

胚发育时间和禾谷镰刀菌粗毒素对小麦幼胚愈伤组织诱导及幼苗分化的影响^{*}

张小红^a, 陈耀锋^b, 闵东红^b, 权军利^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 农学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以3个小麦品种为材料,研究了幼胚发育时间和禾谷镰刀菌粗毒素对小麦幼胚培养特性的影响。结果表明,胚发育时间对小麦幼胚离体培养有较大影响,花后10~13 d的小麦幼胚诱导产生的愈伤组织质量较好,胚性愈伤组织诱导率较高,是适宜的取材时间;禾谷镰刀菌粗毒素对不同小麦品种幼胚愈伤组织、胚性愈伤组织和苗分化的影响趋势相同,粗毒素为60 g/L时,对小麦幼胚愈伤组织诱导有明显抑制,低于60 g/L时有一定的促进作用;粗毒素在0~60 g/L对胚性愈伤组织形成及苗分化的影响随浓度增高抑制作用增强,在60 g/L时胚性愈伤组织的形成能力较低或丧失;适宜的粗毒素筛选浓度为1.5~4.5 g/L。

[关键词] 小麦; 胚发育时间; 禾谷镰刀菌粗毒素; 幼胚培养

[中图分类号] S512.1.034

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0092-05

体细胞无性系变异是植物组织培养过程中的普遍现象,利用植物组织培养过程中产生的体细胞无性系变异,通过病原菌毒素进行植物抗病突变体筛选,已成为作物抗病育种的有效途径之一^[1-3]。近几年,在小麦抗赤霉病育种中,以病原菌毒素为筛选因子进行小麦抗赤霉病性状改良已取得一定成效,先后获得了抗性明显提高的新品种或新材料^[4-6]。但是,由于受基因型、毒素浓度及筛选方式等因素的制约,离体筛选体系仍不完善,效率较低,至今仍处于探索阶段^[7]。在抗赤霉病细胞突变体筛选中,包含多种毒素成分的病原菌粗毒素因提取较为简单方便,且与纯毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)具有相同的生物活性,而被广泛应用^[8]。离体培养的小麦幼胚愈伤组织诱导率及再生能力较高,是抗病突变体筛选的理想材料之一^[9]。本试验以小麦幼胚为外植体,研究了胚发育时间及禾谷镰刀菌粗毒素对3个小麦品种(不同基因型)幼胚离体培养特性的影响,以为进一步建立广谱高效的小麦抗赤霉病毒素筛选体系及提高毒素离体筛选效率提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试小麦材料 普通小麦材料西农1376,

97-21和苏麦3号,均由西北农林科技大学农学院细胞工程育种实验室提供。

1.1.2 病原菌菌种 用于产毒培养的赤霉病菌种为禾谷镰刀菌,由西北农林科技大学植保学院段双科研究员提供。

1.1.3 培养基 诱导培养基:MS+20 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT+30 g/L 蔗糖,pH 5.8,以琼脂固化。

分化培养基:MS+10 mg/L KT+0.5 mg/L IAA+30 g/L 蔗糖,pH 5.8,以琼脂固化。

1.1.4 禾谷镰刀菌培养基 在诱导培养基和分化培养基中分别添加0,1.5,3.0,4.5,6.0 g/L 禾谷镰刀菌粗毒素原液,调整pH为5.8左右,高压灭菌。

1.2 禾谷镰刀菌产毒培养及粗毒素提取

禾谷镰刀菌菌种经马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基扩大培养后,于无菌条件下接种麦粒培养基繁殖,在20~25℃下暗培养30 d。取出培养物,置于60℃烘箱烘干后粉碎,用于提取粗毒素。

禾谷镰刀菌粗毒素提取参照刘思衡等^[10]的方法。将500 g 禾谷镰刀菌麦粒干培养物按100 g干培养物加500 mL体积分数85%乙醇的比例浸提5 d(期间搅动数次),收集浸提液,重复浸提1次,将2次浸提液混合后先用双层纱布过滤,再用滤纸过滤,即

^{*} [收稿日期] 2006-06-14

[基金项目] 陕西省农业分子生物学重点实验室2002-2004项目

[作者简介] 张小红(1968-),女,陕西商洛人,副研究员,在读博士,主要从事植物细胞工程育种研究。E-mail: zhxh2493@126.com

[通讯作者] 陈耀锋(1956-),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事小麦遗传育种研究。

得棕黄色提取液, 再将提取液于 45 ℃烘箱中蒸发浓缩为粗毒素浓度为 1 g/mL 的禾谷镰刀菌粗毒素原液。4 ℃储藏备用。

1.3 胚发育时间对小麦幼胚离体培养的影响

以小麦穗中部吐露花药为始花期, 挂牌记录时间。分别于花后 10, 13, 16 和 18 d 从田间剪取麦穗, 于实验室剥取麦粒, 在超净工作台上先用体积分数 75% 酒精迅速漂洗消毒后, 再用 1 g/L 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 无菌条件下剥取幼胚, 接种在诱导培养基上。45 d 后, 观察并统计愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率。

1.4 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦胚性愈伤组织形成的影响

取花后 13 d 的小麦幼胚, 接种在含 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 g/L 禾谷镰刀菌粗毒素的诱导培养基上, 诱导培养 45 d 后, 统计愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织形成率。

1.5 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦幼苗分化的影响

将无毒素诱导培养基上获得的胚性愈伤组织切成直径 0.5 cm 的小块, 转接于含 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 g/L 禾谷镰刀菌粗毒素的分化培养基上。培养 30 d 后, 统计小麦幼苗分化率及平均每块愈伤组织分化幼苗数。

1.6 培养条件

于散射光下进行愈伤组织诱导, 分化培养阶段于光强为 1 500~2 000 lx、光照时间为 12 h/d 条件下进行培养, 培养温度(25±2) ℃。

表1 胚发育时间对小麦愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effect of embryo development time on inductivity of callus and embryogenic callus <i>in vitro</i>								%
小麦品种 W heat variety	愈伤组织诱导率 Inductivity of callus				胚性愈伤组织诱导率 Inductivity of embryogenic callus			
	10 d	13 d	16 d	18 d	10 d	13 d	16 d	18 d
西农 1376 Xinong 1376	97.2	98.9	100	99.3	56.2	52.2	8.5	5.3
97-21	99.3	100	97.4	94.3	32.4	34.6	3.3	0
苏麦 3 号 Sumai 3	96.6	95.5	96.8	93.2	16.6	15.9	0	0

2.2 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦愈伤组织形成的影响

由表 2 可以看出, 禾谷镰刀菌粗毒素浓度为 0~6.0 g/L 时, 小麦愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率 3 个品种的变化趋势相同。粗毒素在 0~4.5 g/L 时, 3 个品种小麦愈伤组织诱导率均达到 95% 以上; 当禾谷镰刀菌毒素质量浓度为 6.0 g/L 时, 小麦愈伤组织诱导率明显降低, 西农 1376、97-21 和苏麦 3 号分别为 49.45%、38.67% 和 28.00%, 较 0~4

2 结果与分析

2.1 胚发育时间对小麦幼胚愈伤组织形成的影响

由表 1 可知, 胚发育时间对不同小麦品种愈伤组织诱导率影响不大, 均在 93% 以上。但在实验中发现, 花后 16~18 d 的小麦幼胚诱导形成的愈伤组织生长速度较慢, 形成的愈伤块明显变小, 质地较硬, 质量较差。而花后 10~13 d 的幼胚产生的愈伤组织生长速度较快, 形成的愈伤组织块较大, 颜色鲜亮, 质地松脆, 质量较好。可见, 品种和发育时间对小麦幼胚愈伤组织诱导率的影响不大, 但发育时间对愈伤组织的产量和质量有明显影响, 花后 10~13 d 的幼胚形成的愈伤组织量较多、质量较好。

由表 1 还可以看出, 相同胚发育时间, 不同小麦品种的胚性愈伤组织诱导率差异较大, 如西农 1376 花后 10 d 胚性愈伤组织诱导率约为苏麦 3 号的 4 倍, 表明胚性愈伤的形成能力与品种有关。对同一小麦品种而言, 不同发育时间接种, 其胚性愈伤组织诱导率也有较大差异, 在发育 10 和 13 d 时接种, 胚性愈伤组织诱导率较高, 超过 13 d 后, 胚性愈伤组织诱导率显著降低(表 1), 表明发育时间对胚性愈伤组织的形成有重要影响。因此, 在小麦幼胚培养中, 以授粉后 10~13 d 的幼胚较为适宜。但在实际操作过程中, 对于发育 10 d 或低于 10 d 的小麦幼胚, 由于胚较小, 分离过程中操作难度较大, 故以 13 d 左右的幼胚为好。

5 g/L 时降低了 49.44%~67.47%。可见浓度为 0~4.5 g/L 时, 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦愈伤组织诱导率的影响并不随其质量浓度的增加而呈递增或递减的趋势, 但在 6.0 g/L 时产生抑制, 说明禾谷镰刀菌粗毒素 6.0 g/L 对小麦愈伤组织形成是一个敏感浓度。禾谷镰刀菌粗毒素浓度在 6.0 g/L 时产生的愈伤组织, 生长慢、愈伤块很小、质量差, 后期形成的胚性愈伤组织较少, 最终难以获得再生植株。

观察发现, 在含 1.5~4.5 g/L 禾谷镰刀菌粗毒

素的培养基上,小麦愈伤组织生长较无毒素培养基上的旺盛。

由表2还可以看出,禾谷镰刀菌粗毒素对小麦胚性愈伤组织的形成有较强的抑制作用,随禾谷镰刀菌粗毒素浓度的增加,胚性愈伤组织诱导率逐渐减小。禾谷镰刀菌粗毒素浓度为60 g/L时,3个小麦品种中只有西农1376的胚性愈伤组织诱导率为

1.2%,而其余2个品种均未形成胚性愈伤组织,也丧失了进一步分化成再生植株的能力。

通过愈伤组织途径进行离体抗赤霉突变体筛选时,毒素的浓度既要有较高的选择压力,又要能保证离体培养物具有一定的再生能力。本试验结果表明,禾谷镰刀菌粗毒素的浓度不宜高于60 g/L,以1.5~4.5 g/L为适宜。

表2 不同浓度禾谷镰刀菌粗毒素对小麦愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率的影响

禾谷镰刀菌粗毒素/ (g·L ⁻¹)		愈伤组织诱导率 Inductivity of callus			胚性愈伤组织诱导率 Inductivity of embryogenic callus		
Concentration of crude toxin	西农1376 Xinong 1376	97-21	苏麦3号 Sumai 3	西农1376 Xinong 1376	97-21	苏麦3号 Sumai 3	%
0	98.89	100	95.45	52.22	34.58	15.89	
1.5	100	100	98.67	12.22	5.56	7.60	
3.0	100	100	100	5.39	2.21	4.21	
4.5	100	100	96.67	2.69	1.10	2.68	
6.0	49.45	38.67	28.00	1.20	0	0	

2.3 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦胚性愈伤组织幼苗分化的影响

由表3可见,小麦胚性愈伤组织幼苗分化率和平均每块胚性愈伤组织分化幼苗数在3个小麦品种间存在差异。在不含禾谷镰刀菌粗毒素培养基上,西农1376、97-21和苏麦3号胚性愈伤组织幼苗分化率依次为77.78%、66.67%和40.00%,相差近2倍,平均分化幼苗数分别为12.3、4.5和3.3,相差近4倍。在含禾谷镰刀菌毒素培养基上,胚性愈伤组织幼苗

分化率随禾谷镰刀菌粗毒素浓度的增加而降低;平均每块胚性愈伤组织分化幼苗数随禾谷镰刀菌粗毒素浓度的增加而减少,3个小麦品种的变化趋势相同。

试验中还发现,在禾谷镰刀菌粗毒素浓度为4.5和60 g/L时,3个小麦品种分化出的幼苗高度低,生长势较弱,说明毒素不仅对幼苗分化和分化幼苗数有抑制作用,而且对成苗质量也有不利影响。

表3 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦胚性愈伤组织幼苗分化的影响

Table 3 Effect of crude toxin on plantlet differentiation and plantlet amount

禾谷镰刀菌粗毒素/ (g·L ⁻¹) Concentration of crude toxin	胚性愈伤组织幼苗分化率/% Rate of plantlet differentiation			平均每块胚性愈伤组织分化幼苗数 Mean plantlet number of pre callus		
	西农1376 Xinong 1376	97-21	苏麦3号 Sumai 3	西农1376 Xinong 1376	97-21	苏麦3号 Sumai 3
0	77.78	66.67	40.00	12.3	4.5	3.3
1.5	66.67	43.33	20.00	10.0	4.3	2.5
3.0	47.62	35.71	15.00	9.4	3.8	2.3
4.5	35.71	33.30	10.00	5.6	3.6	1.5
6.0	19.05	6.67	0	4.3	2.0	0

3 讨论

小麦离体培养植株高效再生技术体系,是利用细胞工程技术进行小麦性状改良的基础,也是进行毒素离体筛选的重要前提,而外植体的选择是影响试验成败的关键因素之一^[1]。在离体培养过程中,外植体的发育时期、生理状况等对培养效果均有较大影响。本研究的结果表明,小麦幼胚培养时,胚发育时间对愈伤组织诱导率影响不大,但对愈伤组织的

产量和质量及胚性愈伤组织的形成均有明显影响,花后10~13 d的小麦幼胚形成的愈伤组织量较多、质量较好,且其胚性愈伤组织的诱导率较高,是适宜的取材时间。

在运用毒素进行抗病突变体筛选时,适宜的毒素浓度对抗性筛选至关重要,毒素浓度太高会引起过度的生长抑制,甚至死亡,致使基因型(品种)间的抗性差异很难表现出来;同样毒素浓度太低也不利于基因型抗性差异的体现^[11-12]。本研究结果表明,禾

谷镰刀菌粗毒素对小麦幼胚愈伤组织、胚性愈伤组织及胚性愈伤组织幼苗的影响不同。在0~60 g/L范围内, 随粗毒素浓度升高幼胚胚性愈伤组织诱导率下降速度较快, 胚性愈伤组织幼苗分化率及平均每块胚性愈伤组织分化幼苗数下降速度较缓, 粗毒素浓度60 g/L对胚性愈伤形成和胚性愈伤组织幼苗分化产生强烈抑制, 使植株离体再生频率极大降低, 甚至丧失; 而愈伤组织诱导率在60 g/L时才受到明显抑制, 在1.5~45 g/L粗毒素培养基上幼胚愈伤组织的生长较无毒素培养基上旺盛。禾谷镰刀菌粗毒素在低浓度下对愈伤组织的刺激生长作用和高浓度下的抑制作用与吴志凤等^[4]和刘宗镇等^[13]的研究结果基本一致。

陆维忠等^[14]研究认为, 在小麦抗赤霉突变体离体筛选中, 合适的毒素选择浓度应在既对愈伤组织的生长有比较明显的抑制, 又能使其保持一定分化能力的浓度范围。但本研究发现, 在对愈伤组织形成有明显抑制作用的粗毒素浓度下, 产生的愈伤组织

生长状态不良, 且对胚性愈伤组织形成和胚性愈伤组织幼苗分化有强烈的抑制作用, 使植株离体再生频率极大降低, 甚至丧失。因此作者认为, 通过小麦幼胚愈伤组织途径进行离体筛选时, 合适的毒素筛选浓度应是, 对愈伤组织生长无影响而对胚性愈伤组织形成和胚性愈伤组织幼苗分化有明显抑制作用, 但又能使胚性愈伤组织保持一定的形成和分化能力的浓度。本研究结果表明, 经小麦幼胚愈伤组织途径进行离体筛选时, 适宜的禾谷镰刀菌粗毒素浓度为1.5~45 g/L, 60 g/L的粗毒素是一个敏感浓度, 粗毒素浓度不宜高于这一浓度, 否则难以获得再生植株, 失去筛选的意义。

本试验仅是对小麦幼胚离体筛选中的胚发育时间和禾谷镰刀菌粗毒素浓度进行的初步研究, 对通过粗毒素筛选获得的再生植株的抗性变异特点及其与筛选时粗毒素浓度的关系, 尚需进一步的抗病性鉴定。

[参考文献]

- [1] 赵成章. 禾谷类作物体细胞无性系变异及其应用[C]//颜昌敬. 农作物组织培养. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 91-101.
- [2] 赵蕾, 梁元存, 张天宇. 利用致病毒素筛选植物抗病突变体的研究进展[J]. 生物技术, 2001, 11(3): 41-44.
- [3] 陈军营, 何盛莲, 陈新建, 等. 体细胞无性系变异在小麦育种中的应用[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(2): 112-115.
- [4] 吴志凤, 王裕中. 利用禾谷镰刀菌粗毒素筛选小麦抗赤霉病突变体[J]. 江苏农学院学报, 1994, 15(1): 35-39.
- [5] 刘思衡. 小麦幼穗离体培养筛选抗赤霉病细胞无性系的研究[J]. 福建农学院学报, 1997, 12(3): 7-10.
- [6] 郭丽娟, 姚庆筱, 胡启德. 通过组织培养筛选小麦抗赤霉病突变体的研究[J]. 遗传学报, 1992, 19(3): 209-265.
- [7] 杨建明, 沈秋泉, 杨文新. 抗赤霉病细胞工程育种进展[J]. 大麦科学, 2000(2): 8-12.
- [8] 王裕中, 陈怀谷, 杨新宁, 等. 禾谷镰刀菌粗毒素的生物活性及其在小麦品种抗赤霉病性鉴定中的应用[J]. 中国农业科学, 1989, 22(4): 54-57.
- [9] 陆维忠, 程顺和, 沈晓蓉, 等. 细胞工程在小麦抗赤霉病育种中的利用[J]. 江苏农业学报, 1998, 14(1): 9-14.
- [10] 刘思衡, 廖海林, 潘祥华. 应用赤霉病菌粗毒素测定小麦品种抗赤霉病性的初步研究[J]. 福建稻麦科技, 1989(1): 35-39.
- [11] 柴守玺. 麦类作物赤霉病抗性离体筛选的原理与方法[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(1): 76-78.
- [12] 穆利霞, 何晓明, 王小菁. 植物抗性突变体离体筛选和鉴定研究进展[J]. 广东农业科学, 2006(1): 30-33.
- [13] 刘宗镇, 陈权庆, 姚泉洪, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对小麦愈伤组织诱导和分化的类生长激素作用[J]. 上海农业学报, 1991, 7(增刊): 1-7.
- [14] 陆维忠, 蒋宁, 周楠, 等. 小麦抗赤霉病无性系变异的研究与应用[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(2): 7-11.

Effect of *Fusarium graminearum* crude toxin and embryo development time on inducement and plantlet differentiation of calli in wheat young embryos culture

ZHANG Xiao-hong^a, CHEN Yao-feng^b, MIN Dong-hong^b, QUAN Jun-li^b

(a College of Life Science, b College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The effects of *Fusarium graminearum* crude toxin and embryo development time on immature embryos culture were investigated in three wheat varieties. The results showed embryo development

time had obvious effect on immature embryo culture in wheat. The period of 10-13 days after blooming date was the optimum time for immature embryo culture, inductivity of embryogenic calli was higher and quality of callus was preferable. Effect of crude toxin were the same on callus, embryogenic callus and plantlets differentiation for three genotypes. When concentration of the crude toxin was 6.0 g/L, growth of callus were inhibited obviously, while the concentration lower than 6.0 g/L promoted the growth of callus. When the selective dose of crude toxin was in 0-6.0 g/L, formation of embryogenic callus and differentiation of plantlets were inhibited intensively with the increase of the crude toxin concentration. When the crude toxin was 6.0 g/L, formation of embryogenic callus was lower or even lost. The suitable dose of crude toxin was 1.5-4.5 g/L on selection of wheat scab-resistant mutant *in vitro*.

Key words: wheat; embryo development time; *Fusarium graminearum* crude toxin; young embryo culture

(上接第91页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)12-0087-EA

The relationship between micro-SRC value and wheat quality

GAO Mei^{1a}, ZHANG Guo-quan^{1b}, NI Fang-yan^{1b}, LUO Qin-gui^{1b}, WEI Yin², ZHANG Ji-shu^{1a}

(1a Life Science College, 1b College of Food Science & Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Agrofood Science and Technology, CAAS, Beijing 100094, China)

Abstract: The relationship between micro-SRC value of wheat flour and protein quality, starch quality and dough rheology characteristics was analyzed systematically using 14 wheat varieties (lines), which were bred recently in Shaanxi province and widely planted in Shaanxi and Henan province, and the limit values to classify the wheat quality were determined preliminarily according to the distribution of lactic acid micro-SRC value. The results show that, the lactic acid micro-SRC value, regarded as the rapid measuring indicator responding to glutenin characteristics, is mostly related to GMP, gluten index and SDS sedimentation value; sodium carbonate micro-SRC value, reflecting the starch damage level, is mainly related to the damaged starch content and maximum viscosity; and when it comes to predict the dough rheology characteristics, water micro-SRC value can represent the changes of dough stability time, lactic acid micro-SRC value can represent the variation of water absorption, development time and energy, sodium carbonate micro-SRC value can describe changes of water absorption and softening degree. The lactic acid micro-SRC value of strong wheat may be above 120%, that of common wheat may be at 100%-120%, and that of soft wheat may be below 100%. This micro-SRC method can reflect wheat protein quality, starch quality and dough rheology characteristics accurately, and is a simple and convenient method to detect wheat quality on micro scale.

Key words: wheat quality; micro-solvent retention capacity; quality classification