱导的愈伤组织质量很差, 明显逊色于N6和SK3。杨学荣等(1980)认为GM针对籼稻有良好的效果, 但从我们的结果来看并不适合于籼粳交偏籼后代的花药培养。

另外, N6和SK3都有较高的出愈率, N6培养的4个株系出愈率为5.87%~9.88%, SK3培养的4个株系出愈率为6.58%~9.43%; N6的平均出愈率为7.57%, SK3的为8.63%。但N6的平均绿苗发生率为28.97%, 而SK3的为24.60% (表1)。N6和SK3的愈伤组织都是在同一种分化培养基上分化的, 它们绿苗发生率之所以有些差异, 可能是两者的愈伤组织质量不太相同所致。由此看来, 籼粳交后代的花药用培养基N6培养的效果似乎好些。不同株系的出愈率和绿苗分化率无论在N6还是SK3上, 其差异均达到极显著水平。

2 样株叶片剪除对愈伤组织绿苗发生率的效应

从表2可以看出, 无论是N6还是SK3, 剪除样株叶片后的绿苗分化率显著下降, 155+SK3

表1 N6和SK3培养基对不同株系的出愈率和绿苗分化率的效应
Table 1 Effect of N6 and SK3 media on calli rate and green plantlet differentiation rate of different lines

株系	N6培养基				SK3培养基			
	愈伤组织数/个	出愈率/%	绿苗数/株	绿苗分化率/%	愈伤组织数/个	出愈率/%	绿苗数/株	绿苗分化率/%
153	285	8.19 ^B	152	53.33 ^A	266	9.43 ^A	127	47.74 ^A
181	183	5.87 ^D	14	7.65 ^D	75	6.58 ^D	4	5.33 ^D
230	255	9.88 ^A	57	22.35 ^C	123	9.11 ^B	25	20.33 ^B
271	233	6.75 ^C	54	23.18 ^B	414	8.52 ^C	60	14.49 ^C
总计	956	7.57	277	28.97	878	8.63	216	24.60

大写字母表示在0.01水平上差异显著(Duncan法)。下表同此。

的降幅最大, 达到52.00%, 179+N6的降幅最小, 但也达到了24.58%。经剪叶后, 155+SK3的绿苗发生率降到0, 不剪叶的绿苗发生率则达到52%。说明在花药培养过程中, 除了去掉烂叶和黄叶外, 不能去掉绿叶, 否则会严重影响愈伤组织的绿苗分化率。各处理的绿苗分化率无论是剪除样株叶片还是不剪均达到极显著差异。

3 不同株系的自然加倍

从表3可以看出, 籼粳亚种间杂交构建BIL的不同株系的自然加倍中, 二倍体的比例占多数, 其次是单倍体和多倍体, 混倍体所占比例最小。但不同材料间的差异很大, 株系155的二倍体、单倍体和多倍体分别为35.71%、33.93%和28.57%, 各自所占比例大概相当。而226则全部

表2 样株叶片剪除对绿苗分化率的影响
Table 2 Effect of cutting leaves on green plantlets differentiation rate

株系和培养基	剪叶			不剪叶			绿苗分化率 下降率/%
	愈伤组织数/个	绿苗数/株	绿苗分化率/%	愈伤组织数/个	绿苗数/株	绿苗分化率/%	
179+N6	835	29	3.47 ^B	385	108	28.05 ^C	24.58
155+SK3	58	0	0 ^C	100	52	52.00 ^B	52.00
261+SK3	13	4	30.77 ^A	17	9	52.94 ^A	22.17

表3 不同株系的自然加倍数
Table 3 The nature-doubled number of different lines

株系	单倍体		二倍体		多倍体		混倍体	
	统计数/株	比例/%	统计数/株	比例/%	统计数/株	比例/%	统计数/株	比例/%
153	72	28.80	160	64.00	16	6.40	2	0.80
155	19	33.93	20	35.71	16	28.57	1	1.79
179	55	37.67	71	48.63	18	12.33	2	1.37
181	11	55.00	9	45.00	0	0	0	0
226	7	100.00	0	0	0	0	0	0
230	23	26.14	61	69.32	4	4.55	0	0
234	6	9.23	57	87.69	2	3.08	0	0
261	29	61.70	18	38.30	0	0	0	0
271	5	6.58	60	78.95	10	13.16	1	1.32
273	63	45.00	62	44.29	14	10.00	1	0.71
总计	290	32.40	518	57.88	80	8.94	7	0.78

都为单倍体, 没有二倍体、多倍体和混倍体存在。二倍体比例最高的是 234 (87.69%), 多倍体和混倍体比例最高的都是 155 (分别为 28.57% 和 1.79%)。181、226 和 261 没有多倍体发生。在 10 个株系中出现混倍体的也仅有 153、155、179、271 和 273, 它们所占比例为 0.71%~1.79%; 其它 5 个株系都无混倍体发生。各株系均为回交自交系, 基因型差异较小, 说明尽管差异微小, 但对花药培养后代的绿苗自然加倍的影响仍很大。

讨 论

从籼粳亚种间杂交构建的 BIL 花培群体中可以选择出优良的纯系。为了扩大遗传距离, 加速杂交后代的稳定性和提高选择效率, 用籼粳亚种间杂交构建的回交自交系的花药进行培养并再从中选择优良单株是一种比较理想的策略(方宣钧等 2001; 李梅芳和周开达 2001)。四川农业大学水稻研究所较早用此法育成了水稻重穗型恢复系‘蜀恢 162’(周开达和汪旭东 1997)。我们所得到的 518 个二倍体单株中, 经 2005 年两季的测配, 几个单株都表现出较优良的综合性状, 将母本的大穗多粒、株叶形态好的特点与父本的早熟、后期转色好及米质好的特点结合到了一处。

根据本文结果我们认为, 完善籼粳亚种间杂交构建 BIL 的花药培养体系时, 应从较多的株系中取材, 这样才能够保证花药培养的后代有较大的二倍体群体以供选择。籼粳亚种间杂交构建的 BIL 进行花药培养时, 应保留全部绿叶并用 N6 作诱导培养基和 MS 作分化培养基, 如此得到的绿

苗分化率较高, 通用培养基不宜采用。由于不同株系间绿苗的自然加倍率和二倍体比率差异很大, 有的甚至完全是单倍体, 因此花药培养时最好从 BIL 中尽量多取较理想的株系进行培养, 以保证花培后代有较高的二倍体比率供育种选择。

参考文献

- 陈英, 左秋仙, 王瑞丰, 张桂华(1992). 应用正交试验法筛选籼粳稻杂种花药培养基. 见: 李向辉, 陈英, 孙勇如主编. 植物细胞培养与遗传操作. 长沙: 湖南科学技术出版社, 60~71
- 方宣钧, 吴为人, 唐纪良(2001). 作物DNA标记辅助育种. 北京: 科学出版社, 35~40
- 何涛, 罗科, 韩思怀, 郭学兴(2002). 水稻花药培养中培养力相关因素的研究. 西南农业学报, 15 (4): 15~18
- 李梅芳, 周开达(2001). 水稻生物技术育种. 北京: 中国农业科技出版社, 3~20
- 刘保申, 殷丽青, 张建军(1996). 硅素提高水稻花药培养效率的作用. 上海农业学报, 12 (1): 14~18
- 刘殊, 程慧, 王飞, 朱英国(2002). 我国杂交水稻主要恢复系的 DNA 多态性研究. 中国水稻科学, 16 (1): 1~5
- 罗琼, 胡延玉, 李平, 李仁端(1995). 提高水稻花药培养效果的研究. 四川农业大学学报, 13 (4): 487~491
- 王松文(1997). 36 个水稻骨干系的分子聚类及其遗传育种学意义. I. 分子标记多态性与杂交亲和. 华北农学报, 12 (4): 1~6
- 杨学荣, 王建人, 李还林, 李友芳(1980). 禾谷类作物通用诱导培养基和它在提高籼稻花培绿苗频率的研究. 植物生理学报, 6 (1): 67~74
- 张跃非, 张超英(1999). 硅素在水稻花药培养形成愈伤组织中的作用研究. 绵阳经济技术高等专科学校学报, 16 (2): 11~13
- 周开达, 汪旭东(1997). 亚种间重穗型杂交稻研究. 成都: 四川科学技术出版社, 12~57
- 朱永生, 陈葆棠, 张端品(2001). 提高水稻籼粳杂交后代花药培养力的研究. 华中农业大学学报, 20 (4): 314~317