

研究
简报

纤毛鹅观草 × 普通小麦 J-11 杂种 F₁ 代球形胚愈伤组织 的诱导、生长及植株再生

伍碧华 王忠

(四川农业大学小麦研究所, 四川都江堰市, 611830)

Callus Induction, Growth and Plant Regeneration of Globular Embryos from Hybrid F₁ between *Roegneria ciliaris* and *Triticum aestivum* cv. J-11

Wu Bihua Wang Zhong

(Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan City, Sichuan 611830)

本试验中, *R. ciliaris* × *T. aestivum* cv. J-11 的属间杂种幼胚退化于圆球形期, 较翁益群等^[2], 刘大钧等^[3], 颜济等^[4]以及 Sharma 等^[6]报道的显著提前。因此, 本文将对产生这种差异的原因及获得杂种的不同途径进行初步的分析与讨论。

1 材料和方法

杂交母本 (♀) 纤毛鹅观草 (*R. ciliaris*) 和父本 (♂) 普通小麦 (*T. aestivum*) 品种 J-11 均种植于四川农业大学小麦研究所。常规去雄, 人工授粉后 7—10 天剪取穗子, 剥取种子用 75% 酒精浸泡 30 秒钟, 转入 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 14—15 分钟, 无菌水洗 4 次, 在实体显微镜下解剖、观察, 然后将剥取的幼胚接种于 0.4% (w/v) 琼脂粉固化的培养基上。

采用 N₆ 基本培养基, 分别添加 IAA、2,4-D、NAA、IBA、KT、6-BA、谷氨酸 (Glu)、水解酪蛋白 (GH)、酵母汁 (YE); 肌醇以及蔗糖。培养基 pH 调至 5.8。培养温度白天为 23 ± 2°C, 夜间为 18 ± 2°C; 每日人工照光 12 小时, 光强度为 2000lx。

2 结果与分析

2.1 杂种 F₁ 代的胚龄与籽粒和胚胎发育的关系

授粉后 7 天和 8 天的籽粒呈绿色饱满状, 解剖镜下观察到种皮内有充足的水分, 少量胚

* 国家自然科学基金资助课题。

本文承蒙杨俊良, 颜济二位教授审阅并提出宝贵意见, 谨致谢意。

收稿日期: 1993-08-11, 终审完毕日期: 1994-05-03

乳；胚胎呈透明圆球形，8日龄的呈半致密状，7日龄的呈水泡状，易被触伤。授粉后9天的籽粒呈黄绿色，近薄片状、解剖镜下只见极少的胚乳痕迹；胚胎呈枯褐色圆球形，表现明显的退化特征。授粉后10天时，胚乳和胚胎均退化殆尽，整个籽粒呈枯黄的薄片状，长度较7至8天的明显变短（见表1）。可见，纤毛鹅观草（♀）与普通小麦J-11（♂）的杂种胚胎退化于圆球形胚期，较翁益群等^[2]，刘大钧等^[3]，颜晓等^[4]，以及Sharma等^[6]报道的显著提前。

2.2 胚龄对杂种F₁代幼胚培养的影响

1990年分别接种7，8和9日龄的幼胚到表3的I培养基上，结果7日龄和9日龄的胚一直没有发生变化，处于停止生长的状态。8日龄的胚则有7.1%的由肉眼看不见发育为可见的小球状物，但继续培养后不见变化。1991年直接在脱分化培养基V上培养7日龄和9日龄的胚，结果9日龄的胚仍无变化，7日龄的胚则有37.5%的诱导出愈伤组织（见表2）。

可见，*R. ciliaris*与*T. aestivum* cv. J-11属间杂交9日龄的胚，因退化为枯褐色，人工培养后也不能生长发育，丧失了诱导的能力。8日龄的半致密状胚则能在人工培养基上进行一定的生长、发育。7日龄的胚，因呈水泡状，暴露后失水极快，解剖时易被触伤，以致难以在生长发育类培养基（I）上生长，但受伤后的活体胚组织或细胞尚具有脱分化的潜力。

2.3 培养基对杂种F₁代幼胚培养的影响

2.3.1 脱分化培养

1990年，将表3的I培养基上长大的8日龄胚转到脱分化培养基II上，2周后诱导出

表1 不同胚龄对杂种F₁代籽粒的胚胎发育反应的比较
Table 1 Response of various embryo age on grains of hybrid F₁ embryos development

年份 Year	胚龄 Embryo age (days)	授粉 小花数 No. of florets pollinated	产生的 籽粒数 No. of developing grains	籽粒的形态特征 Morphology of grains			胚乳 Endosperm	胚胎的显微特征 Micro-character of embryos
				颜色 Color	饱满度 Plump degree	长度 Length (mm)		
1990	10	170	11	枯黄	薄片状	2.5-3.0	未见到	未见到胚
	9	272	5	黄绿	近薄片状	3.0-3.5	极少量	黄褐色,小于0.4mm的圆球形
	8	384	21	绿色	饱满	4.0-4.5	少量	透明,半致密,0.4mm大的圆球形
1991	7	164	17	绿色	饱满	3.5-4.0	少量	透明,水泡状,小于0.4mm的圆球形
	9	243	9	黄绿	近薄片状	3.0-3.5	极少量	黄褐色,小于0.4mm的圆球形
	7	159	16	绿色	饱满	3.5-4.0	少量	透明,水泡状,小于0.4mm的圆球形

表2 杂种F₁代的胚龄与胚胎培养的结果
Table 2 Result of embryo age and embryo culture of hybrid F₁

年份 Year	胚龄(天) Embryo age(days)	接种胚数 No. of embryo inoculated	生长发育的胚数 Embryos of development		产生愈伤组织的胚数 Embryos of induction calli		再生植株数 No. of plant regeneration
			No.	%	No.	%	
1990	9	3	0	0.0	-	-	0
	8	14	1	7.1	1	7.1	36
	7	13	0	0.0	-	-	0
1991	7	8	-	-	3	37.5	22
	9	5	-	-	0	0.0	0

表3 培养基组成(单位: 除蔗糖外, 其余均为“毫克/升”)
Table 3 Medium components (Unit: the others are “mg/L” except sucrose)

类型 Types	编号 No.	成份 Components
生长发育类 Types of development	I	N6+IAA0.5+KT1.0+Glu400.0+CH100.0+YE100.0+IN*100.0+SI**8%
脱分化类 Type of induction	II	N6+2,4-D2.0+CH300.0+IN100.0+SU8%
callus	III	N6+2,4-D1.0+IAA1.0+KT0.5+CH300.0+IN100.0+SU8%
	IV	N6+2,4-D1.0+IAA1.0+KT0.5+CH300.0+IN100.0+SU3%
再分化类 Types of regeneration	V	N6+2,4-D1.0+IAA1.0+KT0.5+CH300.0+IN100.0+SU6%
	VI	N6+NAA0.02+6-BA2.0+CH500.0+IN100.0+SU3%
	VII	N6+NAA0.02+6-BA2.0+KT0.5+CH500.0+IN100.0+SU3%
	VIII	N6+IAA0.5+IBA1.0+IN100.0+SU3%

*: IN-----Inositol **: SU-----Sucrose

2.0mm 大、黄色、致密, 颗粒状愈伤组织, 但继续培养后愈伤组织不再增大。将愈伤组织转入 III 培养基, 3 周后愈伤组织略微增大, 且局部褐化。去除褐化组织后, 立即转入蔗糖浓度降至 3% 的 IV 培养基, 2 周后愈伤组织块迅速增大到 8—9mm, 形态与 II 培养基上诱导的相同。可见, 形成的愈伤组织不宜继续培养于高浓度 (8%) 蔗糖的培养基上, 需要转入低浓度蔗糖的培养基, 这与以往的研究一致^[5]。

根据发育早期的幼胚需要较高的蔗糖浓度^[5]和 1990 年的培养结果, 1991 年直接在 6% 蔗糖含量 (介于 III 与 IV 之间) 的 V 培养基上培养 7 日龄胚, 结果愈伤组织的诱导、生长、增殖和保持均表现良好。由此可见, 培养基 V 对 *R. ciliaris* × *T. aestivum*. cv. J-11 属间杂种 F₁ 圆球形胚的脱分化具有较好促进作用。

2.3.2 再分化培养

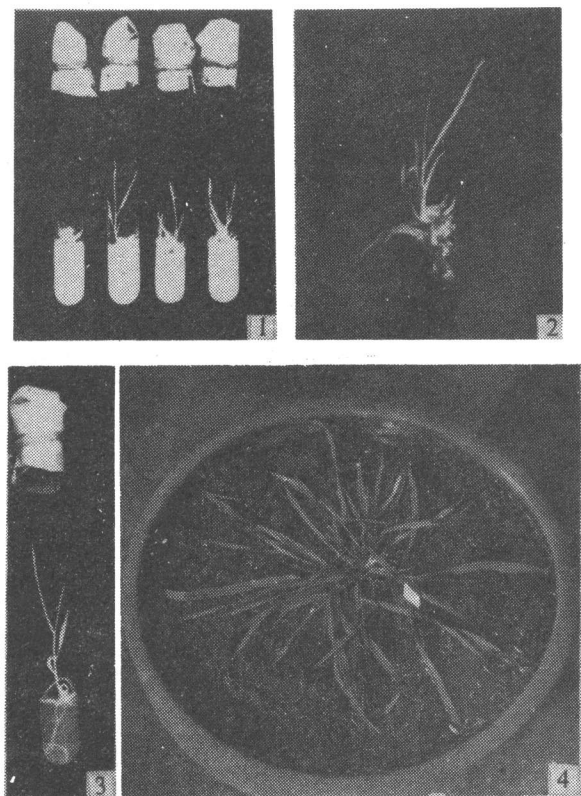
将诱导的愈伤组织转到再分化培养基 VI 上, 1 周后培养物变成黄绿色, 4—5 周时分化出少量的仅 5mm 长的不定芽及多条 10—15mm 长的不定根。切去不定根后将带芽的培养物转入 VII 培养基, 2 周后分化出粗壮的芽丛, 最长芽达 22mm; 4—5 周时, 整个培养物增殖到可切割为 6—7 块 5—6mm 大的芽丛愈块, 最长芽达 60mm。可见, 培养基 VII 对不定芽分化, 生长的促进作用明显优于 VI。产生这种差异的原因有待进一步研究。

切取较长的不定芽到 VIII 培养基上, 2—3 周后分化出根 (图 3); 余下的芽丛愈块继续在 VII 培养基上培养, 分化出不定芽 (图 1—2)。最后, 分别获得 7 日龄和 8 日龄的胚培再生植株 22 苗和 36 苗 (表 2)。

试管苗盆栽后生长正常 (图 4), 经根尖细胞检查, 染色体数目为预期的 35 条。

3 讨论

纤毛鹅观草与普通小麦属间杂种 F₁ 幼胚的培养, 已有一些报道^[2-4,6]除 Sharma 等培养的胚龄下限为 10 天^[6]外, 翁益群等^[2], 刘大钧等^[3]和颜^[4]等^[4]培养的胚龄都是 12 天以上。可见, 在他们的研究中, 杂种 F₁ 代的胚胎均能在母株上发育到 10 天以上不至夭亡。本研究中, 纤毛鹅观草×普通小麦 J-11 杂种 F₁ 代的幼胚于授粉后 9 天即开始退化, 10 天已完全



图版说明

1. 从 *R. ciliaris* × *T. aestivum* cv. J-11 属间杂种 F₁ 代球形胚诱导的愈伤组织上分化的再生小植株。 2. 试管外的不定芽。 3. 小植株培养 3 周后形成的根系。 4. 移栽后的再生植株。

Explanation of plates

1. Adventitious buds from the callus derived from globular embryo of hybrid F₁ between *R. ciliaris* and *T. aestivum* cv. J-11. 2. Adventitious bud outside test tube. 3. Root system formed from adventitious bud after three weeks in culture. 4. Regenerated plant after transplantation.

退化(表 1)。造成这种差异的原因,可能与小麦亲本的不同基因型和纤毛鹅观草的不同生态型,以及杂种合成的不同生态环境有关。

纤毛鹅观草(♀)与普通小麦“C·S”(♂)属间杂种 F₁ 代 10 日龄的胚已具有盾片^[6]; 13 日龄的胚已发育到纺锤形至心形胚期^[4], 离体培养后能萌发成苗^[2-4,6]; 但与普通小麦“(♂)“Newton””, “TAM105”和“Vona”品系杂交 10 日龄的胚则发育为无盾片的鱼雷形胚, 离体培养后未能萌发成苗^[6]。本试验中纤毛鹅观草 × 普通小麦 J-11 8 日龄前的胚处于无器官分化的圆球形期, 采用脱分化途径获得杂种更为适宜。