

水稻花药愈伤组织诱导的多因子正交试验研究

王 辉, 肖小君, 齐泽民*, 黄作喜, 王 芳

(内江师范学院 生命科学学院, 四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 四川 内江 641112)

摘要: 以密阳 46 和培矮 64/8006 杂交 F1 代的花药为材料, 研究两个材料花粉发育时期与叶枕距大小的相关性。结果表明, 密阳 46 在叶枕距 5~7 cm 时, 小孢子大部分处于单核靠后期; 培矮 64/8006 杂交 F1 代稍迟, 叶枕距为 7~9 cm 时, 大部分小孢子才进入单核靠后期。同时通过 $L_9(3^4)$ 正交试验, 研究了培养基类型、激素配比、蔗糖和 2,4-D 浓度对花药出愈率的影响, 筛选出两个品种愈伤组织诱导的最佳培养条件: 密阳 46 为 SK3+4 mg·L⁻¹ 2,4-D+1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+3%蔗糖, 培矮 64/8006 杂交 F1 代为合 5+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+6%蔗糖。

关键词: 水稻; 花药; 愈伤组织诱导; 正交试验

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)04-0545-05

Studies on anther callus induction of rice by orthogonal test

WANG Hui, XIAO Xiao-Jun, QI Ze-Min*, HUANG Zuo-Xi, WANG Fang

(School of Life Science, Neijiang Normal University, Key Laboratory of Colleges and Universities in Sichuan for Research and Utilization of Distinctive Agricultural Undertakings, Neijiang 641112, China)

Abstract: Using the anther of Milyang 46 and the F1 hybrids of Pei'ai 64/8006, the correlation of pollen development with the distance of the pulvinus was studied. The results showed that most of the microspores were in the late uninucleate stage when the distance of the pulvinus was 5-7 cm for Milyang 46; while it was 7-9 cm for the F1 hybrids of Pei'ai 64/8006. Besides, the effects on anther callus induction rate of the types of medium, the ration of plant hormones, the concentration of the sucrose and 2,4-D were investigated by using orthogonal tests $L_9(3^4)$, and the best conditions for callus induction of the two accessions were selected; the Milyang 46 was SK3+4 mg·L⁻¹ 2,4-D+1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+3% sucrose while the F1 hybrids of Pei'ai 64/8006 was HE5+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+6% sucrose.

Key words: rice; anther; callus induction; orthogonal test

水稻花药培养技术是最早应用于生产的生物技术之一。其特点纯合快、周期短。目前,在水稻花药培养技术体系构建、花药培养创造新的种质资源以及花培育种等方面,都得到了很大发展。但水稻花培前期诱导愈伤组织及愈伤组织分化出绿苗的频率较低,一般在 10% 以下,籼稻更低(赵维娜,2004)。同时,在筛选水稻愈伤组织诱导的最佳诱导培养基

和分化培养基时,大都采用简单比较,而没用统计学方法进行处理和分析(张祎颖等,2008;赵海岩等,2005)。正交试验是以数理统计学为基础的一种理想的优化试验设计方法,通过正交试验可用最少的试验次数,从多个因素中确定影响试验结果的各因素的主次和最优结果(杨持,1996)。以密阳 46 和培矮 64/8006 杂交 F1 代两个品种的花药为试材,采

收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-03-06

作者简介: 王辉(1982-),男,四川金堂人,硕士,研究方向为植物遗传育种,(E-mail)whscnj@126.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zmin918@sina.com)

用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,研究了不同基因型材料以及同一基因型材料在不同培养基类型、激素配比及浓度、蔗糖浓度等因素对诱导愈伤组织的影响,旨在说明这些因素的主次关系,并筛选出适合这两个品种花药愈伤组织诱导的最佳外部条件,为建立高效的花培再生体系及后期的遗传转化和分子标记等研究奠定基础,为花培育种创造更多新的种质资源。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试水稻 (*Oryza sativa*) 材料两个:密阳 46 (Milyang 46) 一原种源自韩国,属于籼粳杂交后代选育的强优势恢复系,经南方环境长期栽培驯化,其生育特性及经济性状可能已经变异为粳型稻(张桂芳等,1999)。培矮 64/8006 (Pei' ai 64/8006) 一籼粳交 F1 代,以自育恢复系 8006 为父本,广亲和的培矮 64 为母本杂交收种。2010 年 4 月采用小区分 2 批播种,便于多次取材重复试验。

1.2 方法

1.2.1 取材、镜检与低温预处理 取材于晴天上午 8:00~10:00 进行,此时花粉发育正处于分裂盛期。水稻花粉发育的适宜时期是单核靠边期(又称单核后期)。其外部形态特点:剑叶与倒二叶叶枕距为 5~10 cm,剥穗可见颖花浅绿色,花药伸长至颖壳的 1/3~1/2。田间选取植株健壮、无病斑的主茎,保留剑叶和倒二叶,贴挂标签,湿毛巾包裹,装袋带回。取回的稻穗按照剑叶与倒二叶叶枕距 1~3、3~5、5~7、7~9、9~11 和 11~13 cm 六个长度区间分别进行抽检,每个材料每一区段检测 2~3 个稻穗,每个稻穗均取中段 5 cm 颖花的花药适量置于载玻片上压碎,露出小孢子,加 1~2 滴醋酸洋红染色 1~2 min,镜检以确定花粉发育时期,每一品种制片 10 张。对镜检合格的相同叶枕距的稻穗,先用 75% 的酒精棉球擦拭材料外表,再用消毒后的湿毛巾包裹,装入塑料袋内密封,置 8~10 °C 冰箱,预处理 7~10 d(陈红等,2007)。

1.2.2 培养基和培养条件 剥取低温预处理后的稻穗,取中段 5 cm 于超净工作台上先以 70% 酒精浸泡 20~30 s,无菌水冲洗 3 次,再以浓度为 15% 和 10% 的次氯酸钠分别浸泡 5、15 min,最后无菌水冲洗 3 次,接种不同培养基上。本试验考虑了培养基类型、激素配比、蔗糖浓度、2,4-D 浓度 4 个因素,选

用 $L_9(3^4)$ 正交表(表 1)。每一因素设 3 个水平,A 因素的 3 个水平 1,2,3 分别对应培养基类型 N6,合 5 和 SK3;B 因素 3 个水平 1,2,3 分别对应激素配比 2,4-D,2,4-D+1 mg · L⁻¹ NAA 和 2,4-D+1 mg · L⁻¹ NAA + 0.5 mg · L⁻¹ KT;C 因素分别对应蔗糖浓度 30 g · L⁻¹,60 g · L⁻¹ 和 90 g · L⁻¹;D 因素分别对应 2,4-D 浓度 0 mg · L⁻¹,2 mg · L⁻¹ 和 4 mg · L⁻¹。正交表及 3 因素的详细配比见表 2。培养基附加琼脂粉 0.5% 和活性炭 0.1%,pH5.8。接种后置于 25.5 °C 恒温培养箱中暗培养,湿度为 55%。定期观察记录花药诱导发育情况,50 d 后统计愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率%=(诱导愈伤组织数/接种花药数)×100),并作方差分析和多重比较。

表 1 诱导愈伤的 $L_9(3^4)$ 正交试验表
Table 1 Design form of orthogonal test $L_9(3^4)$

水平 Level	因素 Factor			
	A 培养基类型 Type of medium	B 激素配比 Ration of plant hormones (mg · L ⁻¹)	C 蔗糖浓度 Concentration of the sucrose (g · L ⁻¹)	D 2,4-D 浓度 Concentration of the 2,4-D (mg · L ⁻¹)
1	N6	2,4-D	30	0
2	合 5	2,4-D+1 NAA	60	2
3	SK3	2,4-D+1 NAA +0.5 KT	90	4

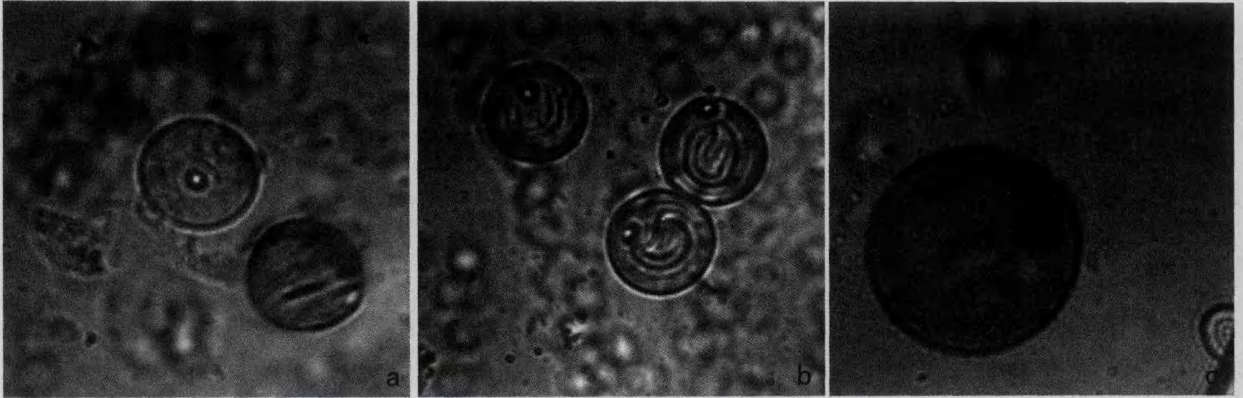
2 结果与分析

2.1 镜检

镜检发现,同一品种在同一穗层,其花药发育的时期差异较小,不同穗层的差异较大,稻穗下端靠近穗节部分的花药发育最晚,一般比顶端晚 1~2 个时期。在叶枕距为 1~5 cm 时,稻穗中部 5 cm 的花药小孢子多数处于单核早中期(图版 I:a);叶枕距 5~9 cm 时,基本都进入单核靠边期(图版 I:b);9~13 cm 时,为双核期和成熟花粉粒时期(图版 I:c)。密阳 46 的主茎穗在剑叶与倒二叶叶枕距为 5~7 cm 时,中部颖花的小孢子多数进入单核靠边期,为最佳取材时期。培矮 64/8006 杂交 F1 代则在叶枕距为 7~9 cm 时,为最佳取材时期。

2.2 愈伤组织诱导

水稻两品种接种的花药在遮光培养 10 d 左右开始变成黄褐色,30 d 时有淡黄色光泽的愈伤组织生成,之后陆续有愈伤组织出现。50 d 后统计出愈率,结果见表 2。



图版 I 水稻花药小孢子发育时期的比较 ($\times 400$) a. 单核早中期; b. 单核后期/靠边期, 液泡清晰可见; c. 成熟花粉粒, 细胞大且呈球形。

Plate I Comparison of the microspore of the rice anther at different developmental stages ($\times 400$)

a. At early to middle uninucleate stage; b. At late uninucleate stage, the vacuole can be clearly seen; c. Mature pollen grains, the cells are large and spherical.

表 2 水稻诱导愈伤的 $L_9(3^4)$ 试验结果

Table 2 The results of callus induction of rice in orthogonal test $L_9(3^4)$

品种 Variety	试验号 Test No.	因素 Factor				接种数(枚) Inoculated number	出愈率(%) Calli induction	愈伤膨大情况 Calli swollen situation	综合表现 Comprehensive performance
		A	B	C	D				
密阳 46 Milyang 46	1=A1B1C1D1	1	1	1	1	300	3.00	+	+
	2=A1B2C2D2	1	2	2	2	300	4.67	+++	+
	3=A1B3C3D3	1	3	3	3	300	17.33	++++	++++
	4=A2B1C2D3	2	1	2	3	300	10.67	++	++
	5=A2B2C3D1	2	2	3	1	300	8.33	+++	++
	6=A2B3C1D2	2	3	1	2	300	16.00	+	+
	7=A3B1C3D2	3	1	3	2	300	5.67	+	+
	8=A3B2C1D3	3	2	1	3	300	22.67	++++	++++
	9=A3B3C2D1	3	3	2	1	300	10.67	+++	+++
培矮 64/8006 Pe'ai64/8006	1=A1B1C1D1	1	1	1	1	300	1.33	+	+
	2=A1B2C2D2	1	2	2	2	300	24.00	+++	++
	3=A1B3C3D3	1	3	3	3	300	26.00	++++	++++
	4=A2B1C2D3	2	1	2	3	300	25.33	++++	+++
	5=A2B2C3D1	2	2	3	1	300	24.00	+++	++
	6=A2B3C1D2	2	3	1	2	300	28.67	++++	++++
	7=A3B1C3D2	3	1	3	2	300	10.67	++	+
	8=A3B2C1D3	3	2	1	3	300	11.33	++	++
	9=A3B3C2D1	3	3	2	1	300	25.67	+++	+++

注: +++++>++++>+++>++>+。

结果显示,两品种不同处理均诱导出了愈伤组织,籼粳交 F1 代平均出愈率高于籼型材料。密阳 46 最高出愈率为处理 8,达 22.67%;培矮 64/8006 最高出愈率为处理 6,达 28.67%。

表 3 结果表明,对于密阳 46, D 因素的极差最大, B 次之, C 第三, A 最小。因此,参试的 4 个因素对密阳 46 花药出愈率影响主次关系为 $D > B > C > A$, 即 2,4-D 浓度 > 激素配比 > 蔗糖浓度 > 培养基类型。由于培养基类型对出愈率的影响最小, 方差

分析作为误差项, 只分析 2,4-D 浓度、激素配比和蔗糖浓度 3 因素各水平间差异的显著性, 结果为 3 因素的 F 值均 $< F_{0.05}$, 说明差异不显著, 因 3 者的自由度相同, 由 F 值确定它们的主次关系为 $D > B > C$ 。根据表 3 中各因素水平的平均值可以看出, 培养基类型以 A3 水平为最好, 激素配比以 B3 水平为最好, 蔗糖浓度以 C1 水平为最佳, 2,4-D 浓度以 D3 水平为最佳。所以 4 个因素的理论最佳组合为 $A_3B_3C_1D_3$ 。即 $SK3+4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+3%蔗糖。试验中发现, 2,4-D浓度由2 mg·L⁻¹增至4 mg·L⁻¹时,密阳46愈伤组织诱导率增加明显,同时,诱导率随激素种类

的增加而不断升高。因此,在适当条件下,试验应尽量增加激素种类的搭配和提高2,4-D浓度,以提高诱导率。

表3 水稻愈伤组织诱导率试验结果的直观分析
Table 3 Audio-visual analysis concerning to the results of callus induction in rice

品种 Variety	因素和 Total of the factors	A	B	C	D	平均值 Average values	A	B	C	D
密阳46 Milyang 46	K1	25.00	19.34	41.67	22.00	x1	8.33	6.45	13.89	7.33
	K2	35.00	35.67	26.01	26.34	x2	11.67	11.89	8.67	8.78
	K3	39.01	44.00	31.33	50.67	x3	13.00	14.67	10.44	16.89
	R	14.01	24.66	15.66	28.67	R'	4.67	8.22	5.22	9.56
培矮64/8006 Peifai64/8006	K1	51.33	37.33	41.33	51.00	x1	17.11	12.44	13.78	17.00
	K2	78.00	59.33	75.00	63.34	x2	26.00	19.78	25.00	21.11
	K3	47.67	80.34	60.67	62.66	x3	15.89	26.78	20.22	20.89
	R	30.33	43.01	33.67	12.34	R'	10.11	14.34	11.22	4.11

对于培矮64s/8006, B因素的极差最大, C次之, A第三, D最小。因此, 4个因素对其花药诱导愈伤组织影响效应的主次依次为: B>C>A>D, 即激素配比>蔗糖浓度>培养基类型>2,4-D浓度。将2,4-D浓度作误差项, 方差分析培养基类型、激素配比和蔗糖浓度3因素各水平之间差异的显著性, 结果为3因素的F值均<F_{0.05}, 说明它们之间的差异不显著。由F值确定它们的主次关系为D>B>C。多重比较(LSD法)结果在显示试验因素B1, 3水平差异显著, 1, 2和2, 3水平差异不显著。说明在诱导花药出愈率时, 使用多种激素效果优于单一激素。根据表3中各因素水平的平均值分析, 4因素的理论最优组合为A2B3C2D2, 即合5+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+6%蔗糖。

3 结论与讨论

水稻花药愈伤组织的形成受到多种因素的影响, 取材时期、培养基类型、激素种类和浓度配比是其中主要的控制因素。如果考虑所有因素进行全面试验, 工作量相当大, 结果分析也十分繁杂。正交试验设计用部分试验来代替全面试验, 通过对部分试验结果的分析, 了解全面试验的情况, 减少试验次数和设计分析方法的繁杂, 克服在培养条件设计上的盲目性, 提高了工作效率和试验的准确性。

3.1 关于花粉发育时期与水稻叶枕距大小的相关性

花药细胞发育时期一般分为四分体时期、小孢子时期(单核早期、单核中期、单核靠边期、双核期)和成熟花粉粒时期。不同植物花药培养最适宜的发

育时期不同。黄瓜小孢子处于单核中后期的花药诱导愈伤组织培养出愈率最高(谢森等, 2005)。水稻花药诱导愈伤组织的适宜时期为单核靠边期(赵维娜, 2004; 赵海岩等, 2005; 陈红等, 2007)。本试验发现, 不同品种的水稻, 在剑叶与倒二叶叶枕距相同时, 其稻穗中部颖花的花粉发育时期不尽相同, 密阳46在叶枕距5~7 cm时, 大部分小孢子处于单核靠边期; 而培矮64/8006杂交F1代在叶枕距5~7 cm时, 多数仍处于单核中期, 而叶枕距为7~9 cm时, 大部分小孢子才进入单核靠边期。

3.2 基因型对出愈率的影响

试验比较了恢复系密阳46和培矮64/8006 F1代的出愈情况, 结果表明(表2): 基因型已稳定的品种(密阳46), 其平均出愈率远低于基因正处于分离盛期的材料(培矮64/8006 F1代)。究其原因, 可能与材料本身亲缘关系以及基因分离大小有关。另外, 由于密阳46于南方环境长期栽培驯化, 从其生育特性及经济性状表现判断可能已变异为籼型稻(张桂芳等, 1999), 这与陈红等(2007)研究认为籼粳交出愈率高于籼稻的结论相符。

3.3 诱导条件对出愈率的影响

不同品种的水稻花药诱导愈伤组织条件是不同的。对于培养基类型, 柳美南等(2008)认为适合粳稻的N6、籼稻的合5、籼粳杂种的SK3以及对籼、粳稻都有较好效果的通用和M8培养基。本试验结果与之不符, 籼稻以SK3最好, 籼粳杂种以合5最好。其原因有待进一步研究。殷红等(2006)认为2,4-D是诱导水稻花药愈伤组织的必要条件, 4%~6%的蔗糖浓度适合水稻诱导愈伤组织。本试验在不加2,4-D和用NAA及KT代替的情况下, 也能诱导愈

伤组织形成,但效果相对较差,这可能是多种激素混合形成“复合启动因子”,对花药愈伤组织的形成有促进作用。

3.4 低温预处理时间对愈伤组织形态结构的影响

陈红等(2007)研究发现,低温预处理 8 d 左右的材料诱导的愈伤组织(结构紧密且略泛白色)好于低温预处理 10 d 以上的材料花药培养出的愈伤组织(松散,成分散小米状)。本试验低温预处理 7~10 d,结果两种材料试验所得的愈伤组织大都松散成小米粒状,转接时较为困难。其原因是否与处理时间过长有关有待进一步研究。

参考文献:

- 杨持. 1996. 生物统计学[M]. 呼和浩特:内蒙古大学出版社,274
- 赵维娜. 2004. 水旱稻杂交 F1 代花药培养技术的研究及其 DH 系的构建[C]. 中国农业大学硕士学位论文,5-6
- 殷红. 2006. 细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社:72-76
- Chen H(陈红), Qin RZ(秦瑞珍). 2007. Improvement of callus induction efficiency in anther culture of autotetraploid rice(提高水稻同源四倍体花药培养愈伤诱导率的研究)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **33**(1):120-125
- Chen H(陈红), Qin RZ(秦瑞珍). 2007. Main factors affecting rice anther culture(水稻花药培养过程中各种影响因子的研究进展)[J]. *J Agric Sci Tech*(中国农业科技导报), **9**(3):52-56
- Liu MN(柳美南), Zhong HM(钟海明), Chen MQ(陈绵桥), et al., 2008. Anther culture and application of rice(水稻花药培养及其应用)[J]. *Mod Agric Sci Tech*(现代农业科技), (17): 234-236
- Xie M(谢森), Qin LY(秦丽颖), Pan JS(潘俊松), et al., 2005. Flower morphogenesis and microspore development versus anther culture of cucumber[J]. *Acta Bot Boreal -Occident Sin*(西北植物学报), **25**(6):1 096-1 100
- Zhan GF(张桂芳), Yang FC(杨孚初), Zhang SH(张世辉), et al. 1999. A preliminary study on the variation of rice restorer line Milyang 46(恢复系密阳 46 变异现象初步研究)[J]. *Hybr Rice*(杂交水稻), **14**(3):15-16
- Zhang YY(张祎颖), Hong RK(洪汝科), Zhang JW(张锦文), et al. 2008. High quality and blast resistance DH lines via anther culture(花药培养获得优质抗稻瘟病水稻)[J]. *Southwest Chin J Agric Sci*(西南农业学报), **21**(1):75-78
- Zhao HY(赵海岩), Zheng WJ(郑文静), Wang CH(王昌华), et al. 2005. Anther culture and off spring breeding of rice(水稻花药培养及后代选育)[J]. *Liaoning Agric Sci*(辽宁农业科学), (1):5-7
- confer ozone tolerance in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiol*, **97**(1):452-455
- Shah K, Kumar RG, Verma S, et al. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings[J]. *Plant Sci*, **161**:1 135-1 144
- Shen H, Hong L, Ye WH, et al. 2007. The influence of the holoparasitic plant *Cuscuta campestris* on the growth and photosynthesis of its host *Mikania micrantha* [J]. *J Exp Bot*, **58**(11):2 929-2 937
- Shen H, Ye WH, Hong L, et al. 2005. Influence of the obligate parasite *Cuscuta campestris* on growth and biomass allocation of its host *Mikania micrantha* [J]. *J Exp Bot*, **56**(415):1 277-1 284
- Stewart GR, Press MC. 1990. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol*, **41**(1):127-151
- Taylor A, Martin J, Seel WE. 1996. Physiology of the parasitic association between maize and witchweed (*Striga hermonthica*): is ABA involved[J]. *J Exp Bot*, **47**(8):1 057-1 065
- Taylor CM, Hastings A. 2004. Finding optimal control strategies for invasive species: a density-structured model for *Spartina alterniflora* [J]. *J Appl Ecol*, **41**(6):1 049-1 057
- Vitousek PM, D'Antonio CM, Loope LL, et al. 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global change [J]. *New Zeal J Ecol*, **21**(1):1-16
- Waterhouse DF. 1994. Biological control of weeds: Southeast Asian prospects[M]. Australia Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research
- Yu SW, Tang ZC. 1999. Plant Physiology and Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press
- Zavaleta ES, Hobbs RJ, Mooney HA. 2001. Viewing invasive species removal in a whole-ecosystem context [J]. *Trends Ecol Evol*, **16**(8):454-459
- Zhang LY, Ye WH, Cao HL, et al. 2004. *Mikania micrantha* in China—an overview[J]. *Weed Res*, **44**(1):42-49

(上接第 525 页 Continue from page 525)