

C₁₇、K 培养基在小麦花药培养脱分化中的应用效果研究

杨 雪, 邢文会, 刘春雷, 张丽琴, 王 丁, 王世杰, 常慧萍, 韩鸿鹏

(河南教育学院 生命科学系, 河南 郑州 450046)

摘要: 为提高小麦花药培养的诱导率, 筛选出更适合河南小麦花药培养的脱分化培养基, 采用 128 个小麦杂交组合, 将其花药接种于 C₁₇ 和 K 培养基上, 对 2 种培养基在小麦花药培养脱分化过程中的效果进行比较, 并以 K 培养基为基本培养基, 分别添加 0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L KT, 探究培养基中 KT 浓度对小麦花药脱分化的影响。结果表明, K 培养基愈伤组织诱导率(4.66%)明显高于 C₁₇ 培养基(2.45%)($P < 0.05$), 两者变异系数表现为 C₁₇(0.56) > K(0.22), 说明 K 培养基诱导小麦花药愈伤组织的稳定性较好。在 K 培养基中加入 0.25 mg/L 的 KT, 小麦花药脱分化效果显著高于其他 KT 质量浓度($P < 0.01$), 且稳定性最好。

关键词: C₁₇ 培养基; K 培养基; 小麦花药培养; 愈伤组织; 诱导率

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)09-0028-03

Application of C₁₇ and K Culture Media in Dedifferentiation of Wheat Anther Culture

YANG Xue, XING Wen-hui, LIU Chun-lei, ZHANG Li-qin, WANG Ding, WANG Shi-jie,

CHANG Hui-ping, HAN Hong-peng

(Department of Life Science, Henan Institute of Education, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: The purpose of this study was to increase the induction rate of wheat anther culture, and to screen the culture medium suitable for the dedifferentiation of wheat anther culture in Henan province. The anthers of 128 wheat crosses were inoculated on C₁₇ medium and K medium, and the effects of the two media were compared. Taking K as the basic culture medium, it was added with 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L KT to explore the effect of KT concentration on the dedifferentiation of wheat anther culture. The results showed that the rate of callus induction was significantly higher on K culture medium(4.66%) than on C₁₇ culture medium(2.45%) ($P < 0.05$). In addition, the stability of wheat callus induction was also better on K culture medium than on C₁₇ culture medium according to their variation coefficients(0.56 for C₁₇ and 0.22 for K). Adding 0.25 mg/L KT in the culture medium had the best effect in wheat anther differentiation ($P < 0.01$) and the highest stability.

Key words: C₁₇ culture medium; K culture medium; wheat anther culture; callus; induction rate

小麦花药培养技术是获得小麦单倍体的主要途径, 在国内外已得到广泛研究与应用^[1]。自 20 世纪 70 年代初, 我国已培育 20 个小麦花药培养的新品种和新品系, 如河南省农业科学院选育的高产、广适、抗寒的小麦新品种花培 5 号、花培 8 号和超高产品种花

培 6 号, 在多年多点区试和生产示范试验中均表现出良好的丰产性、稳产性和适应性^[2-4]。虽然该项技术已得到广泛应用, 但在实际应用中小麦花药培养的诱导率不高。究其原因, 主要是材料的基因型和生理状态、培养基的种类和成分、培养条件的控制与管理等

收稿日期: 2014-04-04

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); 河南省基础与前沿技术研究项目(132300410457); 河南教育学院青年课题(20090103)

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

因素在不同程度上制约着小麦花药培养的效果。其中培养基的选择和优化是提高小麦花药培养效率的有效手段,对提高愈伤组织诱导率具有重要意义。

本研究采用的 C₁₇ 培养基是适合小麦花药培养的培养基,已被许多研究单位采用并改进^[5-9]。K 培养基是海燕等^[10]在多年的小麦花培育种及对多种培养基应用和研究的基础上建立的一种效果较好的培养基。两者均是我国小麦单倍体育种中广泛使用的培养基。为进一步确定适合河南省冬小麦花药培养的高效培养基,探讨了 C₁₇ 培养基和 K 培养基在小麦花药培养脱分化过程中的效果,以期为提高河南省冬小麦育种效率提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试材来自河南教育学院生命科学系小麦育种研究中心提供的 2012 年小麦杂交组合 1D292 ~ 1D420,共 128 个。

1.2 方法

1.2.1 取材时期与材料处理 4 月下旬,取大田种植的小麦幼穗花药,压片,用醋酸洋红染色后镜检。选择小孢子发育到单核靠边期的幼穗,放入 4℃ 冰箱内低温预处理 2~3 d,接种前在 75% 的乙醇中浸蘸均匀,然后在超净工作台上取出花药分别接种于 C₁₇ 和 K 培养基上。

1.2.2 培养基选择和 KT 质量浓度筛选 脱分化基本培养基使用 C₁₇ 和 K 培养基 2 种。分别附加 2,4-D 2.0 mg/L、KT 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L,pH 值调至 5.8。供试材料随机分为 4 组,分别接种于 C₁₇ 和 K 培养基。KT 质量浓度的筛选以 K 培养基为基本培养基,分别添加 0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L KT,其他成分同上,灭菌后备用。供试材料随机分为 I、II、III 3 组,分别接种于含有不同质量浓度 KT 的 K 培养基上。

1.2.3 培养条件 材料接种后置于暗培养室,温度 28~29℃,湿度 50%~60%。

1.2.4 数据统计与处理 材料接种 25~30 d 后统计不同培养基上小麦花药长出的愈伤组织数,计算愈伤组织诱导率。

2 结果与分析

2.1 C₁₇、K 培养基对小麦花药愈伤组织诱导率的影响

由表 1 可知,C₁₇ 培养基的愈伤组织诱导率为 1.10%~4.07%,平均 2.45%;K 培养基的愈伤组织诱导率为 3.33%~5.76%,平均 4.66%。比较而言,

K 培养基的诱导效果明显优于 C₁₇ 培养基,其愈伤组织平均诱导率较 C₁₇ 培养基提高了 90.2%。*t*-检验结果(略)显示,二者差异达到了显著水平($P < 0.05$),说明 K 培养基愈伤组织诱导率显著高于 C₁₇ 培养基。且两者变异系数表现为 C₁₇(0.56) > K(0.22),说明 K 培养基诱导小麦花药愈伤组织的稳定性较好。

表 1 C₁₇、K 培养基对小麦花药愈伤组织诱导率的影响

供试材料	C ₁₇			K		
	接种花药数/枚	愈伤组织数/个	愈伤组织诱导率/%	接种花药数/枚	愈伤组织数/个	愈伤组织诱导率/%
第 1 组	7 020	286	4.07	8 580	390	4.55
第 2 组	20 280	624	3.08	14 040	468	3.33
第 3 组	10 140	156	1.54	8 580	494	5.76
第 4 组	18 090	199	1.10	1 560	78	5.00
平均	—	—	2.45	—	—	4.66
变异系数	—	—	0.56	—	—	0.22

2.2 C₁₇、K 培养基的成分比较

培养基各成分的配比与优化直接影响小麦花药培养的出愈率。从表 2 可以看出,C₁₇ 和 K 培养基的成分中,铁盐及有机物成分如维生素、甘氨酸、肌醇等含量完全相同。与 C₁₇ 相比,K 培养基的大量元素中 KNO₃、NH₄NO₃、CaCl₂·2H₂O 和 MgSO₄·7H₂O 的含量均较低,KH₂PO₄ 的含量略有增加;微量元素中 MnSO₄·H₂O、ZnSO₄·7H₂O 和 H₃BO₃ 的含量均有不同程度的减少,KI、CuSO₄·5H₂O、CoCl₂·6H₂O 含量则有不同程度的增加。

表 2 C₁₇、K 培养基成分及含量 mg/L

成分	C ₁₇	K	成分	C ₁₇	K
KNO ₃	1 400	1 000	KI	0.83	1
NH ₄ NO ₃	300	200	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	140	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	150	100	维生素 B ₁	1	1
KH ₂ PO ₄	400	500	维生素 B ₆	0.5	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	烟酸	0.5	0.5
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3	甘氨酸	2	2
MnSO ₄ ·H ₂ O	8.49	2.3	肌醇	200	200
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2.0	D-生物素	1.5	2
H ₃ BO ₃	6.2	1.5			

2.3 不同质量浓度 KT 对小麦花药愈伤组织诱导率的影响

表 3 显示,KT 质量浓度为 0~2.0 mg/L 时,随着 KT 浓度的增加,小麦花药愈伤组织诱导率呈先上升后下降再上升的趋势。KT 质量浓度为 0.25 mg/L 时,小麦花药愈伤组织诱导率最高(3.850%)。单因素方差分析(略)显示,小麦花药出愈率在各质量浓度间的差异达到了极显著水平($P < 0.01$),说明在 K 培养基中加入 0.25 mg/L KT,小麦花药愈伤组织诱导率显著提高,脱分化效果最好。

添加不同浓度 KT 的小麦花药愈伤组织诱导

率的标准差和变异系数不同。KT 质量浓度为 0.25 mg/L 时小麦花药愈伤组织诱导率变异系数

最小(0.223),说明该质量浓度处理诱导小麦花药愈伤组织的稳定性最好。

表 3 不同质量浓度 KT 对小麦花药愈伤组织诱导率的影响

供试材料	KT 质量浓度/(mg/L)						%
	0	0.25	0.50	1.0	1.5	2.0	
第 I 组	0.33	4.31	0.87	0.54	3.87	1.94	
第 II 组	0.23	2.86	0.71	0.36	1.25	2.71	
第 III 组	0.42	4.38	1.67	1.39	2.05	3.75	
平均	0.327	3.850	1.082	0.763	2.390	2.801	
标准差	0.095	0.858	0.515	0.550	1.343	0.906	
变异系数	0.291	0.223	0.476	0.721	0.562	0.324	

3 结论与讨论

3.1 C₁₇ 和 K 培养基的诱导效果差异

本试验结果表明,K 培养基对小麦花药愈伤组织的诱导效果和稳定性均优于 C₁₇ 培养基。该结果与海燕等^[10]、姜秀芳等^[11]的研究成果较为一致。再次印证 K 培养基是最适合于黄淮麦区小麦花药培养的愈伤组织诱导培养基。

3.2 C₁₇ 和 K 培养基的成分差异

C₁₇ 和 K 培养基是广泛应用于小麦花药培养的 2 种培养基^[2-7]。本试验结果显示,2 种培养基的成分存在一致性,与常规的 MS 培养基相比,两者均降低了氮素含量,提高了肌醇和蔗糖的含量,并添加了 D-生物素,这些成分的改变有利于小麦花药愈伤组织诱导率的提高;与此同时,2 种培养基的成分也存在差异,K 培养基的 NO₃⁻、SO₄²⁻ 含量明显低于 C₁₇ 培养基,矿质营养 Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、BO₃³⁻ 含量较 C₁₇ 大幅度降低,Cu²⁺、Co²⁺ 含量增加。较低的矿质元素含量非但没有降低 K 培养基的小麦花药诱导率,反而提高了诱导率及其稳定性。这与其具有较高的 Cu²⁺、Co²⁺ 含量不无关系。

Cu²⁺ 是许多与氧化还原反应相关的酶的辅基,如多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶都需要 Cu²⁺ 作为辅基起到电子传递的作用,在植物呼吸作用的氧化还原中起着重要作用。Cu²⁺ 也是质体蓝素的成分,参与光合电子传递,Cu²⁺ 还与固氮酶的活性有关。Co²⁺ 是维生素 B₁₂ 的成分,也是黄素激酶、葡糖磷酸变位酶、异柠檬酸脱氢酶、草酰乙酸脱羧酶等的激活剂,对植物的生长发育有重要的调节作用。因此,较高的 Cu²⁺、Co²⁺ 含量有利于小麦花药的物质代谢与能量代谢,尤其在提高固氮效率和有效利用呼吸代谢能量等方面作用较大,使小麦花药在较低浓度矿质营养条件下能够较好生长,并提高花药愈伤组织的诱导率。

3.3 不同质量浓度 KT 对小麦花药脱分化的效果

本研究表明,在培养基中加入 0.25 mg/L KT,愈伤组织的诱导率较其他浓度组显著提高。通常 K 培

养基中 KT 的质量浓度为 0.5 mg/L,本结果表明,在 KT 质量浓度为 2.0 mg/L、1.5 mg/L、0.25 mg/L 时小麦花药愈伤组织诱导率较 K 基本培养基(KT 质量浓度为 0.5 mg/L)分别提高 1.589、1.209、2.558 倍。说明这 3 个 KT 质量浓度较适合本研究的供试小麦材料,在材料改变的情况下,KT 质量浓度要随之进行相应的调整,以求找到合适的激素浓度,提高小麦花药的出愈率。

此外,KT 质量浓度为 0~2.0 mg/L 时,小麦花药愈伤组织诱导率随着 KT 质量浓度的增加呈先上升后下降再上升的趋势。较高出愈率对应的 KT 质量浓度为 0.25 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L,其中以 0.25 mg/L 处理的出愈率最高,2.0 mg/L 次之。由此推测,植物在细胞分裂分化的发育过程中适合诱导愈伤组织的 KT 质量浓度不是唯一的,可能存在 2 个甚至多个峰值。诸多峰值的存在可能与植物强大的适应性有关,有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 隋新霞,樊庆琦,李根英,等.小麦花药培养研究进展[J].麦类作物学报,2005,25(4):127-131.
- [2] 海燕,康明辉,张丹,等.高产广适抗寒小麦新品种花培 5 号的选育[J].河南农业科学,2008(7):37-39.
- [3] 康明辉,海燕,赵永英,等.高产广适抗寒小麦新品种花培 8 号的选育及特征特性[J].种业导刊,2010(6):21-23.
- [4] 康明辉,海燕,赵永英,等.超高产小麦新品种花培 6 号的选育[J].河南农业科学,2009(6):60-61.
- [5] 王培,陈玉蓉. C₁₇ 培养基在花药培养中应用的研究[J].植物学报,1986,28(1):38-45.
- [6] 陈荣敏,温书敏.脱落酸(ABA)对小麦花药培养的影响[J].河北农业大学学报,1999,22(2):24-26.
- [7] 王培,陈玉蓉.固体培养基上浸润培养提高花粉植株诱导率的研究[J].华北农学报,1992,7(3):59-65.
- [8] 裴翠娟,胡含,刘成华.影响小麦花培诱导因素的研究[J].作物学报,1988,14(1):36-38.
- [9] 秦跟基,杨琴,陈佩度.表-油菜素内酯对小麦花药培养效率的影响[J].南京农业大学学报,1999,22(4):9-12.
- [10] 海燕,和现昌,黄冰艳,等.癸培养基的研制及在小麦花药培养中的应用研究[J].植物学报,1997,39(8):742-747.
- [11] 姜秀芳,郑继周,邓春霞,等.小麦花培材料的筛选和利用[J].中国农学通报,2005(2):62-64.