

# 幼胚离体培养在麦类作物远缘杂交中的应用

赵绪兰 陈集贤 高国强 冯海生 孙立南

(中国科学院西北高原生物研究所)

## 摘 要

1982—1988年期间,用麦类作物的80个种间、属间杂种幼胚进行离体培养,杂种幼胚的平均成苗率达到82—100%,远高于相应组合的平均杂交结实率(0.8—42.9%)。离体培养是剥取授粉后12—18天的杂种幼胚在适宜于直接成苗的固体培养基上进行,成苗率高的培养基为: White, NAA 0.5mg/L, IAA 0.5mg/L, KT 0.5mg/L, CH 300mg/L,蔗糖5%。

**关键词:** 麦类;幼胚培养;外植体;再生植株

植物远缘杂交的不亲和性,除了受精障碍外,在不少情况下则是由于受精后胚的早期退化而造成。胚乳发育不良或胚与胚乳间不亲和性导致胚的早期败育(Edwar, C. Y.等,1978;裘文达,1984)。离体培养杂种幼胚成苗,是克服远缘杂交不亲和性的途径之一(周之杭等,1979;双志福等,1984;陈孝等,1984;李浚明等,1984)。为了研究这一方法在几种麦类作物远缘杂交中的应用效果并进而完善它,我们在1982—1983年和1988年开展了此项研究,取得了一定的效果。

## 一、材料和方法

供试材料共80余个组合,其中1982—1983年为:普通小麦(*Triticum aestivum* L.)×瓦维洛夫黑麦(*Secale vavilovii* Grossh.),二棱大麦(*Hordeum distichon* L.)×瓦维洛夫黑麦等。1988年为:密利提奈小麦(*T. militinae* Zhuk. et Migusch)×普通小麦,云南小麦(*T. aestivum* subsp. *Yunnanense* King)×普通小麦,普通小麦×斯卑尔托小麦(*T. Spelta* L.),普通小麦×圆锥小麦(*T. turgidum* L.),栽培二粒小麦(*T. diocuum* Schuebl)×大赖草(*Leymus giganteus* Vahi.),硬粒小麦(*T. durum* desf.)×大赖草,普通小麦×大赖草,普通小麦×埃及小麦(*T. aethiopicum* Jakubz)等。

田间或温室选取的材料均以单穗计,母本抽穗后套袋、杂交,授粉后12—18天胚龄的胚作为外植

体。接种前将幼穗用70%酒精消毒2次,在无菌条件下剥出未成熟的种子,将种子依次经饱和漂白粉液7—8分钟和升汞液1—3分钟灭菌,无菌水冲洗2—4次,从种子中剥离出幼胚接种于培养基。

接种材料在湿度60—80%、2只40瓦日光灯每日光照8—10小时、温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的恒温条件下培养。

当幼胚植株进入花粉母细胞分裂期取幼穗固定(卡诺氏液),3—24小时后换入70%酒精中备用。用醋酸洋红染色,涂抹压片观察其染色体。

## 二、结果与分析

### (一) 成苗率

幼胚离体培养有2种成苗方式,1是先诱导愈伤组织,然后分化成苗,2是直接诱导幼胚成苗。采用第1种成苗方式,可使难得的少量杂种胚获得大量的再生植株,还能利用愈伤组织较长期地保存杂种种质。但是,在愈伤组织形成尤其是在继代培养中,培养物易发生核型变异和突变(李浚明等,1985;徐智宏,1985;付杰等,1987;章力建,1987),远缘杂交的变异与离体培养中发生的变异相混淆,会给杂种后代的遗传分析带来困难。采用第2种成苗方式,虽然不能一个幼胚得数苗,但可避免上述变异相混的弊端。为此,我们采用了直接诱导幼胚成苗的方式。

各远缘杂交组合杂种幼胚离体培养的成苗率尽管不同,但与人工杂交的结实率相比,杂种幼胚离体培养明显地提高了远缘杂交的成功率(表1)。

各种远缘杂交组合的杂交结实率为0.8—42.9%,而杂种幼胚离体培养的得苗率可达82—100%,由此可见,离体培养杂种幼胚是克服远缘杂交不亲和性的一种有效方法。人工杂交时,亲缘关系最近的杂交组合的结实率高,如云南小麦×普通小麦平均结实率为42.9%,密利提奈小麦×普通小麦为33.3%,普通小麦×斯卑尔托小麦为29.7%;亲缘关系较远组合的杂交结实率较低,栽培二粒小麦×大赖草为6%,普通小麦×大赖草为2.5%。但用相同组合授粉后12—18天的幼胚离体培养,杂种胚的得苗率均在80%以上。一些难杂交的属间杂交组合,如普通小麦与大赖草的杂交,先后用44个普通小麦品种与大赖草杂交仅有5个组合得几粒瘦秕种子,下种后陆续夭亡。用离体培养的方法目前已得苗8株。

### (二) 杂种幼胚的接种时间

对于胚乳发育不良或因胚与胚乳间不亲和的材料进行离体胚培养,幼胚应在未退化前剥取接种。几年的试验均在授粉后12—18天采样,过早或过晚,均不易成苗。陈朱希昭等(1984)在栽培大麦与普通小麦的杂交中,观察到大约在授粉后10天内胚乳完全退化而消失,原胚还可继续有所发育,大约在授粉后12—15天杂种原胚发育达到高峰,剥取此时的原胚离体培养最适合。无论是第1种成苗方式,还是第2种成苗方式,无论是以小麦幼胚为外植体还是以杂种幼胚为外植体,多数试验结果均以开花或授粉后15天左右为适宜取样期(李浚明等,1984;双志福等,1984;梁竹青等,1986;朱德水,1986;付杰等,1986)。在我们的试验中,小黑麦、小大麦和小赖草等杂种幼胚,在授粉后12—18天接种,一般在接种后3—4天胚在培养基上萌动,7—10天分化出芽进而生根,15—20天长成全苗,1

月左右即可移植。

表 1 不同组合的杂交结实率和幼胚诱导成苗率

Table 1 Percentage of seed set and frequency of green plantlet of immature embryos culture in different romate cross combination

年份 Year	组 合 Cross combination	杂 交 Cross		幼胚培养 Immature hybrid embryos culture		
		授粉花数 No. of pollinated florets	结实率 Percentage of seed set (%)	接种幼胚数 No. of immature embryos inoculated	绿苗数 No. of green plantlets	成苗率 Percentage of green plantlet (%)
1982	普通小麦×瓦维洛夫黑麦 <i>T. aestivum</i> × <i>Secale vavilovii</i>	368	19.5	61	50	82.0
1983	普通小麦×瓦维洛夫黑麦 <i>T. aestivum</i> × <i>Secale vavilovii</i>	679	17.4	95	94	98.9
	二稜大麦×瓦维洛夫黑麦 <i>H. distichon</i> × <i>Secale vavilovii</i>	158	13.3	110	8	80.0
1988	密利提奈×普通小麦 <i>T. militinae</i> × <i>T. aestivum</i>	84	33.3	6	6	100
	云南小麦×普通小麦 <i>T. aestivum</i> Yunna × <i>T. aestivum</i>	70	42.9	6	6	100
	普通小麦×斯卑尔托 <i>T. aestivum</i> × <i>T. Spelta</i>	64	29.7	19	19	100
	普通小麦×圆锥小麦 <i>T. aestivum</i> × <i>T. turgidum</i>	88	15.9	14	14	100
	栽培二粒小麦×大赖草 <i>T. diocuum</i> × <i>Leymus giganteus</i>	1331	6.0	4	4	100
	普通小麦×大赖草 <i>T. aestivum</i> × <i>Leymus giganteus</i>	3638	2.5	4	4	100
	硬粒小麦×大赖草 <i>T. durum</i> × <i>Leymus giganteus</i>	365	0.8	3	3	100
	普通小麦×野生二粒 <i>T. aestivum</i> × <i>T. dicoccoides</i>	120	9.2	20	19	95.0
	普通小麦×埃及小麦 <i>T. aestivum</i> × <i>T. aethiopicum</i>	198	24.7	42	37	88.1

在高原夏季气温偏低的条件下,授粉后若遇连阴雨天,幼胚发育缓慢,授粉后 15 天的幼胚很小,难于剥离;若遇晴天,即使在 15 日之前,也易剥取幼胚。因此,取样的具体时间,应视天气情况,可在授粉后 15 天前后 3 天、幼胚长 0.5—2 毫米范围内变动。

### (三) 适宜的培养基

几年来,我们采用了 White、N<sub>6</sub>、MS 和 Nitsh 等 4 种基本培养基,其中 White 为最好,N<sub>6</sub> 次之。在离体条件下,人工模拟胚乳营养成分供给幼胚,才能保证幼胚进一步正常发育。因此,在培养基中,除大量、微量元素和糖外,还需供应有机氮和生长调节物质。2,4-D 作为主要的愈伤组织诱导物,在直接培养幼胚成苗的培养基中不加外,添加生长素 NAA 和 IAA、细胞分裂素 KT 或 BA 与有机氮源 CH (水解酪蛋白),对保持外植体

新鲜,维持其较长的分化时间,促进幼胚分化,提高成苗率起了重要作用。在基本培养基中添加不同补加物的 12 种固体培养基和 5 种液体培养基上的筛选试验表明,由于幼胚易沉于液体培养基中而丧失分化能力,固体培养基更适于幼胚培养;在 12 种固体培养基中有 7 种诱导效果较好(表 2),其中 White + NAA 0.5mg/L + IAA 0.5mg/L + KT 0.5 mg/L + CH 300mg/L + Sucrose 5% 最佳,1983 年的平均成苗率为 86.4%,1988 年为 94.5%。

表 2 不同培养基对成苗率的效应 (单位:毫克/升 Unit: mg/L)  
Table 2 Effect of different media on plant regeneration of immature embryo culture

年份 Year	处 理 Treatment	接种幼胚数 No. of immature embryos inoculated	苗数 No. of green plantlets	成苗率 Percentage of green plantlet (%)
1983	White + NAA0.5 + IAA0.5 + KT0.5 CH 300 + S. 5%	206	178	86.4
	White + NAA 1 + IAA 1 + KT 1 + CH 300 + S.5%	100	48	48.0
	White + NAA 0.5 + IAA 0.5 + KT 0.5 + CH 300 + S.5%	55	52	94.5
1988	White + NAA 0.5 + IAA0.5 + KT 0.5 + CH 300 + S.7%	19	16	84.2
	N <sub>6</sub> + NAA0.5 + IAA0.5 + KT0.5 + CH 300 + S.5%	39	31	81.6
	White + NAA0.5 + IAA0.5 + KT0.5 + CH300 + S.5%	7	4	66.7
	MS + NAA0.5 + IAA0.5 + KT0.55 + CH300 + S.5%	33	14	50.0
	White	10	/	/

#### (四) 再生植株的表现

—— 杂种幼胚再生植株表现了远缘杂交杂种后代的一般特征,其株型、穗型为倾向于母本的中间型,但有明显的变异发生。如普通小麦与瓦维洛夫黑麦杂种幼胚的再生植株,其幼苗芽鞘或芽鞘同第 1 片真叶的叶鞘呈紫色(瓦维洛夫黑麦的特征),穗型比小麦的长,部分不育。花粉母细胞减数分裂中期 I 有 28 个染色体(图版 I:1, 图版在第 230 页),有的细胞中还可见到二价体、多价体(图版 I:2),具微核细胞数占观察细胞数的 98.03%(作为对照的普通小麦品种阿勃幼胚离体培养的为 8.47%),通过第 2 次减数分裂形成五、六分体(图版 I:3)数占总细胞数的 10.3%。二稜大麦与瓦维洛夫黑麦杂种幼胚再生植株的幼苗的叶鞘也呈紫色,株型倾向于大麦,部分可育,但有分枝穗、双穗、茎分枝和茎卷曲等现象。栽培二粒小麦和大赖草的再生植株的株高明显低于双亲,高度不育,穗变长,小穗密度变稀,颖壳窄长,出现穗分枝。栽培二粒小麦与大赖草的减数分裂中期 I、后期 I,普通小麦×大赖草的后期 I 也出现大量游离或落后染色体(图版 I:4)。

### 三、讨 论

本研究的技术要点是,在补加生长素 NAA、IAA 与细胞分裂素 KT 和有机氮 CH 的 White 固体培养基上,培养授粉后 15 天左右的杂种幼胚,可诱导麦类作物的多种种间、属间杂种幼胚成苗。此种离体培养幼胚的方法的成苗率较高,不但是一种克服远缘杂交不亲和性的有效方法,而且有如下特点:一是培养物不经过愈伤组织阶段,可避免远缘杂交的变异与离体培养中产生的变异相混;二是从原胚直接诱导成苗,体细胞分化成苗的可能性很小。当然,这还需要在今后的工作中,对杂种胚胎发育过程的观察和离体培养过程中产生变异的原因和方式进行专门研究,来进一步证实上述论点。

### 参 考 文 献

- 双志福、王振富、降彩霞、张瑞仙、李昌华、李青芳,1984,节节麦与小麦、黑麦或小黑麦的杂种幼胚的离体培养,遗传学报,11(6): 461—465。
- 付杰、陈淑阳、张安静,1987,小麦-簇毛麦杂种幼胚无性系的建立及植株再生的研究,西北植物学报,7(1): 37—44。
- 朱德水,1986,活体胚乳法培养小麦杂种幼胚的研究简报,植物生理学通讯,(5): 45—47。
- 陈朱希昭、陈孝、张文洋、杜振华,1984,栽培大麦×普通小麦杂种发育的胚胎学观察,遗传学报,11(5): 368—373。
- 陈孝、杜振华、张文洋、君福玉、徐惠君、朱至清,1984,栽培大麦×普通小麦杂种及其再生植株,作物学报,10(1): 65—71。
- 李浚明、朱涓、蔡体树,1984,大-小麦杂种幼胚愈伤组织的诱导和植株再生,科学通报,(6): 1009—1011。
- 李浚明、朱涓、蔡体树,1985,栽培大麦×普通小麦属间杂种的无性系变异,遗传学报,12(6): 434—439。
- 周之杭、杜荣寿、安祝平、俞新大、蒋志青、胡秀英,1979,大麦和小麦杂种胚的离体培养及杂种幼苗的形态和染色体观察,遗传学报,6(3): 343—348。
- 徐智宏,1985,植物体细胞的遗传变异,遗传,7(6): 37—40。
- 章力建,1987,小麦未成熟胚诱生大量绿苗的研究初报,遗传学报,14(3): 175—178。
- 梁竹青、高明尉、成雄鹰,1988,供育种用的小麦未成熟胚离体培养技术研究,作物学报,14(2): 137—142。
- 裘文达,1984,园艺植物组织培养,上海科学技术出版社。
- Edward C. Yeung, Trevor A. Thorpe and C. John Jensen, 1978, In vitro, Fertilization and embryo culture. *Plant tissue culture methods and applications in agriculture*, Academic Press, London, 253—271.

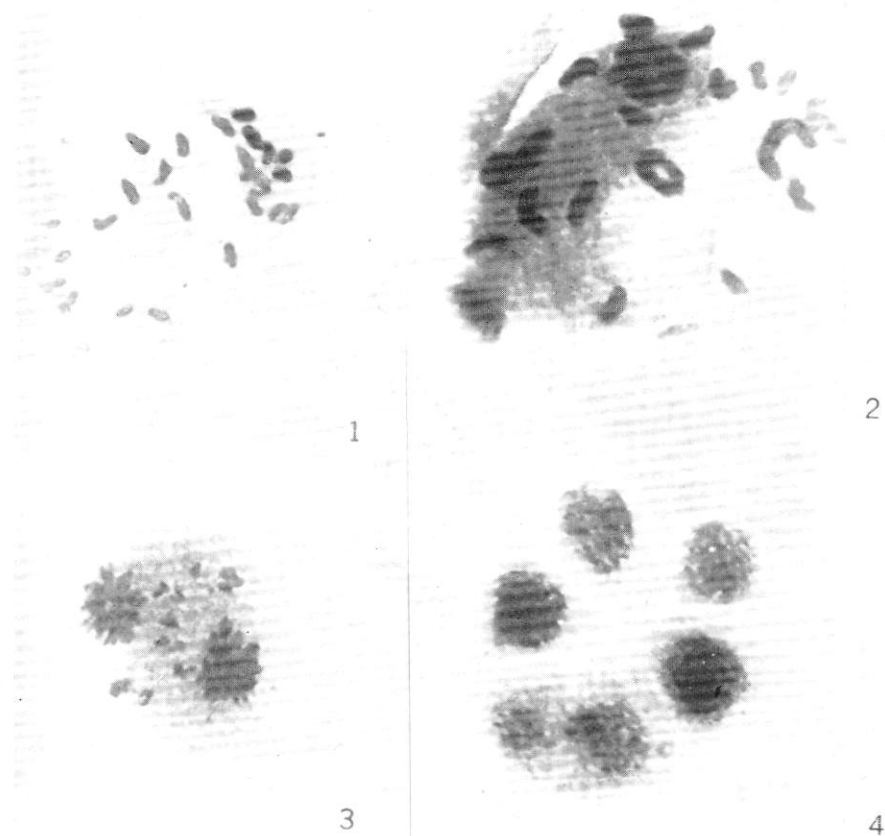
## APPLICATION OF IMMATURE EMBRYO CULTURE OF INTERSPECIFIC OR INTERGENERIC HYBRIDS IN TRITICEAE

Zhao Xulan, Chen Jixian, Gao Guoqiang, Feng Haisheng and Sun Linan

(Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining)

The immature hybrid embryos from eighty interspecific or intergeneric hybridized combinations were in vitro culture. It is one of the methods overcoming the incompatibility of the remote hybridizations to culture hybrid embryos. In the same cross combinations, the average percentage of set seeds by normally crossing was 0.8—42.9%, but the regeneration rate of the green plantlets by immature embryo culture procedures was 82—100%. The optimum stage of the immature embryos used as explant is ranged from 12 to 18 days after pollination. The medium for the immature hybrid embryo culture with high regeneration rate of the green plantlets was White+NAA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L+Kinetin 0.5 mg/L+Casein 300 mg/L+Sucrose 5%.

**Key words:** Triticeae; Immature embryo culture; Explant; Regenerated plant



普通小麦×瓦维洛夫黑麦 1.中期I具28个染色体, 2.中期I具1个环状二价体和1个环状三价体, 3.六分体

普通小麦×大赖草 4.落后染色体。

*T. aestivum* × *Secale vavilovii* 1. With 28 chromosome at Metaphase I, 2. One ring bivalent and one ring trivalent at Metaphase I, 3. Hexad

*T. aestivum* × *Leymus giganteus*, 4. Lagging chromosome.