

## 研究报告 Original Papers

## 预处理和培养温度对陆稻游离小孢子愈伤组织诱导及分化的影响

郭桂梅<sup>1,2,\*</sup>, 何婷<sup>1,2,\*</sup>, 高润红<sup>1,2</sup>, 徐红卫<sup>1,2</sup>, 陈志伟<sup>1,2</sup>, 黄亦辰<sup>1,2,3</sup>, 杨沙沙<sup>1,2,3</sup>, 刘成洪<sup>1,2</sup>, 李颖波<sup>1,2</sup>, 陆瑞菊<sup>1,2</sup>, 黄剑华<sup>1,2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106; <sup>2</sup>上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106; <sup>3</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306

**摘要:** 以陆稻品种‘云2号’和‘云3号’为材料, 分别研究了花药预处理、游离小孢子预处理和小孢子初期培养温度对小孢子愈伤组织产量及绿苗形成数的影响。结果表明, 将游离前的小孢子花药在32 °C下预处理2 d, 或将游离小孢子在32 °C下预处理2 d, 均可以提高小孢子的愈伤组织产量; 将游离小孢子置于32 °C培养2 d后转入25 °C培养优于只置于25 °C培养, 可以明显提高小孢子愈伤组织产量及绿苗形成数量。

**关键词:** 陆稻; 小孢子; 温度; 愈伤组织产量; 绿苗产量

## Effects of Pretreatments and Culture Temperature on Callus Induction and Differentiation in Upland Rice Microspore Culture

GUO Gui-Mei<sup>1,2,\*</sup>, HE Ting<sup>1,2,\*</sup>, GAO Run-Hong<sup>1,2</sup>, XU Hong-Wei<sup>1,2</sup>, CHEN Zhi-Wei<sup>1,2</sup>, HUANG Yi-Chen<sup>1,2,3</sup>, YANG Sha-Sha<sup>1,2,3</sup>, LIU Cheng-Hong<sup>1,2</sup>, LI Ying-Bo<sup>1,2</sup>, LU Rui-Ju<sup>1,2</sup>, HUANG Jian-Hua<sup>1,2,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; <sup>2</sup>Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China; <sup>3</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Two cultivars of upland rice were used to investigate the effects of pretreatments of anther or isolated microspores and the initial culture temperature on callus yield and number of green plantlets. The results showed that 2 d of 32 °C pretreatment on anthers or isolated microspores could improve the callus yield. Comparing to continuous culture under 25 °C, 2 d initial culture under 32 °C prior to subculture under 25 °C could remarkably improve the yields of the callus and green plantlet.

**Key words:** upland rice; microspore; temperature; callus yield; green plantlet yield

陆稻是水稻的变异型, 是栽培稻中的旱作生态类型, 泛指能在无垠旱地、坡地及干旱生态环境下生长的栽培稻类。在全球人口膨胀、气候变暖、水资源短缺的情况下, 陆稻的开发和利用对保障全球粮食安全具有特殊的意义。陆稻具有耐旱、耐瘠、适应性广等特点, 一是可直接利用, 二是可作为种质资源改良水稻抗旱性(翟伟等2010; 胡颂平和周清明2001)。

花药和小孢子培养是高效获得纯合二倍体植株的主要手段, 目前水稻花药培养技术已经是一种较为成熟、实用、有效的育种手段, 在育种工作和理论研究中得到了广泛的应用(柳美南等2008; 姜健等2001)。花药培养育种具有育种年限短、遗传类型多、选择效率高等特点(于凤池等

2009), 游离小孢子培养技术是在花药培养技术的基础上发展起来的一种单倍体诱导技术, 除具备花药培养的特点外, 还具有更多的优越性, 是真正意义上的单细胞培养体系, 避免了花药壁等结构的干扰(曹丽娟等2005; 秦余香和夏光敏2004)。小孢子培养技术可以为陆稻遗传改良和种质利用提供一条变异、选择、纯合的新途径。相比花药培养, 该技术的诱变、耐逆选择灵敏度更高, 再生植株加倍后的群体中全部为加倍单倍体, 并且为陆

收稿 2014-10-15 修定 2014-12-03

资助 上海市种业发展项目[沪农科种字(2011)第1号]和上海市农业科学院学科建设专项(LY11)。

\* 共同第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: sw1@saas.sh.cn; Tel: 021-62201032)。

稻的单倍体转基因技术和细胞杂交技术提供技术支持。小孢子培养技术的优化有着重要的育种应用价值和理论研究价值(黄剑华2007; 陆瑞菊等2002), 但由于愈伤诱导率低、分化率低、白化苗严重、基因型限制等问题, 限制了花药小孢子培养技术的发展与应用(王玲仙等2009)。

影响小孢子培养效果的因素有很多, 如供体植株的基因型、供体植株的生长状况、小孢子发育的时期、培养前后预处理和培养液的配方等(Prem等2005; Santra等2012)。预处理可以以幼穗、离体花药为对象, 也可以直接对小孢子进行预处理(赵爱菊等2008)。为了提高供试基因型材料的愈伤组织诱导及绿苗分化, 许多研究者在花药小孢子培养过程中尝试改变环境因子(Yuan等2011; Redha和Talaat 2008), 其中, 冷、热温度刺激, 饥饿、渗透压胁迫以及秋水仙碱、磷酸胺除草剂等化学处理都是花药和小孢子培养中广泛使用的预处理方式(Germana 2011; Islam 2010)。

有关陆稻的小孢子培养报道极少, 国内未见报道。Datta等(1990)研究了陆稻小孢子的胚胎发生和植株再生, 但均采用自然脱落的方法来获得游离小孢子, 且未涉及预处理温度和培养温度。鉴此, 本文研究了预处理温度和培养温度对陆稻小孢子培养效果产生的影响, 报道如下。

## 材料与方 法

### 1 植物材料

以大田种植的陆稻(*Oryza sativa* L.)品种‘云2号’和‘云3号’为供试材料。

### 2 预处理方法

从大田选取中部小花小孢子发育处于单核中-晚期的幼穗, 用75%的酒精棉球擦拭进行表面消毒, 再用干净的湿纱布包好, 外面包塑料膜保湿, 标记后放入4℃冰箱中进行低温处理。所有材料(幼穗)首先均采用4℃低温预处理10 d左右, 然后进行不同预处理。花药先分别在25℃(对照)与32℃(热击)处理2 d, 然后游离小孢子, 一部分直接纯化, 分别于不同的温度下进行初期培养2 d, 再转入25℃下统一暗培养; 另一部分分别置于不同的温度下进行小孢子预处理2 d, 再进行纯化及25℃暗培养。花药和游离小孢子的预处理液含60 g·L<sup>-1</sup>甘露醇、1.1 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、0.976 g·L<sup>-1</sup> MES, pH 5.8。

### 3 花药游离小孢子方法

参照陆瑞菊等(2001)和Lu等(2008)的方法游离花药中的小孢子。接种前, 幼穗用10%的消毒灵消毒10 min, 无菌水冲洗4~5次。每个试管大约接1200枚花药, 加入15 mL提取液(含60 g·L<sup>-1</sup>甘露醇、1.1 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、0.976 g·L<sup>-1</sup> MES, pH 5.8, 过滤灭菌), 使用匀浆机高速旋切, 悬浮液用150目筛网过滤, 滤液以100×g低速离心5 min, 重复3次, 收集小孢子。培养前小孢子用诱导培养基洗涤1次, 密度调节至1.0×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>, 取1.5 mL小孢子悬浮液, 接种于培养皿(30 mm×15 mm)中, Parafilm封口, 进行暗培养。

### 4 培养基

诱导培养基以改良的N<sub>6</sub>为基本培养基, 添加麦芽糖75 g·L<sup>-1</sup>、谷氨酰胺750 mg·L<sup>-1</sup>、KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>和2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>, pH 5.8。分化培养基以2/3MS为基本培养基, 添加麦芽糖30 g·L<sup>-1</sup>、KT 2 mg·L<sup>-1</sup>、NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, 用5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固化培养基, pH 5.8。壮苗培养基以1/2MS为基本培养基, 添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>、IAA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>、多效唑4.0 mg·L<sup>-1</sup>, 用5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固化培养基, pH 5.8。诱导培养基为过滤灭菌, 分化培养基和壮苗培养基采用0.11 MPa、121℃高温、高压灭菌15 min。

### 5 统计指标与数据处理

小孢子在25℃下暗培养30 d时, 吸尽液体培养基, 用电子天平称量每个培养皿中愈伤组织的重量, 即为愈伤组织产量(mg); 绿苗产量为平均每100 mg愈伤组织分化的绿苗株数; 白苗产量为平均每100 mg愈伤组织分化的白苗株数。所有数据采用DPS 7.0与Microsoft Excel 2010进行分析。

## 实验结果

### 1 花药高温热击处理对游离小孢子愈伤组织诱导及分化的影响

由图1可见, 离体花药经32℃高温热击处理后, 诱导的愈伤组织产量显著增加, 且再生植株数也增加, 但白苗产量增加的幅度较绿苗产量更大。另外, 不同基因型之间存在差异。

### 2 小孢子预处理温度对愈伤组织诱导及分化的影响

由图2-A可知, ‘云2号’和‘云3号’小孢子经32℃预处理2 d均能提高愈伤组织产量, 但不明显。图

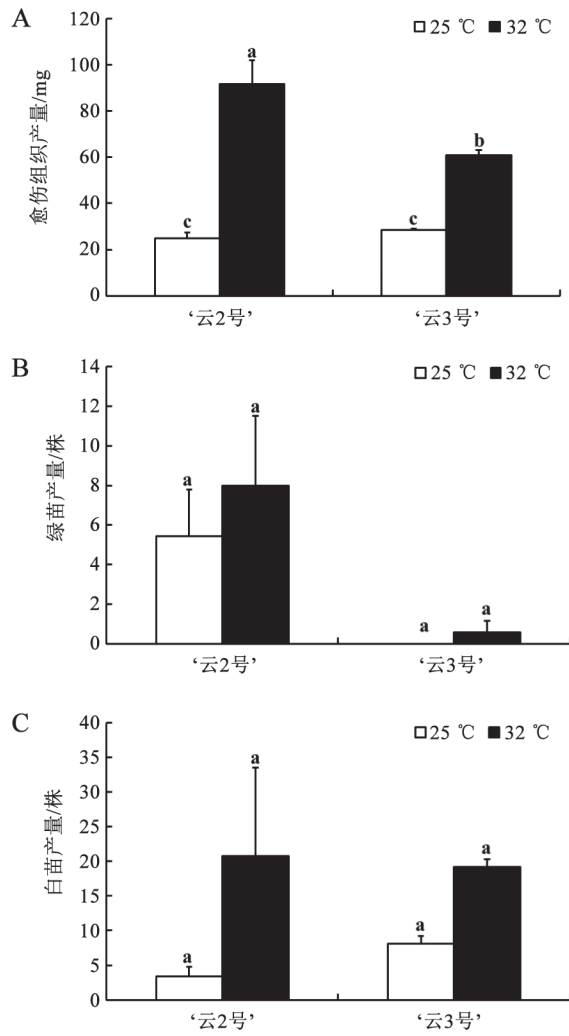


图1 花药的高温热击处理对愈伤组织、绿苗及白苗产量的影响

Fig.1 Effect of high temperature heat shock treatment of anther on yields of callus, green plantlet and albino plantlet  
不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ); 图2和图4同此。

2-B和C显示, 小孢子经32 °C预处理2 d, '云2号'和'云3号'的绿苗产量均降低, 而白苗产量有一定程度的提高; 总体来说, '云3号'的分化能力高于'云2号'。

### 3 游离小孢子初期培养温度对愈伤组织诱导及分化的影响

'云2号'游离小孢子在培养初期采用高温热击(32 °C)培养2 d, 能提高愈伤组织产量(图3和图4-A); 大幅度提高再生植株的产量, 绿苗产量由对照的5.42株提高到了16.78株, 白苗产量由3.37株提高到了13.16株(图4-B)。

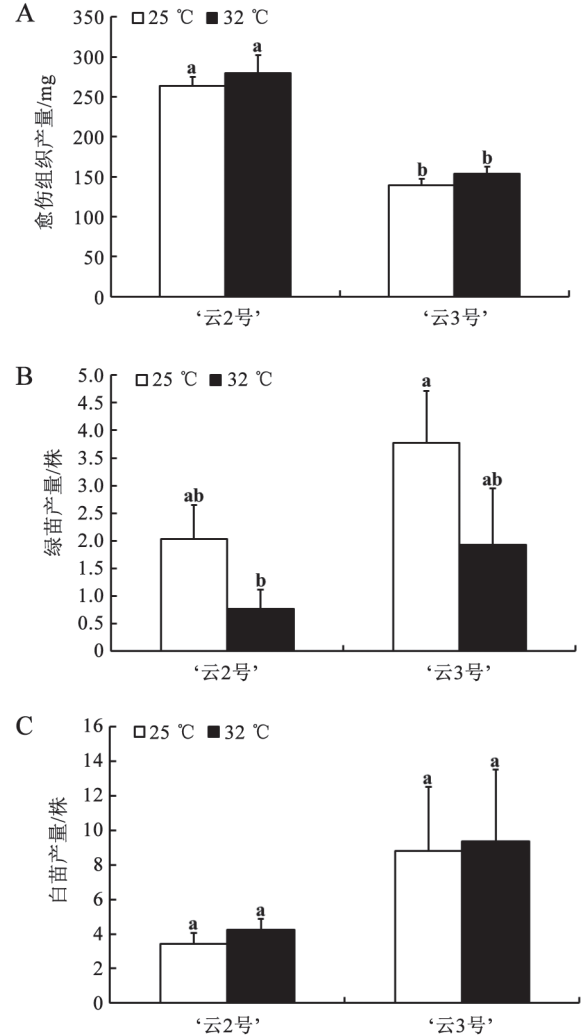


图2 小孢子预处理温度对愈伤组织、绿苗及白苗产量的影响

Fig.2 Effect of pretreatment temperature of microspore on yields of callus, green plantlet and albino plantlet

## 讨 论

小孢子培养过程经历的时间较长, 程序复杂且难度大, 环节较多, 提高某一环节的效率就可以影响小孢子培养愈伤组织产量和再生植株形成数量。目前, 陆稻小孢子培养的愈伤组织产量还较低, 如何提高愈伤组织产量是关键, 在保证愈伤组织产量稳定提高后, 绿苗形成数也会随之增加。愈伤组织的形成受到多个因子的影响, 而温度在整个陆稻小孢子培养过程中起重要作用, 包括供试材料生长的温度、田间取材时的温度、预处理温度、培养温度等等。

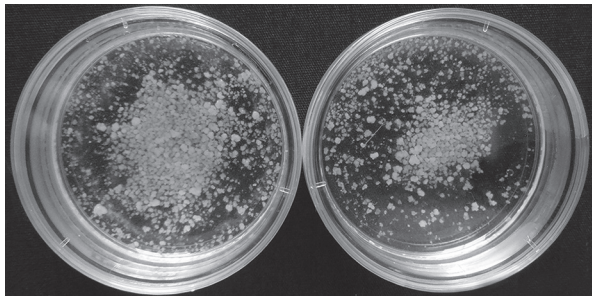


图3 不同初期培养温度下陆稻‘云2号’愈伤组织的生长情况  
Fig.3 The calli under different initial culture temperature of upland rice ‘Yun-2’  
左: 32 °C; 右: 对照。

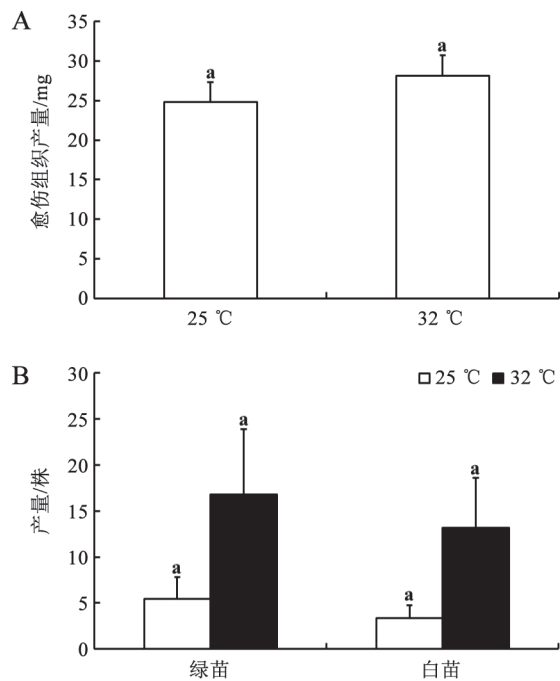


图4 初期培养温度对陆稻‘云2号’愈伤组织、绿苗及白苗的影响

Fig.4 Effect of initial culture temperature on yields of callus, green plantlet and albino plantlet of upland rice ‘Yun-2’

本研究结果显示, 预处理温度、培养温度明显影响陆稻小孢子的愈伤组织诱导率, 并且会影响愈伤组织的分化率即再生植株的获得率。对小孢子游离前的花药进行32 °C热击处理2 d或对小孢子进行2 d的32 °C热击, 均能提高愈伤组织产量。这种高温热击作用的可能机理是, 高温预处理诱导了热击蛋白的表达, 改变了内源激素的分布, 进而影响细胞的分裂和增殖, 中断了小孢子的定

向发育过程, 从原来的配子体发育途径变为孢子体发育途径(顾祥昆等2013; 边立娜等2013; Shariatpanahi等2006; 金航等2006; 庄军平等2001; Zhao等1996; Pechan等1991)。董静等(2005)认为, 32~34 °C高温处理可提高小麦花药的愈伤组织产量; 李光威等(2001)认为, 33 °C高温预处理对小麦游离小孢子培养有促进胚状体和愈伤组织形成的作用; Touraev等(1996)报道, 在小麦小孢子培养中, 33 °C高温预处理可提高花粉胚获得率; 在大麦小孢子培养中, 32 °C高温结合甘露醇的处理增加了绿苗植株的产量(Oleszczuk等2006); 张跃非等(2010)认为, 水稻花药在诱导培养前须经35 °C热击处理24 h。本研究发现, 花药经过高温热击处理后, 其小孢子分裂启动较早, 愈伤组织诱导的高峰期也提前; 张跃非和李碧如(2010)也认为高温热击处理能加快小孢子分裂, 使愈伤组织的诱导高峰期提前6~9 d。

另外, 本研究结果表明, 游离小孢子先置于32 °C高温下初期培养2 d后, 再转入25 °C下培养, 可大幅度提高再生植株的产量。贺梅等(2010)认为, 水稻花药接种后先在30 °C高温下初期培养3 d后, 再转入26 °C下培养, 比一直培养在26 °C下有更高的花粉植株产量。梁辉等(1997)认为先进行24 h的高温培养再转入28 °C培养, 可以大幅度提高小麦绿苗分化率, 但愈伤组织诱导率明显下降。其他一些研究也表明, 在高温下预培养一定时间后再转至常温培养, 有利于愈伤组织和胚状体的诱导(边立娜等2013; 牛永超等2010; 周伟军等2002)。

由此可见, 对陆稻游离小孢子培养进行高温热击是有益的, 无论是对小孢子游离前的花药进行32 °C热击处理2 d, 还是对游离小孢子进行2 d的32 °C热击, 或对游离的小孢子进行高温初期培养2 d, 均能提高愈伤组织产量, 并有利于愈伤组织的分化。对于‘云2号’来说, 若综合考虑每皿愈伤组织获得的绿苗形成数, 对离体花药进行高温热击处理优于初期高温培养, 更优于游离小孢子热击预处理。本文以主栽陆稻品种为材料, 研究了决定小孢子培养效果的愈伤组织诱导率的重要技术步骤, 证实优化预处理温度和培养温度可以明显提高培养效果, 而且这种方法较为简单, 容易控制。

#### 参考文献

边立娜, 牛国保, 孙德岭(2013). 花椰菜游离小孢子培养研究进展.



- 天津农业科学, 19 (6): 5~7
- 曹丽娟, 栾非时, 李锡香(2005). 植物游离小孢子培养的研究进展. 东北农业大学学报, 36 (5): 660~663
- 翟伟, 胡小荣, 周红立, 陶梅(2010). 早稻的抗旱性及遗传改良研究现状. 植物遗传资源学报, 11 (4): 394~398
- 董静, 郭飞波, 张国平(2005). 麦类作物小孢子培养研究进展. 麦类作物学报, 25 (2): 102~106
- 顾祥昆, 李菲, 张淑江, 章时蕃, 张慧, 孙日飞(2013). 芥菜游离小孢子培养技术研究. 中国蔬菜, (12): 23~30
- 贺梅, 黄少锋, 张丽萍, 宋冬明(2010). 花药培养育种在水稻育种上的应用. 北方水稻, 40 (1): 75~78
- 胡颂平, 周清明(2001). 陆稻抗旱性研究进展. 湖南农业大学学报(自然科学版), 27 (3): 240~244
- 黄剑华(2007). 小孢子和花药培养技术在作物定向遗传改良上的应用. 作物研究, (3): 167~169
- 姜健, 金成海, 侯春香, 金信忍, 杨宝灵(2001). 水稻花药培养研究与应用进展. 中国农学通报, 17 (4): 49~52
- 金航, 张金渝, 张智慧(2006). 影响花药培养的主要因素. 现代中药研究与实践, 20 (3): 61~64
- 李光威, 兰素缺, 孙宝启(2001). 小麦游离小孢子培养的研究. 华北农学报, 16 (1): 83~87
- 梁辉, 欧阳俊闻, 贾双娥, 张弛, 贾旭(1997). 小麦花药培养初期高温处理对培养反应的影响. 科学通报, 42 (13): 1436~1439
- 柳美南, 钟海明, 陈绵桥, 姚志坚, 黄蓉芬, 唐娟, 刘海林(2008). 水稻花药培养及其应用. 现代农业科技, (17): 234, 236
- 陆瑞菊, 黄剑华, 何南扬, 龚来庭, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅(2002). 应用小孢子离体培养技术培育大麦新品系. 麦类作物学报, 22 (4): 88~90
- 陆瑞菊, 黄剑华, 孙月芳, 王亦菲, 周润梅(2001). 秋水仙碱对大麦离体培养小孢子存活与成苗的影响. 植物生理学报, 27 (2): 135~140
- 牛永超, 李加纳, 殷家明, 林响, 徐新福, 韩甫, 周清元(2010). 基因型和处理温度对芥菜型油菜游离小孢子培养的影响. 西南大学学报(自然科学版), 32 (8): 23~28
- 秦余香, 夏光敏(2004). 小麦的小孢子培养. 植物学通报, 21 (5): 625~630
- 王玲仙, 蔺忠龙, 白现广, 吕广磊, 付坚, 殷富有, 黄兴奇, 程在全(2009). 水稻游离小孢子培养最新研究进展. 生物技术, 19 (6): 92~95
- 于凤池, 姚坚, 姚海根(2009). 水稻花药培养的影响因素及其发展探析. 现代农业科技, (15): 59, 62
- 张跃非, 李碧如(2010). 温度在水稻花药培养过程中的影响研究. 吉林农业, (11): 68, 76
- 张跃非, 王金玲, 邓晓容(2010). 高温热击处理对培养水稻花药愈伤组织形成的影响. 绵阳师范学院学报, 29 (11): 81~84
- 赵爱菊, 高增玉, 李亚军, 刘玉平, 陈希勇(2008). 禾谷类作物的小孢子培养. 河北农业科学, 12 (4): 73~74, 80
- 周伟军, 毛碧增, 顾宏辉, 唐桂香(2002). 秋水仙碱及热击与低温诱导对油菜小孢子胚状体成苗率的影响. 作物学报, 28 (3): 369~373
- 庄军平, 巩振辉, 苏菁(2001). 温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响. 西北农业学报, 10 (2): 49~51
- Datta SK, Datta K, Potrykus I (1990). Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both 'indica' and 'japonica' rice (*Oryza sativa*). Plant Sci, 67: 83~88
- Germana MA (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tiss Org, 104: 283~300
- Islam SMS (2010). The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Aust J Crop Sci, 4 (9): 660~665
- Lu RJ, Wang YF, Sun YF, Shan LL, Chen PD, Huang JH (2008). Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.): the effect of floret co-culture. Plant Cell Tiss Org, 93 (1): 21~27
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2006). Androgenic response to pre-culture stress in microspore cultures of barley. Protoplasma, 228: 95~100
- Pechan PM, Bartels D, Brown DCW, Schell J (1991). Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. Planta, 184: 161~165
- Prem D, Gupta K, Agnihotri A (2005). Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss). In Vitro Cell Dev Biol-Pl, 41 (3): 266~273
- Redha A, Talaat A (2008). Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. Plant Cell Tiss Org, 92 (2): 141~146
- Santra M, Ankrah N, Santra DK, Kidwell KK (2012). An improved wheat microspore culture technique for the production of doubled haploid plants. Crop Sci, 52 (5): 2314~2320
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiol Plant, 127: 519~534
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sex Plant Rep, 9: 209~215
- Yuan SX, Liu YM, Fang ZY, Yang LM, Zhuang M, Zhang YY, Sun PT (2011). Effect of combined cold pretreatment and heat shock on microspore cultures in broccoli. Plant Breeding, 130 (1): 80~85
- Zhao JP, Simmonds D, Newcomb W (1996). Induction of embryogenesis with colchicines instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. Planta, 198: 433~439