

花粉离体培养基的优化和苯达松除草剂对敏感型水稻恢复系‘Mc526’花粉活力的影响

王云生^{1,2}, 谢震¹, 陆徐忠², 宋丰顺², 李莉², 杨剑波^{2,*}

¹安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; ²安徽省农业科学院水稻研究所, 合肥 230031

摘要: 建立了适合水稻花粉离体萌发的液体培养基配方, 并用花粉萌发和碘-碘化钾(I₂-KI)染色测定法检测了喷施苯达松后含敏感致死基因的水稻恢复系‘Mc526’的花粉生活力。结果表明, 苯达松处理前期(施后 1~4 d), ‘Mc526’花粉活力与未作处理的接近; 处理后期(施后 5~8 d)略低于未作处理的, 但差异不显著。苯达松对母本结实率影响不显著。

关键词: 水稻; 恢复系; 苯达松敏感致死基因; 花粉活力; 液体培养基

The Optimization of Pollen Media *in vitro* and the Influence of Bentazon on Pollen Viability of Rice (*Oryza sativa* L.) Restorer Line ‘Mc526’

WANG Yun-Sheng^{1,2}, XIE Zhen¹, LU Xu-Zhong², SONG Feng-Shun², LI Li², YANG Jian-Bo^{2,*}

¹College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; ²Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China

Abstract: A solution medium for pollen germination of rice (*Oryza sativa*) *in vitro* was established. After bentazon treatment, the pollen viability of rice restorer line ‘Mc526’, which included bentazon sensitive lethal (*bsl*) gene, was researched by using pollen germination and I₂-KI pigmentation. The results showed that in the early treated period (1–4 d), the pollen viability of ‘Mc526’ was similar to the control. And in the later period (5–8 d), the pollen viability was a bit lower than the control, but the difference was not obvious. It indicated that bentazon had no salient influence on the setting rate of sterile line.

Key words: rice; restorer line; bentazon sensitive lethal gene; pollen viability; culture medium

苯达松(bentazon)为苯并噻二唑(benzothiadiazole, BTH)类除草剂, 作用的靶位点为光系统II的D1蛋白, 可阻断非环式光合电子传递链, 抑制光合作用, 从而引起敏感型植物死亡(徐志防等 1999; Han 和 Wang 2002; Wu 和 Wang 2003)。其对莎草科杂草有杀除作用, 可用于水稻田间除草(McFadden 等 1990; Burton 和 Maness 1992)。1984年, Mori 通过 γ -射线辐射‘农林8号’(Norin8, N8), 发现一个对苯达松敏感致死(bentazon sensitive lethal, *bsl*)的突变体‘农林8号m’(Norin8m, N8m)(陈忠明等 1999)。*bsl*基因作为一种化学致死标记, 在杂交水稻中应用价值表现在:(1)将其转入光温敏雄性不育系, 用于杂交制种, 苗期喷施苯达松可清除由于因不育系不稳定而产生的自交种子, 从而确保杂交稻制种的纯度;(2)将*bsl*基因转育到恢复系中, 用于父母本混播制种, 抽穗期喷施苯达松除去恢复系, 实

现制种机械化(陈忠明等 1999; Zhang 等 2002)。朱启升(2004)将水稻‘农林8号m’与恢复系材料杂交, 选育出对苯达松敏感且杂种优势强的恢复系, 用于父母本混播制种, 从而为应用*bsl*基因革新水稻杂交制种技术奠定了基础。但如果花期喷施苯达松导致恢复系花粉活力下降, 必然对不育系结实率产生影响, 这将不利于制种产量和质量的提高。因此, 此项技术在推广之前, 应研究其可行性。本文以水稻的混制一号杂交组合[‘Mc526’(含有*bsl*基因)×‘绿3A’]为材料,

收稿 2007-10-18 修定 2007-11-21

资助 安徽省科技攻关(重大)项目(06003010B)和安徽省教育厅自然科学基金项目(2005KJ169)。

致谢 安徽省农业科学院绿色食品研究所朱启升、杨前进和张德文先生在本文完成过程中曾给予帮助。

* 通讯作者(E-mail: yjianbo@263.net; Tel: 0551-2160212)。

在优化其花粉离体培养条件的基础上, 结合对父母本结实率的调查, 用花粉萌发和碘-碘化钾(I₂-KI)染色测定法研究苯达松处理对水稻花粉活力的影响, 以期能为混播制种技术的可行性提供参考。

材料与方 法

材料为水稻[(*Oryza sativa* L.)混制一号杂交组合[‘Mc526’(含有 *bsl* 基因)×‘绿3A’], 由安徽省农业科学院朱启升先生提供。试验在安徽省天长市国家丰产工程安徽省示范基地进行。早育秧, 5月28日播种, 6月21日人工移栽, 父母本比为1:5, 小区面积1.67 m×3.99 m, 区间间隔1 m, 重复3次。沙质土壤, 肥力中等。分别于现穗期(抽穗3%~5%)、始穗期(抽穗10%)、抽穗期(抽穗50%)和齐穗期(抽穗80%) (廖伏明等2003), 每亩喷施45 L 3 000 mg·L⁻¹ 苯达松溶液, 田间定畦定量均匀喷雾, 以喷施等量清水作对照。处理25 d后, 随机取小区中间的5株, 调查整株的结实率。并于抽穗期, 用上述相同方法进行苯达松处理后, 每天鉴定一次花粉活力, 连续8 d。试验重复3次。苯达松水剂(25%, V/V)由江苏绿利来公司生产, 其他试剂为国产化学纯。

由于水稻花粉在离开雄花, 即扬粉后仍存有萌发能力的时间很短, 最长只有10 min (王金祥和陈良碧2001; 王胜华等2000)。为了缩短花粉离体时间, 提高花粉的萌发能力, 于水稻开花时将喷施清水的花粉洒落在涂有培养基的载玻片上, 然后将载玻片放置于垫有湿滤纸的培养皿中, 在28℃左右的恒温箱中培养30 min (何小弟等2005)。每种培养液观测5个玻片, 每个玻片5个视野, 以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准, 萌发率=(已萌发的花粉粒数/花粉粒总数)×100%。采用正交试验设计, 研究蔗糖、硼和钙离子对水稻花粉萌发的影响。

采用优化的液体培养基培养经苯达松处理后的‘Mc526’花粉, 统计其花粉总数和萌发花粉数量, 计算花粉萌发率。

I₂-KI 染色测定时, 取经苯达松处理后的‘Mc526’成熟花药放在载玻片上, 加1滴蒸馏

水, 用镊子将花药捣碎, 促使花粉粒释放。再加1滴I₂-KI溶液, 盖上盖玻片。于显微镜下观察5个视野, 统计花粉的染色率(邹琦2000)。

采用SPSS10.0软件统计分析测定数据。

结果与讨论

1 水稻花粉培养基的优化

将蔗糖、H₃BO₄和CaCl₂各分5个水平(蔗糖: 0、50、100、150、200、250 g·L⁻¹; H₃BO₄: 0、10、20、30、40 mg·L⁻¹; CaCl₂: 0、10、20、30、40 mg·L⁻¹), 进行正交设计, 以初步确定适合水稻花粉萌发的浓度组合(表1)。方差分析表明, 差异显著的因子依次为: 蔗糖、H₃BO₄、蔗糖×H₃BO₄、蔗糖×CaCl₂。CaCl₂在正交试验中的作用并不显著, 而是在蔗糖和H₃BO₄的主导作用下起辅助作用。

根据正交试验进一步分析各水平均值的结果表明: 不同蔗糖浓度下水稻花粉萌发率以100 g·L⁻¹最高(平均萌发率为23.48%)、150 g·L⁻¹次之(平均萌发率为22.58%), H₃BO₄以20 mg·L⁻¹的为最高(平均萌发率为32.55%), CaCl₂以40 mg·L⁻¹为最高(平均萌发率为20.14%)。据此推测三因子的最佳组合培养基应为: 100或150 g·L⁻¹蔗糖+20 mg·L⁻¹ H₃BO₄+40 mg·L⁻¹ CaCl₂。由于以上组合未在正交试验中出现, 为了验证正交试验的结论, 进一步做了确定适合水稻花粉萌发的蔗糖浓度实验。在确定H₃BO₄ (20 mg·L⁻¹)和CaCl₂ (40 mg·L⁻¹)浓度的基础上, 对蔗糖又做了100、125和150 g·L⁻¹ 3个浓度梯度试验。由表2可知, 125与100和150 g·L⁻¹蔗糖之间差异显著, 而100和150 g·L⁻¹之间差异不显著, 其中最适宜花粉管伸长生长的蔗糖浓度为125 g·L⁻¹ (平均萌发率为62.22%)。据此认为, 适合于水稻花粉生长的液体培养基最佳组合应为: 125 g·L⁻¹蔗糖+20 mg·L⁻¹ H₃BO₄+40 mg·L⁻¹ CaCl₂。

2 苯达松对‘Mc526’花粉管萌发的影响

采用优化的水稻花粉萌发培养基, 观察苯达松处理后的花粉萌发率。花粉平均萌发率为58.23%, 略低于未经苯达松处理的(60.75%), 尤其是处理后期(施药后5~8 d)更加明显, 但差异未达显著水平($P=0.135$) (图1, 表3)。这表明, 抽穗期喷施适

表1 水稻花粉的萌发率

Table 1 Germination rate of rice pollen

编号	蔗糖浓度 /g·L ⁻¹	H ₃ BO ₄ 浓度 /mg·L ⁻¹	CaCl ₂ 浓度 /mg·L ⁻¹	花粉总数	花粉萌发数	萌发率 /%
1	0	0	0	1 024	4	0.40 ^d
2	0	10	10	1 011	41	4.06 ^d
3	0	20	20	1 032	105	10.20 ^c
4	0	30	30	1 064	32	3.05 ^d
5	0	40	40	1 211	113	5.34 ^d
6	50	0	20	1 184	84	4.10 ^d
7	50	10	30	1 005	157	15.65 ^b
8	50	20	40	1 210	417	34.50 ^{ab}
9	50	30	0	1 165	208	17.85 ^b
10	50	40	10	1 100	59	5.35 ^d
11	100	0	40	1 101	184	9.72 ^c
12	100	10	0	730	256	35.01 ^{ab}
13	100	20	10	1 055	466	44.20 ^a
14	100	30	20	1 075	237	22.01 ^b
15	100	40	30	1 115	45	6.50 ^{cd}
16	150	0	10	1 157	24	2.05 ^d
17	150	10	20	1 004	139	13.85 ^c
18	150	20	30	1 032	224	40.86 ^a
19	150	30	40	1 039	556	35.62 ^{ab}
20	150	40	0	1 074	208	20.41 ^b
21	200	0	30	1 101	92	5.31 ^d
22	200	10	40	1 160	251	15.59 ^b
23	200	20	0	1 030	89	10.61 ^c
24	200	30	10	949	105	2.93 ^d
25	200	40	20	1 077	40	3.76 ^d
MS	364.10	418.99	72.96			
F	5.17*	5.95**	1.036			

培养条件为: 28 ℃, 30 min; 不同的字母代表差异显著($P < 0.05$); *和**分别代表0.05和0.01的显著水平。下表同此。

表2 蔗糖对水稻花粉萌发的影响

Table 2 Effect of sucrose on rice pollen germination

编号	蔗糖浓度 /g·L ⁻¹	H ₃ BO ₄ 浓度 /mg·L ⁻¹	CaCl ₂ 浓度 /mg·L ⁻¹	花粉总数	花粉萌发数	萌发率 /%
1	100	20	40	1 024	468	45.67 ^b
2	125	20	40	950	591	62.22 ^a
3	150	20	40	930	443	43.30 ^b

培养条件为: 28 ℃, 30 min。

量的 3 000 mg·L⁻¹ 苯达松溶液对 ‘Mc526’ 花粉萌发没有明显的抑制作用。

3 苯达松对 ‘Mc526’ 花粉 I₂-KI 染色的影响

‘Mc526’ 成熟花粉的可育率较高(平均可育

率为 95.07%), 败育花粉以典败为主(平均典败率为 3.71%)。苯达松处理前期(施药后 1~4 d)的花粉可育率(平均可育率为 94.62%)与未经苯达松处理的差异甚微; 而苯达松处理后期(施药后 5~8 d)花粉

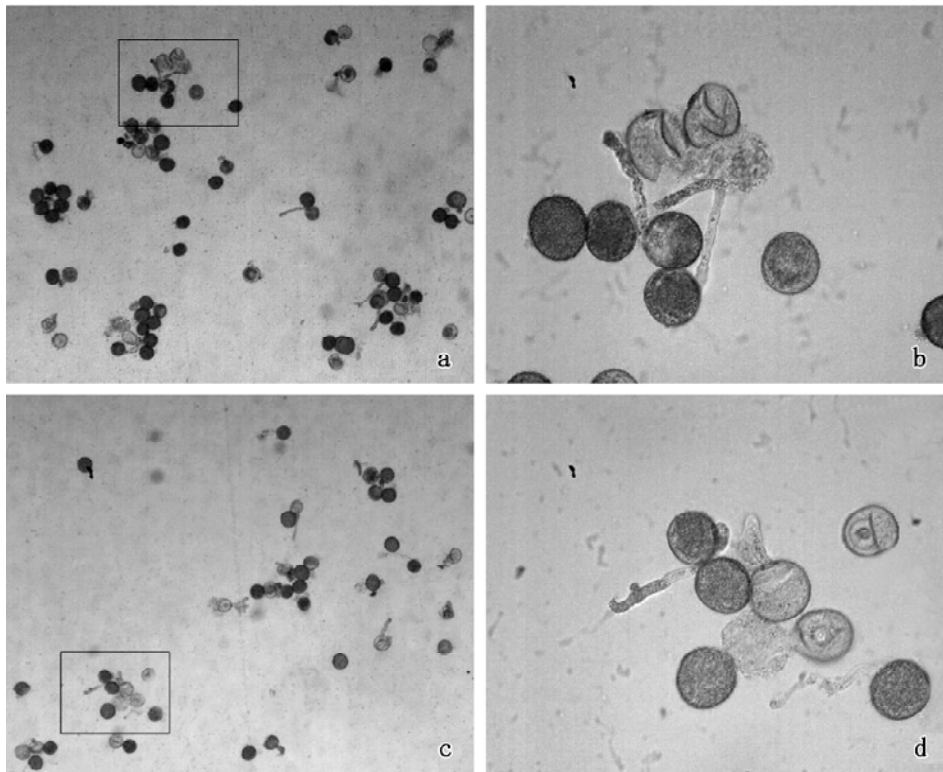


图1 ‘Mc526’抽穗期花粉萌发的显微观察

Fig.1 Micro-observation of ‘Mc526’ pollen germination at heading period

a : 对照的第6天(放大倍数100×); b : 对照的第6天(放大倍数400×); c : 苯达松处理后第6天(放大倍数100×); d : 苯达松处理后第6天(放大倍数400×)。

表3 苯达松对‘Mc526’花粉萌发的影响

Table 3 Effect of bentazon on ‘Mc526’ pollen germination

处理时间/d	花粉萌发率/%	
	对照	处理
1	62.86±1.23	62.47±0.93
2	63.81±0.56	63.78±0.75
3	59.90±2.10	59.00±1.36
4	60.02±1.36	59.47±2.01
5	59.08±0.69	55.60±1.02
6	64.12±2.11	56.53±2.35
7	60.00±2.35	54.76±2.15
8	56.24±1.78	54.26±3.01

液体培养基组分为: 125 g·L⁻¹蔗糖、20 mg·L⁻¹ H₃BO₄、40 mg·L⁻¹ CaCl₂; 培养条件为: 28℃, 30 min。

可育率(平均可育率为92.84%)有所下降, 但差异不显著($P=0.059$) (表4)。这表明, 抽穗期喷施适量的3 000 mg·L⁻¹苯达松溶液对‘Mc526’花粉育性没有明显影响。

4 苯达松对混制一号父母本结实率的影响

由表5可知, 苯达松显著抑制‘Mc526’结实, 不同抽穗期喷施的结实率较未喷施的下降90.39%。这表明, 花期喷施适量苯达松可有效降低恢复系结实对杂交稻种纯度的影响。而不同抽穗期喷施苯达松的‘绿3A’结实率与未喷施苯达松的差异不显著($P=0.154$), 表明花期喷施适量的3 000 mg·L⁻¹苯达松溶液对不育系结实率无显著影响。但随着喷施时期的推迟, 恢复系结实率不断提高, 如齐穗期施药比现穗期的‘Mc526’结实率提高286.84%。

总之, 喷施时期的推迟会对杂交稻种纯度产生影响, 不利于机械化制种。为了提高杂交稻种纯度, 应选择水稻抽穗早期施药。此外, 抽穗期喷施苯达松对‘Mc526’花粉活力并不产生显著影响。这些对用*bsl*基因实现杂交水稻机械化混播制种有一定的参考意义。

表4 苯达松对‘Mc526’花粉育性的影响
Table 4 Effect of bentazon on ‘Mc526’ pollen procreation

处理时间/d	对照				处理			
	不育率			可育率/%	不育率			可育率/%
	典败率/%	圆败率/%	染败率/%		典败率/%	圆败率/%	染败率/%	
1	5.28±0.35	0.28±0.11	0.38±0.12	94.07±0.79	4.78±0.59	0.43±0.21	0.72±0.26	94.06±0.12
2	4.14±0.36	0.53±0.65	0.61±0.35	94.72±0.37	4.38±0.71	0.15±0.55	0.83±0.42	94.62±0.35
3	4.35±0.23	0.54±0.45	0.59±0.46	94.53±0.12	3.32±0.31	1.29±0.24	0.97±0.28	94.42±0.21
4	3.29±0.59	0.64±0.68	0.87±0.31	95.20±0.81	3.31±0.80	0.50±0.32	0.83±0.36	95.36±0.61
5	3.31±0.23	0.50±0.45	0.83±0.40	95.36±0.69	4.80±0.22	0.48±0.41	1.44±0.54	93.29±0.25
6	3.05±0.65	0.81±0.33	0.81±0.61	95.33±0.77	5.32±0.64	0.53±0.45	1.60±0.12	92.55±0.91
7	3.17±0.25	0.74±0.51	0.52±0.25	95.58±0.58	5.12±0.21	1.02±0.36	0.88±0.20	92.97±0.56
8	2.50±0.29	0.61±0.12	1.14±0.39	95.76±0.36	6.02±0.33	0.84±0.25	0.60±0.21	92.54±0.74

表5 不同抽穗期喷施苯达松对混制一号父母本结实率的影响
Table 5 Effect of spray application of bentazon in different heading stages on the setting rates of restorer line and sterile line of hybrid rice combination Hunzhi 1

品种	结实率/%				
	对照	现穗期	始穗期	抽穗期	齐穗期
‘Mc526’	81.88±5.81	3.80±1.03	4.10±0.94	8.89±2.13	14.70±3.15
‘绿3A’	62.68±3.25	61.94±4.21	62.11±3.13	61.73±4.51	63.05±4.78

参考文献

- 陈忠明, 邹江石, 曾大力, 钱前(1999). 水稻农林8号m苯达松敏感致死性的遗传及其应用前景. 杂交水稻, 14 (2): 39~40
- 何小弟, 赵正兰, 周魁, 吴发明, 徐玮玮, 刘华(2005). 17种梅(桃)属观赏树木花粉生活力的比较. 南京林业大学学报, 29 (2): 29~32
- 廖伏明, 杨益善, 袁隆平(2003). 水稻高世代光温敏不育系低温下育性选择效果研究. 杂交水稻, 18 (4): 51~54
- 王金祥, 陈良碧(2001). 不同气体下贮藏的3种禾本科植物花粉活力和呼吸速率变化. 植物生理学通讯, 37 (2): 113~116
- 王胜华, 陈放, 周开达(2000). 水稻花粉的离体萌发. 作物学报, 26 (5): 609~612
- 徐志防, 罗广华, 王爱国, 陈贻竹(1999). 光合作用的光抑制与光合器官的活性氧代谢. 植物生理学通讯, 35 (4): 325~332
- 邹琦(2000). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社
- 朱启升(2004). 杂交水稻混播制种技术研究进展. 作物研究, 18 (4): 204~207
- Burton JD, Maness EP (1992). Constitutive and inducible bentazon hydroxylation in shattercane (*Sorghum bicolor*) and johnsongrass (*S. halapense*). Pestic Biochem Physiol, 44: 40~49
- Han Y, Wang C (2002). Physiological basis of bentazon tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) lines. Weed Biol Manag, 2: 186~193
- McFadden JJ, Gronwald JW, Eberlein CV (1990). *In vitro* hydroxylation of bentazon by microsomes from naphthalic anhydride-treated corn shoots. Biochem Biophys Res, 168 (1): 206~213
- Wu C, Wang C (2003). Physiological study on bentazon tolerance in inbred corn (*Zea mays*). Weed Tech, 17: 565~570
- Zhang J, Xu Y, Wu X, Zhu L (2002). A bentazon and sulfonyleurea sensitive mutant: breeding, genetics and potential application in seed production of hybrid rice. Theor Appl Genet, 105: 16~22