

激素对小麦幼胚胚性无性系高频率诱导的影响

王睿辉, 陈耀锋, 高秀武, 秦震霓, 任惠莉, 韩德俊, 梁虹

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 研究了3种外源激素对3个小麦品种(系)幼胚体细胞胚性无性系高频率形成的影响。结果表明: 2, 4-D 能显著促进小麦幼胚体细胞胚性无性系的形成, 并存在着基因型间的差异, 在小麦体细胞无性系形成中起主要作用。其最佳适用质量浓度为2.0~3.0 mg/L, 2, 4-D 的这种作用能被培养基中加入的细胞分裂素所加强, 这种作用在不同的细胞分裂素间是有差异的, 在质量浓度0.1~2.0 mg·L⁻¹内, 随KT浓度的升高, 6-BA浓度的降低, 胚性愈伤诱导率提高。

[关键词] 小麦; 外源激素; 幼胚; 胚性无性系

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0033-04

由植物离体组织或器官诱导产生的体细胞胚性无性系, 是进行作物遗传修饰^[1,2]的基础材料和进行基因操作^[3]的理想受体。当前, 这一技术的关键问题之一就是体细胞胚性无性系的高频率获得。在小麦上, 可产生体细胞胚性无性系的途径很多^[3], 其中幼胚培养是比较常用的方法之一。通过幼胚培养建立体细胞胚性无性系已有很多报道^[1,4~7], 但建立起不依赖于基因型的小麦体细胞无性系高频率产生技术体系还需要继续探索。本研究就2, 4-D, KT和6-BA等3种外源激素对小麦幼胚体细胞胚性无性系高频率产生的影响进行了研究, 试图为这一系统的建立寻找一条行之有效的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的3个小麦品种(系)为西北农业大学细胞工程实验室田间种植的花育888、小偃22和WT59。

1.2 方法

于开花后10~13 d取样, 剥出籽粒于无菌条件下用体积分数为70%乙醇漂洗8 s, 体积分数为0.1% HgCl₂消毒8 min, 无菌水洗3次, 用镊子剥出幼胚接种于诱导培养基中, 基本培养基为MS培养基, 附加不同的激素种类和质量浓度设置不同的处理。所有的处理均含30 g/L蔗糖, 5 g/L琼脂, pH为5.6~5.8。常规方法灭菌。

接种后的培养瓶于2 000~3 000 lx光照, (25

±3) 条件下培养, 35 d后统计不同品种(系)不同处理的出愈率(出愈率=产生的愈伤组织块数/接入的幼胚数×100%)、平均鲜重增加量(g)(平均鲜重增加量=((继代后的愈伤组织鲜重-继代前的愈伤组织鲜重)/抽样数)和胚性愈伤组织诱导率(胚性愈伤组织诱导率=胚性愈伤块数/接入幼胚数×100%)。

2 结果与分析

2.1 2, 4-D对幼胚体细胞胚性无性系形成的影响

2, 4-D是小麦幼胚培养中常用的外源激素, 在KT为0.5 mg/L的MS培养基中, 附加不同质量浓度的2, 4-D, 研究了2, 4-D对3个小麦品种(系)的幼胚体细胞胚性无性系形成的影响, 结果(表1)表明: 不同质量浓度的2, 4-D对小麦幼胚体细胞胚性愈伤组织的诱导和平均鲜重增加两方面都存在着明显的影响。在所试验的范围内, 随培养基中2, 4-D质量浓度的提高, 胚性愈伤组织的诱导率和平均鲜重显著增加, 而达到一定质量浓度之后又随之下降, 3个品种(系)在胚性愈伤组织诱导率和平均鲜重增加量出现最高值时的2, 4-D质量浓度有所不同, 小偃22和花育888在3.0 mg/L时获得愈伤组织平均鲜重增加量和胚性愈伤诱导率最高, 而WT59则是在2.0~3.0 mg/L内效果较好, 表明较高质量浓度的2, 4-D能诱导胚性愈伤组织的形成与产生, 但质量浓度过高或超过某一阈值之后便对胚性愈伤组

[收稿日期] 2000-03-28

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2000K07-G1-01); 杨陵生物技术育种中心资助项目(99-8)

[作者简介] 王睿辉(1973-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事农业生物技术研究。

织形成不利; 这一阈值的大小因小麦品种(系)不同 而有所差异。

表 1 2, 4-D 对小麦幼胚体细胞胚性无性系形成的影响

Table 1 Effect of 2, 4-D on the induction of embryogenic somaclone derived from wheat							
品 种 Varieties	2, 4-D 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentra- tion of 2, 4-D	接入幼胚数 No. of immature embryos inoculated	产生愈伤数 No. of calli induced	出愈率/% Percentage of calli induced	平均鲜重 增加量/g Average increase of FW	产生胚性 愈伤数 No. of embryo- genic calli(EC) induced	胚性愈伤 诱导率/% Percentage of EC
花育 888 Huayu No. 888	1.0	30	30	100	0.070	17	56.00
	2.0	30	30	100	0.094	20	64.43
	3.0	30	30	100	0.097	22	74.29
	4.0	30	30	100	0.065	15	50.28
小偃 22 Xiaoyan No. 22	1.0	30	30	100	0.069	17	55.00
	2.0	30	30	100	0.094	20	65.97
	3.0	30	30	100	0.095	22	71.67
	4.0	30	30	100	0.066	19	63.20
WT59	1.0	30	30	100	0.072	17	58.33
	2.0	30	30	100	0.093	19	64.86
	3.0	30	30	100	0.080	19	62.50
	4.0	30	30	100	0.067	12	38.53

2.2 KT 对幼胚体细胞胚性无性系形成的影响

在附加 2.0 mg/L 2, 4-D 的 MS 培养基上附加不同质量浓度的 KT, 研究了 KT 对小麦幼胚胚性愈伤组织的诱导和愈伤组织鲜重的影响。结果(表 2)表明, KT 对小麦胚性愈伤组织诱导率和愈伤组织的生长量有显著的影响, 并存在着基因型间的差

异。在所试验的范围内, 花育 888 和小偃 22 随着培养基中 KT 质量浓度的提高, 愈伤组织的平均鲜重和胚性愈伤组织诱导率也逐步增加; 而 WT59 则在 KT 质量浓度为 0.1~1.0 mg/L 时, 愈伤组织的平均鲜重和胚性愈伤组织的诱导率随 KT 质量浓度的提高而增加, 之后随 KT 质量浓度的提高而下降。

表 2 KT 对小麦幼胚体细胞胚性无性系形成的影响

Table 2 Effect of KT on the induction of embryogenic somaclone derived from wheat							
品 种 Varieties	KT 质量 浓度/(mg · L ⁻¹) Concentra- tion of KT	接入幼胚数 No. of immature embryos inoculated	产生愈伤数 No. of calli induced	出愈率/% Percentage of calli induced	平均鲜重 增加量/g Average increase of FW	产生胚性 愈伤数 No. of embryo- genic calli(EC) induced	胚性愈伤 诱导率/% Percentage of EC
花育 888 Huayu No. 888	0.1	30	30	100	0.054	19	62.40
	0.5	30	30	100	0.057	22	72.43
	1.0	30	30	100	0.061	23	77.78
	2.0	30	30	100	0.091	29	95.00
小偃 22 Xiaoyan No. 22	0.1	30	30	100	0.060	17	55.97
	0.5	30	30	100	0.061	18	58.75
	1.0	30	30	100	0.063	24	78.98
	2.0	30	30	100	0.085	26	88.00
WT59	0.1	30	30	100	0.070	13	43.24
	0.5	30	30	100	0.073	16	52.78
	1.0	30	30	100	0.087	23	77.09
	2.0	30	30	100	0.040	18	60.10

2.3 6-BA 对幼胚体细胞胚性无性系形成的影响

在 2, 4-D 质量浓度为 2.0 mg/L 的 MS 培养基上附加不同质量浓度的 6-BA, 研究了 6-BA 对小麦幼胚体细胞胚性无性系的形成和愈伤组织鲜重的影

响。结果(表 3)表明, 在低质量浓度条件下, 6-BA 显著地提高了 3 个小麦品种(系)小麦幼胚愈伤组织平均鲜重和胚性愈伤组织诱导率, 但随 6-BA 质量浓度的升高, 这种效应逐步降低。

表 3 6-BA 对小麦幼胚体细胞胚性无性系形成的影响

Table 3 Effect of 6-BA on the induction of embryonic somaclone derived from wheat

品 种 Varieties	6-BA 质量 浓度/(mg · L ⁻¹) Concentration of 6-BA	接入幼胚数 No. of immature embryos inoculated	产生愈伤数 No. of calli induced	出愈率/% Percentage of calli induced	平均鲜重 增加量/g Average increase of FW	产生胚性 愈伤数 No. of embryo- genic calli (EC) induced	胚性愈伤 诱导率/% Percentage of EC
花育 888 Huayu No. 888	0.0	30	30	100	0.054	19	62.40
	0.1	30	30	100	0.071	22	72.73
	0.5	30	30	100	0.054	10	65.26
	1.0	30	30	100	0.039	18	60.54
	2.0	30	30	100	0.021	15	50.83
小偃 22 Xiaoyan No. 22	0.0	30	30	100	0.060	17	55.97
	0.1	30	30	100	0.080	26	85.00
	0.5	30	30	100	0.037	23	77.17
	1.0	30	30	100	0.030	23	76.80
	2.0	30	30	100	0.023	22	72.50
WT59	0.0	30	30	100	0.070	13	43.24
	0.1	30	30	100	0.078	19	63.33
	0.5	30	30	100	0.065	16	54.00
	1.0	30	30	100	0.042	16	53.33
	2.0	30	30	100	0.020	13	43.33

3 讨 论

Vasil 等^[8]报道了禾谷类植物体细胞胚胎发生中 2, 4-D 的重要作用, 在 MS 培养基加入 25 mg/L 2, 4-D 可以形成愈伤组织, 一旦转移到无 2, 4-D 的培养基上, 就能产生胚状体。王亚馥等^[4]在小麦的幼胚培养中用附加有 6.0 mg/L 2, 4-D 和 0.5 mg/L KT 的 MS 培养基上诱导出了大量胚性愈伤组织。王常云等^[5]将 3 个小麦品种的幼胚在不同的 2, 4-D 质量浓度培养后认为, 1.0~4.0 mg/L 的 2, 4-D 质量浓度诱导效果较好。本研究证实, 虽然 3 个供试品种(系)间有差异, 但 2.0~3.0 mg/L 的 2, 4-D 显著促进了供试 3 个品种(系)的愈伤组织鲜重的增加和胚性愈伤组织的形成。

Camran 等^[9]在小麦的未成熟胚培养中观察到细胞分裂素(CTK)对于一些品种的胚发生有明显的促进作用, 在含生长素的培养基上添加 KT 可大

大地促进胚性愈伤组织的形成和胚状体(embryoid)的发生。Nabors 等^[10]认为, 在使用 2, 4-D 的同时, 加入 KT (0.1~1.0 mg/L) 可显著促进胚性愈伤组织的形成, 但也有细胞分裂素对胚性愈伤组织没有明显促进或抑制作用^[6,9]的报道。最近有的学者报道^[11], 在禾本科作物(玉米)的愈伤组织诱导中, 2, 4-D 通常起决定作用, 在含 2, 4-D 的诱导培养基中添加低浓度的 KT 或 6-BA, 能有效地提高玉米幼胚诱导的愈伤组织的再生能力, 但 6-BA 的浓度较高时会抑制愈伤组织的发生。刘纪华和施介村^[12]也有类似的报道。本研究证实, 2, 4-D 是小麦幼胚胚性无性系形成的主要诱导激素, 在含 2, 4-D 的诱导培养基中附加一定浓度的细胞分裂素能显著提高小麦胚性愈伤组织的诱导率, 但 2 种细胞分裂素的促进效果是有差异的, KT 在较高浓度时, 更有利于小麦胚性愈伤组织的形成, 而 6-BA 只有在较低浓度时促进胚性愈伤组织形成的作用显著。

[参考文献]

- [1] 曹清波, 余毓君. 小麦幼胚愈伤组织诱导和抗赤霉病体细胞筛选[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. 小麦改良的方法与技术[J]. 生物工程进展, 1999, 19(4): 67-72
- [4] 王亚馥, 崔凯荣, 陈克民, 等. 小麦幼胚培养中体细胞胚发生和植株再生[J]. 植物学通报, 1992, 9(增刊): 29
- [5] 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
- [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] 徐星明, 于飞, 胡适全. 小麦幼胚组织培养力的遗传研究[J]. 遗传, 1991, 13(6): 34-37
- [8] Vimala Vasil, Indra K V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet[J]. Ann Bot(Lond), 1981, 47

- (5): 669- 678
- [9] Caman J G, Jefferson N E, Campbell W F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli I, II [J]. Plant Cell Tissue, Organ Culture, 1987, 10(2): 101.
- [10] Nabors M W, Heyser J W, Dykes T A, et al Long duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures[J]. Planta, 1983, 157(5): 385- 391.
- [11] 黄璐, 卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织DNA 的差异[J]. 植物生理学报, 1999, 25(4): 332- 338
- [12] 刘纪华, 施介村. 青饲玉米有益突变体筛选的研究[J]. 植物学报, 1996, 38(10): 839- 842

Effect of exogenous hormones on high frequency induction of embryogenic somaclone derived from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.)

WANG Rui-hui, CHEN Yao-feng, GAO Xiu-wu, QIN Zhen-ni, REN Hui-li, HAN De-jun, LIANG Hong

(College of Agronomy, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Effect of three exogenous hormones on high frequency induction of three varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) immature embryos is studied. The following results are acquired: Concentration of 2, 4-D in media significantly affects the induction of embryogenic calli derived from immature embryos of wheat, with different frequency between the three genotypes. The most appropriate concentration of 2, 4-D is at 2.0 ~ 3.0 mg/L. This capability of 2, 4-D can be enforced by the addition of KT or 6-BA in medium. But this enforcement differs between KT and 6-BA. KT has a significant role in the induction of embryogenic calli at relatively high concentration while 6-BA works well at lower concentration.

Key words wheat (*Triticum aestivum* L.); exogenous hormone; immature embryo; embryogenic somaclone