

文章编号:1000-8551(2005)01-013-04

花药组织培养和小麦×玉米杂交技术应用于产生小麦单倍体的比较研究

李新华

(山东省农业科学院原子能农业应用研究所,山东 济南 250100)

摘要:两个春小麦品种意塔和帕旺的花药组织培养和小麦×玉米杂交技术产生单倍体的效果不同。不同基因型花药诱导愈伤组织的诱导率从9.4%到19.7%不等,不同基因型所产生的再生株数量亦不同,两个小麦品种都有绿苗和白化苗产生,绿苗诱导率自1.3%到5.0%。分别利用小麦×玉米杂交技术能有效诱导两个春小麦品种单倍体,杂交结实率为80.2%~95.1%,但只有10.9%~14.6%的籽粒含有幼胚,其中95%以上的幼胚可发育成绿苗。每100个杂交小花中平均可生成10.5个到14.0个绿苗,不产生白化苗,染色体亦不自然加倍。

关键词:小麦;单倍体;花药培养;小麦×玉米杂交

PRODUCTION OF WHEAT HAPLOIDS USING ANTHER CULTURE AND WHEAT×MAIZE HYBRIDIZATION TECHNIQUE

LI Xin-hua

(Institute for Application of Atomic Energy, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong, 250100)

Abstract: Two spring wheat varieties, "Eta" and "Pavon", differed significantly in their response to anther culture and wheat×maize hybridization techniques for the production of haploids. Depending on the genotype, the frequency of embryo induction from cultured anthers ranged from 9.4 to 19.7 per 100 anthers. Plant regeneration from cultured embryos also varied with the genotype. Two spring wheat varieties produced both green and albino plantlets. The frequency of green plants produced per 100 cultured anthers ranged from 1.3 to 5.0. The wheat×maize hybridization technique was highly effective in producing haploids in two spring wheat varieties, although the frequency varied with genotype. The percentage of seed set ranged from 80.2 to 95.1, but only 10.9% and 14.6% of seeds contained embryos. About 95% of the cultured embryos developed into green plants. About 100 florets pollinated produced 10.5 and 14.0 plants separately. There was no evidence of albinism or spontaneous chromosome doubling.

Key words: *Triticum aestivum*; haploids; anther culture; wheat×maize hybridization

随着诱导单倍体方法的不断完善,单倍体在作为遗传分析工具或直接进行育种方面的应用越来越多。在谷类作物中,花药(小孢子)诱导和远缘杂交是产生单倍体的两个主要技术。尽管花药培养育出了许多品种^[1,2],在小麦中利用花药诱导单倍体时,常常遇到单倍体诱导率低、幼胚发育差和大量白化苗等问题。

1970年 Kasha 和高国楠^[3]首先报道了利用栽培大麦和球茎大麦杂交得到单倍体幼苗。Subrahmayam^[4]和 Ho、Kasha^[5]分别于1973、1975年通过遗传学和细胞遗传学方法证明球茎大麦的染色

收稿日期:2004-01-16

基金项目:国际原子能机构资助项目(C6/CPR/00021P),主要工作在波兰卡特维兹州立大学生物遗传实验室完成。

作者简介:李新华(1963-),男,山东莒县人,副研究员,从事小麦诱变育种。E-mail:lixinhuaf@163.com

体在细胞分裂过程中消失。由于单倍体幼胚缺少胚乳,单倍体幼胚必须在培养基上进行胚抢救,迄今为止世界上利用该方法育成了 50 余个大麦品种^[6]。1986 年 Laurie^[7~9]等利用小麦 × 玉米成功诱导出小麦单倍体植株,并通过细胞学观察证实了小麦 × 玉米得到的幼胚是单倍体幼胚,小麦 × 玉米杂交得胚率显著高于小麦 × 球茎大麦。用小麦 × 玉米诱导单倍体不受小麦基因型的限制,任何基因型小麦都可以得到单倍体植株^[10~13]。

1 材料与方法

1.1 材料

春小麦品种:意塔和帕旺;玉米品种:提塔。小麦和玉米品种均来自波兰栽培的品种。

1.2 方法

1.2.1 植株生长条件 在同一个温室中种植玉米和春小麦,种植玉米和小麦植株比例为 1:10。为了使玉米开花期与小麦开花期相遇,保证杂交工作的顺利完成,第 1 批玉米在小麦播种前的 1 个月播种,然后每隔 3~4d 播种 1 次玉米,小麦则在第 1 批播种后,每隔 2 周播种 1 次,及时浇水、施肥、灭虫,保证小麦和玉米的健壮生长。白天与夜间的温度分别为 22℃ 和 17℃,光周期是 16h。

1.2.2 花药培养 取小孢子发育期处在单核期的麦穗,将麦穗基部浸泡盛有 N6 盐烧杯中,放到 4℃ 的冰箱中贮存 6d。冷藏处理过的麦穗经消毒灭菌,剥中部小穗的花药,分别置入的 Potato-2、W14 和 190-2 的固体诱导培养基中。每 3ml 的培养基大约置入 100 个花药,在 28℃ ~ 30℃,黑暗条件下培养。取诱导培养 30d 后的愈伤组织(直径 2mm 左右)分别置入 Potato-2、W14 和 190-2 分化培养基中,在 22℃ 低光条件下培养。2~3 周后发育正常的幼苗分别转移到不含有激素的 Potato-2、W14 和 190-2 培养基中。

1.2.3 胚抢救 通过小麦 × 玉米得到的单倍体幼胚,发育到 14~18d 时在改良的 B₅ 培养基上进行幼胚的抢救。取 0.1g/L 浓度的 2,4-D 使用后 14~18d 的麦穗,无菌条件下对小麦籽粒的表面进行消毒灭菌(小麦籽粒浸泡在含有 20% 次氯酸钠的漂白溶液中 7min,然后用无菌蒸馏水冲洗 3 次)。取出籽粒置于无菌培养皿中,用解剖针打开籽粒,用环状针取出单倍体幼胚,置入装有改良的 B₅ 培养基的试管内。幼胚在 20℃ 黑暗中培养,当胚芽鞘长度为 1~2cm 时,将试管转移到 22℃、光照 16h、光强 5000lx 条件下的生长室生长。

2 结果与分析

2.1 花药培养中不同基因型的效果

本实验利用 1237 个意塔小麦的花药和 1526 个帕旺小麦的花药,分别置于 Potato-2、W14 和 190-2 3 种培养基上,实验结果证明(表 1):意塔小麦产生愈伤组织的花药数为 101 个,占接种花药的 8.2%;帕旺小麦产生愈伤组织的花药数为 165 个,占接种花药的 10.8%。意塔小麦获得 116 块愈伤组织,占接种花药的 9.4%,而帕旺小麦获得 300 块愈伤组织,占接种花药的 19.7%;意塔和帕旺花药培养后分别获得 16 个和 77 个的绿苗,绿苗诱导率分别达到 1.3% 和 5.0%。通过花药培养帕旺小麦较意塔小麦易获得较多的愈伤组织和绿苗,说明帕旺和意塔基因型间存在差异。

表 1 不同基因型的小麦花药培养效果

品种 variety	接种花药数 No. of plated anthers	产生愈伤组织的花药 percent of responding anthers (%)	愈伤组织诱导率 percent of calli (%)	绿苗率 percent of green plants (%)	白化苗率 percent of albino plants (%)
意塔 Eta	1237	8.2	9.4	1.3	2.3
帕旺 Pavon	1526	10.8	19.7	5.0	5.9

2.2 花药培养中不同培养基的效果

本实验分别使用 Potato-2、W14 和 190-2 3 种培养基进行花药组织培养、诱导愈伤组织和产生单倍体绿苗。实验结果表明(表 2):在产生愈伤组织的花药数和愈伤组织数中,3 种诱导培养基的效果依次为 190-2 > Potato-2 > W14,但帕旺小麦在 Potato-2 诱导培养基上能得到 27.2 %的愈伤组织,在本实验中最高。在获得绿苗的效果中,3 种诱导培养基的效果依次为 Potato-2 > 190-2 > W14,而白化苗的诱导频率则依次为 190-2 > Potato-2 > W14。从本研究结果可以看到,190-2 比 Potato-2 和 W14 可获得较多的愈伤组织,但 Potato-2 培养基可以得到较多的绿苗和较少的白化苗。在愈伤组织的培养过程中,可能由于温度高等原因导致白化苗较多。

表 2 小麦花药培养中不同诱导培养基的效果

Table 2 Effect of different induction medium on haploid production in anther culture

培养基 medium	品种 varieties	接种花药数 No. of plated anthers	产生愈伤组织的花药 percent of responding anthers (%)	愈伤组织诱导率 percent of calli (%)	绿苗率 percent of green plants (%)	白化苗率 percent of albino plants (%)
Potato-2	意塔 Eta	119	4.2	5.0	1.7	2.5
	帕旺 Pavon	599	8.1	27.2	9.3	5.8
W14	意塔 Eta	430	3.5	3.7	1.2	0.9
	帕旺 Pavon	434	5.5	6.7	1.2	2.5
190-2	意塔 Eta	688	11.8	13.7	1.3	3.2
	帕旺 Pavon	493	18.7	24.5	3.2	8.9

2.3 小麦花药培养小孢子不同发育时期的诱导效果

为了准确判断小麦花粉发育的时期,在光学显微镜下对每 1 个麦穗进行镜检。根据细胞核的大小和位置及大液泡有无及形状大小变化,判断花粉所处的发育时期。本实验只选择处于单核早期、中期和晚期的麦穗进行培养。通过实验结果(表 3)可以看到,产生愈伤组织的花药数约为 4.0 % ~ 24.6 %,以小孢子发育早期产生愈伤组织的花药数多。出愈率范围是 6.0 % ~ 85.1 %,小孢子发育早期出愈率高于中期和晚期。绿苗诱导率 0.5 % ~ 27.2 %,小孢子发育早期绿苗诱导率高于中期和晚期。白化苗诱导率为 1.6 % ~ 20.0 %。从本实验结果证明,处于早期发育的小孢子有利于产生愈伤组织和绿苗。

表 3 小麦不同小孢子发育时期的花药培养效果

Table 3 Effect of different stage of microspores on haploid production in anther culture

小孢子发育期 development stage	品种 varieties	接种的花药数 No. of plated anthers	产生愈伤组织的花药 percent of responding anthers (%)	愈伤组织诱导率 percent of calli (%)	绿苗率 percent of green plants (%)	白化苗率 percent of albino plants (%)
早期 early	意塔 Eta	108	12.0	13.0	4.6	2.8
	帕旺 Pavon	195	24.6	85.1	27.2	20.0
中期 middle	意塔 Eta	497	12.7	12.9	1.6	3.2
	帕旺 Pavon	706	8.2	10.9	1.7	2.0
晚期 late	意塔 Eta	632	4.0	6.0	0.5	1.6
	帕旺 Pavon	625	9.4	11.2	1.9	5.9

2.4 利用小麦 ×玉米产生小麦单倍体幼胚

通过试验观察到(表 4):意塔和帕旺 2 个小麦品种经玉米花粉授粉后分别得到结实籽粒 995 粒和 390 粒(分别占授粉小花数的 80.2 %和 95.1 %)。用解剖针打开发育健壮的籽粒,用环状针分别取出 135 个意塔单倍体幼胚和 60 个帕旺单倍体幼胚(分别占授粉小花数的 10.9 %和 14.6 %);该幼胚在改良的 B5 培养基上培养,分别得到 130 株和 58 株单倍体幼苗,分别占授粉小花数的 10.5 %和 14.1 %。小麦 ×玉米产生小麦单倍体幼苗(10.5 % ~ 14.1 %)大于小麦花药组织培养(1.2 % ~ 9.3 %),该技术能得到较多的单倍体幼苗,同时克服了小麦花药组织培养中出现大量白化苗的缺点。在小麦 ×玉米杂交技术诱导单倍体幼苗中,任何基因型小麦都可以得到幼苗,比花药组织培养诱导小麦单倍体更有效。

表 4 利用小麦 × 玉米产生小麦单倍体幼胚

Table 4 Production of haploid embryos using wheat × maize hybridization					
品种 variety	授粉小花数 No. of florets pollinated	结实种子数 No. of seeds	结实率 percent of seeds(%)	单倍体幼胚率 percent of embryos(%)	单倍体绿苗率 percent of green plants(%)
意塔 Eta	1240	995	80. 2	10. 9	10. 5
帕旺 Pavon	410	390	95. 1	14. 6	14. 1

3 讨论

本实验使用的 Potato-2、W14 和 190-2 3 种固体培养基,是欧洲大部分实验室在小麦花药培养中经常使用的培养基,在文献中可以查到该培养基的配方,故在此不再列出。不同基因型小麦在花药组织培养中,所产生的愈伤组织及绿苗、白化苗是不同的,基因型间存在差异。但在培养过程中,可能由于温度高的缘故,导致白化苗多于绿苗。如果在培养过程中降低温度,可能分化出更多的绿苗。190-2 培养基无论在意塔还是帕旺小麦组织培养中,都能得到较多的愈伤组织,为进一步培育幼苗打下了基础。

在实验过程中,分别利用了栽培到高温条件下生长的玉米花粉和常温条件下生长的玉米花粉,只有常温条件下的玉米花粉,具有受精能力,高温条件下生长的玉米花粉不能使小麦受精,可能在高温条件下玉米花粉发育不正常,导致玉米花粉败育。试验中两个小麦品种是春小麦品种,无须经过低温春化阶段即能拔节成穗。如果使用的小麦是冬小麦或半冬性小麦品种,必须经过低温处理度过春化阶段才能移置到温室。为避免小麦与玉米开花期不一致,造成杂交困难。通过错期播种小麦和玉米,使小麦与玉米的花期相遇,完成小麦与玉米的杂交。

小麦通过花药培养得到单倍体时,不同的基因型愈伤组织诱导率差异极大,有的基因型得不到愈伤组织。小麦 × 玉米杂交技术克服了小麦基因型的限制,任何基因型小麦都可以得到单倍体幼苗,然后再进行染色体加倍,可以得到双倍体的植株。小麦 × 玉米杂交技术生产小麦单倍体是一种新的小麦育种技术,可以缩短小麦育种年限,加快育种进程,相信利用该育种技术在我国可以育成新的小麦品种。

参考文献:

- [1] 胡含,王恒立. 植物细胞工程与育种. 北京:北京工业大学出版社,1990,1~5
- [2] 颜昌敬. 农作物组织培养. 上海:上海科学技术出版社,1991,12~34
- [3] Kasha KJ, Kao KN. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature, 1970, 225:874~876
- [4] Subrahmayam N C. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following inter specific hybridization. Chromosome, 1973, 42:111~125
- [5] Ho KM, Kasha KJ. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. Genetics, 1975, 81:263~275
- [6] Devaux P, Zivy M, Kilian A, Kleinhofs A. Doubled haploids in barley. In: Scoles G. and Rosnagel B. (eds.), Proc. V International Oat Conference and VII International Barley Genetics Symposium. Univ. of Saakatoon, 1996, pp. 213~222
- [7] Laurie D A, Reynondie S. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. Plant Breed, 1991, 106:182~189
- [8] Laurie D A, Bennet M D. Wheat × maize hybridization. Can J Genet Cytol, 1986, 28: 313~316
- [9] Laurie D A, Bennet M D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. Genome, 1989, 32: 956~961
- [10] Zhang J, et al. wheat embryo-genesis and haploid production in wheat × maize hybrids. Euphytica, 1996, 90:315~324
- [11] Suenaga K. Doubled haploid system using the inter generic crosses between wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour, 1994, 9:83~139
- [12] Iwona Szarejko. Production of doubled haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.) through chromosome elimination, In: Manual on General Genetics and Basic Methods in Plant Biotechnology. Silesian University of Poland, 2001, 175~180
- [13] 李根英,等. 玉米花粉诱导小麦单倍体的研究进展. 山东农业科学, 2003, 1:52~54