

REA 对小麦花药培养的影响

和现昌 王金兰 海燕 徐向阳*

(河南省农科院小麦研究所, 郑州 450002)

摘 要 研究了 REA 对小麦花药培养的影响, 结果表明, REA 对愈伤组织诱导率、绿苗诱导率的提高均有显著作用。使不同基因型的愈伤组织在 C_{17} 培养基上的诱导率提高了 1.47~12.25 倍, 在“癸”培养基上提高了 0.52~3.40 倍; 基因型、培养基和 REA 之间存在着互作, 且对不同的基因型 REA 的最适附加量不同; 对愈伤组织的生长有促进作用; 可促进绿苗分化, 大幅度提高绿苗分化率; 并可降低白苗诱导率。

关键词 小麦 花药培养 REA 附加剂 愈伤组织 绿苗 白苗 诱导率

花药培养技术应用于育种实践的重要前提是能够产生足够多的单倍体幼苗。因此, 改进培养基成份, 提高绿苗诱导率一直是许多学者致力追求的目标。椰子汁、丝瓜液、活性炭、 Ag^{2+} ^[2,7,8] 等作为培养基的附加剂对提高培养效率起到了一定的作用。目前, 虽然个别基因型在特定培养条件下其出苗率可以高达 36.0%^[3], 但对育种计划中的多数亲本(杂交组合)来说, 其出苗率还很低。有的甚至诱导不出花粉植株, 且在所诱导的花粉植株中, 白化苗所占的比例往往在 50% 以上, 严重影响了单倍体育种的效率。因此, 我们自 1991 年起开展了小麦花药培养附加剂的筛选、研制工作, 期望能得到适于小麦花药培养的新型附加剂。试验结果表明, 所设计的 REA 附加剂对小麦花药培养具有很好的促进作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1991 年和 1992 年分别在本研究室花培育种材料中随机取 5 个和 3 个 F_1 杂交组合作花药供体, 1991 年为 TS88/冀 5418, 花 95-2/冀 5418, 豫麦 16 选系/豫麦 13, 贵农 11/豫麦 13 和豫麦 16/豫麦 13; 1992 年为豫麦 16/冀 5418//P37, 豫麦 13/贵农 10 号//豫麦 13/豫麦 2 号和豫麦 13/豫麦 16//TJB 529。供试材料均种植在小麦研究所试验地内。

1.2 试验处理

1991 年用 C_{17} 做诱导培养基, 试验设 3 个处理: (1) $C_{17}+0.1\text{mg/L REA}$; (2) $C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$; (3) $C_{17}+0.5\text{mg/L REA}$ 。1992 年脱分化采用 C_{17} 、癸培养基, 处理仍设三个水平: (1) $C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$, 癸 $+0.3\text{mg/L REA}$; (2) $C_{17}+0.6\text{mg/L REA}$, 癸 $+0.6\text{mg/L REA}$; (3) $C_{17}+0.9\text{mg/L REA}$, 癸 $+0.9\text{mg/L REA}$ 。分化采用 MS、癸培养基。处理设三个水平: (1) MS $+0.3\text{mg/L REA}$, 癸 $+0.3\text{mg/L REA}$; (2) MS $+0.6\text{mg/L REA}$, 癸 $+0.6\text{mg/L REA}$; (3) MS $+0.9\text{mg/L REA}$, 癸 $+0.9\text{mg/L REA}$ 。

表 1 在 C_{17} 培养基上添加 REA 对愈伤组织诱导率的影响

年份	杂 交 组 合	培 养 基	接花药数 (个)	愈伤组织数 (块)	诱导率 (%)	处理/对照
1991	TS88/冀 5418	C_{17}	782	36	4.57	
		$C_{17}+0.1\text{mg/L REA}$	468	88	18.80	4.14
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	468	68	14.50	3.05
		$C_{17}+0.5\text{mg/L REA}$	540	116	21.50	4.70
	花 95—2/冀 5418	C_{17}	750	0	0	
		$C_{17}+0.1\text{mg/L REA}$	630	69	10.90	
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	816	71	8.70	
		$C_{17}+0.5\text{mg/L REA}$	942	228	24.20	
	豫麦 16 选系/豫 麦 13	C_{17}	575	2	0.35	
		$C_{17}+0.1\text{mg/L REA}$	940	29	2.90	8.29
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	874	20	2.29	6.54
		$C_{17}+0.5\text{mg/L REA}$	996	24	2.40	6.84
	贵农 11/豫麦 13	C_{17}	1104	45	4.00	
		$C_{17}+0.1\text{mg/L REA}$	487	17	3.50	0.88
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	520	29	5.58	1.40
		$C_{17}+0.5\text{mg/L REA}$	520	18	3.46	0.87
	豫麦 16/豫麦 13	C_{17}	8050	27	0.34	
		$C_{17}+0.1\text{mg/L REA}$	534	4	0.80	2.35
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	450	16	3.56	10.47
		$C_{17}+0.5\text{mg/L REA}$	423	4	0.95	2.79
1992	豫麦 16/冀 5418 //P37	C_{17}	918	10	1.18	
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	928	9	0.97	0.82
		$C_{17}+0.6\text{mg/L REA}$	666	6	0.90	0.76
		$C_{17}+0.9\text{mg/L REA}$	1029	15	1.46	1.24
	豫麦 16/贵农 10 //豫麦 13/豫麦 2 号	C_{17}	508	1	0.2	
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	428	6	1.4	7.00
		$C_{17}+0.6\text{mg/L REA}$	453	12	2.65	13.25
		$C_{17}+0.9\text{mg/L REA}$	531	2	0.39	1.95
	豫麦 13/豫麦 16 //TJB529	C_{17}	390	12	3.08	
		$C_{17}+0.3\text{mg/L REA}$	440	20	4.55	1.48
		$C_{17}+0.6\text{mg/L REA}$	447	34	7.61	2.47
		$C_{17}+0.9\text{mg/L REA}$	526	31	5.89	1.91

1.3 培养条件及方法

接种前外植体经低温预处理,用 70% 酒精进行表面消毒,接种花药按常规。置 28℃ 暗培养,统计出愈伤组织块数。将豫麦 13/豫麦 16//TJB529 组合的愈伤组织转移到分化培养基上,24℃光照培养,统计分化出的绿苗、白苗丛数。

2 结果与分析

2.1 REA 对诱导愈伤组织的影响

2.1.1 REA 对愈伤组织诱导率的提高有显著作用 组合花 95-2/冀 5418 在 C_{17} 培养基上不能诱导出愈伤组织,但分别加入 0.1、0.3、0.5mg/L REA 后,愈伤组织诱导率则分别达到 10.9%、8.7%和 24.2%,对 REA 表现出极强的敏感性。组合 TS88/冀 5418、豫麦 16 选系/豫麦 13、豫麦 16/豫麦 13、豫麦 13/贵农 10 号//豫麦 13/豫麦 2 号、豫麦 13/豫麦 16//TJB529 的出愈率也分别增至 21.5%、2.9%、3.56%、2.65%、7.61%,提高 2.47~13.25 倍。而组合豫麦 16/冀 5418//P37、贵农 11/豫麦 13 仅在 REA 添加量分别为 0.5、0.3mg/L 时,出愈率略有提高,其它处理比对照均有所降低(表 1)。在癸培养基上加入 REA 也表现出类似的结果(表 2)。

表 2 在癸培养基上附加 REA 对愈伤组织的影响

杂 交 组 合	培 养 基	接花药数 (枚)	愈伤组织数 (块)	诱导率 (%)	处理/对照
豫麦 16/冀 5418 //P37	癸	918	10	1.18	
	癸+0.3mg/L REA	972	22	4.76	4.03
	癸+0.6mg/L REA	1000	32	3.20	2.71
	癸+0.9mg/L REA	1037	54	5.21	4.40
豫麦 16/贵农 10 //豫麦 13/豫麦 2 号	癸	436	6	1.30	
	癸+0.3mg/L REA	356	7	1.97	1.52
	癸+0.6mg/L REA	520	5	0.96	0.74
	癸+0.9mg/L REA	511	5	0.89	0.75
豫麦 13/豫麦 16 //TJB 529	癸	371	13	3.50	
	癸+0.3mg/L REA	520	26	5.00	1.43
	癸+0.6mg/L REA	638	48	7.52	2.15
	癸+0.9mg/L REA	575	51	8.87	2.53

2.1.2 REA、基因型和培养基之间存在互作关系 同一基因型在不同的培养基上对 REA 的反应不同,组合豫麦 16/冀 5418//P37 在 C_{17} 培养基上,对 REA 表现“迟钝”,除在加入 0.9mg/L REA 时出愈率比对照 C_{17} 略有增加外,在另二个培养基上无显著差异;但是,该组合在癸培养基上却对 REA 表现出极强的敏感性,出愈率分别为原癸培养基的 4.03、2.71、4.4 倍;而组合豫麦 13/贵农 10 号//豫麦 13/豫麦 2 号则恰好相反,在附加有 0.3、0.6、0.9 mg/L

的 C_{17} 培养基上, 出愈率分别增至原 C_{17} 培养基的 7、13.25、1.95 倍, 而在癸培养基上, 则效果较差(表 1, 表 2)。

2.1.3 REA 对促进愈伤组织生长有积极作用

以愈伤组织达到适合转移分化为标准(称之为“适龄”), 据观察附加 REA 后, 形成适龄愈伤组织的时间集中在接种后 37~66d 内, 而对照则延续到接种后 87d(见图)。

2.2 REA 对绿苗分化的影响

在本研究中, 来自组合豫麦 13/豫麦 16//TJB529 F_1 花药的 12 块愈伤组织在 MS 培养基上不能分化, 而分别附加 0.3、0.6、0.9mg/L REA 后, 总分化率猛增至 47.83%、80.56%、42.55%, 其中, 绿苗分化率猛增至 43.48%、75%、36.17%(见表 3)。在设计的新型癸培养基上^[6], 附加 REA, 虽然总分化率有所降低, 但绿苗分化率却相应的提高(见表 4)。不难看出, 在分化培养基(MS、癸)上, 附加 0.6mg/L REA 对提高绿苗率是很有益的, 尤其是选择 MS+0.6 mg/L REA, 可以大幅度提高绿苗率。还观察到, 愈伤组织在附加 0.6、0.9 mg/L REA 的培养基(MS、癸)上, 转移后第三天即有绿苗分化, 而没有附加 REA 的培养基上, 二周后才开始分化。这情况实属少见。待进一步研究。

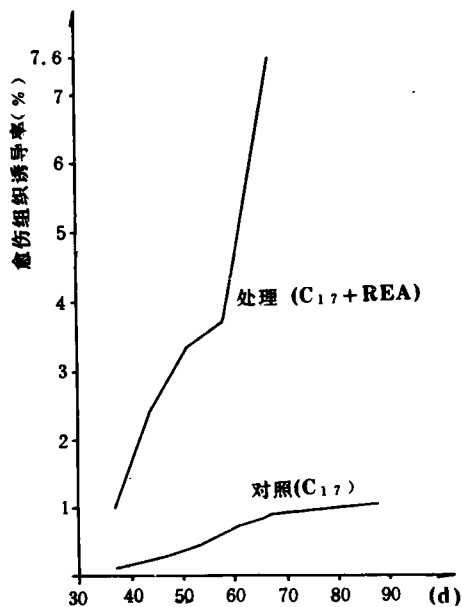


图 REA 对愈伤组织生长的影响

表 3 在 MS 培养基上附加 REA 对绿苗分化的影响

培养基	愈伤组织数 (块)	绿苗数 (丛)	白苗数 (丛)	绿苗诱导率 (%)	白苗诱导率 (%)	总诱导率 (%)	白苗率/总诱导率
MS	12	0	0	0	0	0	
MS+0.3mg/L REA	23	10	1	43.48	4.35	47.83	9.1
MS+0.6mg/L REA	36	27	2	75.00	5.56	80.56	6.9
MS+0.9mg/L REA	47	17	3	36.17	6.38	42.55	14.9

2.3 REA 与白化苗

在 MS 培养基上附加 REA 后, 绿苗率大幅度提高的同时, 白苗率却非常低(见表 3)。在三种培养基上, 分别为 4.35%、5.56%、6.38%, 仅占总分化率的 9.1%、6.9%、14.9%; 来源于同一基因型的愈伤组织, 在癸培养基上白苗率高达 27.27%, 占总分化率的 50%, 当加入 0.3、0.6、0.9mg/L REA 后, 白苗率分别降至 4.13%、16.68%、12.9%, 白苗/总苗之比也从 50% 降至 12.4%、31.6%、28.6%(见表 4)。说明白苗率与培养基关系密切, 适宜的条件可以降低白苗的分化。

表4 在“癸”培养基上附加 REA 对绿苗分化的影响

培 养 基	愈伤组织数 (块)	绿苗数 (丛)	白苗数 (丛)	绿苗诱导率 (%)	白苗诱导率 (%)	总诱导率 (%)	白苗率/总诱导率
癸	11	3	3	27.27	27.27	54.55	50.0
癸+0.3mg/L REA	24	7	1	29.17	4.13	33.30	12.4
癸+0.6mg/L PEA	36	13	6	36.10	16.68	52.73	31.6
癸+0.9mg/L REA	31	10	4	32.25	12.90	45.16	28.6

3 讨论

近年来许多学者对白化苗的亚显微结构,引起白化苗的遗传和生理因素进行了探讨,取得了一些有意义的结果。许多研究表明,花药培养条件和花粉供体的生理状况都会影响白化苗的形成^[1],RFLP 研究表明,花药培养产生的白化苗中普遍存在叶绿体 DNA 缺失现象^[4]。欧阳俊闻等人的研究还表明,不同基因型花药培养中的不同绿苗分化率和不同的白苗分化率是受核基因控制的^[1]。本研究结果表明,白化苗的产生与营养状况关系密切,通过培养基成分的调整可以控制或减少白化苗的产生。

由于培养基和离体条件对基因型的选择作用,致使育种材料丰富的基因型表达受到限制,影响了育种效果^[5]。许多学者通过筛选利用高培养力的桥梁亲本来提高绿苗产量,或在培养方法上创新改进都收到了一定效果。作者认为,筛选新的、具有生理活性的物质,研制具有广泛适应性的高效培养基,是提高花粉绿苗产量的有效途径。在本研究中已初步证明在 C₁₇、癸培养基中加入适量的 REA 可使多数基因型组合出愈率大幅度提高,对提高绿苗分化率,降低白苗率也有显著作用。

关于 REA 与其它培养基成分的互作及各种基因型材料的广泛适应性有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 欧阳俊闻. 小麦花药培养的进展. 见:植物细胞工程与育种. 北京:北京工业大学出版社,1990,1~5
- 2 张承妹. 丝瓜液对水稻花药培养的影响. 见:植物细胞工程与育种. 北京:北京工业大学出版社,1990,380~387
- 3 胡道芬. 小麦花药培养育种. 见:农作物组织培养. 上海:上海科技出版社,1990,223~239
- 4 徐星明. 小麦花药培养力的遗传研究概况. 遗传,1992,14(3):45~46
- 5 李梅芳. 水稻花药育种前景. 作物杂志,1991(3):17~18
- 6 王金兰等. 适于小麦花药培养的癸培养基. 植物杂志,1991,18(1):21~22
- 7 Philippe Vain et al. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type callus in *zea mays* L. by AgNO₃. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989 (18), 143~151
- 8 Avihai Pert. Plant Cell Reports, 1988 (7): 403~406

The Effect of REA on Wheat Anther Culture

He Xianchang Wang Jinlan Hai Yan Xu Xiangyang

(Wheat Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Abstract This study was conducted to identify the effect of REA on wheat anther culture with 8 genotypes and 3 media in 1991—1992. Results obtained were as follows: (1) REA has significant effects on callus induction frequency. In the presence of suitable amounts of REA, the callus induction frequencies of the genotypes cultured on C_{17} medium were 2.47—13.25 times as high as those without REA. When REA was added to KUI medium, the callus induction frequencies increased by 52—340%. For most of the genotypes used, it's useful for improving callus frequency to add 3—6mg/L REA to C_{17} medium and KUI medium. (2) The interaction of REA, media and genotypes was found, the most suitable addition amount of REA was relative to genotypes and media. (3) REA could promote the growth of plantlets and increase the green plantlet frequency at great degree. It's very useful for improving green plantlet frequency to add 6mg/L REA to MS medium. (4) REA could decrease albino frequency. It was suggested that albino was relative to nutrition conditions. The production of albino could be partly controlled by means of adjusting the ingredients of the medium.

Key words: REA; Wheat; Anther culture; Callus; Green plantlet; Albino; Induction frequency