

光敏核不育水稻花培变异性及其选育技术路线^{*}

何予卿 陈亮^{**} 徐才国

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉, 430070)

提 要 本研究以培矮 64S/8902S F_2 代中选出的 11 个典型的光敏核不育单株进行花培, 获得了 22 个花培单个愈伤分化苗 (指由单个愈伤组织分化的一丛苗, 以下简称愈伤苗系) 为本研究的试验材料。通过远安, 海南不同生态条件考察来源于同一愈伤苗系的育性变化。结果表明, 同一 F_2 单株来源的不同愈伤苗系之间, 以及同一愈伤苗系的不同单株间, 结实率变异范围和变异系数较大。同一愈伤苗系不同单株结实均值均以海南高于远安, 说明多数光敏核不育单株, 具有长日条件下育性稳定和短日条件下育性易转换特性。分子标记分析未能检测到不同于双亲的结构变异位点, 并证实来源于同一愈伤苗系的不同单株变异, 是由于花培过程中多个花粉粒同时诱导、分化而来的结果。本文还讨论了籼型光敏核不育水稻的选育技术路线。

关键词 花药培养; 愈伤苗系; 分子标记; 光敏核不育水稻

Variability of Anther Culture and the Technology Strategies for Developing Practical Photoperiod Sensitive Male Sterile Rice

HE Yu-Qing CHEN Liang XU Cai-Guo

(The National Key Lab of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University)

Abstract The materials of this study were 11 typical PSGMS plants selected from F_2 generation of Peiai64S/8902S, and 22 callus regenerated plants (CRP) were obtained from anther culture. The fertility of these plants were investigated under the different ecology conditions of Yuan'an and Hainan. The major results are as follows: Wider variation range and Larger variation coefficient of seedsetting rate were found both among different callus lines from the same F_2 plant and among different plants from the same callus line. The seedsetting rate of the same plant was higher in Hainan than that in Yuan'an. It shows that most PSGMS plants have the characteristic of fertility stability under long day condition and fertility reversibility under short day condition. RFLP analysis have not detected the genetic variation among the DH plants. It shows the CRP variation that come from same callus might be induced and differentiated by multiple pollens effects simullaneosly.

Key words Anther culture; Callus regenerated plants; Molecular marker; The photoperiod sensitive male sterile rice

光敏核不育水稻是极其珍贵的遗传资源^[1]。光敏核不育水稻的发现拓宽了杂种优势的应用范围, 使亚种间杂种优势的利用成为可能^[2]。目前, 在育种上选育了一大批籼型光敏核不

* 美国洛克菲勒和国家 863 项目资助。

** 现在厦门大学生命科学院工作。

收稿日期: 1999-01-08, 接受日期: 2000-01-11

育系,其中一类光敏核不育系表现长日条件下,育性不稳定而短日条件下育性易转换如8902S,另一类表现为长日条件下育性较稳定而短日条件下育性难转换的缺点如培矮64S。诸多学者认为引起光敏核不育水稻在长日条件下育性不稳定性,而短日条件下育性转换困难的主要原因是由于遗传背景的影响即微效基因的作用和光敏核不育水稻的异质性所引起的^[3-5]。He等研究认为,培矮64S和8902S的不育主效基因等位,而影响光敏核不育水稻的育性不稳定性和育性可转换性分别由微效基因作用,并分别定位了7个和6个QTLs影响光敏核不育水稻的育性不稳定性和育性可转换性,并证实光敏核不育水稻的育性不稳定性和育性可转换性同时受基因互作的影响,表明光敏核不育水稻育性表达的复杂性和选育的难度。花药培养技术最突出的优点在于加快育种进程,在较短的时间内获得稳定纯合的个体。近年来,花药育种对于选育光敏核不育系已初见成效^[6-7]。本研究利用具有长日条件下的育性稳定,且短日条件下育性易转换的E单株进行花药培养,结合分子标记研究花培愈伤苗系的变异性,探讨了选育实用性光敏核不育系的技术路线。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从培矮64S/8902S F₂代中选用11个典型的光敏核不育单株,即生长箱在长日低温(> 14.5h, 24°C)条件下育性较稳定,而在短日高温条件(10h, 28°C)下,育性易转换进行花培,获得了22个花培愈伤苗系作为本研究的试验材料。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 花药培养 花药培养的材料以取田间合适稻穗(单核靠边期),置8~10°C低温预处理8~10天接种。诱导培养基以N₆基本培养基,附加水解酪蛋白400 mg/L,激素配比为(2, 4-D 2.0 mg/L+ NAA 3.0 mg/L+ KT 1.0 mg/L),蔗糖浓度为6%。分化培养基以MS为基本培养基,激素配比为KT 2 mg/L+ NAA 0.2 mg/L,附加水解酪蛋白400 mg/L,谷氨酰胺和天冬酰胺各200 mg/L, 20 mg/kg PG络合锗(PG络合锗由陈葆棠博士惠赠)。所有培养基用0.7%的琼脂固化,灭菌前用1N NaOH或1N HCl调pH至5.8~6.0, 1.1 kg/cm²(121°C)高压灭菌15~20分钟。培养条件以诱导花药愈伤组织在黑暗条件下进行,愈伤组织分化在光照下进行,每天光照10~12h,培养室温度控制28±2°C。

1.2.2 花培无性苗的繁殖及移栽 对于来自同一愈伤组织分化的一丛绿苗,小心分开,并置1/2 MS培养基培养一周,待绿苗长出粗壮的根后并炼苗,直接移栽大田。

1.2.3 不同自然光温处理

1.2.3.1 不同自然光温生态处理 育性不稳定性鉴定:对DH群体的H₁代和H₂代,选取自然长日条件下,湖北省远安县苟家垭镇窑河村(湖北农业科学院远安育种基地与武汉纬度基本相同,海拔540 m),以8月25日前抽穗的自然结实率作为DH群体光敏核不育水稻的育性不稳定性指标。

育性可转换性鉴定:对DH群体的H₁代,选取自然短日条件下,华中农业大学海南试验育种基地(海南陵水县光坡镇),以4月5日以后抽穗的结实率,作为鉴定DH群体光敏核不育水稻的育性可转换性指标。

1.2.3.2 生长箱人控光温处理 对DH群体的H₁代在海南自然生态条件下育性转换较好的单株,收种后种植于华中农业大学试验农场为H₂株系每株系选3株进行人控光温处理,

光温条件采用长日低温 (> 14. 5h, 23. 5℃)和短日高温 (10h, 28℃)两种光温处理, 以鉴定其实用性。育性指标采用花粉可染率和结实率两种标准

1. 2. 4 分子标记 RFLP分析 RFLP分析方法参照 Zhang等^[8]。

2 结果与分析

2. 1 培矮 64S/8902S的不同 F₂ 单株在花药培养能力上的差异

培矮 64S/8902S F₂单株花药培养的愈伤组织诱导率和绿苗分化率(表 1)表明: 所有 11个 F₂单株均能诱导出愈伤组织, 仅 2个单株的愈伤组织未能分化成绿苗, 不同单株的愈伤组织诱导率和绿苗分化率差别较大, 其变幅分别为 3. 50%~ 10. 4%和 0~ 13. 3%之间, 均值分别为 6. 63%和 5. 46%, 说明粳型光敏核不育系能够诱导愈伤并分化成苗, 但愈伤诱导率和分化率均较低。共有 23块愈伤组织分化成苗, 其中 21块分化绿苗, 2块分化白苗, 白苗分化率相对较低, 可能是由于 PG络和错作

表 1 不同 F₂单株花药培养能力
Table 1 The anther culture capacity for different F₂ plants

来源 Source	愈伤诱导率 (%) Callus induce frequency	绿苗分化率 (%) Green plantlet differential frequency	分化愈伤数 Number of callus differentiation
HP2	5. 86	5. 0	2
HP5	10. 40	6. 0	3
HP8	9. 12	5. 3	3
HP34	5. 15	13. 3	4 [†]
HP43	5. 25	2. 0	1
HP56	6. 12	1. 67	1
HP70	8. 27	8. 9	3
HP80	6. 18	7. 5	3
HP101	8. 61	10. 4	2 [†]
HP117	4. 67	0	0
HP215	3. 50	0	0

* 指分化白苗的愈伤数。

* The callus number of white plantlet

表 2 同一愈伤无性系的不同倍性植株用的结果^[8]。

Table 2 The different ploid plant from the same callus clonic line

来源 Source	单倍体 Haploid	二倍体 Diploid	多倍体 Polyploid
HP2-1	3		
HP2-2		10	
HP5-1	19	2	
HP5-2	22	73	
HP8		2	
HP8-1	19		11
HP8-2		8	
HP34-1	5	5	
HP34-2	32	14	
HP34-3	6	4	
HP34-4	4		
HP43-1		7	9
HP56	15	23	
HP70-1	2		
HP70-2	10		
HP70-3	53		20
HP80		6	
HP80-1		40	1
HP80-2	2	24	2
HP101-1			2
HP101-2		24	2

对 21块愈伤组织分化的 21丛绿苗, 小心将每一丛的每一株绿苗分别分开移栽于大田表明(表 2), 通过田间植株形态目测, 植株形态分化有单倍体、二倍体和多倍体, 共分化有单倍体 173株、二倍体 261株和多倍体 47株, 其中有 4块愈伤组织只分化成单倍体, 4块愈伤仅分化成二倍体, 1块仅分化成多倍体, 其余各愈伤组织块均同时分化为单倍体和二倍体, 二倍体和多倍体或单倍体、二倍体与多倍体并成。花药培养过程中二倍体和多倍体来源可能是由于单倍体自然诱发加倍的结果

2. 2 花培愈伤苗系的变异检测

2. 2. 1 不同生态条件下花培 H₁代的变异 对来源于 5个 F₂单株的 8个愈伤组织获得的 80个 H₁单株, 通过海南、远安不同生态条件的结实率考察(表 3)表明: 在海南低纬度短日照条件下不同 F₂单株来源的不同愈伤苗系之间, 同一 F₂单株来源的不同愈伤苗系之间, 以及来源于同一愈伤组织的不同单株之间, 结实率育性变异相当大。如 HP5-2, 26株结实率均值达 40. 9%, 而结实率变异范围为 0~ 87. 4%, 变异系数表现较大, 如 HP8-1, 变异系数为 193. 84%。而远安高海拔长日条件下育性鉴定同样表现

出,不同 F_2 单株来源的和同一 F_2 单株来源的不同愈伤苗系之间,以及同一愈伤苗系之内的不同单株之间,结实率育性也有一定变异。且变异系数较大,处于 37.26% ~ 99.22% 之间,变异系数较大的原因可能是由于来源于同一愈伤组织苗系的不同单株具有不同来源。但与海南育性相比,同一愈伤苗系不同单株结实率均值基本上均以海南高于远安,且海南比远安结实率变异范围宽,表明大部分花培单株在长日条件下育性相对稳定,而短日条件下育性易转换。

表 3 H_1 在不同条件下的结实率表现 (%)

Table 3 The fertility performance of H_1 under different ecological conditions (%)

来源 Source	植株数 Plant	远安 (96) Yuan'an (96)			海南 (96) Hainan (96)		
		均值 Mean	变异范围 Variation range	变异系数 Variation coefficient	均值 Mean	变异范围 Variation range	变异系数 Variation coefficient
HP5-2	26	3.97	0- 7.69	54.09	40.97	0- 87.4	64.64
HP8-1	8	2.78	0- 5.84	77.10	4.00	0- 22.53	193.84
HP8-2	7	4.22	2.46- 5.60	37.26	2.19	0- 8.16	133.2
HP34-1	3	11.73	7.11- 18.60	51.72	38.55	24.86- 46.7	30.94
HP80-1	6	4.68	2.71- 9.71	52.07	35.19	7.90- 58.24	60.70
HP80-2	4	2.10	0.52- 5.00	99.22	14.09	3.80- 21.92	55.07
HP80-3	5	6.29	2.70- 10.57	52.56	15.65	0- 59.90	161.91
HP101-2	23	9.54	0- 19.85	64.57	20.24	0- 43.70	57.16

进一步分析了 H_1 花培单株在海南与远安育性相关 (表 4) 表明: 远安长日条件下结实率与花粉可染率达极显著相关, 而它们与海南条件下的结实率相关均不显著。何予卿等 (1998) 研究认为, 影响光敏核不育水稻的育性稳定性和育性可转换性均表现为微效基因的作用, 且它们分别有独立的作用系统。这一结果进一步证实了这两个独立的作用系统的微效基因可以通过重组交换聚合于同一优良的光敏核不育系中^[3]。

表 4 花培单株 H_1 在不同生态条件下的育性相关分析

Table 4 The correlation of H_1 under different ecological condition

	HN 96	YA96PF
YA96PF	0.12	
YA96SS	0.17	0.42*

Note HN96 Hainan 96 seed set
YA96PF Yuanan 96 pollen fertility
YA96SS Yuanan 96 seed set

2.2.2 H_1 单株的育性表现 对 79 个 H_1 单株在海南分别套袋收种繁殖 H_2 表明: H_2 单株在株叶形态上表现非常一致, 未发现同一 H_1 来源的 H_2 的各单株之间有株叶形态分离现象, 说明各单株均来源于花粉单倍体。

选取在海南结实较高来源于 3 个愈伤苗系的 43 个 H_2 单株 (每个 H_2 各 3 株) 进行长日低温 (> 14.5h, 23°C) 和短日高温 (10h, 28°C) 两种不同光温。HP34-1 的各单株表现两种光温处理结实率均较高以外, 而 HP5-3 和 HP101-2 两愈伤苗系的不同 H_2 单株均表现长日低温条件下, 花粉可染率和结实率低, 而短日高温条件下花粉可染率和结实率均高, 即表现出极显著的实用型光敏核不育特性, 并鉴

定两个优良的光敏核不育系 DH6 DH7 如表 6

2.3 花培单株的分子标记检测

选用定位于培矮 64S/8902S F_2 遗传连锁图上分布于水稻 12 条染色体上 (He 等, 1998), 且双亲具有多态型探针 酶组合 60 个, 共计 71 个 RFLP 位点, 分析了来自于 17 个愈伤苗系的 116 个单株的基因型。结果表明, 所有花培单株的 RFLP 位点均来自于双亲之一的纯合位点, 且没有发现来自于双亲的共显性杂合位点, 或者不同于双亲的结构变异位点。同一探针在不

表 5 花培单株 H₂在不同光温条件下的育性变异

Table 5 The fertility variation of H₂ under different photo-thermo condition

来源 Source	类别 Type	植株数 Plant	长日低温 (> 14.5h, 23.5℃) Long-day low temperature			短日高温 (10h, 28℃) Short-day high temperature		
			均数 Mean	变异范围 Variation range	变异系数 (%) Variation coefficient	均数 Mean	变异范围 Variation range	变异系数 (%) Variation coefficient
			(%)			(%)		
HP5-2	PF	23	9.21	0~ 42.86	133.63	40.56	18.33~ 81.53	39.23
	SS	23	1.43	0~ 13.04	215.27	26.06	0~ 79.71	101.47
HP34-1	PF	3	36.15	19.57~ 60.00	42.59	77.53	75.0~ 81.13	35.21
	SS	3	36.02	16.05~ 55.22	54.38	35.21	28.15~ 40.00	4.13
HP101-2	PF	17	4.02	0~ 12.50	128.70	45.97	11.31~ 82.32	62.59
	SS	17	1.96	0~ 6.44	113.75	39.79	5.97~ 76.56	62.13

PF: Pollen Fertility SS: Seedsetting Rate

同来源的愈伤苗系间, 以及同一愈伤苗系内的不同单株之间, 可能表现出双亲之一的不同带型, 说明在组织培养过程中, 突变染色体结构变异可能不是造成无性系变异的主要原因

表 6 花培单株的育性表现 (%)

Table 6 The fertility performance for the plants of anther culture

株号 Plant No.	长日, 23.5℃ ¹ LD> 14.5h, 23.5℃		远安 96 Yuan'an 96		短日, 28℃ ² SD= 10h, 28℃		海南 96 Hainan 96
	花粉育性 Pollen fertility	结实率 Seed set	花粉育性 Pollen fertility	结实率 Seed set	花粉育性 Pollen fertility	结实率 Seed set	结实率 Seed set
DH6	0.1	0	0	0	78.64	52.56	75.09
DH7	10	1.14	0	0	81.53	79.71	87.04
DH52	60	55.22	65.01	55.30	81.13	76.47	60.00

Note ¹LD long day ²SD short day

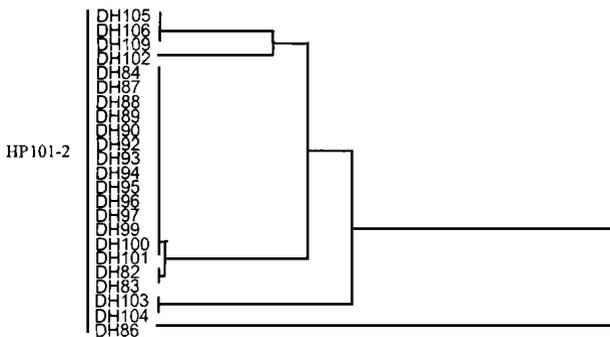


图 1 来源于同一双单倍体 HP101-2愈伤无性系的聚类

Fig. 1 The cluster analysis of callus clones for double haploid line HP101-2

对 116个单株通过遗传聚类分析表明, 116个单株按最小遗传距离可分为 42类(数据未列出)。进一步对来源于同一愈伤组织 HP101-2的 23个无性繁殖单株聚类分析表明, 按最小遗传距离可分为 6类, 其中 14个单株完全聚为一类, 遗传距离为 0(如图 1)。说明来源于同一花药愈伤苗系的单株, 可能是由于一个花粉粒诱导分化而来的, 也可能是由多个花粉粒共同诱导分化的结果, 后者可能是造成同一愈伤苗系在不同性状上表现变异的主要原因, 因而, 在同一愈伤苗系内是可以进行选择的。

3 讨论

3.1 花药培养无性系的变异性

花药培养由于小孢子通过离体培养, 经过脱分化、再分化和形态发生等一系列诱导过程中, 容易发生基因突变以及染色体结构变异等已有一些报道。李平等(1995)通过 RFLP对籼稻圭 630和粳稻 02428及其 F₁花培的 81个 DH系分析表明, 81个 DH系不同程度地发生

DNA缺失以及DNA序列的扩增,且籼稻的变异频率大于粳稻。但另一个花培的DH群体中(窄叶青8号原系17),很少发现DNA变异^[9]。陈英等(1996)对7个籼稻品种花培获得的161个花粉无性系农艺性状,同工酶变化和RFLP标记检测发现,农艺性状和分子标记所检测的变异较小^[10]。本研究通过116个花培单株,利用分布于水稻12条染色体的60个多态型RFLP探针的71个位点分析,未发现不同于双亲的结构变异位点,表明利用花药培养产生的遗传变异较小,遗传稳定性较高,利于光敏核不育水稻的选育和提纯。同时,由于花药培养所得的愈伤组织是由于多个花粉粒共同诱导、分化而来,同一愈伤苗系内选择是有效的。

3.2 实用光敏不育系选育技术路线的探讨

花培育种应用于水稻常规育种已取得了很大成果。1988年蔡得田首先证明了农垦58S的不育花粉具有再生植株的潜能,花培便很快应用于光敏核不育系的遗传和育种研究中^[6,7]。凌定厚等(1992)认为,以培育光敏核不育系为目的的花药培养与一般常规育种的花培采用 F_1 为供体亲本不同,不仅应对 F_2 代在长日条件下进行不育株的选择,还应在短日条件下,考察育性转换特性,这种选个体作为花药培养的供体亲本可以大大提高选择效率^[7]。

何予卿等(1998)、He等(1999)研究认为,光敏核不育主要受不育主效基因作用,同时还受一组光温敏感的QTL影响,这些微效的QTL是影响光敏核不育基因的育性稳定性和育性可转换性的制约因子,正是由于这些QTL的作用,使得光敏核不育水稻的遗传和育种显得特别复杂,要求我们在选育光敏核不育系时,不仅要选择主效基因,更重要的是如何聚合这些影响光敏核不育基因表达的优良的QTL^[3,5]。因此,作者认为,通过不同光温条件和不同生态条件下,反复考察 F_2 群体中光敏核不育单株的育性稳定性和育性可转换性,使在不同环境条件下,影响光敏核不育基因育性表达的QTL得以充分表达,然后在 F_2 选育不育性既稳定,且容易转换的单株进入 F_3 或通过花药培养,可培育实用型的光敏核不育系。因为这样鉴定,一部分效应较大的有益的QTL已经纯合,并已聚合于选育的光敏核不育单株中,一部分QTL呈杂合状态,通过花培还有一次1:1分离重组的选择机会,或进入 F_3 代可继续纯合,可能还有极少数不利的QTL,效应相当小,对光敏不育主效基因影响也较小,这样的选择不仅可用于光敏核不育系之间的改造,还可用于光敏核不育系与正常品种杂交选育之中。

致谢: 本文在华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室完成的,并得到张启发教授指导,在此表示感谢!

参 考 文 献

- 1 石明松. 湖北农业科学, 1981, 7: 1-3
- 2 袁隆平. 杂交水稻, 1987, 1: 1-4
- 3 何予卿, 杨静, 徐才国等. 华中农业大学学报, 1997, 17(4): 305-311
- 4 薛光行, 赵建宗, 陈平等. 中国农业科学, 1995, 24: 37-42
- 5 He Y. Q., Xu C., Yang J et al. *Theor Appl Genet*, 1999, 99(3): 683-693
- 6 蔡得田, 陈冬玲, 祝虹. 实验生物学报, 1988, 21: 401-404
- 7 凌定厚, 陈梅芳, 马镇荣等. 遗传学报, 1993, 20: 167-173
- 8 Zhang Q F., Sheng B Z., Dai X K et al. 1994, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 99: 8675-8679
- 9 李平等, 1995, 遗传学报, 22(4): 286-292
- 10 陈英, 陆朝福, 徐云碧等, 遗传学报, 1996, 23(3): 196-204