

提高小麦幼胚组织培养效果的初步研究^{*}

孙 岩

(黑龙江省农科院育种所, 哈尔滨 150086)

摘要: 研究结果表明, 幼胚接种前低温(-4°C)处理 2 d 可显著提高分化频率。幼胚组培的最佳培养基是 MS 培养基。不同材料的幼胚外植体对软 X 射线有不同的辐射敏感性, 较适宜的照射剂量为 1kRad。

关键词: 小麦组培; 分化频率; 培养基; 低温处理; 软 X 射线

中图分类号: S 512.103.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2004)01-0025-03

Primary Studies on the Effect of Improving Tissue Culture of Young Embryo of Wheat

Sun Yan

(Crop Breeding Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086)

Abstract: Experiment result showed that before inoculation low temperature treatment for 2 days could significantly improve differentiation frequency. MS medium is suitable for wheat young embryos culture. 1kRad dose of soft X ray is suitable for wheat young embryos.

Key words: wheat tissue culture, frequency of differentiation, medium, low temperature treatment, soft X-ray.

小麦幼胚等外植体经组织培养后可产生丰富的体细胞无性系变异。这些变异已在小麦育种上得到广泛利用, 并取得了令人瞩目的育种成果^[1, 2]。辐射处理与组织培养结合, 可以提高体细胞无性系变异频率, 并显示出了良好的育种前景^[3, 4]。组织培养中分化频率是影响小麦体细胞无性系变异育种成效的关键之一。因此, 如何提高试材的分化频率以及在辐射与组培结合上寻找适宜的照射剂量, 是体细胞无性系变异育种的重要研究内容。现将有关研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦纯系 10 份, 即: 农大 7742、龙 6239、20K2138、20K1096-1、20K1094、20K3187、克 498、20K1059、20K203、野猫。品种 4 个, 即: 龙辐麦 8 号、龙辐麦 10 号、龙麦 26、龙辐麦 3 号。开花 14 d

后取幼胚为外植体。

1.2 方法

1.2.1 诱导培养基选择 诱导培养基有 3 种: ① MS+2 mg/L 2, 4-D+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂, pH 5.8(简称 MS); ② MS 大量元素加倍+1 mg/L 2, 4-D+0.1 mg/L KT+300 mg/L 谷氨酰胺+150 mg/L 天门冬酰胺+20 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂, pH 5.8(简称 2MS); ③ B₅+2 mg/L 2, 4-D+500 mg/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂, pH 5.8(简称 B₅)。

1.2.2 接种方法 在小麦开花 14 d 后, 取其试材麦穗, 剥取幼胚, 在无菌条件下置入 70% 的酒精中浸泡 30 s, 0.1% HgCl₂ 消毒 7 min, 无菌水漂洗 3~4 次后接种, 每个三角瓶接 10 枚。

1.2.3 愈伤组织的诱导与分化 接种后的三角瓶置于培养室内暗培养, 室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。暗培养 10 d

^{*} 收稿日期: 2003-04-25

基金项目: 省自然科学基金项目(C0327)

作者简介: 孙岩(1972-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 农艺师, 主要从事小麦生物技术研究。

左右后, 调查出愈情况, 计算诱导频率。将诱导出的愈伤组织转接到分化培养基上(3 种诱导培养基去掉 2, 4-D 再加 0.5 mg/L KT), 每瓶 10 枚, 置于培养室内分化, 室内温度 23±1℃。每天光照 12 h, 光照强度 2000 Lux。14 d 后调查分化情况, 计算分化频率。

1.2.4 低温处理 设两种处理并以不处理为对照, 即: ①剪取试材开花后 14 d 的带叶麦穗, 插入盛有 1/2MS 培养液的烧杯后, 放在-4℃的光照培养箱中培养 2 d, 然后按 1.2.2 的方法接种在 MS 培养基上; ②将试材的带叶麦穗在-4℃的光照培养箱中培养 4 d, 然后接种在 MS 培养基上; ③不处理的为对照。采穗后立即剥取幼胚, 按 1.2.2 方法接种在

MS 培养基上。调查出愈情况, 计算诱导频率。转分化, 计算分化频率。

1.2.5 软 X 射线处理 小麦开花 14 d 后, 分别取龙辐麦 8 号、10 号、龙麦 26 和龙 6239 四份材料的麦穗, 剥取幼胚分 3 份置于 3 个培养皿中, 分别用 1、2 和 5kRad 软 X 射线照射, 并设不处理为对照。所有的幼胚按 1.2.2 和 1.2.3 的方法接种、培养和转分化, 调查出愈频率和分化频率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基的培养效果

6 份材料在 3 种培养基上的培养结果及其差异显著性测验分别列入表 1、表 2 和表 3。

表 1 在不同培养基下小麦幼胚的出愈率和分化频率

品种(系)	培养基种类	接种数(枚)	愈伤数(枚)	出愈率(%)	苗数	分化率(%)	品种(系)	培养基种类	接种数(枚)	愈伤数(枚)	出愈率(%)	苗数	分化率(%)
龙辐麦 8 号	MS	200	200	100	14	7	农大 7742	MS	200	200	100	23	11.5
	2MS	200	196	98	24	12.2		2MS	200	200	100	12	6
	B ₅	200	200	100	0	0		B ₅	200	190	95	0	0
龙辐麦 10 号	MS	200	198	99	40	20.2	龙麦 26	MS	200	200	100	22	11
	2MS	200	192	96	34	17.7		2MS	200	194	97	24	12.4
	B ₅	200	200	100	0	0		B ₅	200	200	100	0	0
龙 6239	MS	200	194	97	94	48.5	龙辐麦 3 号	MS	200	193	96.5	84	43.5
	2MS	200	184	92	72	39.1		2MS	200	197	98.5	62	31.5
	B ₅	200	200	100	0	0		B ₅	200	200	100	0	0

表 2 不同培养基培养效果的差异显著性测验

培养基	出愈率			分化率		
	平均数	显著性		平均数	显著性	
		5%	1%		5%	1%
MS	98.75	a	A	23.62	a	A
2MS	96.92	a	A	19.82	a	AB
B ₅	99.17	a	A	0	a	B

由所列结果看出: ① 6 份材料在 3 种培养基上的诱导频率在 92%~100%之间, 而材料间以及培养基间差异不显著; ②MS 培养基的分化频率与 B₅ 培养基存在显著差异, 其中在 MS 培养基上 6 份材料的平均分化频率为 23.62%, 而在 B₅ 培养基为 0; ③不同材料在分化频率上存在显著或极显著差异,

表 3 不同材料培养效果的差异显著性测验

品种(系)	出愈率			分化率			品种(系)	出愈率			分化率		
	平均数	显著性		平均数	显著性			平均数	显著性		平均数	显著性	
		5%	1%		5%	1%			5%	1%		5%	1%
龙辐麦 8 号	99.33	a	A	6.4	b	B	农大 7742	98.33	a	A	5.83	b	B
龙麦 26	99.00	a	A	7.8	ab	AB	龙辐麦 3 号	98.33	a	A	25	a	AB
龙辐麦 10 号	98.33	a	A	12.63	ab	AB	龙 6239	96.33	a	A	29.2	a	A

3 种培养基平均分化频率最高的是龙 6239 (29.2%), 最低的是农大 7742 (5.83%)。

2.2 低温不同处理的培养效果

低温处理的试验结果以及差异显著性测验分别列入表 4、表 5 和表 6。

由所列结果看出: ①8 份材料在低温不同处理下诱导频率在 95.6%~100%之间, 材料间以及低温不

同处理间差异不显著; ②低温不同处理的分化频率存在显著差异, 不同材料低温 2 d 处理的分化频率都较高, 平均为 24.54%, 且与 4 d 处理的以及不处理对照差异显著, 低温处理 4 d 的分化频率与不处理对照接近; ③不同材料在分化频率上存在显著或极显著差异, 其中克 498 的平均分化频率最高 (28.17%), 20k3187 最低 (2.03%)。

表 4 低温不同处理的小麦幼胚出愈率和分化率

品系	取样后低温	接种数	出愈数	出愈率	苗数	分化率	品系	取样后低温	接种数	出愈数	出愈率	苗数	分化率
	处理(d)	(枚)	(枚)	(%)	(株)	(%)		处理(d)	(枚)	(枚)	(%)	(株)	(%)
20k2138	0	180	176	97.8	12	6.8	20k203	0	100	98	98	24	24.5
	2	80	80	100	22	27.5		2	100	96	96	39	40.6
	4	100	100	100	11	11		4	90	90	100	15	16.7
20k1096—1	0	90	90	100	17	18.9	克 498	0	140	139	99.3	35	25.2
	2	80	80	100	30	37.5		2	90	90	100	37	41.1
	4	90	90	100	20	22.2		4	100	99	99	18	18.2
20k1094	0	80	78	97.5	3	3.8	20k 1059	0	140	140	100	15	10.7
	2	80	79	98.8	8	10.1		2	180	178	98.9	45	25.3
	4	90	86	95.6	0	0		4	100	97	97	18	18.6
20k3187	0	90	90	100	0	0	野猫	0	100	98	98	3	3.1
	2	80	78	97.5	4	5.1		2	80	77	96.2	7	9.1
	4	100	97	97	1	1.0		4	90	90	100	1	1.1

表 5 低温不同处理培养效果的差异显著性测验

低温不同处理 (d)	出愈率			分化率		
	平均数	显著性		平均数	显著性	
		5%	1%		5%	1%
0	98.83	a	A	11.63	b	A
2	98.43	a	A	24.54	a	A
4	98.58	a	A	11.1	b	A

2.3 不同剂量软 X 射线处理的培养效果

试验结果分别列入表 7 和表 8。

结果看出: ①不同剂量下所有材料的诱导频率都可达到 100%, 不同材料在愈伤组织的褐化频率上存在差异, 而褐化率随剂量的增加而提高; ②分化频率与其处理剂量关系密切, 除 2kRad 与 5kRad 处理

相比分化频率差异不显著外, 1kRad 与 2kRad、5kRad 之间的差异达到了显著和极显著水平。

表 6 不同材料培养效果的差异显著性测验

品系	出愈率			分化率		
	平均数	显著性		平均数	显著性	
		5%	1%		5%	1%
20k 1096—1	100	a	A	26.2	a	AB
克 498	99.43	a	A	28.17	a	A
20k 2138	99.27	a	A	15.1	ab	AB
20k 1059	98.63	a	A	18.2	ab	AB
20k 3187	98.17	a	A	2.03	b	B
野猫	98.07	a	A	4.43	b	B
20k203	98	a	A	27.27	a	AB
20k 1094	97.3	a	A	4.63	b	B

表 7 不同剂量软 X 射线处理的出愈率及褐化率和分化率

品种(系)	处理	接种数(枚)	出愈数(枚)	愈率(%)	褐变数(枚)	褐变率(%)	苗数	分化率(%)
龙麦 26	0k Rad	300	300	100	0	0	62	20.7
	1k Rad	300	300	100	0	0	13	4.3
	2k Rad	310	310	100	0	0	2	0.6
	5k Rad	300	300	100	300	100	0	0
龙 6239	0k Rad	300	300	100	0	0	153	51
	1k Rad	270	270	100	20	7.4	10	3.7
	2k Rad	230	230	100	21	9.1	0	0
	5k Rad	230	230	100	158	68.7	0	0
龙辐麦 8 号	0k Rad	300	300	100	0	0	35	11.7
	1k Rad	300	300	100	7	2.3	4	1.3
	2k Rad	290	290	100	20	6.9	0	0
	5k Rad	290	290	100	224	77.2	0	0
龙辐麦 10 号	0k Rad	300	300	100	0	0	112	37.3
	1k Rad	300	300	100	245	81.7	8	2.7
	2k Rad	300	300	100	250	83.3	4	1.3
	5k Rad	300	300	100	300	100	0	0

表 8 不同剂量软 X 射线处理培养效果的差异显著性测验

处理	出愈率			分化率		
	平均数	显著性		平均数	显著性	
		5%	1%		5%	1%
1k Rad	100	a	A	3.00	a	A
2k Rad	100	a	A	0.475	b	B
5k Rad	100	a	A	0	b	B

3 讨论

3.1 培养基成分对小麦组培效果有很大影响, 从本试验看出, 不同材料在 MS、2MS 和 B₅ 培养基上的诱导频率高达 90% 以上, 且无差异, 但分化频率差异明显, 在 MS 和 2MS 培养基上的平均分化频率分别为 23.62% 和 19.82%, 差异未达到显著水平, 而与 B₅ 培养基的平均分化率(0%) 的差异达到了极显著水平。从实用和高效的角度看, 以小(下转第 32 页)

表 3 金普施特土壤残留对后茬作物白菜的影响

试验处理 (g ai/hm ²)	12 个月后			24 个月后			36 个月后		
	株高 (cm)	鲜重 (g/株)	产量 (kg/hm ²)	株高 (cm)	鲜重 (g/株)	产量 (kg/hm ²)	株高 (cm)	鲜重 (g/株)	产量 (kg/hm ²)
金普施特 50	10. 8A	5. 07A	3965A	13. 4A	7. 56A	4320A	28. 1A	222. 1A	3400A
金普施特 100	7. 1B	1. 68B	2780B	10. 4A	5. 21A B	3680AB	29. 7A	219. 5A	2950A
普施特 75	6. 6B	1. 65B	2050B	10. 2A	4. 15B	3360B	31. 0A	223. 5A	2850A
不施药对照	11. 3A	5. 97A	4605A	13. 2A	7. 23A	4360A	29. 7A	225. 8A	3200A

2.7 金普施特土壤残留对后茬甜菜的影响

各处理区甜菜均能出苗。施药后 12 个月和 24 个月金普施特各处理区甜菜生长受到明显抑制,植株矮小黄化。金普施特 50 g/hm² 处理有少量死苗,残存植株的株高、鲜重与不施药对照差异显著,块根产量差异极显著。金普施特 100 g/hm² 处理甜菜生

长近停滞,大量死苗,施药 24 个月后死苗率仍达 52.1%。残存植株的株高、鲜重、块根产量与不施药对照差异均达极显著水平。施药后 36 个月,对甜菜的苗期生长仍有较明显抑制,金普施特 100 g/hm² 处理甜菜株高、鲜重与不施药对照在 0.05 水平上差异显著,但块根产量与对照差异不明显(见表 4)。

表 4 金普施特土壤残留对后茬作物甜菜的影响

试验处理 (g ai/hm ²)	12 个月后			24 个月后			36 个月后		
	株高 (cm)	鲜重 (g/株)	产量 (kg/hm ²)	株高 (cm)	鲜重 (g/株)	产量 (kg/hm ²)	株高 (cm)	鲜重 (g/株)	产量 (kg/hm ²)
金普施特 50	8. 2A B	1. 61A B	13300B	11. 1b	2. 34b	17400B	23. 3ab	38. 9ab	16600ab
金普施特 100	5. 4B C	0. 70B	8650C	9. 4bc	1. 92b	13700C	21. 8b	29. 5b	16900ab
普施特 75	4. 3C	0. 49B	6750D	7. 8c	1. 46b	12000D	16. 6c	17. 0c	12400b
不施药对照	11. 5A	2. 83A	20050A	14. 1a	4. 32a	19600A	26. 5a	44. 1a	17400a

3 结论

金普施特施药处理后 12~36 个月,种植 8 种后茬作物,研究其土壤残留对后茬作物的影响,3 年试验结果表明:

3.1 金普施特做为普施特与金豆的混剂,对后茬作物的安全性高于普施特。

3.2 金普施特 50、100 g/hm² 处理施药后 12 个月,可种植小麦、玉米,但对其它作物有不同程度药害。

3.3 金普施特施药后 24 个月,在 50 g/hm²推荐剂量下,对白瓜籽、油菜、马铃薯、亚麻、白菜无明显药害,对甜菜药害严重。100 g/hm² 剂量下,对白瓜籽、油菜、马铃薯也无明显药害,对亚麻、白菜苗期有轻度抑制。

3.4 金普施特施药后 36 个月,50 g/hm²推荐剂量下,对甜菜无明显药害。100 g/hm² 剂量下,对亚麻、白菜无明显药害,对甜菜苗期生长仍有较明显抑制,但对产量影响不显著。

(上接第 27 页)

麦幼胚为外植体进行组织培养时采用 MS 培养基为宜。

3.2 小麦幼胚接种前进行低温处理可提高分化频率。从本试验看出,低温(—4℃)处理 2 d 的培养效果最好,分化频率可达到 25%。低温处理提高组培效果的原因,可能是低温延缓了幼胚的发育进程,提高了外植体的素质。

3.3 不同材料的幼胚有不同的辐射敏感性。这种敏感性主要表现在褐变率和分化频率上。愈伤组织褐变主要是由辐射的生理损伤造成的。本试验采用的 3 个剂量引起的辐射损伤较大,分化频率都很低,较适宜的照射剂量为 1kRad。

3.4 在组织培养效果上存在着明显的基因型效应。从本试验 14 份材料的试验结果看出,分化频率最高的可达 51%,有的材料根本不分化。可见,选取适宜的试材是体细胞变异育种的关键。

参考文献:

[1] 朱至清. 体细胞无性系变异与植物改良[A] . 植物体细胞无性系变异与育种[C] , 南京: 江苏科学技术出版社, 1991. 1-10.
[2] 胡含. 我国植物组织培养研究的回顾与展望[J] . 农业生物技术通讯, 2002, (2): 1-4.
[3] 郑企成, 朱耀兰, 陈文华, 等. 小麦体细胞无性系变异中 γ 射线照射效应的研究[A] . 植物体细胞无性系变异与育种[C] . 南京: 江苏科学技术出版社, 1991. 209-215.
[4] 孙光祖. 利用体细胞无性系变异选育小麦抗赤霉病新品系的研究[A] . 中国科技报告[R] . 中国核情报中心. 北京: 原子能出版社, 1997. 1-8.