

小麦花培苗染色体加倍技术研究

杨丽萍, 朱晋云, 李楠

山西省农业科学院小麦研究所, 山西 临汾 041000

摘要: 为了提高冬小麦花培苗染色体加倍效率, 分别用不同浓度的秋水仙碱对参试的冬小麦材料的花药愈伤组织、再生植株根系和花培苗分蘖节进行了加倍处理。结果表明, 用 0.02‰ 和 0.05‰ 秋水仙碱浓度处理的愈伤组织再生植株结实率达 33.3% ~ 61.5%。用 0.2% 的秋水仙碱浸根处理 5 h, 结实株率平均高达 37.5%。用 0.04% 的秋水仙碱 1% 的二甲亚砷溶液浸泡分蘖节的时间应在 5 ~ 10 h 之间较为适宜, 结实株率平均可达 50% 以上。

关键词: 冬小麦; 花药培养; 愈伤组织; 秋水仙碱; 染色体加倍

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.06.10

Chromosome Doubling Technique for Anther Culture of Winter Wheat

YANG Li-ping, ZHU Jin-yun, LI Nan

Institute of Wheat Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Shanxi Linfen 041000, China

Abstract: In order to increase chromosome doubling frequency for anther culture of winter wheat, the callus, roots of regenerative plants and tillering node were treated respectively with different concentration of colchicine. The result showed that there were 33.3% ~ 61.5% setting percentage in the treated callus with 0.02‰ and 0.05‰ colchicine solution. After soaking roots of regenerative plants for 5 hours using 0.02‰ and 0.05‰ colchicine solution, the average setting percentage reached 37.5%. The setting percentage were over 50% in tillering node soaked for 5 ~ 10 hours using 0.04‰ colchicine solution and 1‰ dimethylsulfoxide.

Key words: winter wheat; anther culture; callus; colchicine; chromosome doubling

自从 20 世纪 70 年代利用花药培养技术获得大量花粉单倍体以来, 花培技术的应用潜力已日益显现出来^[1]。花粉单倍体加倍后的二倍体 (DH) 在植物育种、突变、玻璃质选择、分子制图和植物改良方面具有广阔的应用前景^[2~4]。花培育种的目的就是要获得加倍的双倍体植株以及选育出综合性状稳定的优良品种 (系)^[5,6]。在自然条件下, 单倍体自交结实率很低, 由小孢子自然形成的双单倍体植株一般不到 10% ~ 20%, 难以用于育种和遗传等研究, 往往需要借助人为措施, 使其单倍染色体加倍, 成为双单倍体。目前最有效方法是利用秋水仙素进行处理^[7]。小麦花粉加倍方法报道最多的是采用在分蘖盛期用秋水仙素液浸泡分蘖节的方法^[8], 也有在组织培养过程中直接加入秋水仙素的方法。但是, 由于秋水仙素

对植株的毒害作用较大, 植株死亡率较高, 而且抑制种子的萌发和根的生长, 与组织培养结合时, 不但使离体组织受害, 明显抑制不定芽分化, 再生植株生长缓慢, 甚至可使外植体在继代培养中褐化死亡^[5,6]。为此, 近年来, 我们通过染色体人工加倍技术, 利用秋水仙碱不同浓度、不同处理时间、不同处理方式, 对冬小麦材料的花药愈伤组织、再生植株根系和花培苗分蘖节进行了加倍处理, 取得了较好加倍效果。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于 2005 - 2007 年进行。供试小麦材料为晋麦 47 × 975025、农大 5013 × 临远 993 两个不

收稿日期: 2011-10-21; 接受日期: 2011-11-25

基金项目: 山西省农业科学院高新技术项目 (YGX0504) 资助。

作者简介: 杨丽萍, 助理研究员, 主要从事生物技术研究工作。E-mail: 1403145452@qq.com

同杂种基因型 F₁ 代花药。

1.2 培养基

诱导培养基为 N6 + 2,4-D 2 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖 10% ;分化培养基为 N6 + NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖 3% ;壮苗培养基为 MS + NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + 多效唑 3 mg/L + 蔗糖 3% 。

1.3 试验方法

取穗时间:以花粉单核中、晚期为最佳时期(即幼穗顶部距旗叶基部 5 ~ 10 cm,幼穗未露出旗叶鞘,花药长度在 2 ~ 3 mm)。取回的穗子用湿毛巾包裹,放入 4℃ 的冰箱预处理 2 ~ 3 d。接种前,剪去旗叶(留叶鞘),用 75% 的酒精消毒,并从叶鞘下端将幼穗取出,无菌接种。

试验分 3 种处理,(I)对愈伤组织的处理:秋水仙碱的浓度为:0 (CK)、0.02‰、0.05‰、0.1‰、0.3‰。处理温度分 2 种,一是愈伤组织在 4℃ 低温下春化一个月后,转入含有秋水仙碱的脱分化培养基中,在 25℃ 常温下培养 20 d 后将绿芽(苗)转入壮苗培养基中(T1),二是将愈伤组织转入含有秋水仙碱的脱分化培养基中,在 4℃ 低温下培养 30 d 左右,再在 25℃ 常温下培养 15 d (T2),然后经 1 ~ 2 次壮苗后移栽温室,统计结实株数,计算结实株率。

(II)对再生苗根系的处理:将再生植株经过壮苗培养基培养后,分别用 0.2% 的秋水仙碱溶

液浸根 5 h(处理 1)和 10 h(处理 2)(24 ~ 25℃)、0.05% 的秋水仙碱溶液浸根 5 h(处理 3)和 10 h(处理 4)(24 ~ 25℃),处理后将苗移栽温室。统计结实株数,并计算结实株率。

(III)对分蘖节的处理:在分蘖盛期,将植株从土中挖出,洗净根部的泥土,在 24 ~ 25℃ 条件下,用 0.04% 的秋水仙碱加 1% 的二甲亚砷溶液浸泡分蘖节,分 5 h 和 10 h 两个处理,处理后重新移栽土中,统计结实株数,并计算结实株率。

结实株率(%) = 结实株数/移栽绿苗数 × 100%

2 结果与分析

2.1 秋水仙碱对愈伤组织分化和加倍率的影响

由表 1 看出,无论在 T1 和 T2 处理中,0.02‰ 和 0.05‰秋水仙碱浓度处理的愈伤组织再生植株结实率都明显高于对照和其他处理,最高结实率达 61.5%,最低 33.3%。T2 处理与 T1 处理相比,T2 处理的结实率又高于 T1。但从绿苗分化率来看,0.02‰秋水仙碱处理后绿苗分化率显著高于 0.05‰秋水仙碱处理的绿苗分化率,绿苗分化率高出 53.2 ~ 43.2 个百分点。0.1‰和 0.3‰秋水仙碱浓度处理的愈伤组织在 25℃ 常温下培养 10 d 后逐渐褐化,只有“晋麦 47 × 975025”获得结实绿苗 1 株。

表 1 秋水仙碱对愈伤组织分化和加倍率的影响

Table 1 Effect of colchicine on callus differentiation and chromosome doubling frequency.

杂交组合		T1					T2				
		0(CK)	0.02‰	0.05‰	0.1‰	0.3‰	0(CK)	0.02‰	0.05‰	0.1‰	0.3‰
晋麦 47 × 975025	愈伤数	34	28	43	32	31	36	35	41	27	37
	绿苗数	33	26	21	11	3	36	34	18	8	5
	绿苗分化率(%)	97.1	92.9	48.8	34.4	9.7	100	97.1	43.9	29.6	13.5
	成活绿苗数	29	21	16	7	0	33	31	13	4	2
	结实株数	6	7	8	1	0	3	18	8	0	0
	结实株率(%)	20.7	33.3	50.0	14.3	0	9.1	58.0	61.5	0	0
农大 5013 × 临远 993	愈伤数	25	31	27	35	23	21	26	33	32	23
	绿苗数	25	28	12	7	2	21	25	15	9	5
	绿苗分化率(%)	100	90.3	44.4	18.9	8.7	100	96.2	45.5	28.1	21.7
	成活绿苗数	19	20	8	1	0	18	21	9	2	1
	结实株数	2	11	3	0	0	1	12	3	0	0
	结实株率(%)	10.5	55.0	37.5	0	0	5.6	57.1	33.3	0	0

2.2 秋水仙碱溶液浸根的浓度与时间对移栽成活率和加倍率的影响

秋水仙碱溶液浸根的浓度与时间对愈伤组织再生植株移栽成活率和加倍率有显著的影响。经过 0.2%、0.05% 浓度秋水仙碱 5 h 的浸根处理,“晋麦 47 × 975025”花药愈伤组织再生壮苗移栽成活率分别为 69.6% 和 86.7%,高于 10 h 的浸根处理 38.9 个百分点和 49.9 个百分点;“农大 5013 × 临远 993”花药愈伤组织再生壮苗移栽成活率分别为 66.7% 和 76.5%,高于 10 h 的浸根处理 39.4 个百分点和 53.4 个百分点(见表 2)。说明无论高浓度还是低浓度,长时间用秋水仙碱溶液浸根对再生苗都有一定的危害,高浓度的危害程度更大。

表 2 秋水仙碱溶液浸根的浓度与时间对移栽成活率和加倍率的影响

Table 2 Effect of colchicine concentration and soaking time on transplant survival rate and chromosome doubling frequency.

杂交组合		0.2%		0.05%	
		秋水仙碱		秋水仙碱	
		5 h	10 h	5 h	10 h
晋麦 47 × 975025	移栽绿苗数	23	13	15	19
	成活绿苗数	16	4	13	7
	成活率(%)	69.6	30.7	86.7	36.8
	结实株数	6	0	3	2
	结实株率(%)	37.5	0	23.1	28.6
农大 5013 × 临远 993	移栽绿苗数	15	11	17	13
	成活绿苗数	8	3	13	3
	成活率(%)	66.7	27.3	76.5	23.1
	结实株数	3	0	2	1
	结实株率(%)	37.5	0	15.4	12.5

用 0.2% 的秋水仙碱浸根处理 5 h,2 个杂种基因型结实株率平均高达 37.5%,显著高于其他处理,说明用 0.2% 的秋水仙碱浸根处理 5 h,是提高单倍体植株加倍率较为理想且有效的措施。

2.3 秋水仙碱溶液浸泡分蘖节对加倍率的影响

从表 3 可以看出,无论用 0.04% 的秋水仙碱加 1% 的二甲亚砷溶液浸泡分蘖节 5 h,还是 10 h,2 个杂种基因型结实株率都高于用 0.2% 的秋水仙碱浸根处理 5 h,0.04% 的秋水仙碱加 1% 的二甲亚砷溶液浸泡分蘖节 10 h,花粉植株加倍率

表 3 秋水仙碱溶液浸泡分蘖节对加倍率的影响

Table 3 Effect of tillering node soaked with colchicine on chromosome doubling frequency.

杂交组合		0.04% 秋水仙碱	
		5 h	10 h
晋麦 47 × 975025	处理株数	13	16
	结实株数	5	8
	结实株率(%)	38.3	50.0
农大 5013 × 临远 993	处理株数	15	12
	结实株数	7	7
	结实株率(%)	46.7	58.3

可达 50% 以上,加倍效果比较稳定,但是,经过 10 h 处理的麦苗比经过 5 h 处理的麦苗缓苗时间延迟,植株发育不好。虽然 5 h 处理比 10 h 处理的结实株率低 8.3% ~ 8.4%,但 5 h 处理的麦苗缓苗时间短,植株的发育较好。因此,用 0.04% 的秋水仙碱加 1% 的二甲亚砷溶液浸泡分蘖节的时间应在 5 ~ 10 h 之间较为适宜。

3 讨论

早在 1979 年,Wenzel 等就根据当时科技发展情况提出了综合运用单倍体诱导技术、染色体加倍技术、细胞融合技术的“分解 - 综合”育种方案,而其中倍性操作是该方案的重要环节^[6]。到目前为止秋水仙素是诱导植物体细胞染色体加倍的最有效的化学诱变剂,通过该法诱导培育出的良种已在生产中使用^[7-9]。

在花药培养时利用秋水仙碱处理可增加双单倍体的数量。这在多种植物中得到证实,在小麦花药培养中也有许多报道^[5,10]。陈新民等^[10]对在培养基上培养 7 d 的小麦 × 大麦杂种幼胚进行秋水仙素处理,虽然幼胚萌发率平均降低 25%,但存活的 14 株中,有 11 株自交结实,加倍率平均为 78.6%,而未经秋水仙素加倍处理的对照均未结实。蔡华等^[11,12]试验表明小麦与玉米杂交后经幼胚离体培养而产生单倍体植株,其染色体不能自然加倍,必须进行人工加倍才能获得纯合的双单倍体(DH)系,才能自交结实从而稳定地遗传下去,通常采用秋水仙素处理单倍体植株根部的方法进行加倍。王敬东等^[13]用 0.2% 的秋水仙碱浸根 5 h,成活率为 90.7% ~ 100%,平均为 94.2%;结实率的变化为 7.7% ~ 75.0%,平均为

45.9%。秦静远等^[14]用秋水仙碱溶液对小麦幼苗分蘖节进行浸泡和注射,染色体加倍成功率为48.7%。

本试验证明,在小麦花药组织培养中,用0.02‰和0.05‰的秋水仙碱对愈伤组织(在适宜的条件下)进行染色体加倍处理可获得33.3%~61.5%结实株率,比用0.2‰秋水仙碱浸根法(15.4%~37.5%结实株率)更经济、简便,可达到快繁与加倍同时进行的目的。用0.04%的秋水仙碱加1%的二甲亚枫溶液浸泡分蘖节虽然能获得38.3%~58.3%的结实株率,加倍效果也比较稳定,但是,该方法需药剂量大,成本较高,而且移栽后,幼苗成活率会受到影响。

针对不同材料的差异性,秋水仙素作用的浓度、时间、温度、处理方法和材料部位等存在不同,有必要对秋水仙素诱导的关键技术因子进行研究。同时要对影响诱变效率的其他次要因素进行摸索,如预处理酸碱度,后处理手段等,这些方面人们往往忽视,所做工作和研究不多,有待加强^[7,15]。

参 考 文 献

- [1] 肖 菁,刘志勇,宋 羽. 花药-花粉培养在小麦育种中的应用[J]. 安徽农业科学,2010,38(17):8903-8907.
- [2] 隋新霞,樊庆琦,李根英,等. 小麦花药培养研究进展[J]. 麦类作物学报,2005,24(4):127-131.
- [3] 景蕊莲,吕小平,贾继增,等. 用花药培养创建小麦加倍单倍体作图群体[J]. 生物技术,1999,9(3):4-8.
- [4] 李浚明,朱登云. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业出版社,2005,108-109.
- [5] 王敬东,任 贤,张曦燕,等. 春小麦花药单倍体植株染色体加倍技术初探[J]. 麦类作物学报,2005,25(2):13-17.
- [6] 郑永强,徐 坤. 秋水仙素在植物体细胞染色体加倍中的应用研究进展[J]. 中国农学通报,2003,19(5):89-98.
- [7] 彭尽晖,张良波,彭晓英. 秋水仙素在植物倍性育种中的应用进展[J]. 湖南林业科技,2004,31(5):22-25.
- [8] 韩玉琴. 春小麦花粉植株的壮苗及染色体加倍技术研究[J]. 中国农学通报,2004,20(3):4-5,37.
- [9] 袁惠燕,姜 茜,张 琪. 花粉植株染色体倍性及加倍技术研究进展[J]. 北方园艺,2008,2:61-64.
- [10] 陈新民,张文祥,崔淑兰,等. 小麦×玉米产生小麦单倍体的染色体加倍研究[J]. 中国农业科学,2002,35(4):447-450.
- [11] 蔡 华,马传喜,司红起. 小麦×玉米产生的小麦单倍体植株的染色体加倍研究[J]. 麦类作物学报,2005,25(3):20-22.
- [12] 蔡 华,马传喜,司红起. 利用小麦与玉米远缘杂交诱导小麦双单倍体的研究进展[J]. 麦类作物学报,2006,4:154-157.
- [13] 王敬东,张曦燕,任 贤,等. 秋水仙碱对春小麦花药单倍体植株染色体人工加倍研究[J]. 甘肃农业科技,2004,11:9-11.
- [14] 秦静远,白延红,刘亚娟. 小麦单倍体植株的越冬及染色体加倍方法的研究[J]. 陕西农业科学,2007,2:6-8.
- [15] 韩玉琴,肖志敏,赵海滨,等. 自然与人工加倍技术结合提高春小麦花粉植株加倍率的研究[J]. 黑龙江农业科学,2006,6:9-10.