

低温预处理和聚乙二醇处理对小麦花药出愈率的影响

杨 雪,刘春雷,王 丁,张丽琴*,王世杰,常慧萍,邢文会,付瑞敏
(河南教育学院 生命科学系,河南 郑州 450046)

摘要:以河南教育学院小麦育种研究中心培育的小麦新品系为供试材料,选用 C₁₇ 为基本培养基,分别研究了低温预处理 1、2、3、4、5、6、7 d,添加 0(CK)、80、100、120 mg/L 的聚乙二醇(PEG)对小麦花药出愈率的影响。结果表明:低温预处理 4 d 的小麦花药出愈率最高(2.108%),且稳定性较好(变异系数 0.067),与低温预处理 2 d 的小麦花药出愈率差异显著($P<0.05$),与其他 5 个处理之间的差异极显著($P<0.01$)。在培养基中加入 80、100、120 mg/L PEG 可显著提高小麦花药出愈率,尤其以 100 mg/L PEG 效果最佳。

关键词:低温预处理;聚乙二醇;小麦花药;出愈率

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)04-0049-03

Effects of Low Temperature Pretreatment and PEG on Callus Induction Rate of Wheat Anther

YANG Xue, LIU Chunlei, WANG Ding, ZHANG Liqin*, WANG Shijie,
CHANG Huiping, XING Wenhui, FU Ruimin
(Department of Life Science, Henan Institute of Education, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Taking the wheat lines bred by Henan Institute of Education as tested materials and C₁₇ as the basic culture medium, the influence of different low temperature pretreatment times and different PEG concentrations added in the medium on wheat anther callus rate was studied. The results showed that the callus rate of wheat anther was the highest(2.108%) when it was pretreated by low temperature for 4 d, which had good stability($CV=0.067$). On the other hand, adding 80—120 mg/L of PEG in the medium could significantly increase the callus rate of wheat anther, the effect of 100 mg/L PEG being the best.

Key words: low temperature pretreatment; PEG; wheat anther; callus induction rate

小麦为愈伤组织诱导频率偏低材料^[1],虽然小麦单倍体培养技术已经有了长足的发展,但进一步优化各种培养条件,大幅度提高小麦的花药培养效率,仍然是小麦花药离体培养和花培育种研究的重要内容^[2-3]。而单倍体植株的诱导频率与很多因素有关,其中对花药的预处理是一个重要的环节^[4]。在预处理中,低温预处理是一种简便和广泛应用的措施^[5]。低温处理的效应是 Nitsch 等^[6]在研究毛叶曼陀罗(*Datura innoxia*)的花药培养中首先发现的。其后,国内外学者在烟草、大麦、水稻等

植物上进行研究,并从不同角度探讨了低温预处理的作用机制。但对小麦花药低温预处理最佳时间的研究较少,且结果不一。自从 Kao 等^[7]发现聚乙二醇(PEG)可以作为植物原生质体的促融合剂以来,PEG 日益受到人们的关注。目前,很多研究者应用 PEG 作为诱导剂和筛选剂,已有报道以 PEG 为诱导剂获得抗旱植株^[8-9]。但 PEG 在小麦花药培养方面的应用报道不多。为此,研究不同低温预处理时间、不同质量浓度 PEG 对小麦花药脱分化效果的影响,旨在为优化小麦花药培养的条件、提高小麦花药的

收稿日期:2014-09-16
基金项目:国家自然科学基金项目(31071413);河南省科技攻关重点项目(122102110189);河南省自然科学基金项目(2011B210002);河南省高等学校重点科研项目(15A210020)
作者简介:杨 雪(1983-),女,河南浚县人,讲师,硕士,主要从事植物系统分类及组织培养研究。E-mail:sws211@163.com
* 通讯作者:张丽琴(1962-),女,河南安阳人,副教授,主要从事植物学及组织培养研究。E-mail:1zh1q@163.com

培养效率提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试小麦新品系材料为王世杰教授提供的 12-1D292~12-1D418,2012 年 10 月 20 日播种于河南教育学院小麦育种研究中心试验田,2013 年 4 月中旬采摘幼穗,预处理及接种培养在河南教育学院生命科学系实验室完成。

1.2 方法

1.2.1 低温预处理 在大田选取花药处于单核靠边期^[8]的材料并均分成 7 份,将材料用浸湿的塑料袋包好,置 4℃冰箱分别低温预处理 1、2、3、4、5、6、7 d,共 7 个处理,重复 3 次。花药取出后接种在 C₁₇+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 培养基上,pH 值 5.8~6.0。

1.2.2 PEG 处理 将大田采来的单核靠边期的材料置 4℃冰箱中低温预处理 2~3 d。接种前在 75%乙醇中均匀蘸湿备用。选取幼穗中间部位小穗基部小花的花药接种在分别添加 0(CK)、80、100、120 mg/L PEG 的 C₁₇培养基上,共 4 个处理,重复 3 次。

1.2.3 培养 在温度 28~30℃、湿度 60%~80%条件下暗室培养 30 d。

1.2.4 数据统计与分析 统计小麦花药出愈率并作方差分析。小麦花药出愈率=花药愈伤组织数/接种花药数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同低温预处理时间对小麦花药出愈率的影响

由表 1 可知,不同低温预处理时间对小麦花药出愈率影响不同。总体来说,小麦花药出愈率随着低温预处理时间的延长呈现出先升后降再升再降的趋势。低温预处理 2 d 的小麦花药出愈率呈现出小幅度上升,处理 3 d 的出愈率下降,处理 4 d 的出愈率最高(2.108%),随后则随处理时间的延长出愈率逐渐下降,处理 7 d 的出愈率最低(0.398%)。

由表 1 可知,低温预处理 4 d 的出愈率变异系数最小(0.067),说明该处理诱导小麦花药愈伤组织的稳定性最好。单因素方差分析结果显示,低温预处理 4 d 的小麦花药出愈率与低温预处理 2 d 的差异显著($P<0.05$),与其他 5 种处理差异极显著($P<0.01$)。

表 1 不同低温预处理时间的小麦花药出愈率

预处理时间/d	出愈率/%	标准差	变异系数
1	0.801bcdB	0.374	0.468
2	1.290bAB	0.458	0.355
3	0.850bcdB	0.087	0.102
4	2.108aA	0.141	0.067
5	1.156bcB	0.616	0.533
6	0.592cdB	0.325	0.550
7	0.398dB	0.233	0.585

注:同列大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平差异显著,下同。

2.2 不同质量浓度 PEG 对小麦花药出愈率的影响

由表 2 可知,不同质量浓度的 PEG 对小麦花药愈伤组织诱导效果不同。在培养基中分别加入 80、100、120 mg/L PEG,小麦花药出愈率分别较 CK 提高 6.79、28.89、5.98 倍。其中以 100 mg/L PEG 效果最佳。方差分析结果显示,100 mg/L PEG 处理的小麦花药出愈率与其他质量浓度处理之间的差异极显著($P<0.01$)。

表 2 不同质量浓度 PEG 对小麦花药出愈率的影响

PEG 质量浓度/(mg/L)	出愈率/%	较 CK 提高的倍数
0(CK)	0.095cC	
80	0.740bB	6.79
100	2.840aA	28.89
120	0.663bB	5.98

3 结论与讨论

本试验结果显示,小麦花药出愈率随着低温预处理时间的延长呈先升后降再升再降的趋势。低温预处理 2 d 的小麦花药出愈率呈小幅度上升,可能与低温降低花粉代谢,提高有机物的积累有关。而低温预处理 3 d 的出愈率较 2 d 的下降,可能是植物在此低温处理时已达到应对极限,但尚未适应缓冲反应。处理 4 d 的出愈率最高(2.108%),达到 7 个处理中的峰值,且稳定性较好。这可能是由于随着低温预处理时间的延长,花粉代谢与积累达到一个平衡点,在此平衡点小麦花药处于最有利于提高出愈率的生理状态。过了此平衡点,小麦花药的激素水平等生理条件不再适合愈伤组织的诱导,所以低温预处理 5、6、7 d 的花药出愈率显著下降。

有关低温预处理的机制,许多学者做了相应的研究。有的认为低温处理的作用是引起花药内源激素发生变化,从而影响花粉发育^[10];有的认为低温处理会造成小孢子的孤立化,结果改变这些细胞的发育途径^[11];还有报道显示,低温处理后花药和花粉内氨基酸发生变化,从而对诱导花粉植株产生作

用^[12]。总之,低温使得植物体内的新陈代谢活动速率减慢,有利于干物质的积累,这就使得提高出愈率成为可能^[13]。

本试验结果表明,小麦花药出愈率随着 PEG 质量浓度的增加呈现先升后降的趋势,在 100 mg/L 时达到最大值(2.840%)。说明在培养基中加入 80 ~ 120 mg/L 的 PEG 可提高小麦花药出愈率,PEG 的质量浓度为 100 mg/L 时,小麦花药出愈率显著提高。

小麦花药愈伤组织诱导率的高低受多种因素的影响,比如小麦品种、KT 浓度、培养基类型等。除本身的基因型存在差异,在采摘试验材料时也存在个体差异^[14]。由于接种量比较大,材料低温预处理的时间也存在差异。接种过程中人为操作的差异,以及操作过程是否严谨对小麦花药的出愈情况影响也很大。暗培养室的温度、湿度等均对花药出愈率有影响。关于 PEG 单一变量对于小麦愈伤组织出愈率的影响相关机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 曾君祉,欧阳俊闻. 在常温和低温条件下离体培养的小麦花药中小孢子的早期发育[J]. 遗传学报,1980,7(2):165-172.
- [2] 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]. 华北农学报,2006,21(2):34-36.
- [3] 董艳辉,于宇凤,赵兴华,等. 小麦单倍体诱导技术及其应用[J]. 山西农业科学,2014,42(7):764-767.
- [4] 许智宏,卫志明. 花药培养中的几个生理问题[J]. 植物生理学通讯,1988(1):64-68.
- [5] Genovest A D, Magill C W. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock[J]. Crop Sci, 1979, 19:662-664.
- [6] Nitsch C, Norreel B. Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère[J]. C R Acad Sci, 1973, 27(6):303-306.
- [7] Kao K N, Michayluk M R. A method for high-frequency inter generic fusion of plant protoplasts [J]. Planta, 1974, 115(4):355-367.
- [8] Smith R H, Bhaskaran S, Miller F R. Screening for drought tolerance in sorghum using cell cultures in vitro[J]. Cell Dev Biol, 1985, 21:541.
- [9] Hsissal D, Bouharmont J. In vitro selection and characterization of drought-tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) [J]. Agronomic, 1994, 14(2):65-70.
- [10] 徐武,李鸣,张敬,等. 低温预处理过程中大麦花药内源激素的变化[J]. 遗传学报,1997,24(2):165-169.
- [11] 钟华鑫,方国伟,梁海曼. 低温预处理影响籼稻花药培育效率的研究[J]. 植物生理学报,1987,13(2):144-153.
- [12] 黄剑华,陆端菊,王亦菲,等. 低温预处理对大麦花药内源游离氨基酸和多胺水平的影响[J]. 中国农业科学,2001,34(6):626-631.
- [13] 朱晓花,孙吉雄,梁慧敏,等. 低温预处理与植物生长调节剂对结缕草愈伤组织诱导的影响[J]. 草业科学,2009,26(4):121-126.
- [14] 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.