

网络出版时间:2012-04-16 15:40

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120416.1540.024.html>

小麦花药培养效率的影响因素研究

宋运贤^{1,2}, 周素英³, 杜雪玲¹, 花姝洁¹, 魏平民³, 陈耀锋²

(1 淮北师范大学 生命科学学院, 安徽 淮北 235000; 2 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

3 濉溪县农业科学研究所, 安徽 淮北 235000)

【摘要】【目的】研究影响小麦花药培养特性的因素, 优化小麦花药培养条件, 提高小麦花药培养效率。【方法】以 10 个普通小麦品种(系)及其 16 个杂交 F₁ 代花药为材料, 研究了普通小麦基因型、基本培养基种类及低温预处理时间、诱导培养基附加脯氨酸和硝酸铈对小麦花药培养特性的影响。【结果】不同基因型小麦花药培养特性差异较大, 供试基因型的花药反应率与愈伤组织诱导率相关性高, 而两者与绿苗分化率无相关性。荔高 6 号×置丰 0502 F₁、周麦 16×BI0452 F₁、烟农 19×开麦 18 F₁、豫麦 69×新麦 208 F₁、煤生 0308 和皖麦 41×烟农 19 F₁ 有较高的绿苗产率; 基本培养基种类对供试小麦花药愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率有显著影响, 对绿苗分化率影响不显著, 癸培养基小麦花药培养特性总体优于 C₁₇ 培养基; 小麦花药低温预处理时间以 0.5 d 最佳; 在诱导培养基中加入 3.0~4.5 mg/L 硝酸铈后, 小麦花药愈伤组织诱导率提高 83%~430%, 绿苗产率提高 82%~557%; 600 mg/L 的脯氨酸可以使小麦花药的愈伤组织诱导率提高 118%, 绿苗产率提高 222%。【结论】选择花药培养特性好的基因型、对花药低温预处理 0.5 d、在癸诱导培养基中添加 4.5 mg/L 硝酸铈和 600 mg/L 脯氨酸, 可大幅度提高小麦花药的培养效率。

【关键词】 小麦花药培养; 愈伤组织诱导; 低温预处理; 硝酸铈; 脯氨酸

【中图分类号】 Q813.1⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)05-0062-07

Study on the factors affecting the anther culture efficiency of wheat

SONG Yun-xian^{1,2}, ZHOU Su-ying³, DU Xue-ling¹, HUA Shu-jie¹,
WEI Ping-min³, CHEN Yao-feng²

(1 College of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei, Anhui 235000, China;

2 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Suixi Institute of Agricultural Sciences, Huaibei, Anhui 235000, China)

Abstract: 【Objective】In order to improve the anther cultural efficiency of wheat, factors affecting the culture characteristics of wheat anthers were studied. 【Method】With 10 cultivars (lines) wheat and 16 F₁ hybrids as materials, the effects of genotypes, the kind of basal medium, low temperature pretreatment, proline and cerium nitrate on the wheat anther culture were studied. 【Result】The culture characteristics of wheat anthers among genotypes showed large variation. The percentage of callus induction had a high correlativity with reaction rate. But they had no correlation with green plantlet yield frequency. Six genotypes (Ligao No. 6×Zhifeng 0502, Zhoumai 16×BI0452, Yannong 19×Kaimai 18, Yumai 69×Xinmai 208, Meisheng 0308, Wanmai 41×Yannong 19) had a higher green plantlet yield frequency. The kind of basal medium had significant effects on the percentage of callus induction, reaction rate and green plantlet yield frequency, but had no significant effects on the green plantlet differentiation rate. In general the Gui medium

* [收稿日期] 2011-11-10

[基金项目] 国家转基因生物新品种培育项目(2008ZX08002003, 2009ZX08002008B); 安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2007B171, KJ2009B073); 淮北市应用性技术与开发重大项目(080104)

[作者简介] 宋运贤(1976—), 男, 江苏宿迁人, 副教授, 硕士, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: songyunxian@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈耀锋(1956—), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦生物技术育种研究。E-mail: chenylf3828@126.com

was better than C₁₇ medium. Low temperature pretreatment for 0.5 day for anther increased the percentage of callus induction and green plantlet yield frequency. Cerium nitrate and proline had significant influence on the wheat anther culture. In the presence of 3.0—4.5 mg/L cerium nitrate, the callus induction frequency showed an increase of 83%—430% and the green plantlet yield frequency by 82%—557%. It was useful to improve callus induction frequency by 118% and green plantlet yield frequency by 222% to add 600 mg/L proline to the medium. 【Conclusion】 Selecting suitable genotypes with good culture characteristics and suitable low temperature pretreatment time for 0.5 day, the anther cultural efficiency of wheat could be greatly improved by adding 4.5 mg/L cerium nitrate and 600 mg/L proline to the Gui medium.

Key words: wheat anther culture; callus induction; low temperature pretreatment; cerium nitrate; proline

应用离体培养技术诱导高等植物花药组织中的小孢子产生单倍体,是进行作物单倍体育种、遗传饰变及遗传转化的重要基础^[1]。目前单倍体培养技术已经有了长足的进步,并在重要作物的遗传改良中得到了广泛应用。利用这一技术,已选育了一批小麦新品种,如京花1号、川辐5号、花培6号等。但在小麦花药离体培养中诱导再生的频率仍然不高,致使绿苗产率低,选择群体小,满足不了育种工作的需求。因此,进一步优化各种培养条件,大幅度提高小麦花药培养效率,仍然是小麦花药离体培养研究的重要内容^[2]。已有的研究表明,小麦花药培养效率受到基因型、培养基、附加物、培养条件等多种因素的影响^[3-12]。但不同研究者由于利用材料不同,或处理细节存在差异,导致得到的结果相差很大,甚至是相反的结果,可重复性差。如张再君等^[4]研究发现,C₁₇培养基对小麦花药培养的诱导率高于癸培养基;而王金兰等^[5]研究发现,癸培养基对于小麦花药愈伤组织的诱导优于C₁₇培养基;因此有必要进一步探寻小麦花药培养的影响因素,以提高小麦花药培养效率,推动小麦花培育种工作的深入开展。本研究以10个普通小麦品种(系)及其16个杂种F₁为材料,旨在通过基因型、基本培养基的筛选及诱导培养基中附加物的添加,进一步优化小麦花药培养条件,以期大幅度提高小麦花药培养效率,为小麦单倍体高效育种和遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦品种(系):宿9908、煤生0308、皖麦41、徐州24、淮麦29、淮麦22、郑麦9987、豫麦69、新麦208、荔高6号、徐州8913、明麦1号、皖麦19、西农979、宿553、烟农19、开麦18、豫教0308、徐州856、许科208、周麦16、周麦18、BI0452、置丰0502、03中16、偃展4110,均由安徽省濉溪县农业科学研

究所提供。

培养基:小麦花药愈伤组织诱导的基本培养基为C₁₇和癸,附加2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+蔗糖90 g/L+琼脂6 g/L;再分化培养基为MS+NAA 0.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L。

1.2 方法

1.2.1 取材 取大田种植的经镜检小孢子发育到单核靠边期的小麦幼穗置于保鲜袋,并用湿纱布包裹,带回实验室后置于4℃冰箱低温处理。接种前用体积分数75%的乙醇擦拭小麦幼穗消毒,在无菌条件下取出花药接种于各诱导培养基中^[3],每处理接8~10瓶,每瓶120枚左右,试验重复3次。

1.2.2 培养条件的优化 (1)基本培养基对小麦花药培养的影响。将低温处理2 d的所有供试基因型小麦幼穗上的花药分别接种到基本培养基为C₁₇和癸的诱导培养基上。

(2)低温预处理时间对小麦花药培养的影响,供试小麦为周麦18、宿553和煤生0308。将在4℃冰箱中低温处理0.5,2,4,6,8,10,12和14 d的小麦花药接种到以癸为基本培养基的诱导培养基上,以田间取回材料立即接种为对照,为减少试验误差,尽可能选择发育时期相同的小麦幼穗进行低温预处理。

(3)不同质量浓度硝酸铈、脯氨酸对小麦花药培养的影响。以癸为基本培养基分别附加0.0,1.5,3.0,4.5,6.0 mg/L硝酸铈(以皖麦41、徐州24和煤生0308为试材)和0,300,600,900 mg/L脯氨酸(以皖麦41、新麦18和煤生0308为试材),将低温处理0.5 d的小麦花药分别接种到培养基中诱导。

将以上各处理小麦花药置于(25±1)℃暗培养2周后,于1500~2000 lx下,每日光照12 h,50 d后统计花药的反应率和愈伤组织诱导率;将诱导的愈伤组织转入再分化培养基,在光周期12 h/d、

(25±1)℃、1 500~2 000 lx 条件下培养,25 d 后统计绿苗分化率与绿苗产率。反应率=产生愈伤组织的花药数/接种花药数×100%;愈伤组织诱导率=产生的愈伤组织数/接种花药数×100%;绿苗分化率=分化绿苗数/愈伤组织块数×100%;绿苗产率=分化绿苗数/接种花药数×100%。

1.3 数据处理

对所获得的数据利用 DPS7.05 软件进行方差

分析,多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 基因型和基本培养基对小麦花药培养特性的影响

以 2 个亲本基因型和 16 个杂交组合 F₁ 代为材料,研究基因型和癸、C₁₇ 2 种基本培养基对小麦花药培养的影响,结果见表 1。

表 1 基因型和基本培养基对小麦花药培养特性的影响

Table 1 Effect of genotypes and basal medium on the wheat anther culture

基因型 Genotypes	基本培养基 Basal medium	接种花药数 No. of plated anthers	反应率/% Reaction rate	愈伤组织诱导率/% Percentage of callus induction	绿苗分化率/% Green plantlet differentiation rate	绿苗产率/% Green plantlet yield frequency
宿 9908	癸 Gui	1 189	2.19 a	2.19 a	26.92 a	0.59 a
Su 9908	C ₁₇	1 940	1.03 b	1.13 b	31.82 a	0.36 b
煤生 0308	癸 Gui	2 720	4.04 a	4.04 a	76.36 a	3.09 a
Meisheng 0308	C ₁₇	1 805	4.72 a	4.72 a	73.33 a	3.66 a
皖麦 41×烟农 19	癸 Gui	2 211	6.87 a	8.01 a	45.20 a	3.62 a
Wanmai 41×Yannong 19	C ₁₇	1 789	3.90 b	4.02 b	51.39 a	2.07 b
皖麦 19×徐州 24	癸 Gui	2 640	1.82 a	1.82 a	37.50 a	0.68 a
Wanmai 19×Xuzhou 24	C ₁₇	2 125	0.66 b	1.04 b	45.45 a	0.47 b
郑麦 9987×淮麦 22	癸 Gui	1 960	3.16 a	3.83 a	36.00 a	1.38 a
Zhengmai 9987×Huaimai 22	C ₁₇	1 869	1.50 b	1.82 b	32.35 a	0.59 b
郑麦 9987×淮麦 29	癸 Gui	1 917	4.59 a	6.62 a	35.43 a	2.35 a
Zhengmai 9987×Huaimai 29	C ₁₇	2 898	1.07 b	1.21 b	40.00 a	0.48 b
徐州 8913×淮麦 29	癸 Gui	1 256	3.34 a	3.82 a	43.75 a	1.67 a
Xuzhou 8913×Huaimai 29	C ₁₇	1 563	3.01 a	3.77 a	38.98 a	1.47 a
徐州 8913×明麦 1 号	癸 Gui	1 952	4.71 a	4.92 a	22.92 a	1.13 a
Xuzhou8913×Mingmai No. 1	C ₁₇	2 583	2.32 b	2.79 b	29.17 a	0.81 b
豫麦 69×新麦 208	癸 Gui	1 275	7.06 a	7.14 a	58.89 a	4.16 a
Yumai 69×Xinmai 208	C ₁₇	2 853	2.59 b	3.22 b	63.04 a	2.03 b
皖麦 19×西农 979	癸 Gui	2 532	2.84 a	3.79 a	53.13 a	2.01 a
Wanmai 19×Xinong 979	C ₁₇	2 502	1.32 b	1.52 b	63.16 a	0.96 b
烟农 19×开麦 18	癸 Gui	2 831	3.92 a	4.84 a	80.29 a	3.89 a
Yannong 19×Kaimai 18	C ₁₇	1 727	1.97 b	2.14 b	56.76 b	1.22 b
开麦 18×煤生 0308	癸 Gui	3 037	4.28 a	5.10 a	61.29 a	3.13 a
Kaimai 18×Meisheng 0308	C ₁₇	2 011	2.88 b	3.38 b	58.82 a	1.99 b
豫教 0308×徐州 856	癸 Gui	2 100	3.14 a	3.33 a	55.71 a	1.86 a
Yujiao 0308×Xuzhou 856	C ₁₇	1 731	1.85 b	2.14 b	56.76 a	1.21 b
许科 208×明麦 1 号	癸 Gui	3 469	2.91 a	3.34 a	36.21 a	1.21 a
Xuke 208×Mingmai No. 1	C ₁₇	3 087	2.14 a	2.49 a	41.56 a	1.04 a
许科 208×淮麦 29	癸 Gui	3 194	1.53 a	1.85 a	37.29 a	0.69 a
Xuke 208×Huaimai 29	C ₁₇	1 444	1.94 a	2.15 a	41.94 a	0.90 a
周麦 16×BI0452	癸 Gui	2 523	2.73 b	4.04 b	63.73 a	2.58 b
Zhoumai 16×BI0452	C ₁₇	623	4.17 a	5.62 a	65.71 a	3.69 a
荔高 6 号×置丰 0502	癸 Gui	1 622	6.69 a	8.57 a	80.58 a	6.91 a
Ligao No. 6×Zhifeng 0502	C ₁₇	2 520	5.00 b	5.95 b	82.00 a	4.88 b
03 中 16×偃展 4110	癸 Gui	2 262	1.86 a	2.12 a	43.75 a	0.93 a
03 Zhong 16×Yanzhan 4110	C ₁₇	2 640	1.14 b	1.36 b	36.11 a	0.49 b
总计 Total	癸 Gui	40 690	3.98 a	4.22 a	53.17 a	2.25 a
	C ₁₇	37 710	2.18 b	2.67 b	55.31 a	1.48 b

注:同列数据后标不同小写字母表示培养基间存在显著差异(采用 LSD 法,α=0.05)。下表同。

Note: Different letters mean significantly difference between basal medium(according to LSD test,α=0.05). The same below.

由表 1 可见,18 个基因型的平均反应率、愈伤组织诱导率、绿苗分化率、绿苗产率在癸培养基上分

别为 3.98%,4.22%,53.17%和 2.25%,而在 C₁₇ 培养基上分别为 2.18%,2.67%,55.31%和 1.48%;与 C₁₇ 相比,以癸为基本培养基的反应率提高 82.57%、愈伤组织诱导率提高 58.05%、绿苗产率提高 52.03%,差异显著($P<0.05$),但绿苗分化率略低 3.87%,差异不显著($P=0.688$)。从试验材料上看,18 个基因型中有 15 个在癸为基本培养基上的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率高于 C₁₇,除徐州 8913×淮麦 29、许科 208×明麦 1 号 2 个基因型差异不显著外,其余 13 个差异均达显著水平。许科 208×淮麦 29、煤生 0308、周麦 16×BI0452 3 种基因型在 C₁₇培养基上的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率高于癸培养基,其中周麦 16×BI0452 差异显著。2 种基本培养基产生的愈伤组织在相同条件下绿苗分化率只有烟农 19×开麦 18 达到显著水平,其余 17 种基因型差异均不显著;18 种基因型中有 12 种基因型在 C₁₇培养基上产生的愈伤组织绿苗分化率大于癸培养基。表明癸培养基对于提高小麦

花药愈伤组织诱导率具有促进作用,但产生的愈伤组织质量略差于 C₁₇ 培养基,综合来看,对多数基因型小麦花药培养的基本培养基以癸培养基较优。

基因型不同的小麦花药培养的反应率、愈伤组织诱导率、绿苗分化率和绿苗产率差异很大,在 18 个供试基因型中,花药反应率在 0.66%~7.06%,愈伤组织诱导率在 1.04%~8.57%,绿苗分化率在 22.92%~82.00%,绿苗产率在 0.36%~6.91%。在不同基本培养基下,供试基因型的花药反应率与愈伤组织诱导率表现出较高的相关性,而两者与绿苗分化率无相关性。荔高 6 号×置丰 0502 F₁、周麦 16×BI0452 F₁、烟农 19×开麦 18 F₁、豫麦 69×新麦 208 F₁、煤生 0308 和皖麦 41×烟农 19 F₁ 6 个基因型有较高的绿苗产率。

2.2 低温预处理时间对小麦花药培养特性的影响

低温预处理时间对小麦花药培养的影响结果见表 2。

表 2 低温预处理时间对小麦花药培养特性的影响

Table 2 Impact of low temperature pretreatment time on the wheat anther culture						
基因型 Genotypes	低温处理时间/d Pre-treat time	接种花药数 No. of plated anthers	反应率/% Reaction rate	愈伤组织诱导率/% Percentage of callus induction	绿苗分化率/% Green plantlet differentiation rate	绿苗产率/% Green plantlet yield frequency
周麦 18 Zhoumai 18	0	2 031	3.35 d	3.59 d	56.16 c	2.02 c
	0.5	1 756	7.63 a	9.23 a	61.11 b	5.64 a
	2	1 691	6.03 b	7.21 b	63.93 ab	4.61 b
	4	1 971	3.91 c	4.36 c	65.12 a	2.84 c
	6	1 467	3.68 c	4.23 cd	54.84 c	2.32 c
	8	1 078	1.30 e	1.39 e	33.33 d	0.46 d
	10	982	0.31 f	0.31 f	0 e	0 d
	12	762	0.13 fg	0.13 f	0 e	0 d
	14	812	0 g	0 f	0 e	0 d
宿 553 Su 553	0	1 728	1.39 d	1.62 c	46.43 c	0.75 c
	0.5	1 845	6.40 a	7.26 a	52.24 b	3.79 a
	2	1 754	2.57 c	3.31 b	58.62 a	1.94 b
	4	1 850	3.03 b	3.35 b	54.84 b	1.84 b
	6	1 354	1.48 d	1.77 c	45.83 c	0.81 c
	8	980	0.41 e	0.41 de	25.00 d	0.10 c
	10	923	0.65 e	0.76 d	14.29 e	0.11 c
	12	863	0.35 e	0.35 de	0 f	0 c
	14	834	0 f	0 e	0 f	0 c
煤生 0308 Meisheng 0308	0	1 622	1.11 d	1.48 d	66.67 c	0.99 cd
	0.5	2 076	6.79 a	7.32 a	71.05 b	5.20 a
	2	2 123	3.49 b	4.15 b	75.00 a	3.11 b
	4	1 590	3.27 b	3.77 b	71.67 ab	2.70 b
	6	1 412	2.48 c	2.97 c	59.52 d	1.77 c
	8	1 123	0.98 de	0.98 de	27.27 e	0.27 de
	10	978	0.72 e	0.72 ef	14.29 f	0.10 e
	12	903	0.22 f	0.22 fg	0 g	0 e
	14	945	0 f	0 g	0 g	0 e

由表 2 可以看出,适当的低温预处理有利于小麦花药的脱分化,与对照相比,经过 0.5 d 低温预处

理后,周麦 18、宿 553 和煤生 0308 3 个基因型小麦花药的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率均显著提高,达到峰值,此时在 3 种基因型小麦中,周麦 18 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率分别达到 9.23%,7.63%和 5.64%,比对照分别提高了 157%,128%和 278%;宿 553 比对照分别提高了 348%,360%和 405%;煤生 0308 比对照分别提高了 395%,512%和 425%。之后随着低温处理时间的延长,周麦 18、宿 553、煤生 0308 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率均呈现下降趋势,低温处理 8 d 时,3 种基因型的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率明显低于对照,低温处理 14 d 的花药已经失去脱分化能力。低温预处理对于诱导的愈伤组织再分化能力也有一定的影响,周麦 18 处理 4 d 诱导的愈伤组织分化能力最高,宿 553 和煤生 0308 均以处理 2 d 诱导的愈伤组织分化能力最高,与对照相比差异显著。从绿苗产率的角度看,低温预处理 0.5 d 时,3 种基因型小麦的绿苗产率均最高,并且差异显著,效果最好。

表 3 不同质量浓度硝酸铈对小麦花药培养特性的影响

Table 3 Impact of different concentrations of cerium nitrate on the wheat anther culture

基因型 Genotypes	硝酸铈质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of cerium nitrate	接种花药数 No. of plated anthers	反应率/% Reaction rate	愈伤组织诱导率/% Percentage of callus induction	绿苗分化率/% Green plantlet differentiation rate	绿苗产率/% Green plantlet yield frequency
皖麦 41 Wanmai 41	0.0	1 921	3.12 c	3.54 c	44.12 d	1.56 d
	1.5	1 672	7.36 b	8.61 b	60.42 ab	5.29 b
	3.0	1 747	8.30 ab	10.19 ab	62.92 a	6.41 a
	4.5	1 656	9.42 a	11.23 a	59.68 bc	6.70 a
	6.0	1 812	3.86 c	4.53 c	57.32 c	2.59 c
徐州 24 Xuzhou 24	0.0	1 521	0.99 c	1.05 c	43.75 c	0.46 c
	1.5	1 872	2.78 b	3.10 b	48.28 b	1.50 b
	3.0	1 456	5.36 a	5.56 a	54.32 a	3.02 a
	4.5	1 578	4.94 a	4.94 a	56.41 a	2.79 a
	6.0	1 648	1.58 bc	1.82 bc	46.67 bc	0.85 bc
煤生 0308 Meisheng 0308	0.0	1 823	5.59 b	6.47 c	71.17 b	4.61 d
	1.5	2 012	6.01 b	7.46 c	76.67 a	5.72 c
	3.0	1 936	8.42 a	9.70 b	77.54 a	7.49 b
	4.5	1 978	9.16 a	11.83 a	70.94 b	8.39 a
	6.0	1 835	6.76 b	7.90 c	68.97 b	5.45 c

2.4 脯氨酸对小麦花药培养特性的影响

表 4 表明,随着脯氨酸质量浓度的增加,皖麦 41、新麦 18 和煤生 0308 3 种基因型小麦花药愈伤组织诱导率、反应率、绿苗分化率、绿苗产率都呈上升趋势,并在脯氨酸质量浓度为 600 mg/L 时达到最大,与对照相比差异显著。此时在 3 种基因型小麦中,皖麦 41 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗分化率、绿苗产率比对照提高了 118%,114%,47%和

2.3 硝酸铈对小麦花药培养特性的影响

表 3 表明,随着硝酸铈质量浓度的增加,皖麦 41、徐州 24 和煤生 0308 3 种基因型的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率呈上升趋势;其中皖麦 41 和煤生 0308 在 4.5 mg/L 时达到最大值,差异显著。此时皖麦 41 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率分别达到 11.23%,9.42%和 6.70%,比对照提高了 217%,199%和 329%;煤生 0308 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗产率分别达到 11.83%,9.16%和 8.39%,比对照提高了 83%,63.86%和 82%。徐州 24 在 3.0 mg/L 时达到最大值,分别比对照提高了 430%,441%和 557%,差异显著。硝酸铈对于诱导的愈伤组织再分化能力也有一定的影响,皖麦 41、煤生 0308 在 3.0 mg/L 时分化能力最强,皖麦 41 分化能力提高显著,绿苗分化率比对照提高 43%,而煤生 0308 只有 9%,但差异显著。徐州 24 在 4.5 mg/L 时分化最高,绿苗分化率比对照提高 29%。总体看,培养基中添加 3.0~4.5 mg/L 硝酸铈可以大幅提高小麦花药的培养效率。

222%;新麦 18 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗分化率、绿苗产率比对照提高了 77%,120%,16%和 104%;煤生 0308 的愈伤组织诱导率、反应率、绿苗分化率、绿苗产率比对照提高了 90%,64%,15%和 117%。可知培养基中加入脯氨酸不仅提高了愈伤组织诱导率,对于后继愈伤组织分化率也有所促进,表明脯氨酸在促进愈伤组织诱导的同时,也提高了愈伤组织的质量。

表 4 不同质量浓度脯氨酸对小麦花药培养特性的影响

Table 4 Impact of proline concentration on the wheat anther culture

基因型 Genotypes	脯氨酸质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Concentration of proline	接种花药数 No. of plated anthers	反应率/% Reaction rate	愈伤组织诱导率/% Percentage of callus induction	绿苗分化率/% Green plantlet differentiation rate	绿苗产率/% Green plantlet yield frequency
皖麦 41 Wanmai 41	0	1 921	3.12 b	3.54 b	44.12 d	1.56 c
	300	1 693	6.08 a	6.79 a	51.30 c	3.48 b
	600	1 814	6.67 a	7.72 a	65.00 a	5.02 a
	900	1 634	3.36 b	3.61 b	55.93 b	2.02 c
新麦 18 Xinmai 18	0	1 176	2.13 b	2.72 b	34.38 c	0.94 b
	300	1 437	4.59 a	4.66 a	38.81 ab	1.81 a
	600	1 559	4.68 a	4.81 a	40.00 a	1.92 a
	900	1 476	1.69 b	2.10 b	35.48 bc	0.75 b
煤生 0308 Meisheng 0308	0	1 823	3.56 c	6.47 c	71.19 b	4.61 c
	300	1 872	7.64 b	8.65 b	74.69 b	6.46 b
	600	1 456	9.20 a	12.29 a	82.12 a	10.01 a
	900	1 578	6.40 b	7.03 c	72.97 b	5.13 c

3 讨 论

培养基是小麦花药培养的关键,张再君等^[4]研究发现,C₁₇培养基对小麦花药培养的诱导率高于癸培养基,而癸培养基愈伤组织质量优于 C₁₇ 培养基。王金兰等^[5]研究发现,癸培养基对于小麦花药愈伤组织的诱导优于 C₁₇ 培养基。供试的 18 个小麦基因型中,有 15 个在癸培养基上的愈伤组织诱导率高于 C₁₇ 培养基,3 个基因型在 C₁₇ 培养基上优于癸培养基,其中 2 个基因型差异不显著。癸培养基中 KNO₃ 和 NH₄NO₃ 的含量比 C₁₇ 培养基低,已有研究表明,降低培养基中的无机氮源和 NH₄⁺ 浓度,可在一定程度上提高小麦花药的培养效果^[6],这可能是本试验中小麦花药在癸培养基上的愈伤组织诱导率普遍高于 C₁₇ 培养基的原因之一。C₁₇ 培养基中的 Zn²⁺ 浓度高于癸培养基,Zhang 等^[7]发现,高浓度 Zn²⁺ 有利于玉米胚性愈伤组织的诱导。本试验发现,C₁₇ 培养基上诱导的愈伤组织分化率有 12 个基因型大于癸培养基,总体愈伤组织质量优于癸培养基,可能与高浓度 Zn²⁺ 有关。但其相关性及机理还有待于进一步研究。另外,癸培养基和 C₁₇ 培养基对小麦花药培养效果的影响差异只是一种总趋势,对多数基因型而言,癸培养基优于 C₁₇ 培养基,但具体到某些特定基因型则差别很大。这说明,不同基因型材料对不同培养基的反应有别,这种基因型与培养基的互作机制有待进一步深入探讨。

前人研究表明,基因型是影响小麦花药培养的重要因素之一^[8-9]。本研究结果进一步表明,不同基因型小麦花药培养力有显著差异,愈伤组织诱导率介于 1.04%~8.57%,相差近 8 倍,绿苗产率介于

0.36%~6.91%,相差近 20 倍。因此在花培育种工作中,单纯根据农艺性状选配杂交组合往往不能获得足够的绿苗,限制了小麦花药培养效率的提高。由此可见,需要大规模筛选具有高培养力和配合力的亲本基因型。

低温预处理有利于提高花药培养效率在许多作物中已有报道^[10-12],但对于低温处理的时间,则有不同看法:不同发育时期的花药低温预处理效应不同,低温预处理的最佳时间因基因型的不同也有差异,不同处理方法其低温处理的效应也不同^[10]。Huang 和 Sunderland^[11]研究了低温预处理对大麦花药培养的影响,认为大麦穗子在接种前经过 4℃、3~5 d 预处理对愈伤组织诱导有利。张秀刚^[12]认为,3~7 d 低温预处理下小麦花药的愈伤组织诱导率最高。本研究显示,低温预处理 0.5 d 后,小麦花药的愈伤组织诱导率与绿苗产率效果最好,处理 8 d 后低于对照,与前人的研究结果稍有出入,这可能与试验所用材料花粉的发育时期、基因型不同有关。

硝酸铈对离体材料的培养具有促进作用。郭淑华^[13]研究发现,合适浓度的硝酸铈对南瓜组培苗生长有明显的促进作用;胡国武等^[14]研究发现,硝酸铈可刺激红豆杉细胞提高紫杉醇的合成。本试验结果显示,培养基中附加适量的硝酸铈对小麦花药愈伤组织诱导率和绿苗分化率有明显的促进作用,在诱导培养基中加入 3.0~4.5 mg/L 的硝酸铈,小麦花药愈伤组织诱导率可提高 83%~430%,绿苗产率可提高 82%~557%。

脯氨酸在组织培养中的作用已日益引起人们的重视,在诱导和分化培养基中加入脯氨酸均产生了很好的效果^[15-16]。向发云等^[17]在籼稻花药培养研

究中发现,在诱导培养基中添加 600 mg/L 脯氨酸可显著提高花药的愈伤组织诱导率。本试验结果表明,600 mg/L 脯氨酸可以使小麦花药愈伤组织诱导率提高 118%,绿苗产率提高 222%。

[参考文献]

[1] 兰素缺,李光威,权书月,等. 碳源组份及浓度对小麦花药培养和游离小孢子培养的影响 [J]. 华北农学报,2002,17(增刊): 93-97.
Lan S Q,Li G W,Quan S Y,et al. Effects of carbohydrate composition and concentration on anther culture and isolated microspores culture in wheat [J]. Acta Agriculturae Boreall-Sinica,2002,17(Suppl.):93-97. (in Chinese)

[2] 白延红,刘莉,李春莲,等. 蔗糖、激素及基因型对小麦花药培养的影响 [J]. 麦类作物学报,2006,26(3):67-70.
Bai Y H,Liu L,Li C L,et al. Effect of sucrose and hormone on culture characteristics of wheat anther [J]. Journal of Triticeae Crops,2006,26(3):67-70. (in Chinese)

[3] 郭新梅,陈耀锋,任慧莉,等. 禾谷镰刀菌毒素对小麦花药培养特性的影响研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(5):5-8.
Guo X M,Chen Y F,Ren H L,et al. Studies of the effect of *Fusarium graminearum* toxin on wheat anther culture characteristic [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2003,31(5):5-8. (in Chinese)

[4] 张再君,张超美,张杏芝,等. 两种培养基对小麦花药愈伤组织的影响 [J]. 湖北农学院学报,1995,15(4):269-272.
Zhang Z J,Zhang C M,Zhang X Z,et al. The influence of two media on calli in anther culture of wheat [J]. Journal of Hubei Agricultural College,1995,15(4):269-272. (in Chinese)

[5] 王金龙,和现昌,刘文轩. 适于小麦花药培养的癸培养基 [J]. 植物杂志,1991,18(1):21-22.
Wang J L,He X C,Liu W X. The Gui medium suitable for the wheat anther culture [J]. Plant Journal,1991,18(1):21-22. (in Chinese)

[6] 江玉霖,郭润华,符林. K₃ 培养基对小麦花药的培养效果 [J]. 新疆农业科学,1991(3):104-106.
Jiang Y L,Guo R H,Fu L. The effect of K₃ medium on the wheat anther culture [J]. Xinjiang Agricultural Sciences,1991(3):104-106. (in Chinese)

[7] Zhang S,Williams-Carrier,Lemaux P G. Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using *in vitro* shoot meristematic cultures induced from germinated seedlings [J]. Plant Cell Rep,2002,21:263-270.

[8] 任慧莉,李春莲,秦震霞,等. 基因型及外源因子对小麦花药培养一步成苗的影响 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,

2002,30(4):13-16.
Ren H L,Li C L,Qin Z N,et al. Effect of genotype and extrafactor on forming seedling through one-step culture in anther culture of wheat [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2002,30(4):13-16. (in Chinese)

[9] 韩晓峰,陶丽莉,殷桂香,等. 基因型和环境条件对小麦花药培养效果的影响 [J]. 作物学报,2010,36(7):1209-1215.
Han X F,Tao L L,Yin G X,et al. Effect of genotype and growing environment on anther culture in wheat [J]. Acta Agonomica Sinica,2010,36(7):1209-1215. (in Chinese)

[10] 庄军平. 辣椒花药培养技术的研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2001.
Zhuang J P. Studies on the anther culture in pepper [D]. Yangling,Shaanxi: Northwest A&F University, 2001. (in Chinese)

[11] Huang B,Sunderland N. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture [J]. Ann Bot,1982,49:77-88.

[12] 张秀刚. 低温预处理在小麦花药培养中的作用 [J]. 北京农学院学报,1987,2(2):66-71.
Zhang X G. The effect of low temperature pretreatment in wheat anther culture [J]. Journal of Beijing Agricultural College,1987,2(2):66-71. (in Chinese)

[13] 郭淑华. 硝酸铈对南瓜组培苗生长影响的研究 [J]. 安徽农业科学,2009,37(27):13022-13023.
Guo S H. Research on the cerium nitrate on the pumpkin plantlet growth [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009,37(27):13022-13023. (in Chinese)

[14] 胡国武,元英进. 硝酸铈对红豆杉细胞培养及紫杉醇合成的影响 [J]. 稀土,2000,21(2):49-52.
Hu G W,Yuan Y J. Effect of cerium nitrate on the synthesis of taxol in taxus Chinese cell culture [J]. Chinese Rare Earths,2000,21(2):49-52. (in Chinese)

[15] 裴翠娟,胡含,刘程华. 影响小麦花药诱导率因素的研究 [J]. 河北农业大学学报,1992,15(3):17-19.
Pei C J,Hu H,Liu C H. A study on the factors affecting induction rate of anther culture of wheat [J]. Journal of Hebei Agricultural University,1992,15(3):17-19. (in Chinese)

[16] 陈克贵,朱庆麟. 脯氨酸在小麦愈伤组织培养中的作用初探 [J]. 武汉植物学研究,1993,11(1):67-71.
Chen K G,Zhu Q L. A preliminary study on the L-proline roles in wheat callus culture [J]. Journal of Wuhan Botanical Research,1993,11(1):67-71. (in Chinese)

[17] 向发云,宋志红,刘凯,等. 花药培养在籼稻恢复系提纯与改良中的应用 [J]. 湖北农业科学,2007,46(1):15-17.
Xiang F Y,Song Z H,Liu K,et al. Application of anther culture in purifying and improving indica rice restorer lines [J]. Hubei Agricultural Sciences,2007,46(1):15-17. (in Chinese)