

小偃22 幼胚体细胞胚性无性系的诱导*

李璟琦¹, 王成社²

(1 陕西教育学院 生命科学系, 陕西 西安 710061;

2 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用田间取样和室内培养的方法, 研究了不同幼胚发育时期、盾片接种方式和状态、4 预处理时间对小偃22 幼胚体细胞胚性无性系诱导的影响。结果表明: (1) 小偃22 未成熟种子长度占颖壳长度比例为60%~80%时, 幼胚处于半透明向淡黄色过渡状态, 其愈伤组织诱导率达到95%以上, 胚性愈伤组织诱导率达到46.1%~49.4%, 此时是幼胚最佳培养时期。(2) 未成熟籽粒在4℃冰箱保湿保存3 d内可陆续接种, 幼胚愈伤组织诱导率在95%以上, 胚性愈伤组织发生率达到34%~50%, 接种时应使盾片向上并保持完整状态。

[关键词] 小麦; 小偃22; 幼胚培养; 体细胞无性系; 盾片

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0139-03

小麦是世界上种植面积最大的粮食作物, 选育高产、优质、抗逆性强的小麦品种对小麦生产具有重要意义, 而外源优良基因的导入是获得优质小麦品种的重要途径。小麦幼胚体细胞胚性无性系, 在小麦的遗传饰变^[1-2]和品种改良中^[3]具有重要应用价值。通过幼胚建立体细胞胚性无性系已有很多报道^[1, 4-7], 但建立不依赖基因型的小麦体细胞胚性无性系技术体系还需要进一步深入研究。因此, 以栽培品种为基础建立和优化再生系统, 提高植株再生频率, 是小麦分子育种中一个亟待解决的重要课题。

小偃22 是利用小麦与长穗偃麦草杂交和回交选育而成的, 具有高产、稳产、优质、综合抗逆性强等优良农艺性状, 是陕西省小麦第6次更新换代的骨干品种, 符合小麦转基因受体的首要条件。有关激素、胚龄等因素对小偃22 幼胚体细胞胚性无性系的影响已有报道^[8-9]。本试验以小偃22 为材料, 研究了不同幼胚发育时期、盾片接种方式和状态、4 预处理时间对幼胚体细胞胚性无性系诱导的影响, 为建立以栽培品种小偃22 为基础的幼胚高效再生体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

1.1.1 供试材料 小偃22 幼胚, 采自陕西杨凌西北农林科技大学农学院小麦所试验田。

1.1.2 培养基及培养条件 愈伤组织诱导及继代培养基: MS + 2, 4-D 2.0 mg/L + KTQ 2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 4.0 g/L, pH 5.8。所有培养基在121℃高压灭菌20 min, 培养温度25~27℃, 暗培养, 每隔20 d转接培养1次。

1.2 方 法

1.2.1 材料选取与消毒 从小偃22 开花的第1天起挂牌, 开花10 d后, 剪取发育程度不同的麦穗置于4℃冰箱内保存。接种时将麦穗取出, 剥出未成熟籽粒, 在无菌条件下用体积分数70%乙醇浸泡1 min, 体积分数0.1%升汞(HgCl₂)消毒8 min, 无菌水冲洗3~4遍, 于超净台上用解剖刀挑取不同处理幼胚, 以不同方式接种于诱导培养基上。每处理接种10瓶, 每瓶10枚。

1.2.2 试验处理 (1) 不同幼胚发育时期对小偃22 幼胚培养特性的影响 根据未成熟种子长度占颖壳长度的比例, 选取所占比例分别为50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~90%和100% 5种不同发育时期的未成熟种子, 剥取幼胚进行接种处理。

(2) 不同盾片接种方式和状态对小偃22 幼胚培养特性的影响 按照盾片向上、向下放置方式和完整、破裂接种状态设4个处理, 分别选取未成熟种子长度占颖壳长度比例为60%~80%的幼胚进行接种。

(3) 4 预处理时间对小偃22 幼胚培养特性的

* [收稿日期] 2005-09-14

[基金项目] 国家“863”计划项目(2001AA241037); 陕西省科技攻关项目(2001K02-G2)

[作者简介] 李璟琦(1967-), 女, 陕西杨凌人, 副教授, 主要从事农业生物技术研究。

影响。从麦穗上剥下小偃 22 的未成熟种子,用保鲜膜包裹后置于 4℃ 冰箱,分别保存 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 20 d 后,再剥取幼胚接入愈伤组织诱导培养基中培养。

1.3 数据统计

从幼胚接种第 2 天起逐日统计产生愈伤组织数、胚性愈伤组织数、愈伤组织数、发芽胚数、接种幼胚数,计算愈伤组织诱导率、胚性愈伤组织诱导率和胚芽率。

愈伤组织诱导率/% = 产生愈伤组织数/接种幼

胚数 × 100%;
胚性愈伤组织诱导率/% = 胚性愈伤组织数/愈伤组织数 × 100%;
胚芽率/% = 发芽胚数/接种幼胚数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同幼胚发育时期对小偃 22 幼胚培养特性的影响

不同胚发育时期对小偃 22 幼胚培养特性的影响结果见表 1。

表 1 不同幼胚发育时期对小偃 22 幼胚培养特性的影响

Table 1 Age effect of immature embryos on the somaclones induction in Xiaoyan 22

未成熟种子外观形态 Young seed form			幼胚发育状态 Immatured embryo growth state		愈伤组织诱导率/% Frequency of callus induction	胚性愈伤组织诱导率/% Frequency of embryonic callus induction
种子长度占颖壳长度比例/% Seed length/grain husk	颜色 Color	绒毛 Down	幼胚长度/mm Length	颜色质地 Quality		
50~ 60	白色 White	无 No down	0.2~ 0.5	透明 Transparent	68.7	55.8
60~ 70	嫩绿色 Light green	多 Lots of down	0.5~ 0.8	半透明 Translucent	95.6	49.4
70~ 80	嫩绿色 Light green	多 Lots of down	0.8~ 1.0	淡黄色 Light yellow	100	46.1
80~ 90	绿色 Green	较少 A little	1.0~ 1.5	乳白色 Milky white	100	36.5
100	绿色 Green	无 No down	1.5~ 2.0	白色 White	100	12.7

由表 1 可以看出,当未成熟种子长度占颖壳长度比例高于 80% 时,幼胚处于乳白色或白色状态,长度超过 1.0 mm,愈伤组织诱导率达到 100%,但胚性愈伤组织诱导率低于 36.5%;未成熟种子长度占颖壳长度比例为 60%~ 80% 时,幼胚处于半透明或淡黄色状态,长度为 0.5~ 1.0 mm,愈伤组织诱导率达到 95.6%~ 100%,胚性愈伤组织诱导率较高,达到 46.1%~ 49.4%;未成熟种子长度占颖壳长度比例低于 60% 时,幼胚处于无色透明状态,长度为 0.2~ 0.5 mm,胚性愈伤组织诱导率较高,达到 55.8%,但愈伤组织诱导率较低,仅为 68.7%,幼

胚也很难挑出,无菌操作困难。因此,在幼胚体细胞胚性无性系培养时,以选择未成熟种子长度占颖壳长度比例为 60%~ 80%,长度为 0.5~ 1.0 mm,色泽处于由半透明向淡黄色过渡状态的幼胚接种,能诱导出较好的愈伤组织。在陕西杨凌地区 14 d 胚龄的小偃 22 幼胚基本符合这些特征,是最佳的培养时期。

2.2 不同盾片接种方式和状态对小偃 22 幼胚培养特性的影响

小偃 22 幼胚盾片向上、向下接种方式及盾片完整与破裂接种状态对幼胚培养特性的影响见表 2。

表 2 盾片接种方式和状态对小偃 22 幼胚培养特性的影响

Table 2 Effects of inoculation method on the somaclones induction in Xiaoyan 22

盾片接种方式 Inoculation method of scutella	盾片状态 Scutella state	愈伤组织诱导率/% Frequency of callus induction	胚性愈伤组织诱导率/% Frequency of embryonic callus induction	胚芽率/% Frequency of embryo germination
向上 Scutella up	完整 Full scutella	100	48.1	11.5
	破裂 Broken cutella	100	28.7	24.3
向下 Scutella down	完整 Full scutella	100	12.6	41.2
	破裂 Broken cutella	100	9.8	57.6

表 2 表明,在不同接种方式和不同盾片状态下,愈伤组织诱导率一致,均达到 100%,但胚性愈伤组

织诱导率和胚芽率有较大差异。接种方式相同情况下,完整盾片的胚性愈伤组织诱导率高于破裂盾片,

其胚芽率低于破裂盾片; 无论盾片是完整还是破裂状态, 盾片向下接种易诱导幼胚萌发出芽, 而盾片向上接种的胚性愈伤组织诱导率较高。表明在小麦幼胚接种时, 在培养基上盾片应向上接种, 并且注意不要用解剖刀将盾片挑破, 保证盾片的完整状态。

2 3 4 预处理时间对小偃 22 幼胚培养特性的影响

由表 3 可以看出, 经过 1~ 3 d 的 4 低温处

理, 幼胚愈伤组织诱导率在 95% 以上, 胚性愈伤组织诱导率达到 34%~ 50%, 均高于未经过低温处理 (CK) 的幼胚材料; 4 低温处理 5 d 后, 幼胚愈伤组织诱导率低于 74%, 胚性愈伤组织诱导率低于 22%。因此, 用 4 冰箱保存幼胚材料的时间不宜过长, 以 3 d 内接入诱导培养基培养为宜。

表 3 4 预处理时间对小偃 22 幼胚培养特性的影响

Table 3 Effects of treatment time at 4 on the somaclones induction in Xiaoyan 22

处理时间/d Treatment time	愈伤组织诱导率/% Frequency of callus induction	胚性愈伤组织 诱导率/% Frequency of embryonic callus induction	处理时间/d Treatment time	愈伤组织诱导率/% Frequency of callus induction	胚性愈伤组织 诱导率/% Frequency of embryonic callus induction
0(CK)	90	31	5	74	22
1	100	50	7	63	12
2	100	48	14	13	3 7
3	95	34	20	2 7	0

3 讨 论

外植体生理状态对愈伤组织质量的影响接近于基因型^[10]。未成熟胚的生理状态与胚龄有关, 胚龄合适时形成愈伤组织速度快、质量高。多数研究者以小麦开花后 10~ 18 d 或直径 1~ 1.5 mm 的胚作为取材的衡量指标^[9, 11], 这种做法较为粗放, 不能把握最佳的取材时机。本试验经过观察比较认为, 仅用时间和体积作为取材指标不够全面, 而结合未成熟籽粒的外部形态判断更加实用。本研究结果表明, 对小偃 22 而言, 未成熟种子长度占颖壳长度比例为 60%~ 80% 时, 其幼胚正处于“半透明向淡黄色过渡”状态, 是最佳的培养时期, 本试验结果可准确判断和节省幼胚选取时间。

在取材过程中, 由于幼胚处于半透明至淡黄色

阶段的时间较短, 使接种前的取材时间非常集中, 接种压力较大, 容易造成鲜嫩幼胚失水老化而浪费材料。本试验结果表明, 幼穗选取后, 剥取未成熟籽粒, 在 4 冰箱低温保湿保存, 3 d 内陆续接种, 幼胚愈伤组织诱导率在 95% 以上, 胚性愈伤组织诱导率为 34%~ 50%, 可满足幼胚培养的要求, 大大缓解了接种压力。

在接种方式方面, 盾片向上或向下接种方式对幼胚培养特性影响的研究较多, 有学者^[4, 7]认为, 盾片向上接种有利于胚性愈伤组织的诱导, 本试验结果与此一致; 而盾片完整或破裂状态对幼胚培养特性影响的研究还未见报道, 本试验结果表明, 接种破裂状态的盾片不影响幼胚愈伤组织诱导率, 但降低了胚性愈伤组织诱导率, 增加了胚芽率。所以, 接种时应使盾片向上并保持完整状态。

[参考文献]

[1] 曹清波, 余毓君. 小麦幼胚愈伤组织和抗赤霉病体细胞的筛选[J]. 华中农业大学学报, 1991, 10(1): 9-15

[2] 郭丽娟, 姚庆筱, 胡启德, 等. 通过组织培养筛选小麦抗赤霉突变体的研究[J]. 遗传学报, 1992, 19(3): 259-265

[3] 张贵友, 何聪芳, 陈金山, 等. 小麦改良的方法与技术[J]. 生物工程进展, 1999, 19(4): 67-72

[4] 王常云, 王作全, 李晓亮, 等. 小麦幼胚离体培养育种技术研究[J]. 麦类作物, 1999, 19(1): 14-16

[5] 曾寒冰. 小麦未成熟胚离体培养的研究——愈伤组织的诱导及再生植株[J]. 华北农学院学报, 1988, 19(1): 1-8

[6] 叶新荣, 余毓君. 小麦幼胚培养中的体细胞胚胎发生[J]. 武汉植物学研究, 1999, 8(1): 75-78

[7] 安海龙, 卫志明, 黄建秋. 小麦幼胚培养高效成株系统的建立[J]. 植物生理学报, 2000, 26(6): 532-538

[8] 王睿辉, 陈耀锋, 高秀武, 等. 激素对小麦幼胚胚性无性系高频率诱导的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(1): 33-36

[9] 王睿辉, 陈耀锋, 梁虹, 等. 胚龄和基因型对小麦幼胚体细胞胚性无性系的诱导[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(4): 17-20

[10] 陆维忠, 郑企成. 植物细胞工程与分子育种技术研究[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 20-29

[11] 蔡体树, 田慧琴, 林书康, 等. 基因型和胚龄对小麦未成熟胚离体培养反应的影响[J]. 遗传学报, 1989, 16(2): 81-88

- [6] Netafin. Netafin Products Guide, 2001[EB/OL]. [2005-12-15]. <http://www.netafin.com>.
- [7] Nelson. Nelson Products Guide 2000[EB/OL]. [2005-12-15]. <http://www.nelson.com>.
- [8] 杨纪伟. 调节阀流量调节理论研究[J]. 流体机械, 2003, 31(2): 24-26
- [9] 梁学进, 郑明军, 谷 勇. 基于变频控制技术的压力调节方法[J]. 石油仪器, 2005, 19(1): 17-20
- [10] 何武全, 王玉宝. 基于变频恒压控制下的喷微灌单元设计法及应用[J]. 灌溉排水学报, 2005, 24(8): 33-35
- [11] 徐立新, 安慧斌, 孟宪耀, 等. 自力式压力调节阀的改进[J]. 煤气与热力, 2003, 23(3): 158-159
- [12] 吕谋超, 彭贵芬, 杨跃辉, 等. 微灌流量调节器的研制与应用[J]. 灌溉排水, 2001, 20(9): 29-32
- [13] 胡小平, 王长发. SAS 基础及统计实例教程[M]. 西安: 西安地图出版社, 2001.
- [14] 吴持恭. 水力学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1979.

Development of the pressure regulator for large flow in lower-pressure drip irrigation system

ZANG Li-hua, NIU Wen-quan, WU Pu-te

(Northwest A & F University, Institute of Soil and Water Conservation Chinese Academy of Sciences and Water Resources Ministry,
National Engineering Research Center for Water-saving Irrigation at Yangling, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The lower-pressure drip irrigation system is sensitive to pressure, yet the existing pressure regulators don't fit in with the system. In this paper, the author discusses the structure of pressure regulator with double flow channel and the data show that the device structure and the spring diameter are more important to keep the pressure stable than the other factors when the setting inlet pressure is the 0.05-0.35 MPa, and outlet pressure is 0.1 MPa. With the spring diameter 1.5 mm and the spring length 80 mm and the interspaces are 10 mm. The pressure regulating performance of the double flow channel device is better, the test inlet pressure is 0.049-0.32 MPa, outlet pressure 0.045-0.144 MPa, and the flow is 3.4-6.6 m³/h.

Key words: lower-pressure drip irrigation system; pressure regulator; pressure regulating performance; irrigation technology

(上接第 141 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)07-0139-EA

Embryogenic somaclones induction derived from immature embryos in Xiaoyan 22

LI Jing-qí¹, WANG Cheng-she²

(1 Department of Life Sciences, Shaanxi Institute of Education, Xi'an, Shaanxi 710061, China;

2 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: As an experiment material, Xiaoyan 22 was taken from field and cultured in the greenhouse to study inoculation methods and scutella state of Xiaoyan 22 immature embryos of different embryo sizes at 4 treatment time. The results showed: (1) When young seed length/grain husk was from 60 percent to 80 percent, the immature embryo was in a period of transition from semi-transparent to light yellow. The frequency of callus induction was above 95.6 percent. The frequency of embryonic callus induction was from 46.1 percent to 49.4 percent. The phase is just the time to culture immature embryos. (2) Young seeds were preserved at 4 refrigerator with plastic film and inoculated within three days for alleviating the induction tension. The frequency of callus induction of immature embryos was above 95 percent. The frequency of embryonic induction was from 34 percent to 50 percent when the scutellas were inoculated on the culture medium, they were maintained up and full.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.); Xiaoyan 22; immature embryo culture; embryogenic somaclone; scutellas