

固体培养基上浸润培养提高花粉 植株诱导率的研究

王 培

陈玉蓉

(河北省农科院粮油作物研究所 石家庄 050031)

摘 要 在 30×170 mm的试管内, 倒入25~30ml加琼脂固化的 C_{17} 培养基, 接种冬小麦花药后注入2 ml左右不加琼脂而浓度相同的 C_{17} 培养液浸润培养, 冬小麦花药愈伤组织诱导率可从固体培养基的13.94%提高到29.95%, 愈伤组织的绿苗分化率还比固体培养基提高10.2%, 分化绿苗丛数占接种花药的10.94%, 是固体培养的2.37倍。

关键词 冬小麦 花药培养 浸润 固体培养

花药培养可以诱导单倍体和纯合二倍体植株, 花粉植株的后代遗传上也已经证明可以缩短育种世代, 提高选择效果, 并已应用这一方法培育出一批新品种[1, 2, 3]。为了将这一技术广泛应用于育种实践, 我国学者进行了大量研究, 并取得了可喜进展[4, 5, 6], 但这一方法和常规杂交育种相比仍然群体小, 远不能满足育种要求, 尚需大幅度地提高花粉植株的诱导率。

一般普通小麦每个花药含有1700~2900个花粉粒[1], 每个花粉粒均有诱导成愈伤组织的潜力, 因此成倍提高花药愈伤组织的诱导率是完全可能的。Wernicke[12]和Konlenbach[11]研究了固体培养基和液体培养基培养烟草花药的效果, 发现液体培养可以提高诱导率。胡忠[7]、陈英[8]、田文忠[9]应用液体培养也大幅度地提高了水稻花药愈伤组织的诱导率, 但愈伤组织质量差, 绿苗分化率低。徐惠君[10]在小麦上用半液-半固态培养也提高了愈伤组织的诱导率, 但没有提到愈伤组织质量。我们于1989年在冬小麦花药培养中, 将接种在固体培养基上的花药, 接种后倒入2 mm左右的培养液进行浸润培养, 不仅成倍提高了花药愈伤组织的诱导率, 而且愈伤组织质量不但没有降低, 反而比固体培养基诱导的愈伤组织绿苗分化率提高10.2%。同时用这一方法接种后的花药, 不进行二次转移, 这样可减少污染, 操作亦方便, 是提高花粉植株诱导率的一个较好的方法。现报道如下。

材料和方法

一、接种材料

供试验的4个组合, 全部是1988年人工去雄杂交的 F_1 冬小麦(表1)。

表1 接种组合代号

代号	杂交组合
31	花326/津丰1号/中捷321
32	R90×新引114
33	88H ₃ 221×C ₄ 102-5
34	88H ₃ 221×5418

二、花药离体时期和试验方法

供接种的组合1988年10月初于自然条件下适时秋播于本所试验地,不控制生育,植株生长健壮。1989年4月下旬取单核中晚期的麦穗。其标准是,田间看小麦正在孕穗,1~2天麦穗就要露出,室内除去包叶,二手指捏住麦穗基部,整个麦穗成45度弯曲。

取出花药用0.5%的醋酸洋红染色,在显微镜上观察,中央液泡已经形成但细胞核尚无移到萌发孔对面。供接种的麦穗用0.1%氯化汞溶液浸泡8~10分钟,再用无菌水冲洗3~4次,在超净工作台上将花药接种在培养基上,30×170mm试管每管接种花药50~60个,将花药接种在固体培养基上后,每管再注入2ml经灭菌的与固体培养基成份和浓度相同的培养液。

三、培养方法

诱导愈伤组织的基本培养基C₁₇+2,4-D 2mg/L+激动素0.5mg/L+蔗糖9%,pH5.8。固体培养基加入琼脂0.7%。固体和液体培养基均高压灭菌20分钟。接种后的花药放在28~30℃的培养室诱导愈伤组织,从培养20天开始,每隔一天调查一次出愈日,当肉眼能见到愈伤组织后第10天将其转移到分化培养基上。分化培养基为C₁₇+激动素2mg/L+吲哚乙酸0.5mg/L+蔗糖3%+琼脂0.7%,pH5.8。愈伤组织被转入分化培养基后,培养温度保持25~26℃,每天日光灯照明10~12小时。

四、计算方法

$$\text{愈伤组织诱导率} = \frac{\text{形成愈伤组织块数}}{\text{接种花药数}} \times 100$$

$$\text{绿苗分化率} = \frac{\text{分化绿苗丛数}}{\text{转移愈伤组织块数}} \times 100$$

试验结果

一、浸润培养对愈伤组织出现速度的影响

小麦花药接种在固体培养基上后,立即注入2ml的培养液(注意试管倾斜角度不要太大,以防花药粘在试管壁上),花药漂浮在液体表面,在液体条件下进行培养。接种后由于培养液的蒸发及培养基、花药的吸收,液体层逐渐变薄,但由于浸润作用,仍有一层水膜附着整个花药的各部位。半个月后肉眼可见到乳白色的愈伤组织出现,这些愈伤组织在培养液的浸润下生长很快。接种20天后培养液成为一层湿薄膜,这时在花药四周已长出许多小米粒大小的愈伤组织,最多的一个花药可诱导出14块愈伤组织,颜色较浅,多数为乳白色。接种30天后愈伤组织一般直径可长到2mm左右。接种在固体培养基上的花药愈伤组织比浸润培养的

出现较晚, 生长也较慢。接种30天后一般直径只长到 1 mm左右, 颜色较深, 多数为米黄色。

表2 固体培养和浸润培养对出愈速度的影响

愈伤组织转移日期 (月 / 日)	固 体 培 养		浸 润 培 养	
	转移愈伤组织数	%	转移愈伤组织数	%
5 / 28	310	40.05	935	60.10
6 / 4	228	29.45	131	8.40
6 / 9	72	9.30	179	11.50
6 / 14	68	8.80	115	7.30
6 / 22	45	5.80	107	6.90
7 / 2	51	6.60	90	5.80
合 计	774	100.00	1557	100.00

5月28日至7月2日对4月25日浸润培养和固体培养各接种 4 个组合的5000多个花药 6 次调查结果如表 2。可以看出, 第一, 5月28日统计结果, 供试验的各杂交组合诱导出的愈伤组织块数都是浸润培养的多, 并且占各组合愈伤组织块数的百分率也都高, 说明在固体培养基上进行浸润培养愈伤组织开始出现的早不是个别组合, 而是供试的组合均早, 是共性的。第二, 截止7月2日, 即接种后第68天, 浸润培养的各组合共诱导愈伤组织1557块, 固体培养共诱导出愈伤组织774块。5月28日调查, 浸润培养早出的愈伤组织块数占全部愈伤组织块数的60.1%, 固体培养的仅占40.1%, 说明浸润培养在接种一个月前后愈伤组织出现的最快, 早诱导出的愈伤组织比晚的比例高。第三, 5月28日, 即接种后33天调查结果, 浸润培养的4个组合诱导出愈伤组织总共为935块, 固体培养的诱导出愈伤组织310块, 浸润培养是固体培养诱导出愈伤组织总数的3倍。综上所述, 供试的各组合均是浸润培养的愈伤组织出现的早(出现在接种后30天左右), 速度快, 并且集中, 比固体培养愈伤组织早出现5~10天, 为提高绿苗分化率奠定了基础。

二、浸润培养与固体培养对花药愈伤组织诱导率的影响

用二种培养方式各接种的4个冬小麦F₁组合的花药数和诱导出的愈伤组织块数及诱导率列于表3。已有报道, 同一培养基在花药培养和组织、细胞培养中对同一作物的不同品种(组合)间反应有较大的差异。本试验结果表明, 同一培养基的不同培养方式下的4个小麦组合, 其愈伤组织的诱导率为浸润培养在6.28~83.32%之间, 固体培养在2.85~33.78%之间, 说明不同培养方式间差异很大。

供试的4个小麦组合, 浸润培养诱导率高的在固体培养基上诱导率也高, 例如, 33组合在浸润培养中诱导率最高为83.32%, 在固体培养中也最高, 为33.78%, 但浸润培养比固体培养诱导率提高146.7%。在浸润培养中诱导率低的在固体培养基中诱导率也低, 如32组合在浸润培养中诱导率最低为6.28%, 在固体培养中诱导率也最低, 为2.88%, 但浸润培养是固体培养诱导率的2.18倍。4个组合花药愈伤组织的诱导率浸润培养的平均为29.95%, 固体培养的平均为13.94%, 浸润培养比固体培养基提高114.8%, 经 χ^2 独立性测定, $\chi^2 = 406$,

$P=0.01$ 时, $\chi^2=6.63$, $P<0.01$ 。因此可以认为, 浸润培养花药愈伤组织的诱导率比固体培养花药愈伤组织的诱导率提高极显著。

表3 两种培养方式出愈率的比较

培 养 方 式	组合代号	接种花药数	愈 伤 组 织	
			数 目	%
浸 润 培 养	31	1222	157	12.85
	32	1528	96	6.28
	33	1367	1139	83.32
	34	1081	165	15.26
	合 计	5198	1557	29.95
固 体 培 养	31	1216	152	12.50
	32	1546	44	2.85
	33	1477	499	33.78
	34	1314	79	6.01
	合 计	5553	774	13.94

三、不同培养方式对花药愈伤组织分化绿苗的影响

浸润培养和固体培养诱导出的愈伤组织全部转移到相同的 C_{17} 附加激动素 2 mg/L, 吡啶乙酸 0.5mg/L, 蔗糖 3%, pH5.8 的分化培养基上, 其绿苗分化结果列于表 4。结果表明, 供试的 4 个冬小麦 F_1 杂交组合, 一般浸润培养分化率高的组合其固体培养基分化率也高, 如 33 组合诱导出的愈伤组织在二种培养方法中绿苗分化率都最高, 但二者差异不大。第 34 组合在二种培养方法中绿苗分化率均占第二位。4 个供试的 F_1 组合在浸润培养中 32、33 组合愈伤组织的绿苗分化率高于固体培养基, 而 31、34 组合在固体培养基中诱导的愈伤组织

表4 两种培养方式分化率的比较

培 养 方 式	组合代号	愈伤组织块数	分 化 绿 苗	
			数 目	%
浸 润 培 养	31	157	8	5.10
	32	96	9	9.38
	33	1139	526	46.18
	34	165	26	5.76
	合 计	1557	569	36.54
固 体 培 养	31	152	13	8.55
	32	44	1	2.27
	33	499	226	45.29
	34	79	16	20.25
	合 计	774	256	33.07

的绿苗分化率则高于浸润培养的。供试的 4 个 F_1 组合浸润培养和固体培养诱导的愈伤组织平均前者为 36.54%，后者为 33.17%，花药愈伤组织的绿苗分化率培养浸润诱导的比固体培养诱导的提高 10.2%，经 χ^2 独立性测定， $\chi^2 = 2.71$ ， $P = 0.05 = 3.84$ ， $P > 0.05$ 。因此认为，花药愈伤组织的绿苗分化率尽管浸润培养诱导的高于固体培养诱导的，但二者差异不显著，质量基本一样。

据在固体培养基上调查，接种后至出愈的时间分别为 16~20，21~25，26~30，31~35，36~40，41~45，46~50 和 51 天以上产生的花药愈伤组织成苗分化率依次为 56.1%，44.7%，45.1%，36.2%，30.6%，27.3%，25.0%，13.6%。说明花药接种后至出愈的时间越长，分化率越低。浸润培养的愈伤组织开始出现的早且集中。尽管在浸润培养初期由于培养液对愈伤组织的质量可能稍有不良影响，但愈伤组织的出现比固体培养早，分化率高，二者相互抵消，又由于 60.1% 的愈伤组织在接种花药后 38 天全部转入分化培养基，愈伤组织提前出现提高的分化率大于培养液对愈伤组织质量下降的影响。因此浸润培养诱导的愈伤组织的绿苗分化率还高于固体培养诱导的愈伤组织。

四、对二种培养方式的综合评价

花药培养的目的是获得大量单倍体绿苗，培养方式的优劣应以花药为单位的绿苗诱导率为准。表 5 统计了以花药为指标的绿苗诱导率。结果表明，浸润培养诱导出的愈伤组织绿苗占花药的 10.94%，固体培养的占 4.62%，浸润培养诱导的愈伤组织绿苗分化率是固体培养绿苗分化率的 2.37 倍。经 χ^2 独立性测定， $\chi^2 = 152$ ， $P = 0.01 = 6.63$ ， $P < 0.01$ 。因此认为，浸润培养绿苗占接种花药的百分率与固体培养相比差异极显著，浸润培养比固体培养好。

表 5 绿苗占花药数目的比较

培 养 方 式	出愈率 (%) A	绿苗率 (%) B	绿苗占花药 (%) A×B
浸 润 培 养	29.95	36.54	10.94
固 体 培 养	13.94	33.17	4.62

讨 论

田文忠^[9]的研究结果表明，水稻花药液体漂浮培养($N_6 + 2,4-D$ 2mg/L + LH500mg/L + 蔗糖 6%) 与加琼脂固化的愈伤组织诱导率相比，提高 56%，但这些液体漂浮培养诱导出的愈伤组织分化率很低。他以水稻 77-30 为材料液体培养诱导的愈伤组织分化率只有 6.75%，仅为固体培养基的分化率的 1/4。尽管液体培养大幅度地提高了愈伤组织的诱导率，但愈伤组织质量差，未能增加绿苗总数。我们在冬小麦花药培养中用 30×170mm 试管，盛入 25~30ml $C_{17} + 2,4-D$ 2mg/L + 激动素 0.5mg/L + 蔗糖 9% + 琼脂 0.7% 固体培养基。接种后再注入 2ml 不加琼脂而和固体培养基浓度相同的培养液即为浸润培养，愈伤组织诱导率达 29.95%，是固体培养诱导率的 2.15 倍。愈伤组织的绿苗分化率为 36.54% 比固体培养的绿苗分化率高 10.16%，绿苗占花药 10.94%，是固体培养的 2.37 倍。

花药离体培养初期是小孢子改变原有发育途径向愈伤组织或胚状体发育的关键时期,在浸润培养的最初几天,花药全部漂浮在培养液上,整个花药均能接触营养物质。因此小孢子发育较快,注入培养液后由于蒸发和花药、培养基吸收培养液逐渐减少,最后花药落在固体培养基上。但由于浸润作用的原因,接种后花药表面在半个月左右一直浸润在培养液中,花药各个部位均可吸收营养可能是愈伤组织诱导率高的原因。浸润培养诱导的愈伤组织质量好,绿苗分化率高,主要是浸润培养的花药愈伤组织开始出现得早,而且集中。愈伤组织产生早,绿苗分化率高,是由于克服了浸润培养初期花药缺氧对愈伤组织质量的不良影响。接种后短时间漂浮花药就落在固体培养基上,只是由于浸润作用的原因,花药上才有很薄的一层培养液,或者说花药处在湿润状态下仍能呼吸,这和液体培养愈伤组织发育到一定大小便沉落在培养液下面处于缺氧状态不同。浸润培养诱导出的愈伤组织均不生长在液体中,可任其呼吸,由于较好地解决了小孢子发育所需要的营养,又供给了新生愈伤组织适宜的空气,因此不仅大幅度地提高了花药愈伤组织的诱导率,而且愈伤组织质量还略有提高,是目前花药培养中一项较适用的方法。

参 考 文 献

- 1 胡道芬等.冬小麦花粉孢子体的诱导及京花一号的育成.中国农业科学,1983,(1):29~35
- 2 李梅芳等.应用花药培养选育抗稻瘟病品种的研究.作物学报,1983,9(3):173~179;
- 3 赵友凉.高产抗病冬小麦花培28的育成及遗传性状分析.遗传,1986,8(3):17~20
- 4 朱至渭等.通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基.中国科学,1975,(5):484~490
- 5 王培等.C17培养基在小麦花药培养中应用的研究.植物学报,1986,28(1):38~45
- 6 欧阳俊闻.花药培养学术讨论会文集.北京:科学出版社,1978,58~60
- 7 胡忠等.花药培养学术讨论会文集.北京:科学出版社,1978,93~98
- 8 陈英等.水稻花药和花粉液体培养的研究.遗传学报,1979,6(4):5~10
- 9 田文忠等.水稻花药液体培养条件下影响愈伤组织诱导和分化的一些因素的研究.遗传学报,1983,10(5):362~368
- 10 徐惠君.对提高小麦花药绿苗诱导率的探讨.作物杂志,1985(3):30~32
- 11 Wernicke W and Konlenbach H W. Z: Pflanzenhysiol, 1976, 79(3):189~198
- 12 Konlenbach H W and Wernicke W. ibid, 1978, (86):463~472

A Study on Increasing Induction Frequency of Pollen Plants by Culture with a Thin Liquid Layer on Solidified Medium

Wang Pei Chen Yurong

(Cereal and Oil Crops Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031)

Aabstract After inoculation of winter wheat anther into glass tubes containing 25 to 30 ml agar-solidified C_{17} medium, about 3 mm liquid C_{17} medium was added. This raised the callus induction frequency of winter wheat anthes from 13.94% to 29.95% and the green plant regeneration frequency from calli by 10.20% in comparison with culture on solidified media. By this method the number of regenerated green plants accounted for 10.94% of the inoculated anthers which was 2.73 times as much as that by culture on solidified medium.

Key words: Winter wheat; Anther culture; Thin liquid layer; Solidified medium

欢迎订阅《农村科技开发》

本刊发挥农业大学技术、信息密集的优势，以其技术新颖，实用，信息量大，针对性强而备受农民朋友的欢迎。在1991年河北省科技期刊质量评比中，本刊被评为优秀期刊。

本刊主要栏目有：蔬菜地、果树园、养殖业荟萃、信息窗、中药材、加工技术、茜茜答问台等。本刊尤其重视为广大读者服务，愿为读者解答生产中的种种疑难问题；愿为读者牵线搭桥，联系项目，引进技术；愿为读者刊登广告，推广技术，推销产品。

本刊为双月刊，每期定价1.5元，全年共计9元；公开发行，全国各地邮电局均可办理订阅，邮发代号：18—41；也可直接与杂志社联系订阅。社址：河北省保定市河北农大院内农村科技开发杂志社，邮编：071001。