

水稻花药培养技术及其研究进展

赵沙沙 田永宏 陈波 房振兵 潘高峰

(湖北省襄阳市农业科学院, 襄阳 441057)

摘要:水稻花药培养是水稻育种中重要的技术手段。从材料基因型、取材时期与低温预处理、培养基种类、激素配比、碳源、其他添加剂、培养条件等方面总结了水稻花药培养技术的研究进展,分析了现阶段花药培养存在的问题,并对未来的研究方向作出了展望。

关键词:水稻;花药培养;问题;展望

水稻花药培养是采用无菌操作技术,把发育到一定时期的水稻花药接种到人工培养基上,通过改变花粉粒的发育程序诱导脱分化形成愈伤组织,然后使愈伤组织再分化形成单倍体植株的过程。单倍体植株经过秋水仙碱或自然加倍,成为完整的二倍体植株。将花药培养与其他育种技术相结合,可以快速纯合育种材料,有效缩短育种周期,提高选择效率,加快育种进程^[1]。

1 水稻花药培养发展概况

日本学者新关(Niizeki)和大野(Oono)于1968年利用花药培养技术首次获得水稻单倍体植株^[2],开启了水稻花药培养研究的先河^[3]。1970年,我国

开始水稻花药培养的研究,并于1975年第1次利用花药培养技术育成了粳稻新品种单丰1号^[4]。20世纪80年代中期,研究者们开始将花药培养技术应用于水稻育种,先后育成了中花系列、龙粳系列和花育系列等粳稻品种以及后续的其他品种^[5]。但是应用花药培养技术选育的籼稻品种还比较少,到20世纪末仅有5个,其中江西农科院4个、江西农业大学1个,推广面积都不大^[2]。目前,通过花药培养技术育成的常规水稻品种已有40多个^[6]。近年来,随着研究的不断深入,水稻花药培养技术也在逐步完善,并与其他技术相结合应用在遗传育种上,已经成为生物技术育种中相对成熟、实用而有效的技术^[2]。

2 影响水稻花药培养效率的技术要点

在实际操作过程中,由于受基因型、培养基组

基金项目:湖北省农业科技创新中心资助项目(2016-620-000-001-057)
通信作者:田永宏

育种和品种转化能力、持续的资金投入和补给实力、规模化的生产成本优势和精细的加工质量、精准有效而有力度的营销推广能力、良好的企业管理制度和种业风险控制能力。这场比赛是综合实力的较量,不是单项比赛。也许你的企业以上条件都具备,也许只具备几个方面,重要的是你要明白——做强才能做大,协同作战优于单打独斗,系统和完善才能无懈可击。最后能生存的有两种企业,科研、资金雄厚的种业巨头及有地方特色的中小企业。

“品种井喷”是品种审定制度改革的必然结果,品种审定制度改革不能停步也不会停步,近几年来品种审定制度改革解决的主要矛盾是品种参试难、

通过审定难、品种审定标准单一问题。随着这些矛盾的解决,品种同质化等问题又会成为主要矛盾,因此科研创新是种业人的责任和历史使命,也是推动种业发展永恒的主旋律。

参考文献

- [1] 马志强,张延秋.我国品种审定制度改革回眸.中国种业,2020(8): 1-4
- [2] 胡小军,张丽.我国农作物品种审定制度沿革与现状分析.中国种业,2014(7): 1-3
- [3] 郭利磊,张笑晴.我国农作物品种区试审定制度的改革与发展.中国种业,2019(2): 12-14

(修回日期:2020-07-31)

成以及培养环境的影响,水稻花药培养仍然比较困难,尤其是籼稻花药培养力过低,获得的再生植株群体较小,育种选择受到较大的限制,对后续研究产生很大影响。因此,提高花药培养效率,适当扩大花药培养后代群体,对水稻花药培养育种成败至关重要^[7]。提高水稻花培效率,有必要处理好整个过程的每一个环节,完善和优化水稻花药培养技术体系。

2.1 基因型选择 基因型对水稻花药培养力的影响最大。一般认为,花药培养力的大小为糯稻>粳稻>粳籼杂交稻>籼型杂交稻>籼稻,但同一类型的不同品种之间也存在较大差异^[8]。籼稻花药培养力一般偏低,平均愈伤诱导率只有0.5%,一般不会超过5%,有些材料甚至不能诱导出愈伤组织或者难以得到再生植株^[9];绿苗分化率仅有0.1%~1.0%,平均0.5%^[2]。与籼稻相比,粳稻类型更容易被诱导,愈伤诱导率可以达到40%,一般也会超过10%^[10]。苗立新等^[11-12]的研究表明,不同水稻材料之间的花药培养效率存在明显差异, F_1 的花培效率通常会介于双亲之间而偏向母本。如果双亲的花培效率高,则 F_1 的效率也会较高。通常,如果亲本材料有花培效率高的粳稻血缘, F_1 的花培效率也会较高。因此,可以通过筛选基因型,积累花培效率较高的水稻材料,用粳稻品种作为桥梁亲本,配制优异的杂交组合来获取较大量的花培后代群体。

2.2 取材与低温预处理 研究普遍表明,水稻花药培养的最佳时期是单核靠边期,过早或过晚取穗都会影响愈伤诱导率^[13]。田间取材的最佳时间一般为晴天的8:00-10:00或16:00-18:00,此时花粉发育正处于分裂盛期^[14]。田间取穗时可通过某些器官的形态指标来判断花药的发育时期。通常,幼穗苞大而不破,剑叶与倒二叶的叶枕距为8~13cm,多数颖壳已接近成熟大小呈现黄绿色,花丝长度为颖壳的1/3~1/2。但在不同类型的水稻材料中,这种形态指标会有所变化。因此,在实际操作过程中,应首先参考植株的形态指标,然后通过镜检结果来确定花粉发育的确切时期,以大部分花粉处于单核靠边期为宜。

取材后的低温预处理可以明显提高水稻花药培养的愈伤诱导率。低温处理的作用机制是延缓花粉的退化、维持花粉发育的生理环境、提高内

源性生长素水平并降低乙烯水平、启动雄核发育等^[3]。方法是将幼穗的叶片剪去大部分留叶鞘,用75%的酒精棉球擦拭表面进行消毒,然后用干净的湿纱布包裹放入保鲜袋中,置于冰箱中冷藏。以往的研究表明,一般低温8~10℃,预处理7~10d,培养效果比较好,最长不超过20d^[4]。另外,不同材料低温处理的最适温度和最适时间也会略有不同^[9]。

2.3 培养基配制 培养基分为诱导愈伤培养基和愈伤分化培养基,这两种培养基的组成及配比十分重要,直接影响花药培养力。培养基中基本培养基、激素、碳源和有机附加物等各种组分相互作用相互影响,目前,还很难找到一种可以适用于各种类型水稻材料的万能培养基。

2.3.1 基本培养基 水稻花药培养中应用的基本培养基种类很多,如N6、马铃薯培养基、合5、SK3、通用、M8和改良M8等。用不同的培养基培养同一材料,会表现出不同的花培效果。通过大量实验及比较分析,在诱导愈伤阶段,N6培养基适用于粳稻^[15]、合5适用于籼稻^[16]、SK3适用于籼粳杂交^[17]、通用和M8对籼稻和粳稻均较适用^[18];在愈伤分化阶段,不论籼稻或粳稻,MS培养基均比较适用。在实际应用中,应该根据不同类型的水稻材料,适当调整培养基的各种组分及配比,以获得最佳培养效果。

2.3.2 激素配比 培养基中外源激素的种类及比例在水稻花药培养过程中起着至关重要的作用,合理调节KT、2,4-D、NAA和6-BA等激素的用量和比例可以提高水稻花药培养的效率。通常,在诱导愈伤阶段以生长素类为主,一般用2,4-D、NAA等,其中2,4-D是诱导愈伤组织最有效的物质;愈伤分化阶段以细胞分裂素类为主,一般用6-BA、KT等。研究表明,使用复合激素较使用单一激素效果更好,不同材料的最适激素种类及比例有很大差异^[4]。郭书巧等^[19]以3个籼粳杂交组合 F_1 和粳稻品种武运粳8号为试验材料,结果表明2.0mg/L 2,4-D+1.0mg/L NAA+0.2mg/L KT为最佳的激素诱导配比,2.0mg/L 6-BA+0.5mg/L KT具有更好的分化效果。向发云等^[20]以5个籼稻杂交组合 F_1 的花药为材料,发现2.0mg/L 2,4-D+3.0mg/L NAA+1.0mg/L KT诱导愈伤效果较好,2.0mg/L KT+0.5mg/L

6-BA+0.5mg/L NAA 分化效果较好。张艳敏等^[21]以3个粳稻品种为材料,研究表明诱导愈伤组织的最佳组合为2.0mg/L 2,4-D+0.5mg/L NAA+1.0mg/L KT。

2.3.3 碳源 早期研究人员通常用蔗糖作为水稻花药培养的标准碳源,适宜浓度为3%~6%^[4]。随后研究表明,在水稻尤其是籼稻的花药培养中,麦芽糖作为碳源诱导愈伤效果要优于蔗糖,并且诱导出的愈伤组织具有更好的分化效果^[13,22]。朱永生等^[23]的研究也得出相似结论,并证明混合使用蔗糖和麦芽糖(3%蔗糖+3%麦芽糖)有更好的花培效果。使用混合碳源比使用单一碳源的效果要好,原因可能是混合碳源在诱导愈伤过程中满足了不同发育阶段糖类代谢的不同需求^[9]。

2.3.4 其他成分 培养基中其他成分的添加也会影响愈伤诱导及分化。研究表明,在培养基中添加天然活性物质如马铃薯提取液、椰子汁、玉米汁、丝瓜伤流液等和有机添加物如山梨醇、水解酪蛋白、酵母汁、脯氨酸等,对提高籼稻绿苗产出率有较为明显的效果^[24]。活性炭是常用的添加剂,丁元丰等^[25]研究表明活性炭可以显著增加水稻组合的苗高、根长、根数和鲜重,有利于花培苗的生长与分化。在籼稻诱导愈伤阶段是否添加脯氨酸存在争议,大多数人认为添加适当浓度的脯氨酸后,可以提高籼稻的愈伤组织诱导率^[26]。

2.4 接种与培养 用75%的酒精将稻穗表面消毒,然后剥除苞叶,将合适的带枝小穗在新配制的10%次氯酸钠溶液中浸泡10~20min,期间不时振荡搅拌,然后用无菌水冲洗4~5次,用无菌滤纸吸干水后,用“剪颖抖药法”在无菌条件下把花药接种到诱导愈伤培养基上,每皿接种200~300枚花药。在26~28℃的黑暗条件下培养,接种30~60d内统计愈伤组织块数。

将已长出的2~3mm、淡黄紧凑的新鲜愈伤转移至分化培养基中进行光照培养,光培养的光照强度为1000~1500Lx,光照时间为10~12h/d,室温保持在26~28℃,分化培养45d内统计绿苗丛数和白苗丛数。计算愈伤诱导率、绿苗分化率、白苗分化率、分化率以及绿苗产率,以确定培养材料花药培养力的大小。计算公式如下。

$$\text{愈伤诱导率}(\%) = \frac{\text{诱导愈伤组织的花药数}}{\text{接种总花药数}} \times 100$$

$$\text{绿苗分化率}(\%) = \frac{\text{分化出绿苗的愈伤组织数}}{\text{接种愈伤组织总块数}} \times 100$$

$$\text{白苗分化率}(\%) = \frac{\text{分化出白苗的愈伤组织数}}{\text{接种愈伤组织总块数}} \times 100$$

$$\text{绿苗产率(培养力)}(\%) = \text{愈伤诱导率} \times \text{绿苗分化率}$$

$$\text{分化率}(\%) = \text{绿苗分化率} + \text{白苗分化率}$$

2.5 壮苗与炼苗 当幼苗长至2~3cm高时,将其转移至生根培养基中壮苗。培养约7d后幼苗根长达1.5~2.5cm,打开瓶盖炼苗3d,然后清洗根部培养基,将较老叶、黄根剪去,用清水继续养苗3~5d后,移栽到大田进行常规管理。

3 水稻花药培养存在的问题

水稻花药培养是以系统选育与杂交育种为基础,利用植物组织培养技术发展起来的一项育种新技术。与分子标记辅助选择、转基因等其他分子生物学技术相结合,可以培育出优质、高产、多抗、广适的优良新品种,但目前影响水稻花培效率的遗传机理尚不清楚,在实践中仍然存在许多技术困难。

水稻花药培养整个过程步骤繁琐、周期长、工作量大,并且绿苗产率不高,尤其是籼稻更低,有些材料甚至不能诱导出愈伤组织或者难以得到再生植株,从而阻碍了花药培养技术在籼稻育种上的应用。一般认为,绿苗产率受基因型影响最大。目前,常用的方法是从综合性状优良的水稻材料中,筛选出绿苗产率高的材料,再配制优异的杂交组合进行培养来获取较大量的花培后代群体。

在花药培养过程中,由于取材时期、培养基组分和培养条件等因素的影响,往往会存在花药褐化和白化苗的问题。在诱导愈伤早期花药常常会褐化,小孢子由于得不到充足的营养而退化,从而影响愈伤组织的诱导形成。为减少褐化,除了取材时要选择大部分花药处于单核靠边期的幼穗外,还应注意适宜的光照强度、光照时间和培养温度。在绿苗分化阶段,通常还会产生大量的白化苗。已有不少报道表明,花药的生长状态和培养条件均可以影响白化苗分化率。在诱导培养基中,适当降低培养基中无机盐浓度和锰的含量,适量调整2,4-D或者KT的激素配比^[27],既能提高愈伤诱导率,同时又能降低白苗分化率。在愈伤诱导和分化阶段,在不影响正常生长和分化的前提下降低温度,减少光照也可

以降低白苗分化率。

4 水稻花药培养的展望

目前,大部分水稻的绿苗产率仍然很低,尤其是籼稻,远远不能满足育种需要。提高水稻花药培养效率,不仅要选择综合性状优良、花药培养力高的水稻材料,还要完善和优化水稻花药培养技术体系。供体材料确定后,应在田间取材的最佳时间选取大部分花粉处于单核靠边期的幼穗,为后期的花培过程奠定良好的基础。在低温预处理过程中,一般情况下 8~10℃ 低温预处理 7~10d。诱导愈伤和绿苗分化阶段,除了根据不同类型的水稻材料选择合适的基本培养基、最适激素种类及配比、复合碳源和其他成分外,还应注意合适的光温条件,这对花药培养效率有明显的影响。总之,不同材料的适宜培养条件各不相同,所以要在实际工作中不断摸索,寻找某种或某类材料的最佳培养条件。此外,在获得幼苗后,注意移栽前要炼苗,移栽后加强田间管理,以提高成苗率。

基于目前水稻花药培养的研究现状和存在问题,在今后的工作中,应该完善和优化水稻花药培养技术体系,在保证花培效率的同时,尽量使花药培养流程标准化、简单化、快速化。此外,还要拓宽水稻花药培养技术在水稻育种工作中的应用,它不仅可以快速纯合有益基因,应用于传统育种工作中,而且可以与分子标记辅助选择、基因工程等其他分子生物学技术相结合,加速优良新品种的选育与应用。

参考文献

- [1] 向发云,宋志红,刘凯,吴金平,曾祥国,杨国才,胡刚,顾玉成,游艾青. 花药培养在籼稻恢复系提纯与改良中的应用. 湖北农业科学, 2007, 46 (1): 15-17
- [2] 葛胜娟. 水稻花药培养及其在遗传育种上的应用. 种子, 2013, 32 (8): 45-50
- [3] 肖国樱. 水稻花药培养研究. 杂交水稻, 1992 (2): 44-46
- [4] 吴丹,姚栋萍,李莺歌,吴俊,伍富根,邓启云. 水稻花药培养技术及其育种应用的研究进展. 湖南农业科学, 2015 (2): 139-142
- [5] 李春勇,王光建,李洪胜. 花药培养技术在水稻育种中的应用. 农业科技通讯, 2014 (4): 160-162
- [6] 胡建林,周黎,郑兴飞,董华林,费震江,查中萍,游艾青,徐得泽. 水稻花药离体培养的研究现状与展望. 农业科技通讯, 2019 (12): 57-60
- [7] 李三和,陈志军,刘凯,杨国才,王芳芳,胡刚,周雷,阚雯俊,游艾

- 青. 籼稻不育系花药培养诱导条件探讨. 湖北农业科学, 2015, 54 (19): 4868-4870
- [8] 沈锦骅,李梅芳,陈银全,章振华. 花药培养在水稻品种改良上的应用. 中国农业科学, 1982, 15 (2): 15-19
- [9] 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. 中国农业科技导报, 2007, 9 (3): 52-56
- [10] 汪庆,冯都华,崔海瑞,傅俊杰,舒庆尧. 高花药培养效率梗稻杂交组合的筛选. 现代农业科技, 2013 (16): 44-46
- [11] 苗立新,李鑫,崔微微,刘中卓,孙杰. 北方梗稻花药培养力及配合力分析. 辽宁农业科学, 2013 (1): 9-12
- [12] 苗立新,李鑫,张丽丽,李珣,张素红,谢丽霞. 北方梗稻不同基因型花药培养特性比较. 辽宁农业科学, 2013 (3): 43-47
- [13] 李三和,阚雯俊,周雷,刘凯,杨国才,游艾青. 水稻花药培养过程对培养效果的影响. 湖北农业科学, 2018, 57 (24): 164-167
- [14] 陈萍萍,游月华,戴展峰,彭玉林. 不同培养基对水稻花药培养力的影响. 福建农业科学, 2019 (4): 1-3
- [15] 朱至清. 通过氮源比较实验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学, 1975 (5): 484-490
- [16] 凌定厚,姜蕴兰,曾碧霞,何兴兰,庞芝章,黄雪玉,黄鸿枢,黄秉聪. 介绍一种适于籼稻花药培养的培养基 // 花药培养学术讨论会论文集. 北京: 科学出版社, 1977: 265
- [17] 陈英,左秋仙,王瑞丰. 应用正交试验法筛选粳梗稻杂种花药培养基 // 花药培养学术讨论会论文集. 北京: 科学出版社, 1977: 40-49
- [18] 杨学荣,王建人,李还林,李友芳. 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, 1988, 6 (1): 67-74
- [19] 郭书巧,唐海娟,王州飞,张红生. 籼梗杂交 F_1 高效花药培养技术体系的建立. 南京农业大学学报, 2006, 29 (2): 1-5
- [20] 向发云,宋志红,吴金平,曾祥国,吴润玲,冯小明,顾玉成,游艾青. 籼稻材料特性和激素配比对花药培养效率的影响. 湖北农业科学, 2008, 47 (12): 1380-1382
- [21] 张艳敏,高润红,郭桂梅,杜志钊,李梁,何婷,黄剑华. 不同优质梗稻花药对低温和激素处理的培养响应. 上海农业学报, 2011, 27 (2): 121-124
- [22] 孙宗修,斯华敏,程式华,湛小燕. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究. 中国水稻科学, 1993, 7 (4): 227-231
- [23] 朱永生,陈葆棠,张端品. 提高水稻梗稻杂交后代花药培养力的研究. 华中农业大学学报, 2001, 20 (4): 314-317
- [24] 张志雄,向跃武. 水稻综合育种技术及在杂交稻育种中的应用研究. 中国农业科学, 1998, 31 (6): 76-78
- [25] 丁元丰,季彪俊. 活性炭在不同水稻组合花药培养中的作用. 江西农业学报, 2006, 18 (2): 37-40
- [26] 黄翠红,彭圣法,杨瑰丽,刘永柱,郭涛,王慧. 水稻籼型恢复系花药培养初步研究. 广东农业科学, 2014 (3): 13-17
- [27] 贺梅,宋冬明,张丽萍,黄少锋. 水稻花药培养中常见问题及防治措施. 北方水稻, 2010, 40 (5): 50-51

(收稿日期: 2020-07-17)