

供育种用的小麦未成熟 胚离体培养技术研究*

梁竹青 高明尉 成雄鹰

(浙江农业大学)

提 要

通过3年试验已建立起一套可供育种利用的小麦未成熟胚离体培养技术,包括选取最适未成熟胚(直径为1.0~1.5mm)作外植体,在培养中期对愈伤组织进行选择、合理确定培养历期、妥善安排再生幼苗的出苗期、再生苗的保湿栽培以及无性株当代变异的鉴别与选择。采用本技术,3年内117个小麦品种的平均出愈率达77.0%,平均分化率为16.1%, S_2 代有益变异率为6.0%,且已建立 S_1 ~ S_4 代含有5万个单株的无性株系鉴定选种圃。

关键词 小麦育种,未成熟胚培养,离体培养技术

利用体细胞组织进行离体培养,设法使培养物出现各种可遗传的变异,以供育种利用,这是当前作物育种技术开发研究上一项极为引人注目的课题^[2]。小麦育种工作中,利用生长锥、幼穗、未成熟胚、幼叶、胚轴、成熟种子等体细胞组织进行离体培养,都曾先后获得发育正常的无性株^[7]。根据前人以及我们的试验,在上述各类体细胞组织中以幼胚作外植体最切实用,具有取材方便、操作简便、便于诱变处理、诱导分化率高、接种与出苗期能够配合小麦生长季节等优点^[1,7]。本试验自1982年以来通过几年的试验研究,到1986年止,已在杭州本校农场建立起从第1(S_1)~4代(S_4)的无性系鉴定选种圃,包含约5万个无性单株, S_2 的有用变异率平均达6%。入选材料均已转入小麦常规育种程序。试验结果表明,此项技术可供小麦育种利用。本文所讨论的主要限于离体培养技术中的几个关键问题。

材料与方 法

(一) 材 料

几年来的供试小麦材料共达138份,其中包括南方冬小麦、北方冬小麦,美国冬小麦等,以南方冬小麦为主。所有供试材料除特别规定者外,均取自原种圃,剪取材料时均经仔细核实,剔除混杂伪劣者。

田间或温室取材时,均以穗为单位。在麦穗中、上部开花当天,即挂牌标明开花日期。在开花高潮时期,视情况在穗上加套纸袋,以防串花。穗上未成熟胚的胚龄按开花当天算起,从花后9天~21天,逐天或隔若干天分批取回挂牌穗。为求同穗中各颖果的

*本试验得到中国科学院科学基金以及浙江省科委的资助,是资助课题的一个组成部分。

胚龄基本一致, 每穗取回后剔去穗上部与穗基部3~4个小穗, 只选用中部小穗。在每小穗中只选取基部两朵小花的颖果, 以供挤取未成熟胚之用。

(二) 方法

本试验所用培养基为经过修改的MS培养基^[6]。其大量元素与微量元素与MS培养基相同, 但外加L-天门冬酰胺150毫克/升, 盐酸硫胺素0.5毫克/升, 蔗糖20克/升, 2, 4-D 1毫克/升, pH5.8。

分化培养基成份与上相同, 仅除去2, 4-D, 必要时添加萘乙酸(1毫克/升)。培养基经15磅/时²压力锅灭菌20分钟。

外植体的接种一般从4月中旬开始, 最迟至6月上旬结束, 其中5月上旬为高潮期。接种时将颖果先用70%酒精表面消毒, 再用1%升汞处理15分钟, 或用漂白粉消毒20分钟, 然后用无菌水冲洗3次。用挤压法从未成熟种子胚部挤出幼胚, 接种于培养基上, 接种时力求使盾片朝上, 此项操作均在无菌条件下进行。

接种后将材料放入培养室内, 室温控制在27℃左右, 荧光灯照明每日14小时, 照度为1000Lux。当平均气温稳定在20~30℃时, 培养物也可放在采光条件较佳的实验室内, 以节省能源。接种后15~22天开始出现愈伤组织, 以后视愈伤组织生长情况每隔30~50天转培一次, 从10月开始转入分化培养基, 使其分化出再生株。

当再生株幼苗长至6~12厘米, 且具有一定数量的根系后, 即由试管移至底部开有园孔的塑料小试钵中, 塑料小试钵放在装有Hoagland营养液的托盘内, 供幼苗吸收。在幼苗液培过程中, 湿度保持在90~95%左右, 温度25~30℃。一般经3~7天保湿栽培, 即可移至室外炼苗, 经3~10天后再移至大田, 进行常规栽培管理。

结果与讨论

(一) 诱导分化率

3年试验的平均出愈率为77.0%, 平均分化率为16.1%(见表1), 但年度间存在差异。

表1 小麦未成熟胚离体培养的出愈率与分化率

年 度	品种数	接种胚数 (A)	出愈数 (B)	出愈率 (B/A)	净愈数* (C)	成苗数** (D)	分化率 (D/C)	诱导分化率 $\frac{(B/A) \times (D/C)}{(D/C)}$
1983~1984	9	1042	513	49.2%	475	145	30.5%	15.0%
1984~1985	89	6649	4593	69.1%	4330	740	17.1%	11.8%
1985~1986	19	3551	3551	100.0%	2424	276	11.4%	11.4%
合计	117	11242	8657	77.0%	7229	1161	16.1%	12.4%

* 净愈数是指出愈数减去转作其它试验用的愈伤组织数以及受污染的愈伤组织数之后的净存愈伤组织数。

** 成苗数是指能分化出再生株的愈伤组织数。每一愈伤组织分化的再生株株数, 多则若干株, 少则1株。

在相同培养条件下, 小麦未成熟胚离体培养的诱导分化率往往随品种的不同而有明显的变化^[1], 当各年供试品种不同时, 年度间的平均出愈率和分化率就会出现升降变化。

根据 3 年的试验实践, 无论从品种的代表性, 供试品种的数量, 供试的种胚数等方面来看, 在上述相同的培养条件下, 以 1984~1985 年的试验结果, 较能真实反映出小麦未成熟胚的诱导分化效果。这一年的平均出愈率为 69.1%, 分化率为 17.1%, 都很接近 3 年的平均值。

现在把出愈率与分化率的乘积叫做培养率, 用它可以衡量不同离体培养技术的效果。诱导分化率愈高, 产苗量一般也愈多, 培养效果愈好。在本试验中, 3 年平均的培养率为 12.4%, 而 1984~1985 年的平均培养率为 11.8%。

(二) 外植体

用未成熟胚作外植体时, 胚龄长短是影响诱导分化率的主要因子。胚龄过大或过小都会明显降低分化率, 甚至根本不分化。根据 3 年的观察, 在杭州正常开花气温条件下, 大多数南方冬小麦未成熟胚的胚龄小于 10 天, 较难产生愈伤组织, 大于 19 天较难分化成苗。分化的最佳胚龄期一般为 12~18 天, 个别为 11~21 天^[1]。一般而言, 以选取花后第 14~16 天的未成熟胚为宜。

胚龄长短是选取材料的时间指标, 实际上与诱导分化率直接有关的是胚的大小。胚的大小与胚龄紧密相关。小麦一般在开花后一天受精完毕, 进入原胚期, 花后 8 天发育成完整幼胚并开始迅速增长, 到 15 天胚的体积若以直径来表示, 一般可达 1.0~1.5 毫米, 此时接种较为适宜。胚龄过小或过大反映在胚的体积上往往小于或大于上述数值, 均不宜作为离体培养材料。胚体积的大小易受气温条件的影响, 因此气温偏低时胚龄可适当延长 1~2 天, 偏高时可适当提早 1~2 天。一穗从始花至终花随气温条件和品种的不同可以有 4~5 天的间隔, 因之花后同一天在同一穗上可以有不同胚龄的颖果。取材时须注意此项差别, 加以取舍。

(三) 愈伤组织

15 天左右胚龄的未成熟胚一般于接种后 2~3 周内大多开始在盾片部位出现愈伤组织。愈伤组织的形态与生长状况随胚龄、品种及培养条件等的不同而异。在本试验所用培养基情况下(其中 2,4-D 含量不超过 1 毫克/升), 常见的有以下几种类型:

甲型 在出现愈伤组织时, 幼胚无芽鞘伸长; 愈伤组织色泽淡黄, 多数外形致密粗糙, 表面多呈结节状。

乙型 在出现愈伤组织时, 幼胚的胚芽鞘稍有伸长, 但不出现幼叶, 愈伤组织多数色泽淡黄, 外形有的致密有的疏松, 呈光滑状或结节状。

丙型 在出现愈伤组织时, 幼胚的胚芽鞘及幼叶均伸长, 愈伤组织色泽淡黄或淡白, 外形有疏松有致密, 较多呈光滑状。

以上 3 种类型中, 相对而言, 甲、乙两型日后都有较高的分化率, 而丙型分化率较低。

愈伤组织的生长快慢随品种的不同而异, 在同一品种中, 各个愈伤组织也不一致。本文以经过一定期间(75 天)培养的愈伤组织体积大小, 作为衡量生长快慢的指标(即生长率), 而用组织块的直径(厘米)表示愈伤组织的体积。表 2 列举了 8 个不同品种经过 75 天培养后不同体积愈伤组织的频率分布情况。

表 2 指出, 经过 2 个半月培养, 8 个品种愈伤组织体积在 0.5~0.7 厘米之间的占

44.4%，0.8~1.0厘米的占24.2%，两项合计共占68.6%，即2/3以上的愈伤组织其大小为0.5~1.0厘米。8个品种的平均直径为0.73厘米，其中辐泰山4号的平均值最大为0.85厘米，352最小为0.48厘米。

在这批材料中，超过平均值的只有辐泰山4号及ND 7532；在0.65厘米以上的有浙麦2号、苏麦3号和908等3个品种。现证明，这5个生长率较高的品种都有较高的分化率，而生长率很低的352，其分化率为0。由此可见，愈伤组织生长率的高低，与日后的分化率大小存在一定的相关关系。情况如表2所示：

表2 各小麦品种不同体积愈伤组织的频率分布和愈伤组织的分化率分布
(1983年, 接种后75天的情况, 每品种调查50个左右的愈伤组织)

	愈伤组织体积分类(用直径cm表示)				平均大小 (cm)
	0.2~0.4	0.5~0.7	0.8~1.0	1.1~1.5	
908	21.4*	46.4	28.6	3.6	0.65
浙麦2号	19.6	41.1	30.4	8.9	0.69
苏麦3号	28.8	36.1	24.3	10.8	0.66
扬麦1号	50.0	35.0	15.0	0	0.53
核农1号	37.5	31.2	18.8	12.5	0.63
352	38.5	61.5	0	0	0.48
辐泰山4号	1.3	42.7	34.7	21.3	0.85
ND7532	4.5	52.9	20.0	22.6	0.80
平均分布(%)	16.4	44.4	24.2	15.0	0.73
愈伤组织块合计	78	211	115	71	总计475
出现分化的愈伤组织数	4	67	28	64	217
分化率(%)	5.1	31.8	71.3	90.1	45.7

* 表内数字除愈伤组织块数合计一项以及平均大小一栏外，其余均是频率百分数。

表2指出，8个品种愈伤组织的平均分化率为45.7%，但其中生长率愈高或体积愈大的愈伤组织，分化率也愈高。体积为1.1~1.5厘米的分化率高达90.1%；体积为0.2~0.4厘米的，个别材料虽然也能分化出再生苗，但仅占同类体积愈伤组织的5.1%。可见愈伤组织生长率同分化率之间存在线性相关关系，经过统计处理，得到如下直线回归方程：

$$y = -0.1869 + 0.8809x$$

其中x为生长率(体积大小)，y为分化率，取值区间为[0.2~1.5厘米]，相关系数为 $r = 0.98$ ，此r值在0.05水平上显著。据此，可以考虑对生长率很低的愈伤组织(如0.2~0.4厘米)定期加以淘汰，以减轻日后的转培工作量，提高愈伤组织的群体素质。

(四) 培养历期

从接种之日起至再生幼苗离开培养基为止的天数称培养历期。培养历期的长短对日后无性株发生性状变异的频率有明显影响。在一定限期内，培养历期较长，无性株在 S_1 及 S_2 代出现性状变异的频率就较高。表3是

表3 培养历期与 S_2 代变异频率的关系(1982年)

	培养历期(天数)			
	90	120	190	250
观察株数	1195	3414	750	30
变异株数	53	156	69.0	0
变异频率(%)	4.44	4.57	9.20	0

本文第二作者1982年在美国堪萨斯州立大学,对冬小麦ND7532未成熟胚离体培养所产生的无性株 S_2 代,在株高、熟期、育性、株型等9个方面的性状变异进行大田调查的结果,表中的变异频率系指变异株数占 S_2 总株数的比。

对ND7532而言,在培养历期长达250天情况下,由于分化率大幅度下降,成苗群体很小,已无法看到变异,其变异频率为0。在250天以内,培养期延长,变异频率变高,例如190天的变异频率为9.2%,90天仅4.44%,可见培养历期以稍长为好。在我们的试验中除了考虑上述情况外,还要考虑到使接种期和无性株出苗期能与大田开花期和出苗期取得一致,以便操作与选择。根据3年试验,对大多数南方冬小麦品种而言,培养历期可取150~240天,但以180~200天左右为好。

(五) 再生幼苗

愈伤组织转入分化培养基后约半个月,其中凡出现绿点的愈伤组织大多能分化出幼苗,少数仍保持绿点状态,其余部分并不分化。

前面提到3年的平均分化率为16.1%,但在品种间有明显差异。根据1984年观察,89个品种的分化率分布如表4所示:

表4 冬小麦不同品种的分化率分布(1984年)

	分 化 率 (%)											合 计
	0	1~10	11~20	21~30	31~40	41~50	51~60	61~70	71~80	81~90	91~100	
品种数 (个)	17	14	29	12	10	3	1	0	1	0	2	89
频率 (%)	19.1	15.8	32.6	13.5	11.2	3.4	1.1	0	1.1	0	2.2	100

表4指出,在上述培养条件下,分化率高的可达100%,低的为0,多数材料的分化率处于11~20%之间,3年内共获得2千多株再生苗。从目前的研究进展情况来看,适当改变培养条件与选择方法,诱导分化率还可提高。

再生幼苗除极少数为畸形苗以外,大多数为正常苗。正常苗大致可分3类:一类是丛生苗,另一类是带蘖单苗,再一类是无蘖单苗。一般以后二类幼苗居多,而以前二类的存苗率较高。在2000多株无性株中除个别植株出现过1~2个白化分蘖以外,没有出现整株白化株。

再生幼苗出苗期的迟早除了决定于配合小麦大田出苗期以外,还应视品种特性的不同适当加以调整,做到错开时间,分批进行,以免出苗过于集中。在杭州条件下,一般可于10月初转入分化阶段,11月上旬出苗,11月中、下旬移苗,最迟应在12月上、中旬移苗完毕。但是冬性较强的迟熟材料也可提早半个月出苗,春性和早熟品种可适当延迟,使出苗期分散,以利调剂人力,提高设备利用率。根据试验,春性及一部分早熟材料若提早于11月8日以前出苗,多数将在冬季抽穗,须移入温室,始能安全授粉结实。

(六) 当代无性株的性状变异

3年来先后所获得的2000多株无性株,通过单株稀植,增加有效分蘖,再经过温室与夏繁增代等方法,到1985~1986年最高世代为第4代(S_4),从 S_1 到 S_4 代共有5万个单株。在此基础上建立起小麦无性株系鉴定与选种圃。其中二代以上材料均已纳入常规选育程序。

当代无性株 (S_1) 会出现各种形态变异。产生变异的明显部位是穗部。在穗型方面可以出现密穗型 (较多)、疏穗型、棍棒型、甚至斯卑尔脱穗型, 原来是长芒的可以出现顶芒及无芒, 或者无芒的变有芒, 此外还有红壳变白壳, 以及红粒变白粒等等。在 ND7532 中还发现同一株中存在无芒、顶芒及长芒三种穗型; 在红九品种中还出现主穗呈四方柱形、中下部四侧同时着生小穗的罕见穗型。此外, 在株型、叶型、腊质变化等方面也都出现了广泛的变异。至于株高变化以及开花期的迟早, 因无性苗素质各有差异, 出苗时期有不同, 当代较难鉴别其是否出现变异。

根据观察, 无性株的当代变异有的能遗传, 如无芒的 908 S_1 代出现的长芒, 长芒扬麦 4 号、苏麦 3 号等出现的无芒类型, 核农 1 号的穗型变化等等。有的变异性状, 如 S_1 主穗所出现的穗型单独变异 (同株其它分蘖穗不出现变异), 以及一般在 S_1 中常见的疏穗型等, 多数并不遗传, 估计这类变异是 S_1 代的生理效应所致。因此对当代无性株的变异, 应当有区别地加以选择。无性株 S_2 代在株高、熟期、腊质、株型、穗型、颖色、粒色、抗病性等方面会出现广泛变异, 其中有益变异平均高达 6%, 且有许多变异性状为一般材料所罕见。由于多数变异都能遗传, 故完全可供育种利用。关于无性株的性状变异及其遗传, 将在另文中详加讨论。

参 考 文 献

- [1] 梁竹青等, 1986, 中国农业科学, 2: 42~48.
 [2] 大野清春, 1984, 育种学最近の进步, 25集, 46~52.
 [3] Larkin, P. J. et al, 1984, Theor. Appl. Genet., 67: 443~455.

STUDY ON IN-VITRO TECHNIQUE FOR IMMATURE EMBRYO CULTURE OF WHEAT BREEDING

Liang Zhuqing Gao Mingwei Cheng Xiongying

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, Zhejiang Province)

ABSTRACT

A technical system for immature embryo culture of wheat breeding has been established through three years study. This system involves the choice of optimum size of embryo (1.0~1.5mm in diameter) used as explant, the selection of regenerable calli in the mid-period of culture according to their growth rate and appearance, the proper determination of culture duration and of time for starting shoot differentiation and seedling transplantation, the maintenance of high-humidity in misting frame for raising regenerated plantlets, and the identification of distinct variants from among the somaclonal plants. The technology employed in the past three years resulted in an average frequency of callus formation 77% and of plantlet regeneration 16.1%, mutation frequency in S_2 generation up to 6%. A selective nursery consisting of 50 thousand individuals and covering four generations from S_1 to S_4 has been, thereafter, set up for breeding use.

Key words Wheat breeding, Immature embryo culture, In vitro culture technology