

不同诱导培养基对冬小麦组织培养效果的影响

杨玉萍¹, 韦鹏霄², 岑秀芬²

(1. 新乡学院 管理系, 河南 新乡 453000; 2. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005)

摘 要:两种不同的诱导培养基诱导冬小麦的成熟种胚, 用得到的愈伤组织进行分化, 通过对愈伤组织成苗率、分化率、褐死率的统计分析, 结果表明, 各个品种用最好的诱导培养基得到的愈伤组织质量提高, 成苗率、分化率都大于用基本的诱导培养基得到的愈伤组织; 对两种愈伤组织同时进行愈龄实验, 发现不同愈伤组织培养的最适分化时间不同, 继代一次分化率、成苗率都最高; 随着继代代数的增多, 褐死率呈明显的上升趋势。

关键词:诱导培养基; 愈伤组织; 分化; 成苗率; 分化率; 褐死率

中图分类号: S330

文献标志码: A

文章编号: 1008-7613(2007)02-0056-05

0 引言

随着现代生物技术的迅速发展, 利用生物技术进行小麦品种改良日益受到重视。一个高效的愈伤组织形成和再生的组织培养体系是转基因、细胞融合、体细胞突变和筛选等生物技术在育种上应用的基础^[1], 可见小麦组织培养体系的建立非常重要。1969年, Shimada首次从小麦幼胚中诱导出愈伤组织并获得再生植株^[2], 以后关于小麦组织培养的研究越来越多。然而, 无论是愈伤组织的诱导还是再分化体系的建立, 单子叶植物都比双子叶植物困难得多^[3]。小麦离体再生比较困难, 严重妨碍了其基因工程的顺利进展。研究小麦组织培养条件和植株再生影响因素, 是小麦生物技术育种中一个亟待解决的重要课题^[4]。本文用筛选出的两种不同的诱导培养基——适合禾本科作物的基本诱导培养基的和几种激素配合使用比较好的诱导培养基诱导愈伤组织, 通过对一些指标的观察、统计, 分析不同诱导培养基诱导的愈伤组织培养效果的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

黄淮麦区的冬小麦品种(V. = Variety): 高优 503、邯6172, 编号为1、2号。

1.2 材料培养和统计方法

选取健壮饱满种子, 用洗衣粉洗去表面的菌孢子, 用无菌水冲洗4~5次, 紫外灯光照射20 min, 再进行表面消毒处理; 两种诱导培养基分别诱导愈伤组织(温度25℃~28℃, 散射光), 接种15天后, 将得到的愈伤组织转移到分化培养基上(温度25℃~28℃, 1 200 Lx~2 000 Lx日光灯光), 分化

20 d统计成苗率(F.D. = Frequency of green plantlet differentiation)、分化率(A.F.C.D. = Average Frequency of callus differentiation)、褐死率(F.B. = Frequency of callus brown), 比较不同来源的愈伤组织分化的异同。

愈伤组织诱导到10天、12天、14天、16天、18天、20天、22天, 分别分化和继代培养; 分化20天后, 统计分化率和成苗率, 继代20天后, 再分化20天, 统计其分化率和成苗率。另外, 愈伤组织诱导培养到15天, 1/4分化, 3/4继代, 15天后再分化、继代; 共培养3代, 20天后分别统计3代的分化率和成苗率; 以期得出各个品种最佳的分化继代时间和继代数, 并且比较不同来源的愈伤组织异同。

1.3 培养基

基本诱导培养基: $N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2, 4 - D + 500 \text{ mg/L CH}$ (水解酪蛋白)。

筛选出的最好诱导培养基:

1号品种: $N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2, 4 - D + 0.1 \text{ mg/L BA} + 2.5 \text{ mg/L IAA} + 200 \text{ mg/L 谷氨酰胺} + 160 \text{ mg/L 天冬氨酸} + 500 \text{ mg/L CH}$ 。

2号品种: $N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2, 4 - D + 0.5 \text{ mg/L KT} + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 200 \text{ mg/L 谷氨酰胺} + 140 \text{ mg/L 天冬氨酸} + 500 \text{ mg/L CH}$ 。

愈伤组织继代培养基: $N_6 + 1.0 \text{ mg/L KT} + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BA}$ 。

分化培养基:

$N_6 + 0.2 \text{ mg/L NAA} + (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5) \text{ mg/L KT}$ (分别为: X1~X6处理);

收稿日期: 2006-10-07

作者简介: 杨玉萍(1977-), 女, 河南延津人, 新乡学院管理系, 农学硕士, 主要从事小麦的生物技术育种研究。

$N_6 + 0.2 \text{ mg/L NAA} + (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5) \text{ mg/L BA}$ (分别为: X7 ~ X12 处理);
 $N_6 + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 1.0 \text{ mg/L KT} + (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2.0) \text{ mg/L BA}$ (分别为: Y1 ~ Y5 处理);
 $N_6 + 1.0 \text{ mg/L KT} + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BA}$ (愈龄实验)。

1.4 有关数据的计算方法

褐死率(%) = (褐死的愈伤组织数/转移的愈伤组织数) × 100%
出苗率(%) = (产生苗的愈伤组织数/转移的愈伤组织数) × 100%
绿点分化率(%) = (产生绿点的愈伤组织数/转移的愈伤组织数) × 100%
总分化率(%) = (所有分化的愈伤组织数/转移的愈伤组织数) × 100%

2 结果与分析

2.1 分化培养基中单独使用 KT、BA 浓度的结果

由表 1 可得出, 品种间平均值仅分化率达到了极显著差

异, 成苗率、褐死率差异不显著, 品种 1 培养效果较好。从处理间来看, 关于分化率: 品种 1 随 KT 浓度升高而升高, 1 mg/L 达到最大值 74.29%, 比 0.5 mg/L BA (激素 BA 中最大值) 高 7.44%; 品种 2 在 1 mg/L ~ 1.5 mg/L KT 最大为 66.67%, 比 0.2 mg/L ~ 0.5 mg/L BA (激素 BA 中的最大值) 高 16.67%; 两个品种各自到达最大值时, 品种 1 比品种 2 高 7.62%。说明 KT 比 BA 更适合愈伤组织分化, 激素的最佳浓度有所差异。两品种成苗率最高的 BA 浓度都是 0.5 mg/L, 此时品种 1 的分化率在 BA 中也最高; 而品种 2 在 0.5 mg/L KT 时, 分别比最高值低 5.19% 和 0.47%, 且达到了极显著差异。两个品种的褐死率都是随着 KT、BA 浓度的升高而提高的 (KT 浓度为 0.2 mg/L 时不符合此规律, 可能是因为浓度过低, 不利于愈伤组织分化), 相同浓度 BA 比 KT 的褐死率高。
品种 1 和品种 2 用 $N_6 + 2, 4 - D$ 筛选的合适分化培养基均为 $N_6 + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 1.0 \text{ mg/L KT}$ 。单独使用一种激素时差别不大; 一般来说, 几种激素配合使用培养效果较好。在此基础上, 筛选两种激素配合使用的分化培养基更有利于愈伤组织的分化、成苗。

表 1 1 号和 2 号品种分化培养基筛选的实验结果

处理		分化率%		处理间	成苗率%		处理间	褐死率%		处理间
		品种1	品种2	平均值%	品种1	品种2	平均值%	品种1	品种2	平均值%
2. 4 -D 诱 导	X1	61.67	56	58.83 ABC	11.67	20	15.83 BCD	18.33	20	19.17 G
	X2	67.82	57.14	62.48 ABC	18.68	23.04	20.86 ABC	27.19	27.14	27.17 EF
	X3	74.29	66.67	70.48 A	23.33	22.22	22.78 AB	29.07	28	28.54 DEF
	X4	61.78	66.67	64.22 AB	18.27	15.88	17.07 ABCD	32.8	33.33	33.06 BCDE
	X5	53.94	62.5	58.22 ABC	11.88	14.81	13.35 BCD	33.46	37.5	35.48 BC
	X6	50.76	30	40.38 C	11.69	12.52	12.10 CD	34.29	40	37.14 ABC
	X7	61.54	50	55.77 ABC	17.31	18.33	17.82 ABCD	23.24	25.71	24.48 FG
	X8	66.85	50	58.43 ABC	28.52	23.51	26.01 A	26.11	30	28.06 DEF
	X9	60.67	44.44	52.56 ABC	10.31	18.52	14.42 BCD	30.91	31	30.96 CDE
	X10	56.79	43.33	50.06 ABC	9.64	14.67	12.16 CD	34.88	33.33	34.11 BCD
	X11	56.25	40	48.13 BC	10.1	11.62	10.86 CD	39.15	36	37.58 AB
	X12	53.30	38	45.65 BC	9.95	8.57	9.26 D	40.97	44	42.48 A
品种间平均值%		60.47 A	50.40 B		15.11a	16.97a		30.87a	32.17a	
最好诱 导培养 基诱导	X1	69.77	60.56	65.16 ABC	25.58	20.87	23.23 BCD	23.25	27.39	25.32 DEFG
	X2	73.08	61.52	67.30 AB	30.77	25.41	28.09 AB	17.69	18.11	17.90 G
	X3	89.66	65	77.33 A	44.83	26.98	35.90 A	16.9	23.96	20.43 FG
	X4	74.07	66.76	70.42 AB	25.93	28.56	27.24 ABC	29.63	32.22	30.9 BCDE 3
	X5	73.08	59.84	66.46 BC	19.23	21.11	20.17 BCDE	30.77	34.11	32.44 BCD
	X6	55.17	57	56.09 BC	17.24	19.85	18.55 BCDE	37.93	36.28	37.11 AB
	X7	84.62	58.57	71.59 ABC	26.92	17.89	22.41 BCD	19.23	23.16	21.19 EFG
	X8	69.23	61	65.12 BC	19.23	20	19.62 BCDE	22.22	27.5	24.86 FG
	X9	70.37	55	62.69 BC	18.52	16.98	17.75 CDE	23.07	30.93	27.00 CDEF
	X10	60.87	55	57.93 BC	17.39	15.33	16.36 DE	34.62	32.22	33.42 ABC
	X11	57.90	48.24	53.07 BC	15.79	14.69	15.24 DE	36.84	37.95	37.4 AB
	X12	46.15	47.31	46.73 C	11.54	10.71	11.13 E	39.13	41.43	40.28 A
品种间平均值%		68.66 A	57.98 B		22.75a	19.87a		27.61B	30.44 A	

两个品种的分化率、褐死率都达到了极显著差异, 品种 1 在 12 种培养基上的平均分化率为 68.66%, 比品种 2 高 10.68%, 而褐死率却比品种 2 低 2.83%; 成苗率间虽未达到显著差异, 但品种 1 比品种 2 高 2.88%, 比品种 2 的培养效果好, 且对激素浓度的需求有差异。从 12 个处理样品来看, 品种 1 的分化率、成苗率都是随着

KT 浓度的升高逐渐升高, 1.0 mg/L KT 时达到最高值分别为 89.66% 和 44.83%, 褐死率最低为 16.9%, 后逐渐升高; 而 BA 为 0.2 mg/L 时, 达到最高依次为 84.62% 和 26.92%, 后随着浓度升高又降低; 此时褐死率最低为 19.23%。品种 2 的分化率、成苗率也是随着 KT 浓度升高而提高的, 在 1.5 mg/L 时达到最高分别为 66.76% 和

28.56%, 褐死率也比较高; 1.0 mg/L KT 时分化率、成苗率虽然低一些, 但褐死率也降低了 8.22%, 因此, 取 1.0 mg/L KT 进行培养; BA 在 0.5 mg/L 的培养效果最好, 分化率、成苗率、褐死率分别为 61%、20% 和 27.5%。BA 没有 KT 的培养效果好, 但最佳使用浓度稍低。

2.2 不同诱导培养基对品种分化效果的影响

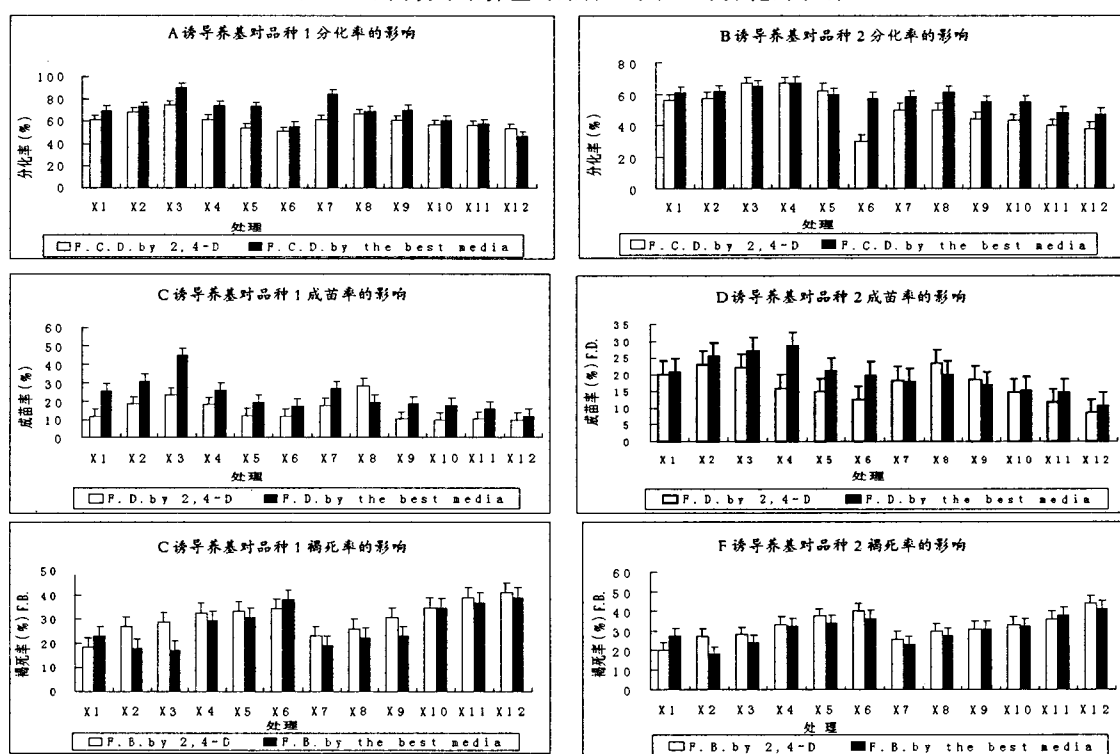
为了比较不同培养基诱导的愈伤组织分化情况, 进行了图 1 的对比。从图 1 中可以看出, 品种 1 和品种 2 的分化率、成苗率用最好培养基诱导的愈伤组织都仅比含有 2,4-D 诱导的高, 而褐死率大多呈相反的结果。从品种 1 的结果来看, 来源于不同诱导培养基的两种愈伤组织, 在 1.0 mg/L KT 时,

分化率、成苗率在 12 个处理样品中都是最高的, 褐死率比较低; 并且此时两种指标差别最大; 褐死率的变化规律有所不同, 2,4-D 诱导的是逐渐升高的, 最好培养基诱导的是先降低后升高。品种 2 的结果是 BA 培养时两种分化率的差别比较大, 而成苗率在 KT 培养时差别大; 对于褐死率, 2,4-D 诱导逐渐升高, 最好培养基诱导的先降低后升高。

2.3 添加 KT、BA 对品种分化效果的影响

按照浓度大小, 将 0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、2.5 mg/L 的 KT、BA 依次定为处理 1、2、3、4、5、6, 比较分析不同诱导培养基、不同激素对品种 1 和品种 2 分化的影响。

图 1 不同诱导培养基对品种 1 号和 2 号分化的影响



由图 2 可以看出, 两品种用两种培养基诱导的愈伤组织在相同分化培养基上有不同的表现。最好培养基诱导的愈伤组织分化率、成苗率有所提高, 褐死率有所下降; 说明激素合适时, 愈伤组织的质量提高, 导致分化效果也较好。但是不同品种对不同激素种类、浓度的反应不同。对于品种 1, 2, 4-D 诱导的愈伤组织在 0.2 mg/L ~ 0.5 mg/L KT、BA 时, 分化率相差不大, 并且两种激素都是随着浓度增加而升高的, 0.5 mg/L BA 达到最高值 66.85%; 成苗率在 BA 培养基上比较高, 0.5 mg/L 达到最高值 37.04%, 比相同浓度 KT 培养的高出 16.35%; 两种激素培养的褐死率都是随着浓度的增加而升高的, 相同浓度时 BA 比 KT 的高一点; 最好培养基诱导的愈伤组织分化率最高的浓度, BA 改变为 0.2 mg/L 时的分化率、成苗率依次为 84.62% 和 15.38%; BA 浓度是 0.5 mg/L 时, 成苗率最高为 20%, 而 BA 浓度在 0.5 mg/L ~ 1.0 mg/L 时, 褐死率最低为 30% ~ 29.63%, 两种愈伤组织分化时, BA

的最佳浓度有所差异; 分化率最高的 KT 浓度也有所变化, 在 1.5 mg/L 时, 为 89.66% (12 个处理中最高), 此时成苗率最高为 44.83%, 而褐死率最低为 16.9%。品种 2, 两种愈伤组织的分化率变化不大, 并且 BA 的培养效果不及 KT, KT 浓度在 1.0 mg/L ~ 1.5 mg/L 范围内时, 2,4-D 诱导的愈伤组织分化率最高为 66.67%, BA 浓度在 0.2 mg/L ~ 0.5 mg/L 范围内时为 50%; 最好培养基诱导的愈伤组织成苗率用 KT 培养的高于 2,4-D 诱导的, 并且最高分化率的 KT 浓度也有差别, 2,4-D 诱导的在 0.5 mg/L 时为 23.04%, 后者在 1.0 mg/L 时为 26.98%; 关于褐死率, 2,4-D 诱导的随着 KT 浓度的增加而升高, 在 KT 浓度为 0.5 mg/L 时, 最好培养基诱导的最低褐死率为 18.12%; 在 0.5 mg/L BA 浓度时, 2,4-D、最好培养基诱导的成苗率最高分别为 23.51%、25%, 都是随着 BA 浓度的增加而提高的。

图 2 两种诱导培养基添加不同激素对品种 1、2 分化的影响结果

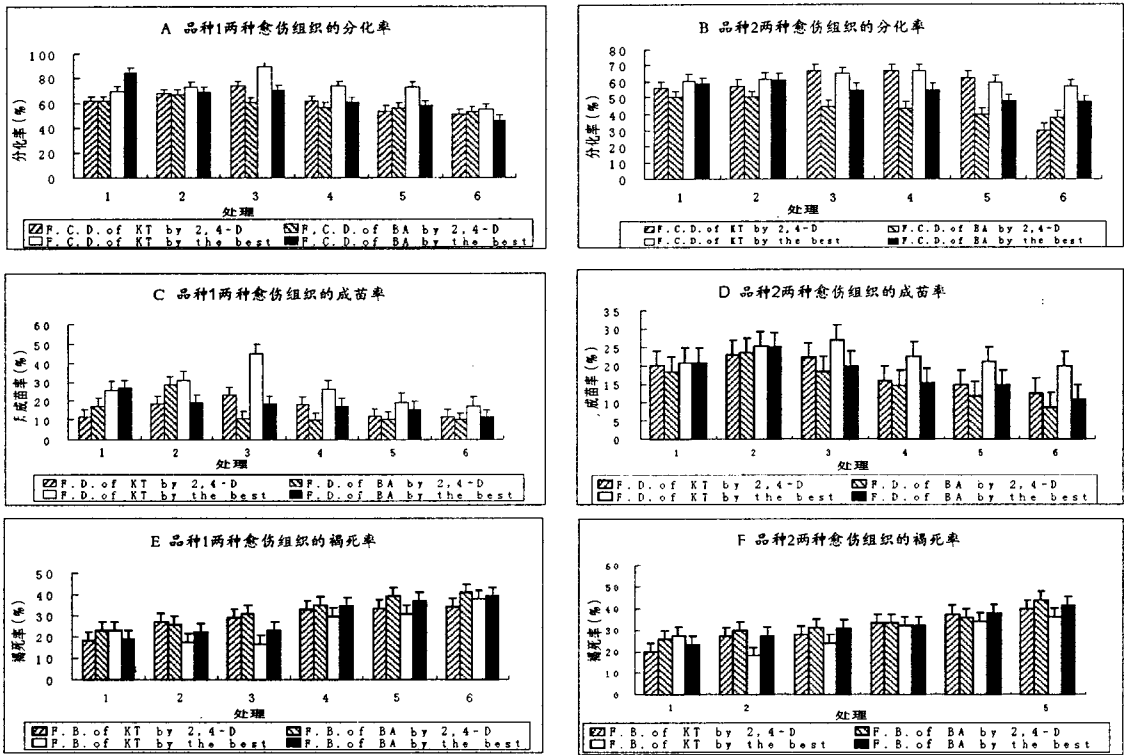


表 2 两种诱导培养基诱导的分化培养基筛选实验结果(KT、BA 共同)

指标	品种	处理					平均值 %	
		Y1	Y2	Y3	Y4	Y5		
2, 4-D 诱导	分化率 %	1	46.67	46.94	55	62.32	53.7	52.93 a
		2	41.94	46	57.14	61.43	51.78	51.66 a
	平均分化率 %		44.31 D	46.47 CD	56.07 AB	61.88 A	52.74 BC	
	成苗率 %	1	11.27	20.41	15.63	15.38	15.07	15.55 A
		2	9.86	18.37	14.06	13.85	13.7	13.97 B
	平均成苗率 %		10.57 C	19.39 A	14.85 B	14.615 B	14.39 B	
	褐死率 %	1	13.33	18.37	10	14.49	16.67	14.57 b
		2	16.13	20	11.9	14.29	17.85	16.03 a
	平均褐死率 %		14.73 B	19.19 A	10.95 C	14.39 BC	17.26 AB	
	最佳培 养基 诱导	分化率 %	1	50.7	73.47	71.88	58.46	57.53
		2	46.48	69.39	68.75	55.38	54.79	58.96 B
平均分化率 %			48.59 C	71.43 A	70.32 A	56.92 B	56.16 B	
成苗率 %		1	16.67	18.37	20	17.39	16.67	17.82 a
		2	16.13	18	21.43	17.14	16.07	17.75 a
平均成苗率 %			16.4 B	18.19 AB	20.72 A	17.27 B	16.37 B	
褐死率 %		1	7.04	6.12	6.25	7.69	10.96	7.61 B
		2	8.45	8.16	7.81	9.23	12.33	9.20 A
平均褐死率 %		7.75 BC	7.14 C	7.03 C	8.46 B	11.65 A		

2.4 分化培养基中 KT 和 BA 两种激素相结合的培养结果

从表 2 中可以看出, 最好培养基诱导的愈伤组织在 5 种分化培养基上的平均值看, 1 和 2 基因型间分化率差异极为显著, 品种 1 比品种 2 高出 3.45%; 成苗率、褐死率差异不显著, 品种 1 的培养效果好于品种 2。从 5 个处理结果看, 两个品种分化率都是在 0.5 mg/L~1.0 mg/L BA (无显著差异) 时培养效果最好, 分化率最高依次为 73.47% 和 69.39%, 品种 1

比品种 2 高出 4.08%; 1.5 mg/L 和 2.0 mg/L BA 的分化率次之, 二者间差异不显著, 0.2 mg/L BA 的分化率最低分别为 50.7% 和 46.48%; 成苗率在品种间虽没有显著差异, 但处理间差异极显著, 两个品种同时在 1.0 mg/L BA 时达到最高, 依次为 20%、21.43%, Y1、Y4、Y5 成苗率之间没有显著差异, Y2 处理的成苗率位于中间, BA 浓度过高或过低都不适合苗的形成; 从褐死率来看, 品种 1 在 0.5 mg/L BA 时最低为

6.12%, 品种 2 在 1.0 mg/L BA 时最低为 7.81%; Y5 处理最高两品种依次为 10.96% 和 12.33%, 其次为 Y4、Y1 处理。

品种 1 的最佳 BA 处理浓度为 0.5 mg/L, 品种 2 为 1.0 mg/L, 品种间有差异。

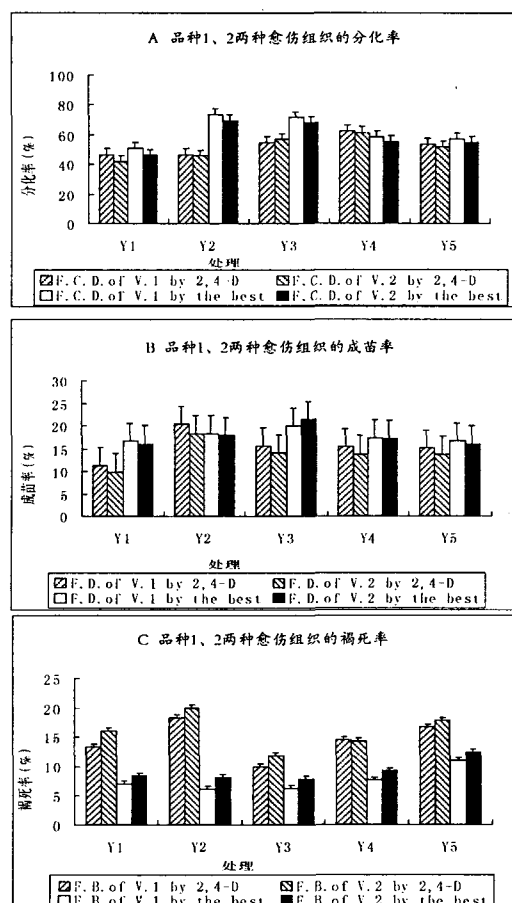


图 3 同时添加 KT、BA 对 1、2 号品种两种愈伤组织分化的比较

从表 2 可知, 用仅含 2,4-D 诱导的愈伤组织在几种分化培养基上的分化率, 两品种差异不显著, 成苗率、褐死率差异显著; 从 3 项指标统计的结果看, 品种 1 的培养效果比品种 2 好, 处理间差异极为显著。从处理的培养效果来看, 品种 1 在 1.5 mg/L BA 分化率最高为 62.32%, 1.0 mg/L 和 2.0

mg/L BA 间无显著差异, 居中; 0.2 mg/L 和 0.5 mg/L BA 处理间差异不显著, 培养效果最差。基因型间成苗率差异极为显著; 两品种的最高值都在 0.5 mg/L BA 处, 依次为 20.41% 和 18.37%; 浓度大的 3 个处理间没有显著差异, 且随着浓度增加逐渐降低; 0.2 mg/L BA 最低, 两品种分别比最高值低 9.14% 和 7.51%。褐化率在基因型间差异显著, 处理间差异极显著, 除 1.5 mg/L BA 外, 品种 2 比品种 1 的都高; 0.5 mg/L 和 2.0 mg/L 培养效果相当, 褐化率最高; 0.2 mg/L 和 1.5 mg/L 次之, 1.0 mg/L 最低。

由图 3 可见, 最好培养基诱导的愈伤组织分化率高于仅用 2,4-D 诱导的, 且两种愈伤组织分化率最高的 BA 浓度有所差异, 相同处理时品种 2 分化率稍低于品种 1; 2,4-D 诱导、分化率最高的两个品种, BA 浓度均为 1.5 mg/L, 最高分化率分别为 62.32% 和 61.43%, 而最好培养基诱导、分化率最高的 BA 浓度有所下降, 为 0.5 mg/L, 其最高分化率分别为 73.47% 和 69.39%, 可知愈伤组织来源不同, 分化时对激素浓度、分化率的影响都比较大。在 0.5 mg/L BA 时, 两品种用相同诱导培养基得到的成苗率最高分别为 20.41% 和 18.37%, 在 1.0 mg/L BA 时, 两品种用最好培养基得到的愈伤组织成苗率最高, 依次为 20% 和 21.43%, 品种 1 两种愈伤组织的成苗率变化不大。关于褐死率, 2,4-D 诱导的明显高于用最好培养基诱导的, 品种 2 的褐死率比相同处理下品种 1 的高; 两个品种用 2,4-D 诱导的都是 0.5 mg/L BA 处理最低分别为 10% 和 11.9%, 在 0.5 ~ 1.0 mg/L BA 时, 最好培养基诱导的较低, 在 0.5 mg/L BA 时, 品种 1 为 6.12%, 在 1.0 mg/L BA 时, 品种 2 为 7.81%。

参考文献:

- [1] Abet, Futsuhara Y. Genotypic Variability Formation and Regeneration in Rice[J]. Theory Apple Genet, 1986, 72: 3-10.
- [2] Shimada T. In Vitro Culture of Wheat I. Callus Formation, Organ Redifferentiation and Single Cell Culture[J]. Can J Genet Cytol, 1969, 11: 194-304.
- [3] 王东元, 赵久然, 郭景伦, 等. 诱变育种在创造玉米新种质中的应用[J]. 北京农业科学, 1999, 17(2): 12-16.
- [4] 闫玉清, 等. 影响小麦成熟胚培养及植株再生因素的研究[J]. 植物研究, 2005, 25(1): 49-51.

【责任编辑 邢怀民】

Influences on the Effect of Triticum Aestivum Culture by Different Induction Medium

YANG Yu-ping¹, WEI Peng-xiao², CEN Xiu-fen²

(1. Management Department, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China; 2. Agriculture School, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Through inducing the mature embryo of *Triticum aestivum* by two different induction media, using the gained callus to make differentiation, by statistically analyzing the frequency of green plantlet differentiation, frequency of callus differentiation, frequency of callus brown, getting the results: the callus quality of different varieties increased by using the best medium. and the frequency of green plantlet differentiation, frequency of callus differentiation were all higher than callus got from the basic medium. Carrying through the callus time experimentation of the two different callus at the same time, found that the best differentiation time of the two calluses was different, when subculture one time, the frequency of green plantlet differentiation, frequency of callus differentiation were all at the highest value. But with subculture more time, the frequency of callus brown shows obvious rising trend.

Key words: induction culture; callus; differentiation; frequency of green plantlet differentiation; frequency of callus differentiation; frequency of callus brown