

## 花药培养对籼稻两用核不育系培矮 64S 的提纯与改良

马镇荣, 凌定厚, 王昌虎

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:** 以籼稻两用雄性核不育系(简称两用系)培矮 64S 为供体, 通过花药培养, 获得了 26 个愈伤系共 1969 株花粉植株。根据花粉一代( $H_1$ )的倍性和育性, 可把它们分为三种类型, 即 a) 单倍体: 有 1 个愈伤系 41 株全为单倍体植株; b) 不分离型: 有 19 个愈伤系的群体育性不分离, 全部植株均在不育期表现败育, 其它性状有差异但不显著; c) 分离型: 其余 6 个愈伤系表现分离, 其中 3 个各有 2-7 株单倍体植株出现, 并且这些愈伤系中均有花粉染色率及自交结实率较高的植株。未经培养的供体两用系(对照)群体中也有 1.5% 的植株为可育株, 说明应用多年的培矮 64S 有关育性的基因型并不纯合。经过两代的选择, 至  $H_3$  代, 所选育的 105 个单株后代中, 个体之间的表现整齐一致。 $H_4$  代分 4 期播种, 各期的播始天数呈由长到短的变化趋势, 表现出生育期感温性的特点。同时观察到, 其稳定不育期比对照长 3 d 左右, 育性转换期结实率比对照高 5.8% 以上。测交了 108 个组合, 各组合  $F_1$  代均表现出高产的特性。研究表明, 花药培养是提纯及改良两用系的有效途径。

**关键词:** 花药培养; 两用雄性核不育系; 品种提纯; 培矮 64S

中图分类号: S511.21.035 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2000)04-0308-07

## PURIFICATION AND IMPROVEMENT ON DUAL-PURPOSE GENIC MALE STERILE RICE PEIAI 64S BY ANTHHER CULTURE

MA Zhen-rong, LING Ding-hou, WANG Chang-hu

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Anther culture of a dual-purpose genic male sterile rice (DGMSR) Peiai 64S resulted in 1969 regenerated plants from 26 callus lines. According to the ploidy and fertility in the first generation of anther plants ( $H_1$ ), they were divided into three types: a) Haploid, all of the 41 plants in 1 callus line were haploid; b) Uniform type, including 19 callus lines, all of which were sterile during the sterility period, and no remarkable differences in other characters were observed; c) Segregation type, including the remaining 6 callus lines which exhibited segregation. In this type, 3 lines with 2 to 7 individuals each were haploid. Some plants in this type had higher pollen staining rate and seed setting percentage. In the control line (Peiai 64S), there were 1.5% of individuals being fertile in sterility period, indicating that Peiai 64S was not a pure line. After selection for two generations, their fertility has been stable in  $H_3$ . The experiments of sowing at intervals in spring with seven lines in the  $H_4$  generation showed, the later the sowing date, the earlier

收稿日期: 2000-04-20

基金项目: 广东省自然科学基金(950294)资助项目

the initial heading date. It was shown that these lines were susceptible to temperature. It was also observed that the duration of stable sterility period in the selected plant lines was longer by 3 days or so than that in the control, and in fertility transformation period, the seed set percentages from self-pollination in these lines were over 5.8% higher compared to the control. The characters of  $F_1$  hybrids from 108 test cross combinations showed potential high-yield trait. It is suggested that anther culture is an effective way for purifying and improving DGMSR.

**Key words:** Anther culture; Dual-purpose genic male sterile rice; Variety purification; Peiai 64S

水稻两用雄性核不育系(以下简称两用系)是两系法杂交水稻的物质基础。自从石明松等<sup>[1]</sup>发现农垦 58S, 并提出两系法水稻杂种优势利用以来, 科学家和育种工作者们开展了多学科、多层次的研究, 取得了长足的进展。在两用系的选育、提纯等方面也做了许多工作, 使两系杂交稻进入了实用阶段。但由于两用系仍然存在着一些问题, 制约着两系杂交稻的大面积推广应用。例如, 培矮 64S 就存在着一些不容忽视的缺点: 1) 繁种比较困难, 虽然采取一些措施可提高繁种效率, 但又加重了人力和财力的负担; 2) 在按常规程序选留种子的过程中, 其纯度逐步有所降低, 并逐渐产生“遗传漂移现象”, 不育起点温度逐代有所升高<sup>[2]</sup>; 3) 开颖时间较短, 角度较小, 柱头外露率较低, 导致异交率较低。因此, 本研究试图应用花药培养提纯及从提高繁种效率等方面改良该不育系。

花药培养一直被认为是一种快速而有效的育种手段<sup>[3]</sup>。在两系杂交稻的花培及育种方面, 蔡得田等<sup>[4]</sup>首先获得了农垦 58S 花药的单倍体植株; 凌定厚等<sup>[5]</sup>研究了提高光敏感雄性不育水稻花粉单倍体育种效率的方法及不育花粉植株育性转换特点; 尹建华、朱德瑶等<sup>[6]</sup>研究了 W6154S 等 6 个籼型光敏核不育水稻杂种的花粉植株的育性分离和表现情况, 阐述了花药培养是籼型光敏核不育系选育的一条有效途径的观点。花培在提纯不同质源的水稻三系不育系方面也已取得了成效<sup>[7]</sup>。1996 至 1999 年, 我们在广州自然条件下对培矮 64S 花培后代  $H_1 - H_4$  群体的育性及其它性状进行了跟踪观察, 并对所选育的稳定株系配制组合。本文报道这一研究的初步结果。

## 1 材料和方法

**材料** 供试两用系培矮 64S 来自湖南杂交水稻研究中心, 它是以农垦 58S 为母本、籼爪型广亲和系培矮 64 为父本杂交选育而成的温敏核不育系。外植体的发育时期为小孢子发育单核晚期。

**培养基** 以 MS 培养基为基本培养基。诱导和继代愈伤组织时, 附加 2,4-D  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , KT  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  和 LH (水解乳蛋白)  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , 蔗糖 3%。在分化培养基中, 附加 KT  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , NAA 和 BA 各  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ , 蔗糖 3%。

**花粉无性系移栽和选育** 按常规方法移植大田, 单株插植。单倍体植株加倍处理后用于另一研究。而经自然加倍的二倍体植株为本研究的选育对象。花粉愈伤组织的再生植株为  $H_1$  代, 其自交后代称为  $H_2$  代, 依此类推。来自同一愈伤组织的再生植株(花粉无性系)为一愈伤系。单株的自交后代则称之为株系。选育的方法为单株(穗)套袋、收种。 $H_3$  代以后, 所选育的株系已整齐一致, 则以株系为单位混合收种、播秧。

**育性观察和测交组合** 在显微镜下检测花粉的 I-KI 染色反应, 统计花粉染色率, 并将该穗套袋, 待其成熟后考种和统计自交结实率。在不育期, 对花粉染色率在 5% 以下的植株(穗), 均考种统计自交结实率, 并留下稻苑跟踪观察。在育性转换期则定期(一般每 10-15 d 1 次)、定株取样镜检并套袋自交。

测交组合试验之前, 先镜检花粉育性, 选择群体整齐、败育彻底的植株作母本, 选取稳定、优质的品种/系(包括华南农业大学提供的籼粳交品系, 如 G0584 等)作父本。杂种一代( $F_1$ )重点考查其产量性状。

花粉无性系的观察、选育均以未经培养的两用系培矮 64S 为对照。 $F_1$  的农艺性状与目前大面积种植的三系强优组合汕优 63 作对比分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 花粉一代( $H_1$ )的育性类型

通过对培矮 64S 的花药培养, 先后获得  $H_1$  代 26 个愈伤系共 1969 株, 每个愈伤系有 40-122 株不等。移栽大田之后观察无性系植株的育性和群体整齐度。在不育期(6 月中旬至 9 月下旬), 根据花粉无性系的育性, 可把它们分为三种类型, 即 a) 单倍体: 有一个愈伤系 41 株全为单倍体植株; b) 不分离型: 有 19 个愈伤系的群体育性不分离, 每个愈伤系的全部植株均在不育期表现不育, 花粉染色率在 0-5% 之间, 自交结实率在 3% 以下。其它性状有差异但不明显; c) 分离型: 其余 6 个愈伤系的群体育性分离, 其中 3 个各有 2-7 株单倍体植株出现, 另外, 这些愈伤系中均有花粉染色率和自交结实率较高的植株, 可育株率最高的 1 个愈伤系有 72 株可育株, 占该系的 59.0% (表 1, 愈伤号 3)。

表 1 培矮 64S  $H_1$  代的部分愈伤系在不同时期的花粉染色率及自交结实率  
Table 1 Pollen staining rate and seed set percentage in the  $H_1$  generation of some callus lines from Peiai 64S during various periods

愈伤系号 Code of callus lines	不育期群体育性 Population fertility in sterility period			花粉染色率 Pollen staining rate (%)				自交结实率 Seed set percentage* (%)
	总株数 T	不育株数 ms	不育株率 ms%	Jun. 5	Sep. 10	Sep. 25	Oct. 10	
1	91	91	100.0	0	0	0.8	56.5	20.2
2	56	56	100.0	0	0	0.3	47.0	22.1
3	122	50	41.0					
4	42	29	70.9	0	0	1.6	51.4	18.3
5	40	40	100.0	0	0	0.2	53.4	21.1
6	105	105	100.0	0	0	0.1	35.7	16.7
7	57	30	52.6	0	0	1.9	43.0	17.6
8	118	118	100.0	0	0	1.3	61.7	31.3
9	45	45	100.0	0	0	0.3	58.0	27.4
10	31	31	100.0	0	0	0.7	34.7	25.8
11	118	59	50.0	0	0	1.2	59.0	28.5
12	63	63	100.0	0	0	0	49.0	25.4
13	58	58	100.0	0	0	0.6	33.5	19.0
14	101	101	100.0	0	0	0	25.8	17.3
15	56	56	100.0	0	0	0.3	24.7	23.7
16	106	106	100.0	0	0	0	33.0	15.0
Peiai 64S (Control)	200	197	98.5	0	0	0	43.9	18.2

\* 自交结实率为育性转换后考查的数据。Seed set percentage from self-pollination was calculated after fertility transformation period. T=Total individuals; ms=Number of male sterile individuals

值得注意的是,对照群体中也有1.5%的植株为可育株。供体两用系群体育性的不稳定及 $H_1$ 代分离类型的出现,说明培矮64S在遗传上并未完全纯合,同时,在长期繁殖和应用过程中的机械混杂及生物学混杂也可能导致不育系的纯度降低和混杂退化。

表1列出部分愈伤系的考查数据。在不育期,经镜检花粉育性和考查种子育性之后,保留败育较彻底的植株稻莩,以跟踪观察。由9月上旬开始,定期、定株取样镜检和套袋自交,9月25日以前所抽出的穗子均发现可染花粉。10月初镜检的结果,花粉染色率最高达到61.7%(表1,系号8),比对照高17.8%。考种结果,大多数自交结实率都在20%以上,最高的为31.3%,比对照高13.1%。实验表明, $H_1$ 代花粉植株的育性转换期在9月26日至10月初之间。根据 $H_1$ 代所有愈伤系的株叶形态和育性转换等在个体之间、群体之间的差异,在留种及保莩过冬之前,作了认真的选择。

## 2.2 花粉无性系后代的跟踪观察与选育

经过 $H_1$ 代早晚两季的淘汰, $H_2$ 代有189个株系,每株系40株左右。 $H_2$ 代在不育期的不育株率为100%,但在不育度上有一些差异;在广州地区的自然气候条件下,育性转换期的自交结实率平均为25.0%(1998年,对照自交结实率仅16.3%),比对照高8.7%(数据没列入表中),但与选育目标相比还有差距。鉴于一些株系在转育度或育性波动上的问题,仅选留了105个单株,分别收种和留莩。

在 $H_3$ 代观察到,6月2日为始穗期。始穗之后,对每个单株后代抽样镜检,结果如表2(仅列出其中8个株系的数据)。可以看到,这些单株后代均表现败育性彻底且整齐一致,所有株系的套袋自交结实率均低于对照,最低为1.08%,比对照低1.19%。晚季,由9月中旬开始定期定株镜检,发现所保留的稻莩均由9月25日后开始转换育性,证明不育期持续115d左右。考种结果,结实率均比对照的结实率高,最高为45.53%(株系号35-9-2),比对照高出19.03%,繁种效率明显提高。

表2 培矮64S  $H_3$ 代的部分株系不育期及育性转换期的花粉染色率及自交结实率

Table 2 Pollen staining rate and seed set percentage in the  $H_3$  generation of some plant lines from Peiai 64S in sterility and fertility transformation periods

株系号 Code of plant lines	不育期 Sterility period		育性转换期 Fertility transformation period	
	花粉染色率 Pollen staining rate (%)	自交结实率 Seed set percentage* (%)	最高花粉染色率 Highest pollen staining rate (%)	自交结实率 Seed set percentage* (%)
13-6-1	0	1.23 ± 0.10	51.4	31.22 ± 1.67
13-6-2	0	2.06 ± 0.21	46.7	29.90 ± 1.03
13-6-3	0	1.33 ± 0.18	50.2	39.34 ± 1.45
34-8-2	0	1.08 ± 0.11	57.0	37.54 ± 1.17
34-8-3	0	1.12 ± 0.12	40.8	32.86 ± 1.27
35-9-2	0	1.20 ± 0.13	55.5	45.53 ± 1.93
40-6-3	0	1.23 ± 0.11	48.9	38.04 ± 1.43
85-5-1	0	1.32 ± 0.08	59.0	42.80 ± 2.76
Peiai 64S (Control)	0	2.27 ± 0.08	45.6	26.50 ± 0.48

\*Seed set percentage from self-pollination

### 2.3 分期播种及测交组合

经过  $H_1-H_3$  代的观察、选择, 在  $H_4$  代, 以其中 7 个株系与对照的种子分 4 期(即 2 月 7 日和 22 日, 3 月 8 日和 23 日)进行播种。根据始穗期记载看出, 随着播种的推迟, 各期的播始期(即从播种到始穗的天数)呈由长到短的趋势(数据未列出), 表明了生育期感温性的特点。表 3 列出了 3 月 8 日播种的  $H_4$  代 7 个群体(各 200 株)的育性转换和群体整齐度。表 3 显示: (1)  $H_4$  代群体育性(及其它性状)整齐一致; (2) 在正造(3 月初播种, 4 月初插植的这一批), 播始期略短, 最短的为 87 d (85-5-1), 比对照短 5 d, 最长的为 92 d (40-6-3), 与对照相同; (3) 稳定不育期略长, 最长的 116 d, 比对照长 3 d (85-5-1); (4) 晚季育性转换期的花粉染色率和自交结实率均比对照高。群体整齐度均在 95.6% 以上。

此外,  $H_4$  代考种结果还表明, 株高比对照高 2-3 cm, 穗长比对照长约 3 cm, 穗粒数也较多(数据未列出), 株叶形态都比较好。

表 3 培矮 64S  $H_4$  代稳定不育期的持续天数及育性转换期的自交结实率

Table 3 Duration of stable sterility period and seed set percentage in fertility transformation period in the  $H_4$  generation of Peiai 64S

株系号 Code of plant lines	播始 天数 Days from sowing to heading	稳定不育期 Stable sterility period		育性转换期 Fertility transformation period		群体 整齐度 Population uniformity (%)
		起止日期 Dates (D/M)	持续 天数 Duration* (d)	最高花粉 染色率 Highest pollen staining rate (%)	自交 结实率 Seed set percentage** (%)	
13-6-1	88	3/6-25/9	115	48.6	36.7 ± 1.78	99.3
13-6-3	90	5/6-26/9	114	57.5	49.2 ± 1.34	97.8
34-8-2	90	5/6-26/9	114	44.3	31.1 ± 1.53	98.5
34-8-3	89	4/6-26/9	115	59.1	49.1 ± 1.97	98.5
35-9-2	89	4/6-26/9	115	63.5	51.5 ± 2.50	97.2
40-6-3	92	7/6-27/9	113	48.0	35.4 ± 1.66	95.6
85-5-1	87	2/6-25/9	116	51.7	45.2 ± 1.86	99.9
Peiai 64S (Control)	92	7/6-27/9	113	40.5	25.3 ± 0.91	99.9

\* 稳定不育天数以花粉不育度高于 95% 时计算。Duration of stable sterility period was calculated when the sterile pollens exceeded 95%.

\*\* Seed set percentage from self-pollination.

在  $H_4$  代, 测交了 108 个组合。  $F_1$  代各组合种植 20-50 株不等。表 4 仅列出了其中 13 个组合的农艺性状的数据, 以三系强优组合的农艺性状作对照。可以看出, 各组合的有效穗/株比对照多 1.4-5.5 穗; 最大穗长 24.6 cm, 比对照长 0.6 cm; 最小穗长 19.9 cm, 比对照短 4.1 cm; 总粒数/穗比对照多 30.5-89.5 粒; 结实率比对照高 15.46%-24.36%; 但千粒重比对照少 2.0-6.9 g。由此可以推测, 本试验各测交组合以有效穗和总粒数多、结实率高而构成较高的产量, 可与三系杂交稻相媲美。

表4 培矮64S H<sub>4</sub>的杂交组合 F<sub>1</sub>代的农艺性状Table 4 Agronomic traits of F<sub>1</sub> hybrids crossed by the H<sub>4</sub> generation of Peiai 64S with some strains

组合 Combinations	有效穗/株 Effective panicles per plant	穗长 Panicle length (cm)	总粒数/穗 Grains per panicle	结实率 Seed set percentage (%)	千粒重 1000-grain weight (g)
13-6-1-1/G0584	10.0 ± 2.0	21.8 ± 1.0	235.7 ± 23.7	88.96 ± 0.50	21.4
13-6-1-1/G0776	13.5 ± 1.3	23.8 ± 0.7	209.4 ± 22.0	94.36 ± 1.08	24.2
13-6-3-2/G0583	9.4 ± 2.1	23.7 ± 0.6	219.8 ± 25.8	91.45 ± 3.56	21.6
34-8-2-1/G0522	10.8 ± 0.8	20.2 ± 0.5	208.1 ± 16.7	86.45 ± 5.43	24.0
34-8-2-1/G0554	9.8 ± 1.9	21.8 ± 0.6	213.0 ± 6.7	88.80 ± 2.39	21.4
34-8-3-2/G0751	12.2 ± 0.8	22.4 ± 1.3	229.1 ± 28.1	85.60 ± 5.33	21.7
34-8-3-2/G0675	9.8 ± 0.8	23.0 ± 0.6	214.5 ± 23.2	86.29 ± 5.50	20.6
35-9-2-1/G0745	10.2 ± 1.8	21.5 ± 0.4	209.1 ± 20.0	85.79 ± 7.16	21.6
35-9-2-1/G0691	11.8 ± 2.0	22.2 ± 0.5	212.7 ± 18.7	89.52 ± 3.27	23.0
40-6-3-1/G0584	13.5 ± 1.3	21.7 ± 0.6	210.7 ± 15.1	85.76 ± 7.10	23.5
40-6-3-1/G0656	12.0 ± 1.4	19.9 ± 0.9	206.3 ± 17.5	85.46 ± 6.34	24.4
85-5-1-1/G0776	11.5 ± 1.0	24.4 ± 0.6	265.3 ± 26.3	92.76 ± 1.29	25.5
85-5-1-1/G0731	10.0 ± 1.6	24.6 ± 0.5	248.7 ± 16.9	89.75 ± 2.17	23.0
汕优63 Shanyou (Control)	8.0 ± 1.0	24.0 ± 1.2	175.8 ± 20.0	70.00 ± 4.50	27.5

### 3 讨论

花药培养的研究已经十分深入并应用于育种工作中。李梅芳等<sup>[8]</sup>的研究证明,由花药培养获得的花粉植株,80%以上是不分离的,因而可以从中选出优良的株系进而快速地培育出新的品种。陈英等<sup>[9]</sup>观察了484个梗稻花粉植株 H<sub>2</sub>代株系,并结合前人的研究结果,证实在水稻中通过花药培养产生的自然加倍的二倍体花粉植株约90%是纯合的。本实验的结果与上述研究的结论是吻合的,即除了供体不纯等因素所导致的分离外,80%左右的群体整齐一致。因此,花粉再生植株及其后代稳定较快。从理论上讲,加倍单倍体群体中所有单株的基因型是纯合的。实验过程也表明,在 H<sub>1</sub>代淘汰了分离株(株系),H<sub>2</sub>代淘汰了整齐度和转育度较差的株系以后,H<sub>3</sub>代群体可基本稳定;通过3-4代的选育,可以获得败育性彻底(在不育期)、稳定不育期较长和繁种效率(在育性转换期)比供体两用系较高的新两用系。当然,涉及两用系育性的因素比较复杂,光(温)诱导的累加效应、营养生长期光温条件的影响等都可能致其育性的不稳定性<sup>[10]</sup>。正因为如此,本实验的选择效率还是较低的。

按常规,两用系的提纯和原种生产程序为:单株选择→低温或长日低温处理→再生留种(核心种子)→原原种→原种→制种<sup>[2]</sup>。这是科学的和可靠的。但两亲本之间的亲缘关系较远的两用系(如培矮64S),因其遗传纯合的过程较长,采用常规系统选择的方法又只局限于表现型的选择,不能确定所选择单株的遗传型是否纯化,所以提纯的周期较长,手段也较繁琐。本研究已表明,花药培养具有独特的遗传隔离效果,可使成对基因纯合,因而可以快速提纯和改良两用系。至于是否能以这一途径取代原种生产程序仍值得进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 石明松,邓景扬. 湖北光敏感核不育水稻的发现、鉴定及其利用途径 [J]. 遗传学报, 1986, 3(2):107-112.

- [2] 袁隆平. 水稻光、温敏不育系的提纯和原种生产 [J]. 杂交水稻, 1994, (6):1-3.
- [3] 朱德瑶, 丁效华, 尹建华. 籼稻花药培养和育种 [A]. 颜昌敬. 农作物组织培养 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1991, 153-169.
- [4] 蔡得田, 陈冬玲, 祝虹, 等. 从“湖北光敏感核不育水稻”的未受精卵子和花药培养出单倍体植株 [J]. 实验生物学报, 1988, 21(4):401-405.
- [5] 凌定厚, 陈梅芳, 马镇荣, 等. 提高光敏感雄性不育水稻花粉单倍体育种效率及不育花粉植株育性转换特点的研究 [J]. 遗传学报, 1993, 20(2):167-173.
- [6] 尹建华, 朱德瑶, 潘熙淦. 籼型光敏核不育水稻杂种花粉植株的育性表现 [J]. 江西农业学报, 1993, 5(增刊): 27-31.
- [7] 张家宏. 应用花培技术提纯不同质源不育系取得成效 [J]. 杂交水稻, 1995, (2):27.
- [8] 李梅芳, 吴传银, 倪丕冲, 等. 花药培养与系统选育在水稻杂交育种中选育效率的比较研究 [A]. 胡含, 王恒立. 植物细胞工程与育种 [M]. 北京: 北京工业大学出版社, 1990, 48-54.
- [9] 陈英. 水稻花粉植株的遗传与作物改良 [A]. 胡含, 陈英. 植物体细胞遗传与作物 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1998, 68-101.
- [10] 陈宗祥, 汤述囊, 潘学彪. 对水稻两用雄性核不育系的认识与思考 [J]. 杂交水稻, 1998, 13(4):4-5.