

技术与方法 Techniques and Methods

玉米花粉诱导普通小麦产生单倍体技术介绍

蔡东明, 吉万全*, 王长有, 王亚娟, 刘新伦

西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100

Introduction to Technique of Maize Pollen Inducing Common Wheat Haploid

CAI Dong-Ming, JI Wan-Quan*, WANG Chang-You, WANG Ya-Juan, LIU Xin-Lun

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

摘要: 采用玉米花粉诱导普通小麦产生的单倍体幼胚, 经离体培养一个世代即可获得纯系。在陕西杨凌地区, 1月27日~2月7日室内分期点播多类型玉米, 3月1日移栽入大棚中, 从4月中旬开始便可获得持续的多类型玉米花粉。小麦散粉前3~5 d授粉, 12 h和36 h后用 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 处理后的得胚率最高(18.2%)。用 $1/2\text{MS}+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BAP+2%蔗糖+ $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂培养基进行幼胚离体培养的效果最好, 平均幼苗产生率为92.15%。授粉100朵小花可以获得大约16个单倍体幼苗。

关键词: 小麦; 玉米; 单倍体

小麦单倍体育种技术是通过单倍体幼胚离体培养和人工加倍在一个世代便可获得纯合的双单倍体, 这比常规育种的周期(7~8年)显著短, 从而大大缩短了育种进程, 是加快小麦育种速度的途径之一。

目前获得小麦单倍体的方法有花药培养、小麦×球茎大麦和小麦×玉米这3种。花药培养由于幼苗产生频率低, 而且不同基因型小麦间的幼苗产生频率差异很大, 从而限制了这一方法的推广应用(陈新民等1996); 小麦×球茎大麦由于受位于小麦第5同源染色体上的显性可交配 *Kr* 基因的限制, 只能在有限的可交配基因型(如中国春)中产生单倍体(王子宁等2001); 而用玉米花粉诱导普通小麦产生单倍体, 由于玉米对小麦可交配基因的不敏感, 杂交结实率高于其他诱导方法, 而且单倍体的产生对于小麦基因型没有严格的选择性, 幼胚培养过程中体细胞基本上没有变异和白化苗的产生, 因此认为用小麦×玉米技术获得单倍体幼胚是较为理想的方法。

Laurie 和 Bennet (1986)用普通小麦与玉米杂交, 并进行幼胚培养, 曾获得了小麦单倍体植株。这一技术要真正用于小麦育种实践中, 必须先获得较高并且相对稳定的得胚率。我国从上世纪90年代以来, 对此项技术开展了研究, 但报道的单倍体胚诱导频率差异较大, 最高的已达48.6%, 最低的不到10% (顾坚等2005), 培养成苗率大约在80% (李根英等2003)。究其原因, 可能是各地在材料选

择、授粉时间、2,4-D 浓度和培养基组分等方法上不同所致, 而且各地自然环境因素相差悬殊, 这也会导致试验结果差异较大。为了探索此项技术在陕西省杨凌地区应用的可行性, 2004年以来, 我们对小麦×玉米花期相遇、小麦单倍体得胚率的提高和幼胚离体培养的相关技术进行了研究, 现介绍如下。

材料与方 法

1 材料

玉米(*Zea mays* L.)材料由本校农学院杨引福先生提供, 其中普通杂交种3种: 陕单902、户单4号和登海1号; 自交系3种: 齐₂₀₅、408和S₂; 糯玉米杂交种 T₂₀₀₉₄×T₀₅₀; 甜糯杂交种 T₂₀₁₂₈×T₂₀₁₀₇; 甜玉米杂交种超甜2000。

小麦(*Triticum aestivum* L.)材料是从本校农学院生物室2004~2005年度选种圃中选出的16份单交组合: C54 (99104-18/W2132)、C75 (95175/001127)、C90 (石8901/小偃128)、C91 (626/N9659)、C100 (626/Y06)、C142 (小偃128/4314)、C146 (98中33/9738)、C200 (3683/9659)、C202 (3683/98139)、C203 (3683/9872)、C205

收稿 2009-05-31 修定 2009-09-04

资助 陕西省自然科学基金(2001SM06)。

* 通讯作者(E-mail: jiwantuan2003@126.com; Tel: 029-87082971)。

(3683/Y06)、C206 (陕 150/3683)、C295 (99446/98139-5-3)、C310 (白硬冬 2-4/98139-10)、C316 (626/白硬冬 2-4)和 C321 (陕 9872/99107-1)。

2,4-D 浓度有 100、150、200、250 和 300 mg·L⁻¹。授粉工具自制(将一小海绵球用细绳固定在铅笔一端,授粉时用海绵球蘸取玉米花粉授于小麦的花上)。

培养基有: (1) 1/2MS, (2) 1/2MS+6-BA (6-苄氨基嘌呤) 0.05 mg·L⁻¹ (单位下同), (3) 1/2MS+IAA (吲哚乙酸) 0.05, (4) 1/2MS+IAA 0.1+6-BA 0.1, (5) 1/2MS+IAA 0.15+6-BA 0.15, (6) 1/2MS+IAA 0.2+6-BA 0.2, (7) 1/2MS+IAA 0.25+6-BA 0.25, (8) 1/2MS+IAA 0.3+6-BA 0.3; 以上各培养基分别添加 2% 蔗糖和 7.5 g·L⁻¹ 琼脂, pH=5.8。

2 方法

2.1 小麦和玉米的播种期 2005 年 1 月 23 日、2 月 11 日于室内分 2 期点播玉米材料, 3 月 1 日移栽入大棚中、并于当天和 3 月 20 日在大棚中直播 2 期。2006 年 1 月 27 日、2 月 7 日、2 月 18 日于室内分 3 期点播玉米材料, 3 月 1 日移栽入大棚中、并于当天在大棚直播 1 期。2004 年 9 月 30 日和 2005 年 10 月 1~2 日在田间选种圃播种小麦材料。

2.2 去雄和授粉 杨凌地区的小麦正常年份是 4 月 9 日~17 日抽穗, 4 月 22~30 日散粉。2006 年 4 月 12 日采用常规法进行小麦去雄, 将去雄的每份材料随机平分为 2 份, 分别于 2006 年 4 月 18 日和 2006 年 5 月 3 日在上午 11 时左右进行授粉, 每穗授粉 2 次, 间隔 1 d, 授粉后分别于 12 h 和 36 h 用 2,4-D 蘸穗 2 次。花粉采用多类型玉米混合花粉, 这样可以

扩大小麦对玉米花粉的选择范围, 提高杂交成功的机率。

2.3 幼胚培养 将 C54、C75、C90、C91、C100、C142、C146、C200、C202、C203、C205、C206、C295、C310、C316 和 C321 的幼胚分别接种在培养基(1)~(8)上, 观察愈伤组织和幼苗的生长发育状况。

结果与讨论

1 花期的调节

2005 年和 2006 年小麦与玉米花期相遇的试验结果(表 1)表明, 2005 年第一播期的普通玉米杂交种以及第二播期的糯玉米杂交种、甜糯杂交种和甜玉米杂交种的花期分别是 4 月 18~20 日和 4 月 27~30 日, 与小麦花期(2005 年 4 月 20~30 日)是相遇的, 其余处理均不相遇。2006 年第一、第二播期的糯玉米杂交种、甜糯杂交种、甜玉米杂交种及第一播期的普通玉米杂交种花期分别是 4 月 17~20 日、4 月 25~28 日和 4 月 21~24 日, 它们与早熟(比当地主栽品种‘小偃 22’成熟早 3 d 及 3 d 以上的材料)、中熟(与‘小偃 22’同期成熟)、晚熟材料(比‘小偃 22’成熟晚 3 d 及 3 d 以上的材料)花期分别相遇, 其余处理均不相遇。

玉米与小麦花期是否相遇, 是进行玉米花粉诱导普通小麦产生单倍体研究的首要条件。由于年际间气候存在差异, 玉米花期需要适当调节才能与小麦花期相遇。本试验玉米材料包括杂交种、甜玉米、糯玉米、甜糯杂交种和自交系, 花期分散, 如果生长前期遇到低温, 花期统一推迟, 使得玉米

表 1 小麦×玉米的花期调节

年份	播种期/ 月-日	移栽期/ 月-日	花期相遇日期/月-日								
			陕单 902	户单 4 号	登海 1 号	齐 ₂₀₅	408	S ₂	T ₂₀₀₉₄ ×T ₀₅₀	T ₂₀₁₂₈ ×T ₂₀₁₀₇	超甜 2000
2005	01-23	03-01	04-18	04-20	04-19	—	—	—	04-14	04-13	04-12
	02-11	03-01	05-02	05-01	04-30	05-08	05-12	05-07	04-30	04-28	04-27
	03-01		05-17	05-15	05-16	—	—	05-21	05-12	05-12	05-11
	03-20		—	—	—	—	—	—	—	—	—
2006	01-27	03-01	04-21	04-24	04-23	04-30	05-03	05-01	04-18	04-20	04-17
	02-07	03-01	05-03	05-03	05-02	05-09	05-13	05-10	04-28	04-26	04-25
	02-18	03-01	05-13	05-14	05-14	—	—	—	—	05-08	05-09
	03-01		05-16	05-16	05-17	—	—	—	05-14	05-13	05-13

加粗日期表示与小麦相遇的玉米花期; 非加粗日期表示与小麦不相遇的玉米花期; “—”表示玉米花期太晚, 未做记录。

花期只与晚熟小麦材料花期相遇有保证,而与早熟和中熟小麦材料花期相遇没有保证,因此,控制玉米花期只考虑如何提前,使得与早熟、中熟和晚熟小麦材料均花期相遇。玉米一般生长到18~19片叶时长出雌穗,再过2~3 d散粉,据此可以推算出是否能与小麦所有材料花期相遇,如果玉米花期滞后,可以通过追肥、浇水、延长覆棚时间的方法加快生长速度(蔡东明 2005)。

2 不同授粉时间和不同2,4-D浓度下的得胚率

散粉前和散粉后5个不同2,4-D浓度下的6个小麦的得胚率结果(表2)表明,相同2,4-D浓度下的散粉前授粉的得胚率均高于散粉后,说明散粉前授粉优于散粉后授粉的。散粉前授粉和散粉后授粉

的在250 mg·L⁻¹ 2,4-D下的均可获得最高的得胚率,表明250 mg·L⁻¹ 2,4-D是适宜的处理浓度。散粉前授粉后用250 mg·L⁻¹ 2,4-D处理的得胚率最高(平均为18.2%),表明散粉前授粉并辅以250 mg·L⁻¹ 2,4-D的处理为最好。

根据以上结果我们认为,小麦散粉前授粉和散粉后授粉得胚率之所以有差异的原因,可能是小麦散粉前柱头已能提供玉米花粉粒萌发所需要的营养和水分,授粉后有少量玉米花粉沿着小麦花粉管进入胚囊;而小麦散粉后部分柱头因衰老不能提供玉米花粉粒萌发所需的营养和水分,因而使小麦散粉前授粉的得胚率高于散粉后授粉的(姚景侠和李浩斌 1995)。

表2 小麦正常散粉期前、后授粉并用5种2,4-D浓度处理后的得胚率

2,4-D 浓度 /mg·L ⁻¹		得胚率 /%						平均
		C75	C142	C146	C202	C206	C295	
散粉前	100	14.0 (14/100)	12.5 (8/64)	14.7 (15/102)	14.1 (14/99)	11.3 (6/53)	12.1 (11/91)	13.1
	150	15.8 (12/76)	14.3 (14/98)	14.7 (16/109)	14.9 (12/81)	14.1 (14/99)	14.5 (12/83)	14.7
	200	16.0 (14/87)	17.0 (18/106)	17.6 (16/91)	18.4 (18/98)	16.9 (13/77)	16.9 (14/83)	17.1
	250	17.7 (14/79)	19.0 (16/84)	17.1 (18/105)	18.7 (17/91)	19.1 (13/68)	17.7 (20/113)	18.2
	300	16.0 (13/81)	15.7 (16/102)	17.0 (16/94)	13.6 (15/110)	14.9 (10/67)	15.9 (14/88)	15.5
散粉后	100	12.1 (8/66)	12.0 (7/58)	9.8 (7/71)	11.1 (5/45)	10.7 (6/56)	11.5 (7/61)	11.2
	150	12.7 (9/63)	13.0 (7/57)	11.8 (10/68)	11.6 (5/43)	11.8 (6/51)	12.9 (9/62)	12.3
	200	14.8 (8/54)	14.3 (7/49)	14.8 (9/61)	13.9 (10/72)	13.8 (8/58)	14.1 (9/64)	14.3
	250	15.5 (11/71)	15.5 (13/84)	15.2 (10/66)	16.0 (8/50)	15.9 (11/69)	14.6 (7/48)	15.4
	300	14.3 (6/51)	12.5 (6/48)	13.6 (9/66)	13.8 (8/58)	14.1 (9/64)	14.8 (8/54)	13.9

得胚率 = 得胚数 / 授粉小花数 × 100%。

3 绿苗在培养基上的分化

由于小麦和玉米远缘杂交后染色体之间的不亲和性,导致球形胚阶段胚胎发育未能分化为较完整的胚,其所产生的合子不协调,核型也不稳定,因此,在合子分裂后形成了只有小麦单倍染色体组的幼胚。同时,合子不均等分裂,也会引起胚乳细胞分裂不正常,以致胚乳细胞内细胞质(或淀粉)贫乏,所以不能为胚胎发育提供正常的营养(陈纯贤等 2000),因此必须经过幼胚离体培养才能得到单倍体幼苗。我们用本文中的技术在8种不同组分培养基上均接种2种小麦幼胚,培养后的结果(表3)表明,培养基(6)的幼苗产生率最高(92.15%),且幼苗生长发育状况比其他培养基培养的效果好,表明

1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+2%蔗糖+7.5 g·L⁻¹琼脂培养基是最适合小麦幼胚离体培养的培养基。

总之,根据本文结果我们认为,(1)陕西杨凌地区,1月27日~2月7日室内点播玉米,3月1日移栽入大棚,这一措施有利于小麦玉米花期相遇。(2)小麦散粉前3~5 d授粉后,250 mg·L⁻¹ 2,4-D蘸穗的得胚率最高(18.2%)。(3)8种幼苗分化培养基中,1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+2%蔗糖+7.5 g·L⁻¹琼脂(pH=5.8)的幼苗产生率最高(92.15%)。按照这个比例,如果授粉100朵小花,可以获得100×18.2%×92.15%=16.77个单倍体幼苗。(4)总的结论是本技术可以应用于本地区的小麦遗传育种。

表3 不同培养基上的幼苗生长

培养基编号	小麦的单交组合	幼胚接种数/个	幼苗产生数/个	幼苗产生率/%	白化苗数/个	幼苗生长状况
1	C54	32	23	71.9	1	生长缓慢, 无根系。
	C75	29	21	72.4	0	
2	C90	33	26	78.8	2	生长势弱, 叶色浅绿。
	C91	37	29	78.4	1	
3	C100	21	17	81.0	2	幼芽分化迟缓, 有1 cm左右根生成。
	C142	15	12	80.0	1	
4	C146	26	22	84.7	3	生长缓慢, 叶色淡绿, 根系不发达。
	C200	30	26	86.7	1	
5	C202	19	17	89.5	2	生长速度较慢, 根系粗短, 发白。
	C203	31	27	87.1	2	
6	C205	25	23	92.0	1	幼芽分化明显, 根系弯曲至瓶底, 叶色深绿, 生长势较弱。
	C206	39	36	92.3	1	
7	C295	34	30	88.2	1	生长较慢, 根细短且色深, 叶色浅绿。
	C310	28	24	85.7	3	
8	C316	38	29	76.3	1	生长迟缓, 叶色浅绿根部呈浅红色。
	C321	26	19	73.1	0	

参考文献

- 蔡东明, 吉万全, 任志龙, 王秋英, 王长友, 张宏, 王亚娟(2005). 陕西关中地区冬小麦与玉米杂交花期调节的研究. 陕西农业科学, (3): 57~58
- 陈纯贤, 孙敬三, 朱立煌(2000). 导入小麦单倍体植株的玉米DNA在后代中的遗传及序列同源性分析. 植物学报, 42 (7): 728~731
- 陈新民, 陈孝, 李学渊(1996). 提高小麦×玉米胚培养植株产生频率的研究. 中国农业科学, 29 (4): 29~32
- 顾坚, 田玉仙, 李绍祥, 刘混, 杨和仙, 杨木军(2005). 小麦小花穗位及发育进度对小麦×玉米单倍体胚诱导率的影响. 麦类作物学报, 25 (1): 30~32
- 李根英, 孟庆华, 隋新霞, 管延安, 黄承彦(2003). 玉米花粉诱导小麦单倍体的研究进展. 山东农业科学, (1): 52~54
- 王子宁, 张艳敏, 郭北海, 樊爱革(2001). 利用单倍体育种技术快速培育糯性小麦新品系. 华北农学报, 16 (1): 1~6
- 姚景侠, 李浩斌(1995). 小麦与玉米杂交及单倍体的产生. 植物学通报, 12 (3): 31~35
- Laurie DA, Bennett MD (1986). Wheat×maize hybridization. Can J Genet Cytol, 28: 313~316