

# 不同诱导培养基对小麦花药培养胚状体诱导率的影响

周 迪<sup>1,2</sup>, 孙连发<sup>2</sup>, 陈立君<sup>2</sup>

(1. 哈尔滨师范大学, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为明确 W14-F 诱导培养基对黑龙江省春小麦品种及人工合成小麦材料的花药培养胚状体诱导率, 以 6 份人工合成小麦材料和 4 个普通小麦品种为材料, 采用 4 种诱导培养基 W14-F、MS、N6 和 C17 进行花药培养比较试验。结果表明: 不同的诱导培养基对于小麦材料的胚状体诱导率不同, 4 种诱导培养基的胚状体诱导能力依次为 W14-F > C17 > N6 > MS, W14-F 培养基胚状体诱导率明显高于其它 3 个培养基。人工合成小麦和普通小麦在 4 种培养基上都得到了相近的胚状体诱导率, 说明 W14-F 培养基同样适合人工合成小麦。利用该技术体系培养人工合成小麦与普通小麦的杂种 F<sub>1</sub> 材料, 得到了较高的诱导率, 这为该技术体系直接应用于利用人工合成小麦改良小麦品种抗病抗逆性研究中提供了可靠的依据。

**关键词:**小麦花药培养; 人工合成小麦; 诱导培养基; 胚状体诱导率

**中图分类号:** S512.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1002-2767(2012)06-0009-04

小麦花药培养是一项能快速稳定遗传变异的技术, 是产生单倍体植株和创造遗传材料的重要途径<sup>[1]</sup>。自 20 世纪 70 年代我国学者首次从普通小麦花药中培育出单倍体植株<sup>[2]</sup>, 至今小麦花药培养技术的研究已发展到较高水平。影响小麦花药培养能力的因素有很多, 主要包括基因型差异<sup>[3-4]</sup>、培养基成分<sup>[5]</sup>、供体植株生理状态及培养条件<sup>[6-7]</sup>等因素。但由于小麦基因调控机理的复杂性, 基因调控研究还没有取得实质性进展, 所以培养基的选择和优化对于提高小麦植株再生能力起着重要的作用, 改变培养基中成分种类或是浓度往往是提高培养效率最有效的手段, 深入研究培养基成分, 对提高花药培养胚状体诱导率和绿苗分化率有重要意义。

该研究中运用的 W14-F 小麦花药培养诱导培养基, 在匈牙利被高效利用, 花药培养效率较高。而另外 3 种培养基 MS、N6 和 C17 为我国小麦单倍体育种中广泛使用的普通培养基。现通过 4 种诱导培养基培养力比较, 以明确 W14-F 诱导培养基在黑龙江省小麦品种的培养中是否仍具有高效性, 筛选出适合于黑龙江省春小麦品种及人工合成小麦材料花药培养的高效培养基, 为黑龙

江省春小麦单倍体育种和人工合成小麦在育种中高效利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 人工合成小麦材料 58001-2[68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/A. SQ (629)], 58004-2[CETA/A. SQ(895)], 58024-2[MAYOOR//TKSN1081/A. SQ-5A(222)], 58014-2[CETA/A. SQ(371)], 58011-2[CETA/A. SQ(1024)]和 58010-1[AR LIN/A. SQ(283)]。

1.1.2 人工合成小麦与普通小麦的杂交种 F<sub>1</sub> F<sub>1</sub>130[ALTAR84/V984(4 GRAINS)/克旱 16]、F<sub>1</sub>295[CROC-1/A. SQ(205)/克 07-889]、F<sub>1</sub>565(I-7/克 07-889)、F<sub>1</sub>573(II-7/克 02-368)、F<sub>1</sub>579(II-7/克 06-884)、F<sub>1</sub>585(II-7/克 07-889)和 F<sub>1</sub>590(II-7/沈 19)。

1.1.3 普通小麦品种 龙麦 31、克旱 16、新克旱 9 号和龙辐麦 3 号。

### 1.2 方法

1.2.1 前处理 在田间取样, 用镜检的方式选择花药细胞处于单核靠边期; 形态学上, 幼穗顶部位于旗叶叶耳与旗下叶叶耳 1/3~2/3 处的小麦植株, 在茎部剪断放入水中, 用塑料袋密封放入 4℃ 冰箱里低温处理 15 d。

1.2.2 灭菌 将穗剥出、去芒, 放入血清瓶中, 加入比例为 1:1 的次氯酸钠和无菌水, 加入 2 滴吐温, 放至摇床摇 18~20 min。血清瓶身用 75% 的乙醇灭菌后放入超净工作台中, 倒出次氯酸钠溶液, 用无菌水冲洗 3~4 次, 直到瓶内没有泡沫

收稿日期: 2012-05-08

基金项目: 科技部国际合作资助项目(2009DFA32510)

第一作者简介: 周迪(1985-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 在读硕士, 从事小麦遗传育种研究。E-mail: zhoudiyy@163.com。

通讯作者: 孙连发(1963-), 男, 吉林省辽源市人, 博士, 研究员, 从事小麦遗传改良研究。E-mail: sunlianfa@yahoo.com.cn。

为止。

1.2.3 取花药 大小弯头镊子各一把,放入75%的乙醇中浸泡,用酒精灯外焰灭菌,放在一旁冷却备用。用大镊子夹住已灭菌的幼穗,小镊子去掉颖壳,剥出花药。

1.2.4 培育胚状体 将取出的花药约200个,放入90 mm培养皿中,培养皿分别盛有4种不同的诱导培养基 W14-F、MS、N6 和 C17 各为12 mL,用封口膜密封。把密封的培养皿放入恒温培养箱中,温度保持在32℃培养3 d,之后移入28℃中培养27~35 d,要求恒温培养箱保持一定的湿度,至胚状体诱导完全。

1.2.5 诱导培养基 (1)W14-F 诱导培养基:W14-F(见表1)+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+Kineton 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,pH调至5.8。(2)MS 诱导培养基:MS+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+Kineton 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,pH调至5.8。(3)N6 诱导培养基:N6+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+Kineton 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,pH调至5.8。(4)C17 诱导培养基:C17+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+Kineton 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,pH调至5.8。

表1 诱导培养基 W14-F 配方

Table 1 The ingredient of the W14-F induction medium

类型 Type	药品成分 Component	用量 Amount
大量元素 Macroelement	KNO <sub>3</sub>	2000 mg
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	380 mg
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14 mg
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	700 mg
微量元素 Microelement	Mn SO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8 mg
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 mg
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg
	KI	0.05 mg
	Cu SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 mg
维生素 Vitamine	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 mg
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.005 mg
	烟酸	0.5 mg
	维生素 B <sub>6</sub>	0.5 mg
	维生素 B <sub>1</sub>	2 mg
铁-钠盐 Fe-Na EDTA	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85 mg
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 mg
	麦芽糖	80 g
	Ficoll	100 g

注:表中药品的用量按照配制1 L培养基计算。

Note:The amount of drugs in accordance with the preparation of 1 L media.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同诱导培养基对普通小麦花药培养胚状体诱导率的影响

从表2看出,4种不同诱导培养基对普通小麦胚状体诱导率影响大小顺序依次为 W14-F>C17>N6>MS,W14-F 培养基的胚状体诱导率与其它3种培养基胚状体诱导率差异显著。在我国常用的几种培养基上培养效果较差的材料,在W14-F 培养基上也能获得较理想的诱导率。值得一提的是,在黑龙江省小麦花药培养中培养力极低的新克旱9号,在长期使用的MS 培养基中胚状体诱导率只有3.41%,而采用W14-F 培养基,胚状体诱导率达到了15.57%,培养效率提高了4.6倍。对于培养力较高的品种龙辐麦3号来说,与胚状体诱导率较高的C17 培养基相比,W14-F 培养基具有更佳的表现,胚状体诱导率提高了5.5倍之多。

### 2.2 不同诱导培养基对人工合成小麦花药培养胚状体诱导率的影响

从表3看出,4种不同诱导培养基对人工合成小麦胚状体诱导率的影响大小顺序依次为 W14-F>C17>N6>MS,W14-F 培养基的胚状体诱导率显著高于其它3种培养基,与普通小麦的花药培养表现出相同的规律。在供试的人工合成小麦材料中,58024-2 在W14-F 培养基的培养效果可较培养效率较低的MS 培养基高7.5倍,较培养效率较好的C17 培养基也要高出近5倍,这说明,W14-F 培养基是适合于人工合成小麦花药培养的理想培养基。

### 2.3 利用 W14-F 培养基对普通小麦与人工合成小麦杂种后代的花药培养

人工合成小麦是通过与普通小麦杂交来实现其优异基因向普通小麦中转移的。为了明确W14-F 对其杂种F<sub>1</sub>的培养效果,在“2.1和2.2”试验结果的基础上,又选择了与其试验材料不同的人工合成小麦与普通小麦的9个杂种F<sub>1</sub>进行花药培养试验。由表4的结果可以看出,在W14-F 培养基中,人工合成小麦与普通小麦杂种后代胚状体诱导率最高可达93.80%(F<sub>1</sub>130),在9份材料中最低的胚状体诱导率也达到了16.18%(F<sub>1</sub>585),这个诱导率水平在通常采用的培养基中也是较高的(见表2),9份材料的平均诱导率达到43.98%。这说明利用W14-F 培养基进行人工合成小麦与普通小麦杂种后代的花药培养,同样具有较强的花药培养胚状体诱导能力,可将基于W14-F 培养基的花药培养技术应用于利用人工

表 2 4 种培养基对普通小麦胚状体诱导率的影响

Table 2 The effect of four different induction media on induction embryoid rate in common wheat

材料 Material	花药数 No. of anthers inoculated	MS		N6		C17		W14-F	
		出胚数	胚状体	出胚数	胚状体	出胚数	胚状体	出胚数	胚状体
		No. of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid	No. of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid	No. r of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid	No. of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid
龙麦 31 Longmai31	373	9	2.41	11	2.93	13	3.49	31	8.31
克早 16 Kehan16	398	12	3.02	16	4.02	20	5.03	68	17.09
新克早 9 号 NewKehan No. 9	411	14	3.41	16	3.89	21	5.11	64	15.57
龙辐麦 3 号 Longfumai No. 3	417	17	4.08	22	5.28	26	6.24	142	34.50
平均值 Mean		13	3.23c	16.25	4.03c	20	4.97b	76.25	18.87a

注:表中平均出胚率数值后的小写字母表示 5%差异显著性。下同。  
Note:Lowercase letters after the induction rate of embryoid express mean $P<0.05$ . The same below.

表 3 4 种培养基对人工合成小麦胚状体诱导率的影响

Table 3 The effect of four different induction media on induction embryoid rate of synthetic hexaploid wheat

材料 Material	花药数 No. of anthers inoculated	MS		N6		C17		W14-F	
		出胚数	胚状体	出胚数	胚状体	出胚数	胚状体	出胚数	胚状体
		No. of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid	No. of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid	No. r of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid	No. of embryoid produced	诱导率/% Induction rate of embryoid
58004-2	406	13	3.2	12	2.96	14	3.45	53	13.05
58024-2	385	21	5.45	29	7.53	33	8.63	158	41.04
58014-2	390	12	3.08	13	3.33	12	3.08	65	16.67
58001-2	402	11	2.74	18	4.48	24	5.97	71	17.66
58011-2	389	9	2.31	15	3.85	21	5.4	57	14.66
58010-1	396	11	2.78	12	3.03	21	5.3	56	14.14
平均值 Mean		12.83	3.26c	16.5	4.20b	20.83	5.31b	76.67	19.54a

表 4 W14-F 诱导培养基对人工合成小麦与普通小麦杂种 F<sub>1</sub> 材料胚状体诱导率的影响

Table 4 Effect of W14-F induction medium on the induction embryoid rate of F<sub>1</sub> derived from the cross of synthetic hexaploid wheat and common wheat

材料 Material	花药数 No. of anthers inoculated	出胚数 No. of embryoid produced	胚状体诱导率/% Induction rate of embryoid
F <sub>1</sub> 130	257	241	93.80
F <sub>1</sub> 295	454	93	20.48
F <sub>1</sub> 396	276	195	70.65
F <sub>1</sub> 565	290	120	41.40
F <sub>1</sub> 573	291	134	46.05
F <sub>1</sub> 579	243	75	30.86
F <sub>1</sub> 585	408	66	16.18
F <sub>1</sub> 590	216	70	32.41
平均值 Mean		130.22	43.98

合成小麦改良小麦品种的研究中以提高人工合成小麦的利用效率。

### 3 结论与讨论

在以提高小麦花药培养植株再生率为目标的研究上,培养基改良一直处于主导地位<sup>[8]</sup>,培养基中的附加物质对花药培养效率起着重要的作用,改变其种类或浓度往往是提高培养效率最有效的手段,陈保锋<sup>[9]</sup>以普通小麦花药为材料,采用 N6、C17、MS 三种基本培养基进行培养,在愈伤组织诱导率上表现分别为 C17>N6>MS。该试验采用的 4 种诱导培养基中,W14-F 为从匈牙利引进的培养体系。该试验运用国外引进的培养体系与国内普遍应用的培养体系作对比,明确了黑龙江省生态条件下培育出的春小麦品种同样适用于该培养体系,胚状体平均诱导率较我国常用的培养体系培养效果有了明显提高。胚状体诱导率较其它培养基培养效率可提高 3~6 倍,对于个别材料甚至可以提高 8 倍以上。该试验中人工合成小麦和普通小麦在 4 种培养基中都表现为相近的培养效率,这说明普通小麦中的花药培养技术体系同样适合于人工合成小麦的花药培养。该试验中没有得到前人报道的人工合成小麦更加适合花药培

养的结果,这可能与所采用的试验材料有关。从人工合成小麦在育种实践中利用的实际出发,对两者的杂种 F<sub>1</sub> 的花药培养,证实了该培养体系具有适用性,这将为黑龙江省高效利用人工合成小麦改良小麦品种的抗病、抗逆性提供了可靠依据。

#### 参考文献:

- [1] 张晓丽,魏俊杰.小麦花药培养的影响因素[J].农业科技报,2007(4):138-139.
- [2] 徐龙珠.基因型对小麦花药培养的影响[J].河南师范大学学报:自然科学版,1992(2):100-103.
- [3] 郝云凤,莫日·陶格斯,樊俊峰,等.春小麦杂交组合配制和基因型差异对花培的影响[J].内蒙古农业科技,2003(5):14.
- [4] 海燕,康明辉,郭景战,等.稀土和基因型对小麦花培绿苗分化率的影响[J].华北农报,2006,21(2):234-236.
- [5] 李守岭,庄南生.植物花药培养及其影响因素研究进展[J].亚热带植物科学,2006,35(3):76-80.
- [6] 王培,陈玉蓉.固体培养基上浸润培养提高花粉植株诱导率的研究[J].华北农学报,1992,7(3):59-65.
- [7] 冬梅.影响小麦花药愈伤组织诱导和植株再生的因素[J].青海农业科技,2000(4):11-12.
- [8] 温之雨,王培.小麦花药愈伤组织诱导和新品种冀 42 选育的研究[J].农业生物技报,2000,8(2):1-4.
- [9] 陈保锋.不同培养基对小麦花药愈伤组织诱导和分化的影响[J].技术与市场,2008(3):46-47.

## Effect of Different Media on the Induction Rate of Embryoid in Wheat Anther Culture

ZHOU Di<sup>1,2</sup>, SUN Lian-fa<sup>2</sup>, CHEN Li-jun<sup>2</sup>

(1. Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** In order to clarify the effect of W14-F induction media on induction rate of embryoid of synthetic hexaploid wheat and common wheat, 6 synthetic hexaploid wheat accessions and 4 common wheat varieties were cultivated on four induction media; W14-F, MS, N6 and C17. The results showed that different induction media got different induction rate of embryoid, W14-F>C17>N6>MS, the induction rate of W14-F was higher than that of the other media evidently; The research on the comparison of synthetic hexaploid wheat and common wheat showed that there was no difference between synthetic hexaploid wheat and common wheat cultivars adapted in Heilongjiang on the rate of embryoid in anther culture. The F<sub>1</sub> derived from crosses of synthetic hexaploid wheat and common wheat got a higher induction rate of embryoid by this technology system, indicating that W14-F medium could be important for enhancing efficiency of breeding for resistance to bio- and abio-stress using synthetic hexaploid wheat.

**Key words:** wheat anther culture; synthetic hexaploid wheat; induction media; induction rate of embryoid