

人工合成冬性六倍体小麦的研究

闫贵云, 孙 玉, 左静静, 牛瑜琦, 冯瑞云, 霍利光, 刘少翔

(山西省农业科学院作物科学研究所, 太原 030031)

摘要:以冬性四倍体硬粒小麦(*Triticum durum*, $2n = 28$, AABB)为母本与粗山羊草(*Aegilops tauschii*, $2n = 14$, DD)杂交,得到的单倍体幼胚($n = 21$, ABD)经组织培养拯救,获得的幼苗经染色体加倍而成为合成小麦(AABBDD)。从中鉴定、筛选出冬性的合成小麦。幼胚仅在1/2 MS培养基上培养,成苗率为75.81%;根据幼胚的发育状态,将发育较完善的幼胚直接接种在1/2 MS培养基上,将发育不良的幼胚先接种于1/2 MS + 2 mg/L 2,4-D培养基上进一步养育幼胚,之后视幼胚发育状况再将其转入1/2 MS培养基中培养成苗,此方法的成苗率为92.44%,较前者的成苗率提高了16.63%。染色体加倍在冬季塑膜拱棚内用0.05%秋水仙素进行半根法处理,较容易获得健壮苗,并且分蘖多。

关键词:硬粒小麦;粗山羊草;染色体加倍;冬性合成小麦

Development of Winter Synthetic Hexaploid Wheat

YAN Gui-yun, SUN Yu, ZUO Jing-jing, NIU Yu-qi, FENG Rui-yun, HUO Li-guang, LIU Shao-xiang

(Institute of Crop Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031)

Abstract: Immature haploid embryos ($n = 21$, ABD) were obtained by crossing durum wheat (*Triticum durum*, $2n = 28$, AABB) as the female parent and *Aegilops tauschii* ($2n = 14$, DD) as the male parent. The haploid embryos were rescued by tissue culture. The plantlets regenerated were treated with colchicine to double their chromosomes and the synthetic wheat with winter growth habit was produced. The regeneration percentage of haploid plantlets was only 75.81% using 1/2 MS medium, but 92.44% haploid plantlets were obtained when the immature embryos were cultured on 1/2 MS medium and 1/2 MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D alternately. The medium alternation was based on the development of immature embryos. If immature embryo developed well, 1/2 MS medium would be used; otherwise 1/2 MS medium containing 2 mg/L 2,4-D would be used. The poorly developed immature embryos grew well on the medium containing 2 mg/L 2,4-D, and then they were moved to 1/2 MS medium to produce more plantlets. Double haploid plantlets (AABBDD) were gained by using 0.05% colchicine with method of half-root in greenhouse in winter.

Key words: durum wheat; *Aegilops tauschii*; chromosome doubling; winter synthetic wheat

粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 与普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的 D 染色体组完全同源^[1], 并含有丰富的抗病^[2-4]、抗虫、优质亚基^[5]、耐旱、耐寒^[6]及耐盐等优异基因^[7-8], 其遗传多样性远比小麦的 D 染色体组丰富。因此, 粗山羊草是改良普通小麦的宝贵遗传资源。国内外研究表明, 粗山羊草与普通小麦直接杂交难度大、杂种自交不育及后代

稳定慢^[9-10], 通过四倍体小麦-粗山羊草的合成小麦与普通小麦杂交不但克服了这些困难, 还可积累四倍体小麦的优异基因。

迄今, 在我国育种应用中, 使用的硬粒小麦 (*T. durum* Desf.)-粗山羊草合成小麦多来自 CIMMYT, 而这些合成小麦大多是春性的, 并不适宜我国冬麦区育种使用。因此, 使用在北方适应性表现比较好

收稿日期:2015-09-16 修回日期:2015-05-29 网络出版日期:2015-09-16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150916.1044.006.html>

基金项目:山西省科技攻关项目(2007031001-2);山西省国际合作项目(2013081009)

第一作者研究方向为小麦远缘杂交与育种。E-mail: yanguiyun9999@126.com

通信作者:刘少翔, 研究方向为小麦远缘杂交与育种。E-mail: shaoliangliu@126.com

的冬性硬粒小麦同粗山羊草进行合成小麦的研究,是北方麦区小麦育种中迫切需要进行的工作。本项目研究旨在合成在冬麦区表现优良的硬粒小麦-粗山羊草双二倍体,建成一套适于北方冬麦区和黄淮海冬麦区使用的将粗山羊草中优异基因向小麦转导的适宜的桥梁体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

配置杂交组合所用母本为四倍体硬粒小麦 DR116、CRDW24、MvTD14-00、MvTD28-04 和 DT94-1,父本粗山羊草分别为 RM0192、Y223、Y207、Y204、Mo5034 和 Y168,其中 DT94-1 来自山西省农业科学院高寒区作物研究所,其他材料均来自中国农业科学院作物科学研究所,粗山羊草分 3 次播种,每次间隔为 7 d,以保证二者花期相遇。

1.2 方法

1.2.1 杂交授粉 杂交按常规方法适时去雄、套袋。大约去雄后 2 d 柱头成熟时用新采集的粗山羊草花粉授粉,之后套袋。

1.2.2 幼胚培养 授粉后 12~14 d 将授粉穗采回,小心取出颖果。用 75% 酒精灭菌 5 min,再用 0.1% 的升汞灭菌 5 min,经无菌水冲洗后,在超净工作台上完整地取出幼胚培养在备好的固体培养基上。幼胚培养的方法有 2 种:①将发育较差的幼胚培养于添加 2 mg/L 2,4-D 的 1/2 MS 培养基上,发育良好的幼胚培养于不添加 2,4-D 的 1/2 MS 培养基上。2 种培养基均添加 2% 的蔗糖,pH 值 5.8。②将幼胚只接种于无激素的 1/2 MS 培养基上;培养温度为 23 ± 1 °C,光强 1500 lx,每天光照 12 h。

1.2.3 转换培养 出苗后,每天光培养 12 h,温度 23 ± 1 °C,光照强度 3000~5000 lx,暗培养温度为 4~8 °C。按照上述(1)方法培养的幼胚,培养 3 d 后,在含 2 mg/L 2,4-D 的 1/2 MS 培养基上萌动的幼胚及时转入无激素 1/2 MS 培养基上;在无激素 1/2 MS 培养基上不能萌动的幼胚要及时转入含 2 mg/L 2,4-D 的 1/2 MS 培养基中,待萌动后再转入无激素的 1/2 MS 培养基上进行培养。

1.2.4 染色体加倍 试验借鉴摩擦禾或玉米花粉刺激小麦单倍体幼胚的苗加倍经验^[9],用半根法加倍。具体做法:于晚秋将培养基中的无菌苗栽到靠墙的阳畦,当气温低于 0 °C 时,要搭塑膜小拱棚,白天气温高于 15 °C 时将塑膜揭开。待苗壮并具分蘖时,用半根法将根浸入 0.05% 秋水仙素中加倍,加

倍时间为 8 h。

1.2.5 数据计算 成胚率(%) = 幼胚数/杂交花数 × 100%;成苗率(%) = 成苗数/接种胚数 × 100%。

1.2.6 数据分析 采用 Excel 2007 和 SPSS 18.0 进行统计分析,采用 LSD 方法进行分析,显著性概率是 0.05。

1.2.7 染色体数目鉴定 合成小麦染色体 F₁ 数目鉴定制片观察采用醋酸洋红染色法^[10]。将种子消毒后在室温条件下用水浸泡 24 h 左右(种子露白),均匀置于铺有吸水纸的培养皿中,腹沟向下,在 18~22 °C 下培养 12 h,转移至 1~4 °C 冰箱中处理 12 h,再转移到培养箱中。如此反复直至根长达到 1.5~2.0 cm。上午 9~11 时剪下根,并放于 0~4 °C 冰水混合物中预处理 24 h,然后用卡诺固定液固定 24 h,用 1 mol/L 的 HCl 在 60 °C 的恒温下水解 8 min。用清水清洗后在洋红染液中染色 24 h,再用 45% 的冰醋酸压片,在 OLYMPUS IX51-A12PH 观察、记录各材料染色体数目及其随体的数目并拍照。

2 结果与分析

2.1 高成胚率的获得

以硬粒小麦与粗山羊草杂交,授粉后 13 d 统计杂交穗的结实率,10 个杂交组合中以 DR116 × Y204 成胚率最高为 29.17%,CRDW24 × Y207 成胚率最低为 10.20%,10 个杂交组合的成胚率均超过 10.0% (表 1)。

表 1 硬粒小麦与粗山羊草杂交成胚率

Table 1 Frequencies of embryos by crossing durum wheat with *Aegilops tauschii*

杂交组合 Cross combination	杂交花数 No. of florets pollinated	成胚数 No. of embryos obtained	成胚率(%) Rate of embryos
CRDW24 × Y207	880	90	10.20
DR116 × Mo5034	600	64	10.67
DR116 × RM0192	220	40	18.18
DR116 × Y204	120	35	29.17
DR116 × Y223	500	60	12.00
DT94-1 × Y207	600	90	15.00
Mv TD14-00 × Y204	360	48	13.33
Mv TD14-00 × Y207	720	75	10.42
Mv TD28-04 × Y168	104	11	10.58
Mv TD28-04 × Y207	540	70	12.96

2.2 胚培养的成苗率

对幼胚进行动态调整培养和只在无激素的 1/2 MS 培养基上培养的成苗率进行比较分析(表 2),10 个杂交组合的幼胚只在无激素的 1/2 MS 培养基上培

养,成苗率为 72.55%;根据幼胚具体发育状态用无激素的 1/2 MS 培养基和含 2 mg/L 2,4-D 的 1/2MS 培

养基调整培养,成苗率则为 91.43%,后者比前者提高了 18.88%。且获得的幼苗根系发达、生长健壮。

表 2 两种不同培养条件下幼胚的成苗比较

Table 2 Percentages of plantlets from the embryos cultured under different conditions

杂交组合 Cross combination	调整培养 Adjust medium			1/2MS 培养基 1/2MS medium		
	接种胚数 No. of embryos inoculated	成苗数 No. of plantlets	成苗率(%) Rate of plantlets	接种胚数 No. of embryos inoculated	成苗数 No. of plantlets	成苗率(%) Rate of plantlets
	DR116 × Mo5034	25	23	92.00	37	30
CRDW24 × Y207	42	40	95.24	40	32	80.00
DR116 × Y223	22	20	90.09	25	21	84.00
DR116 × Y204	25	23	92.00	30	20	66.67
DR116 × RM0192	35	32	91.43	40	24	60.00
DT94-1 × Y207	41	40	97.56	38	25	65.79
Mv TD14-00 × Y204	15	13	86.67	18	11	61.11
Mv TD14-00 × Y207	20	17	85.00	30	21	70.00
Mv TD28-04 × Y207	27	23	85.19	28	22	78.57
Mv TD28-04 × Y168	28	25	89.29	20	16	80.00
合计 Total	280	256	91.43	306	222	72.55

2.3 合成小麦的农艺性状及抗冻性

为了有效利用杂交组合,在田间每个材料随机调查 15 株,对其有效分蘖数、株高、穗长、穗粒数等性状进行方差分析,并将 LSD 方法测验结果列入表 3。结果显示,不同杂交组合之间的各项农艺性状均存在极显著的差异。从有效分蘖数来看,杂交组合 DT94-1 × Y207 单株有效分蘖数最高,为 16.7, Mv TD28-04 × Y168 有效分蘖数最低,为 8.0;从株高来看,DT94-1 ×

Y207 株高最高,为 114.0 cm, Mv TD14-00 × Y204 株高最低,为 83.0 cm;从穗长来看,DT94-1 × Y207 穗长最长,为 13.7 cm, Mv TD28-04 × Y168 穗长最短,为 10.7cm;从穗粒数来看,DT94-1 × Y207 穗粒数最多,单穗结实为 46.3 粒, Mv TD28-04 × Y168 穗粒数最少,为 39.0 粒。综合各农艺性状来看,DT94-1 × Y207 在穗长和穗粒数方面较好(图 1);而 Mv TD28-04 × Y168 株高虽较低,但其他农艺性状较差。

表 3 合成小麦主要农艺性状

Table 3 Characteristics of the synthetic wheat

杂交组合 Cross combination	分蘖数 No. of tillers	株高(cm) Plant height	穗长(cm) Spike length	穗粒数 Seeds per spike
CRDW24 × Y207	13.0 ± 0.6bc	98.9 ± 0.9c	12.7 ± 0.3b	44.7 ± 0.3a
DR116 × Mo5034	14.0 ± 0.6ab	93.3 ± 0.9d	11.7 ± 0.3cd	41.0 ± 0.6bcd
DR116 × RM0192	15.0 ± 0.6a	105.7 ± 3.5b	11.8 ± 0.2bc	40.0 ± 0.6cde
DR116 × Y233	13.7 ± 0.3ab	94.0 ± 0.6d	11.7 ± 0.3bc	41.7 ± 0.8bc
DR116 × Y204	12.0 ± 0.6c	103.7 ± 0.9b	12.2 ± 0.2bc	42.3 ± 0.9b
DT94-1 × Y207	16.7 ± 0.3c	114.0 ± 0.6a	13.7 ± 0.3a	46.3 ± 0.7a
Mv TD14-00 × Y204	13.0 ± 0.7bc	83.0 ± 1.5e	11.7 ± 0.3cd	41.0 ± 0.6bcd
Mv TD14-00 × Y207	10.0 ± 0.6d	93.0 ± 1.7d	10.8 ± 0.4de	39.3 ± 0.3de
Mv TD28-04 × Y168	8.0 ± 0.6e	89.7 ± 1.5d	10.7 ± 0.3e	39.0 ± 0.6e
Mv TD28-04 × Y207	13.0 ± 0.6bc	91.3 ± 1.5d	11.7 ± 0.3cd	42.0 ± 0.6b

为了验证本试验中加倍植株的可靠性,对加倍获得成功 10 个杂交组合植株 F₁ 种子根尖细胞染色体数目进行了鉴定,结果为 2n = 42,图 2 显示的是 DT94-1 × Y207 根尖染色体数目。这些合成小麦在 2013 年 10 月 1 日播种于山西省晋中市东阳试验地,在 2014 年 1 月 20 日最低温度为 -20 °C 的情况下,该 10 个杂交组合都能够安全越冬。

3 讨论

为了提高单倍体幼胚成苗率,很多研究都是在不

同培养基上添加一定浓度的生长素与细胞分裂素^[11-12]。本研究利用无激素 1/2 MS 培养基,对发育良好的幼胚进行培养,获得良好的结果。但是,表面看起来完美的幼胚,也可能发育不良。发育好的胚在 1/2 MS 培养基培养 48 h 便开始萌动。在该培养基上 3~4 d 后仍然不能萌动的胚,如继续培养下去将会死亡,及时将其转入含 2 mg/L 2,4-D 的 1/2 MS 培养基中,会促使幼胚的萌发。以前研究有添加 6-BA 和 IAA 等激素^[13],而本研究使用 2,4-D 对促进愈伤组

织向胚状体发育是有利的。该研究将发育不完善的胚,及时转入含 2 mg/L 2,4-D 的 1/2 MS 培养基中,2,4-D 可促进幼胚进一步发育完善。但是培养时间不能太长,否则会诱导出愈伤组织,导致幼胚不能形成植株。对于肉眼感觉发育不良的幼胚可直接接种于含 2,4-D 的培养基中,培养 3~4 d,在其未诱导出愈伤组织之前及时转入无激素 1/2MS 培养基中,在 2,4-D 的作用下得到进一步发育的幼胚会正常出苗。



图1 DT94-1 × Y207 单株大田长势

Fig. 1 Single plant with DT94-1 × Y207

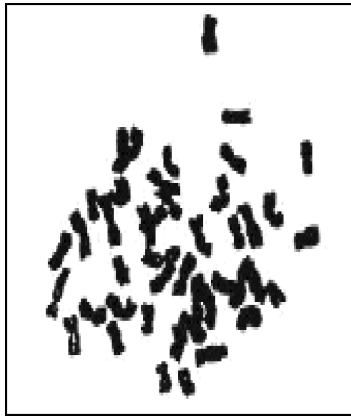


图2 DT94-1 × Y207 根尖染色体数目 ($2n = 42$)

Fig. 2 Somatic chromosome number in the root tip cell of the cross DR94-1 × Y207 ($2n = 42$)

人工合成体小麦具有丰富的遗传多样性,对白粉病不同菌株的抗性反应不同于已知抗病基因,可能含有未知或新的抗病基因^[14],对禾谷孢囊线虫、纹枯病、条锈病和叶锈病的也有很好抗性^[15]。粗山羊草是禾谷孢囊线虫的一个抗源^[16],粗山羊草 2D 染色体携带 *Cre3* 和 *Cre4* 2 个抗禾谷孢囊线虫基因^[17]。R. F. Eastwood 等^[18]报道一个人工合成小麦品系也携带

Cre3 基因。*Cre3* 基因与位于 2D 染色体长臂端部的 *NBS-LRR* 家族 *R* 基因成员有关^[19]。该基因对某些 *H. avenae* 致病性具有很好的抗性,能够有效地降低土壤中的线虫孢囊数量^[20]。对新获得的人工合成小麦进行鉴定,可能发掘出新的小麦抗源。

参考文献

- [1] Jaaska V. Aspartate aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes; intraspecific differentiation in *Aegilops tauschii* and the origin of the D genome polyploids in the wheat group [J]. *Plant Syst Evol*, 1981, 137: 259-273
- [2] 孔令让,董玉琛. 粗山羊草抗小麦白粉病基因遗传多样性的研究[J]. *作物学报*, 1997, 23(2): 176-180
- [3] Gill B S, Rauppe W J, Sharma H C. et al. Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and Hessian fly [J]. *Plant Dis*, 1986, 70: 553-556
- [4] 张海泉,贾继增,杨虹,等. 来自粗山羊草抗条锈病基因的 SSR 标记[J]. *遗传*, 2008, 30(4): 491-494
- [5] Gill B S, Sharma H C, Rauppe W J, et al. Evaluation of *Aegilops* species for resistance to wheat powdery mildew, wheat leaf rust, Hessian fly and greenbug [J]. *Plant Dis*, 1985, 69: 314-316
- [6] Limin A E, Fowler D B. Cold hardiness of some relative of hexaploid wheat [J]. *Can J Genet Cytol*, 1981, 59: 572-573
- [7] Cox T S, Sears G R, Beguette K R. Use of winter wheat × *Triticum tauschii* back cross populations for germplasm evaluation [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 571-577
- [8] 孔令让,董玉琛,贾继增. 普通小麦与粗山羊草属间杂种的染色体构型及其后代的育性特征[J]. *实验生物学报*, 1997, 30(1): 35-44
- [9] 季道藩. 遗传学实验[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 3-6
- [10] 孙敬三,刘辉,路铁刚,等. 利用小麦 × 玉米获得小麦单倍体[J]. *植物学报*, 1992, 34(11): 817-821
- [11] 陈新民,赖桂贤,陈孝,等. 不同小麦组合与玉米杂交产生单倍体的差异[J]. *作物学报*, 1996, 22(4): 438-441
- [12] Riera-Lizarazu O, Mujeeb-Kazi A. Maize (*Zea mays* L.) mediated wheat (*Triticum aestivum* L.) polyploid production using various crossing methods [J]. *Cereal Res Commun*, 1990, 18: 339-343
- [13] 李宝平,茹文明. 植物组织培养技术[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 84-87
- [14] 张宁,陆鸣,宋风景,等. 人工合成小麦对白粉病的抗性评价[J]. *河北农业大学学报*, 2013, 36(1): 6-10
- [15] 武小菲,李洪杰,王晓鸣,等. 28 份人工合成小麦对禾谷孢囊线虫、纹枯病、条锈病和叶锈病的抗性[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(6): 1221-1226
- [16] Eastwood R F, Lagudah E S, Appels R, et al. *Triticum tauschii*: a novel source of resistance to cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) [J]. *Aust J Agric Res*, 1991, 42: 69-77
- [17] McIntosh R A, Yamazaki Y, Dubcovsky J, et al. Catalogue of gene symbols for wheat [M]//Proc 11th Int Wheat Genet Symp. Australia: University of Sydney Press, 2008
- [18] Eastwood R F, Lagudah E S, Halloran C M, et al. Resistance to cereal cyst nematode in *Triticum tauschii* [M]//Imrie B C, Hacker J B. Focused plant improvement: towards responsible and sustainable agriculture. Canberra: Conference Organising Committee, 1993: 7-18
- [19] Lagudah E S, Moullet O, Appels R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat [J]. *Genome*, 1997, 40: 659-665
- [20] Safari E, Gorora N N, Eastwood R F, et al. Impact of *Cre1*, *Cre8* and *Cre3* genes on cereal cyst nematode resistance in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 567-572