

普通小麦与硬粒小麦-簇毛麦双二倍体 杂种体细胞无性系的建立

李洪杰 石云素 史占良 张艳敏 郭北海 王子宁 温之雨

(河北省农林科学院粮油作物研究所河北省作物遗传育种实验室, 石家庄 050031)

摘 要 普通小麦比较容易与硬粒小麦-簇毛麦双二倍体 TH_1 和 TH_1W 杂交, 所选的 9 个普通小麦品种或品系与 TH_1 和 TH_1W 的 19 个杂交组合, 平均结实率为 46.7%, 共计获得 19 个杂交组合 2316 粒杂种种子。正反交结果表明, 以普通小麦为母本的杂交结实率高于反交结实率, 但是在杂种幼胚愈伤组织诱导率受正反交的影响小于杂交结实率。在继代培养过程中, 杂种幼胚愈伤组织生长迅速, 甚至直接诱导出绿苗, 共获得不同杂交组合 2 005 株再生植株, 移栽成活率达到 95% 以上。观察还发现有少量再生植株发生形态变异, 但是组织培养对提高普通小麦×硬粒小麦-簇毛麦双二倍体杂种育性没有明显的作用。

关键词 普通小麦 硬粒小麦-簇毛麦双二倍体 杂交 幼胚培养

中图分类号 S512.035.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7091(1999)增刊-0001-06

簇毛麦(*Dasyphyrum villosum* L. Candargy, 或称 *Haynaldia villosa* Schur., $2n=14, VV$)以其分蘖力强、抗旱耐寒、品质优良, 特别是抗病性突出。簇毛麦的抗白粉病基因对来自世界各地的很多小麦白粉病生理小种都表现高抗甚至免疫, 因此受到广泛的关注^[1]。用普通小麦与双二倍体材料杂交是创造代换系、附加系和易位系, 达到转移簇毛麦有益基因目的的有效途径, 已经转移到普通小麦的簇毛麦基因如抗白粉病、眼斑病基因都是通过这种途径实现的^[2~4]。在远缘杂交过程中, 如何获得大量的杂种植株是转移外源基因的一个前提, 通过杂种组织培养不仅能够短时间内获得大量的再生植株, 而且组织培养过程中还能产生各种染色体数目和结构变异^[5~6]。本研究对普通小麦与硬粒小麦-簇毛麦双二倍体杂种进行幼胚培养, 获得数千株杂种再生植株, 本文报道有关研究结果。

1 材料和方法

1.1 硬粒小麦-簇毛麦双二倍体

硬粒小麦-簇毛麦双二倍体 TH_1 和 TH_1W 是中国农业科学院作物育种栽培研究所用硬粒小麦(*Triticum durum* Desf.) 81086A 与引自前苏联的簇毛麦(*Dasyphyrum Villosum* L. Candargy)合成的, $2n=42$, 染色体组为 AABBVV。 TH_1W 和 TH_1 表现型的区别是前者颖壳具蜡质, 后者不具蜡质^[3]。试验用种由辛志勇研究员和陈孝研究员惠赠。

用作杂交亲本的普通小麦(*Triticum aestivum*, $2n=42$, 染色体组为 AABBDD)品种或品

系有中国春、冀麦 24 号、唐麦 4 号、遗 4071、84 加 79-1-1-5-1-5、鲁资 357、NPFP、冀麦 38 号、91E27、Synthetic, 均由河北省作物遗传育种实验室提供。

1.2 普通小麦与硬粒小麦 - 簇毛麦双二倍体的杂交

1996 年和 1997 年, 杂交在河北省农林科学院粮油作物研究所(石家庄)试验地进行。选取母本植株主穗去雄套袋, 第 2 天授粉, 每穗保留中部数个小穗的基部两朵小花。授粉后 14 d, 取下一部分杂交穗, 统计结实率(结实粒数/授粉小花数)杂种幼胚接种在愈伤组织诱导培养基上进行幼胚培养。另一部分杂交穗保留至种子成熟, 收获杂种种子并统计结实率, 两次统计结果的平均数作为该杂交组合的杂交结实率。

1.3 杂种幼胚培养和再生植株管理

授粉后 14~16 d, 取杂交穗剥出颖果, 用 70% 乙醇表面消毒 1 min, 0.1% 氯化汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 4 次, 在无菌条件下剥出幼胚接种在愈伤组织诱导培养基上, 黑暗培养 3 d, 然后 14 h/d 光照培养, 20 d 后记载出愈胚数, 计算出愈率(出愈胚数/接种胚数)。接种 30 d 后把诱导出的愈伤组织转到继代培养基上, 每隔 20~30 d 继代培养一次。生长状态良好的胚性愈伤组织陆续转移到分化培养基上诱导植株再生。继代培养过程中直接诱导的小植株, 也转移到分化培养基上培养一段时间。所有的再生植株转移到壮苗培养基上壮苗生根, 每个试管转入 1 丛小植株, 待再生植株长出新根后, 将试管苗置于 4℃ 冰箱中越冬。各种培养基成份如表 1, 琼脂浓度均为 0.75%, pH5.8。

移栽前 15~20 d, 从冰箱中取出试管苗放在室外背阴处, 使试管苗逐渐适应室外的环境。11 月下旬, 日均气温降至 7℃ 左右(石家庄)时将试管苗移栽到田间, 每个分蘖栽一穴, 搭起塑料棚保持温度和湿度。次年春, 日均气温回升至 10℃ 时去掉

表 1 杂种幼胚培养的培养基成份

L

用 途	成 份
愈伤组织诱导培养基	MS+150 mg 天冬素+2 mg 2,4-D+5% 蔗糖
愈伤组织继代培养基	MS 无机盐+150 mg 天冬素+0.5~3 mg 2,4-D+2% 蔗糖
愈伤组织分化培养基	1/2MS 大量元素+MS 其它成份+1.0 mg KT+0.5 mg NAA+5% 蔗糖
再生植株壮苗培养基	MS+0.5 mg KT+0.5 mg NAA+3 mg 多效唑+8% 蔗糖

表 2 普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 的杂交结实率

杂交组合	授粉花数	结实粒数	结实率 (%)
中国春×TH ₁ W*	749	691	92.3
TH ₁ W×中国春	368	46	12.5
91E27×TH ₁ *	608	337	55.4
TH ₁ ×91E27*	370	75	20.3
91E27×TH ₁ W	78	67	85.9
TH ₁ W×91E27*	290	99	34.1
冀麦 38 号×TH ₁ W	224	52	23.2
TH ₁ W×冀麦 38 号	190	2	1.1
84 加 7911515×TH ₁ W	128	69	53.9
TH ₁ W×84 加 7911515	201	92	45.8
TH ₁ W×遗 4071	144	2	1.4
TH ₁ ×中国春	196	3	1.5
TH ₁ ×84 加 7911515*	250	85	34.0
TH ₁ ×唐麦 4 号	32	5	15.6
鲁资 357×TH ₁ W*	796	459	57.7
鲁资 357×TH ₁	84	65	77.4
NPFP×TH ₁	147	111	75.5
NPFP×TH ₁ W	24	22	91.7
Synthetic×TH ₁ W	82	34	41.5
普通小麦×TH ₁ 和 TH ₁ W	2920	1907	65.3
TH ₁ 和 TH ₁ W×普通小麦	2041	409	20.0
总 计	4961	2316	46.7

注: * 号者为 1996 年和 1997 年两年杂交结果的平均值。

塑料棚。少量再生植株按相同的方法移栽到中国科学院遗传研究所温室中。

2 结果与讨论

2.1 普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 的杂交

普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 杂交比较容易成功,用中国春、91E27、冀麦 38 号、唐麦 4 号、84 加 7911515、鲁资 357、遗 4071、NPFP、Synthetic 等 9 个普通小麦品种或品系与 TH₁ 和 TH₁W 配制 19 个杂交组合,共计授粉 4961 朵小花,得到杂种种子 2316 粒,平均结实率为 46.7%,但是有一些杂种种子瘪瘦,播种后没有出苗。以普通小麦为母本的杂交结实率高于 TH₁ 和 TH₁W 为母本的杂交结实率。

从表 2 可见,普通小麦×TH₁ 和 TH₁W 杂交结实率在 23.2%~92.3%之间,平均结实率为 65.3%,以 TH₁ 和 TH₁W 为母本的杂交组合平均结实率只有 20.0%(1.1%~45.8%)。同一品种正反交结实率表现很大差异,中国春×TH₁W 正反交结实率相差达到 79.8%。硬粒小麦-簇毛麦双二倍体 TH₁W 和 TH₁ 是从同一个杂交组合 81086A×簇毛麦中选育出来的,从表现型上两者的差别只是颖壳有无蜡质,不过脂酶同工酶谱也表现很大差异。从杂交结实率来看,TH₁W 与普通小麦杂交结实率比 TH₁ 要高一些,是否是两者遗传上的差异所致,需要在更加严格的控制条件下加以验证。虽然杂交结实率受基因型、环境条件、年份等很多因素的影响,但是从表 2 可以看出一个共同的趋势

是,以普通小麦为母本与硬粒小麦-簇毛双二倍体杂交更容易获得杂种种子。

2.2 普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 杂种的幼胚培养和植株再生

取授粉 14~16 d 的杂种种子,在无菌条件下剥出幼胚接种在愈伤组织诱导培养基上,观察可见,发育良好的幼胚在黑暗中培养大约 3 d 后开始膨大,1 周后陆续形成可见的愈伤组织。发育不良的种子从中间切断,将胚的一端接种在培养基上,这样接种的外植体在培养过程中观察不到胚的膨大,少数种子在胚一端也出现愈伤组织,大多数不能诱导出愈伤组织的杂种幼胚多是来自这些发育不良的种子。1996 年 1997 年,对 14 个普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 的杂交组合进行幼胚培养,共接种了 1060 个幼胚,920 个幼胚诱导出愈伤组织,平均出愈率为 86.8%(表 3)。以普通小麦为母本的各个杂交组合平均出愈率为 87.9%

表 3 普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 的杂种幼胚培养结果

杂交组合	接种 胚数	出愈 胚数	出愈率 (%)
中国春×TH ₁ W*	245	224	91.4
TH ₁ W×中国春	16	15	93.8
91E27×TH ₁ *	126	103	81.7
TH ₁ ×91E27*	45	35	75.6
91E27×TH ₁ W	23	22	95.7
TH ₁ W×91E27*	39	26	66.7
84 加 7911515×TH ₁ W	39	38	97.4
TH ₁ W×84 加 7911515	44	36	81.8
TH ₁ ×84 加 7911515*	63	59	93.7
冀麦 38 号×TH ₁ W	26	25	96.2
鲁资 357×TH ₁ W*	146	126	86.0
鲁资 357×TH ₁	38	33	86.8
NPFP×TH ₁ *	192	164	85.4
NPFP×TH ₁ W	18	15	83.3
小麦×TH ₁ 和 TH ₁ W	853	750	87.9
TH ₁ 和 TH ₁ W×小麦	207	170	82.1
总 计	1061	920	86.8

注: * 号者为 1996 年和 1997 年两年接种结果的平均值。

(81.7%~97.4%),反交组合的愈伤组织诱导率 82.1%(66.3%~93.8%)。虽然同一普通小麦品种正反交组合愈伤组织诱导率多以正交组合(普通小麦 \times TH₁和TH₁W)为高,但是,两者的差值大大小于杂交结实率的差值,表明亲本对愈伤组织诱导率的影响远不如对杂交结实率的影响大。

诱导出的愈伤组织培养 20~30 d 后,转至愈伤组织继代培养基继代培养。在培养的最初阶段,杂种愈伤组织在继代培养基上生长非常迅速。有些愈伤组织在继代培养过程中不断出现绿色芽点结构,这种愈伤组织即使不经分化培养也可以在继代培养基上直接发育成绿苗。除此之外,生长状态良好的愈伤组织在分化培养基上也容易实现植株再生,经过长时间培养的愈伤组织仍然保持旺盛的增殖和分化能力。经过不断继代培养和分化培养,共获得普通小麦与硬粒小麦-簇毛麦双二倍体 TH₁ 和 TH₁W 杂种幼胚再生植株 2 005 株。

2.3 普通小麦与 TH₁ 和 TH₁W 杂种再生植株的管理和移栽

2.3.1 再生植株的管理 再生植株的生长状态直接影响到移栽的存活率。虽然生长状态良好的杂种愈伤组织比较容易分化,但是,分化后大多数再生植株生长柔弱,茎、叶窄细,叶色浅绿,呈丛状生长,在一个三角瓶里,几块愈伤组织分化出的绿苗根系相互缠绕在一起,影响了每一个再生植株的生长发育。采取壮苗措施,把分化出的绿苗转入含多效唑的壮苗培养基上,利用多效唑对植株生长的抑制作用,延缓再生植株的生长,使植株在整个夏季不致于过分地生长。绿苗转入壮苗培养基之前,剪去丛生的叶片和老根,然后,每丛苗转入一个试管中,使植株有比较充分的生长空间。经过一段时间的培养,再生植株开始陆续生出白色新根,叶色转为浓绿色,有的植株还有新的分蘖出现,试管中的再生植株茁壮生长。待再生植株生出 3~5 条以上的新根以后,放入 4℃ 冰箱中越冬。

2.3.2 再生植株的移栽 由于长期不见光,从冰箱中取出的试管苗黄化,生长较弱,所以移栽前要经过一段时间的练苗处理。方法是移栽前 15~20 d,将试管苗从冰箱中取出,放在室外背阴处,使试管苗逐渐适应室外的环境。观察发现,如果从冰箱中取出的试管苗直接受到阳光的曝晒,那么试管里的小植株会逐渐失绿,以致死亡。

考虑到一丛再生植株移栽到一穴中,有可能造成植株的分蘖过多,影响植株的进一步分蘖和健康发育。更重要的是,一丛苗的各个分蘖往往不是由一个细胞分化的,在培养过程中可能产生各种染色体变异,不同的细胞染色体组成或许是不一样的,即使在分化时形成一丛再生植株,不同分蘖的遗传基础也可能不一致,这样,会产生嵌合体,从而对后续世代的选择和稳定造成困难。移栽时可以将一丛苗的每一个分蘖分开,这样每一个分蘖即可成为一个独立的植株,这个植株反映了愈伤组织一个细胞的遗传基础。由于多个细胞再生出一个植株的情况很少出现,所以,再生植株单蘖移栽基本可以避免不同分蘖之间的相互干扰,减少嵌合体发生的可能性,有利于加速后代材料的稳定。在塑料棚中,经过一冬一春的生长,一个植株一般可以生出 3~5 个分蘖,多的可以形成超过 10 个以上的分蘖,这些分蘖大多可以成穗,从而扩大了杂种的群体。

移栽时间早晚,对存活率有较大的影响。移栽过早,由于气温和塑料棚内的温度相对较高,移栽后再生植株冬前生长过快,不利于安全越冬,移栽存活率不高。一般每年的 11 月中下旬(石家庄)移栽植株的存活率最高。移栽的地点以背风向阳的田间为好,移栽到温室中的植株生长状态明显不如移栽到田间塑料棚中的植株。由于目前的温室无法准确地控制温度,加

上光照不足,所以温室中的移栽存活率较低。并且,温室中的再生植株前期生长较快,苗细弱,新生分蘖很少。后期因无法有效地降温,使植株生长不能得到适当的控制。移栽到田间的再生植株,塑料棚可以保持幼苗生长在一定的温度和湿度下,不致于使再生植株死于冬天的低温。第二年初春,将塑料棚逐渐掀开,使植株慢慢适应自然环境条件,不会因棚内温度过高而生长过旺,也不会因早春的低温而遭受冻害。采用这种方法移栽成活率可以达到90%以上。1996和1997年移栽到田间塑料棚中的普通小麦与 TH_1 和 TH_1W 的14个杂交组合的再生植株1410株,第二年返青后调查存活1343株,移栽成活率达95.2%。1996年,移栽到温室的3个杂交组合的72株再生植株,存活47株,存活率65.3%。

2.4 普通小麦与 TH_1 和 TH_1W 杂种再生植株的育性和形态变异

通常,远缘杂种自交结实很少,并且受遗传背景、环境等各种因素的影响。另外,由于 TH_1 和 TH_1W 具有簇毛麦的穗轴易断性,它们与普通小麦的杂种也有同样的表现,给准确调查杂种自交育性造成很大的困难。尽管如此,但大量的观察统计(数据略)表明,不管是再生植株还是实生苗,都有相当一部分穗子自交结实,多者一穗可有11粒种子。1997年观察田间生长的各杂种 F_1 共33916朵小花,得到自交种子1132粒。检查再生植株43552朵小花,获得695粒种子。一些研究指出,组织培养对于改善远缘杂种育性有一定的作用^[7~10]。在普通小麦 \times TH_1 和 TH_1W 中,组织培养的这个作用不是很明显,与未经愈伤组织培养阶段的再生植株相比,虽然一些杂交组合的再生植株育性有所提高,但是相差不是很大。实际上,杂种育性受环境的影响更大,在温室生长的47株再生植株共88个穗子,只有两个穗子各结了1粒种子。

对照各个杂种 F_1 实生苗,再生植株在穗部形态上变异不是很大,个别穗子出现芒性的变异,例如从短芒变异出长芒。再生植株株高的变异很大,但是由于再生植株移栽前的生长状况不一致,很难说明这种变异是由于遗传因素引起的。另外,还有个别植株穗下节表现扭曲,这在实生苗中是没有的。在愈伤组织和再生植株中发现广泛的染色体数目和结构变异(有关结果另文报道),但是,观察结果表明,没有发现再生植株的形态变异与染色体变异有直接的关系,在形态表现上,发生染色体数目和结构变异的植株与其它未发生染色体变异的植株以及实生苗没有明显可见的形态差异。

参 考 文 献

- 1 陈孝,施爱农,尚立民. 簇毛麦对不同白粉病菌菌系的抗性反应及其在小麦遗传背景下的表达. 植物病理学报,1997,27(1):17~22
- 2 齐莉莉,陈佩度,刘大均等. 小麦白粉病新抗源-基因Pm21. 作物学报,1995,21:257~262
- 3 陈孝,徐惠君,杜丽璞等. 利用组织培养技术向普通小麦导入簇毛麦抗白粉病基因的研究. 中国农业科学,1996,29(5):1~8
- 4 Murray T D, de la Pena R C, Yildirim A, et al. A new source of resistance to *Pseudocercospora herpotricoides* on chromosome 4V of *Dasypyrum villosum*. Plant Breeding, 1994, 113: 281~286
- 5 李浚明,杨作民,田慧琴等. 普通小麦与簇毛麦属间杂种体细胞无性系的建立及双二倍体的合成. 遗传, 1991, 13: 1~3
- 6 Lee M, Phillip R L. The chromosomal basis of somaclonal variation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,

- 1988, 39: 413~437
- 7 Sharma H C, Gill B S, Sears R G. Inflorescence culture of wheat- *Agropyron* hybrids; Callus induction, plant regeneration and potential in overcoming sterility barriers. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1984, 3: 247~255
 - 8 Fedak G, Grainger J. Chromosome instability in somaclones of a *Triticum Crassum* \times *Hordeum vulgare* hybrid. *Can J Genet Cytol*, 1986, 28: 618~623
 - 9 Molnar-Lang M, Galiba G, Kovacs G, *et al* . Changes in the fertility and meiotic behaviour of barley (*Hordeum*) \times wheat (*Triticum aestivum*) hybrids regenerated from tissue cultures. *Genome*, 1991, 34: 261~266
 - 10 Li L H, Dong Y S. Somaclonal variation in tissue culture of *Triticum aestivum* \times *Agropyron desertorum* F₁ hybrid. *Plant Breeding*, 1994, 112: 160~166

Somatic Tissue Culture of Hybrids Between *Triticum aestivum* and *T. durum-Dasypyrum villosum* Amphidiploid

Li Hongjie Shi Yunsu Shi Zhanliang Zhang Yanmin

Guo Beihai Wang Zining Wen Zhiyu

(Hebei Provincial Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Institute of Food and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031)

Abstract It was easy to cross wheat with *T. durum-D. villosum* amphidiploid cv. TH₁ and TH₁W. The average percentage of seed set among 19 crosses between nine wheat varieties or bred lines selected with TH₁ and TH₁W was 46.7%. A total of 2316 hybrid seeds were brought about. The results of reciprocal crosses revealed that higher seed set was completed with wheat as maternal parent. However, the margin between reciprocal crosses were smaller in callus induction percentage than in seed set percentage. Calli originated from immature embryos of hybrids propagated vigorously, and even differentiated plantlets directly during subculture. Two thousand and five regenerants were attained in total. The survival rate of field transplantation was higher than 95%. Observation also indicated that morphological variations were seen in few regenerants. Tissue culture had no obvious effect on improvement of fertility of *T. aestivum* \times *T. durum-D. villosum* amphidiploid.

Key words: *Triticum aestivum*; *T. durum-Dasypyrum villosum* amphidiploid; Hybridization; Immature embryo culture