

小麦体细胞胚培养的研究进展

张阳, 郝晶

(山西农业大学, 山西 太谷 030801)

摘要: 禾本科植物主要是通过体细胞胚发生途径再生植株, 体细胞胚的研究对植物基因工程及农作物品种改良等都具有重大意义。而小麦作为人类的主要粮食作物之一, 其高效再生体系建立的研究显得尤其重要。研究不同激素、不同有机附加物对小麦体细胞胚发生的影响, 为建立良好的小麦体细胞无性系提供了理论依据。

关键词: 小麦; 体细胞胚; 组织培养; 愈伤组织; 激素; 有机附加物

中图分类号: S512.1-01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-8151 (2006) 06-0140-02

Advance in Research of the Culture of Wheat—Somatic Embryo

ZHANG Yang et al.

(Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China)

Abstract: Gramineae mainly regenerates through the way of reproducing somatic embryo, and it is significant for Plant Genetic Engineering and improving the crops quality to study somatic embryo. Wheat, being one of the main grain crops for human, it is especially important to study the forming of the effective regeneration system. And it supplies the theoretical foundation for building the better asexual plant of wheat-somatic embryo to study the influence from different hormone and additional organic effecting on the wheat-somatic embryo.

Key words: Wheat; Somatic embryo; Tissue culture; Callus Hormone; Additional organic

小麦是世界上重要的粮食作物之一, 随着社会经济的发展及生活水平的提高, 对其抗性增减、品种改良及产量提高的研究显得尤为重要。近年来在科技工作者的努力下, 生物技术已成为改良小麦品质的重要途径之一。而生物技术改良小麦品质离不开组织培养, 在组织培养条件下某些植物的多种外植体都可以分化出胚状体, 但离体胚发生是植物的一种潜能。如何把潜能表达出来, 就要改进培养方法和培养条件, 因为体细胞胚发生是受许多因素影响的。现就外源激素和有机附加物对小麦体细胞发生的影响作出讨论。

一、植物激素对小麦体细胞诱导的影响

植物激素是植物体内天然存在的一系列有机化合物, 含量极低, 调控细胞分化和生长的方向与进程及植物生命活动的整个过程。据报道, 胚性细胞和非胚性细胞是可以相互转化的, 因此激素的作用就显得尤为重要。^[1,2]早在20世纪60年代, 就有学者建立了胡萝卜体细胞发生体系, 它在含有2, 4-D的MS培养基中就可诱导愈伤组织和胚性愈伤组织的形成, 当转移至无2, 4-D的MS培养基中可诱导体细胞胚的形成与发育。^[3]另外, 不同的激素适用于不同植物体细胞的诱导, NAA和6-BA对石刁柏体胚诱导效果较好,^[4]白杆体胚诱导添加2, 4-D和6-BA效果明显。^[5]有研究指出, 在愈伤组织增殖过程中, 诱导的胚性决定细胞(induced embryo genetic determined cell IEDC. s)需要生长素。^[6]

在小麦体细胞胚的诱导过程中, 必不可少的就是激素的

作用, 尤其是生长素和细胞分裂素。它们所需的种类、浓度与供试材料的基因型、外植体的生理状态等多种因素有关。而在大多数植物体细胞胚的诱导过程中2, 4-D无疑是应用最广泛, 也是最有效的生长素类物质。对于小麦来说, 往往需要较高浓度的2, 4-D, Vasil等^[7]报道了禾谷类植物体细胞胚胎发生中2, 4-D的重要作用。不同质量浓度的2, 4-D对小麦幼胚胚性愈伤组织的诱导和平均鲜重增加量两方面都存在着明显的影响。随着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增加, 当达到一定浓度之后又显著下降。有研究结果表明, 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中起主要作用, 并得出其最佳适用质量浓度为2.0~3.0mg/L。^[8]王亚馥等^[5]在小麦的幼胚培养中用附加6mg/L 2, 4-D和0.5 mg/L KT的MS培养基上诱导出大量的胚性愈伤组织。虽然供试品种之间存在基因型之间的差异, 但2.0~4.0 mg/L的2, 4-D显著促进了小麦胚性愈伤组织的形成, 并且2, 4-D的效应是不可取代的。如在胚状体诱导阶段用NAA代替2, 4-D, 胚状体的发生率也较低; 而在愈伤组织的不定芽分化阶段单独加入KT也很难见其有分化现象的产生。可见2, 4-D是适宜小麦体细胞胚形成的不可缺少的激素。在体细胞胚诱导过程中, 生长素添加的时间及浓度对胚状体的诱导率影响很大。较高浓度的2, 4-D有利于小麦幼穗愈伤组织的形成与生长, 低浓度的2, 4-D更有利于胚性愈伤组织的形成。诱导初期添加高浓度的2,

收稿日期: 2006-06-21

作者简介: 张阳(1984-), 男(汉), 山西长治人, 主要从事农业科学方面的研究。

基金项目: 山西农业大学科技创新项目。

4-D 后, 在其生长后期往往需要及时去除或降低 2, 4-D 的浓度, 否则胚状体的诱导率会大幅度降低, 这在众多文献中都有相关报道。^[6,9~11] 这可能是因为外源激素过高的积累打破了外植体本身激素的平衡, 导致生长与分化受阻。前期诱导的 2, 4-D 浓度较低时, 降低 2, 4-D 的时间可相对推迟, 因为体胚的形成对激素水平要求是需要较高的一个相对积累的过程。若前期诱导的 2, 4-D 浓度较高时, 则降低 2, 4-D 浓度的时间应相对提高, 否则胚状体的诱导率会降低。

植物的各种生理效应是不同种类激素之间的相互作用的综合表现。单独加入 2, 4-D 并随其 2, 4-D 浓度降低其愈伤组织分化率有增加趋势, 当 2, 4-D 与 KT 配合使用时与单独使用相比其不定芽分化率明显提高, 甚至高达 100%, 这表明 KT 具有促进 2, 4-D 发挥效应的作用。Caman^[12] 等也指出, 在小麦的未成熟胚培养中观察到细胞分裂素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的发生, 加强 2, 4-D 对小麦幼胚体细胞胚性无性系形成的作用。最近有学者报道,^[1,13] 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。王睿辉和陈耀锋等^[8] 也有类似的报道, 在附加不同浓度 2, 4-D 的同时添加 KT, 虽然在不同品种之间诱导率有一定差异, 但 KT 对提高体细胞胚的诱导作用是明显的, 并且浓度在 0.5~1.0 mg/L 较为合适。

脱落酸对体细胞胚成熟的作用近年来研究的较多。ABA 不一定是体胚成熟所必须的激素, 但其对于提高体胚萌发的一致性和抑制畸形胚的形成是有作用的。^[8] ABA 可以产生类似水分胁迫的效应, 影响细胞的渗透压, 从而促进体胚发生的一致性。另外, ABA 对某些植物体细胞胚胎发生的特异基因表达起调控作用, 激活相关基因表达的特异蛋白, 合成贮藏蛋白, 晚期胚胎发生丰富蛋白和胚胎发生的特异性蛋白。^[15] 添加较低浓度的 ABA 对每块愈伤组织上产生的体细胞胚的恒定个数有一定的作用, 并且生长较为整齐。若 ABA 浓度过高, 则会改变体细胞胚成熟的正常生理代谢, 萌发率大幅度下降, 如培养基中添加 0.5 mg/L 的 ABA 不利于小麦胚性愈伤组织的诱导和分化。Javed (1989) 的研究结果表明, ABA 的效应与外植体的发育时期有关。当

以较为成熟的小麦胚为外植体时, ABA 促进胚性愈伤组织的发生; 而当以较为幼嫩的胚为外植体时, 则抑制胚状体的发生。由此可以看出加入 ABA 的时间较晚对体细胞胚诱导是有利的。

二、其它附加物对体细胞胚诱导的影响

有机附加物对小麦体细胞诱导具有影响作用。有关糖醇类物质对小麦体细胞的诱导报道不多, 只有一些文献称添加较高浓度蔗糖, 体细胞胚的诱导可以维持在一个较高的水平。^[16] 有实验表明, 蔗糖有利于小麦幼穗胚性愈伤组织的形成, 在 2.5%~5.5% 浓度范围内, 随蔗糖浓度的提高, 胚性愈伤组织的形成率也随之提高。^[17] Hunter (1988) 证明麦芽糖作用碳源更有利于愈伤组织的产生和分化。在适宜浓度的培养基中添加不同的甘露醇或山梨醇后, 愈伤组织生长速率减慢, 主要是由于细胞内物质的积累。在添加这类物质时, 如果用量太少 (<20 g), 则效果不明显, 若用量过多 (>60 g), 则会影响细胞正常的生长代谢, 导致细胞死亡。

对于谷氨酰胺及水解蛋白类物质, 其主要作用是增加培养基中的养分, 尤其是氮素含量。体细胞胚的发生需要较高浓度的氮素及其中间产物要求。国外一些文献有报道^[18] 称添加谷氨酰胺对体细胞胚的诱导是有利的。鸭茅细胞悬浮细胞中的体细胞胚胎发生必需水解酪蛋白。^[19] 维生素在植物生命活动中也起着重要的作用。植物幼胚组织所需的维生素要由其它组织供给, 在植物组织培养所需要的 12 种维生素中效果最好的是 VB1。试验显示, 在愈伤组织诱导、继代以及分化培养的 MS 培养基中添加 VB1 (盐硫酸胺物 10 mg/L) 有利于小麦幼胚胚性愈伤组织的发生, 对促进小麦幼胚愈伤组织的分化率也有显著提高, 且随着 VB1 的增加小麦幼胚愈伤组织的直接胚胎发生和非胚性愈伤组织的发生频率降低, 胚性愈伤组织的频率增加。^[20] 在转入分化培养基前对愈伤组织进行干燥处理 (12 h), 可以有效提高其分化频率。所以不同品种添加含氮附加物的作用效果是不同的, 但添加一定量的有机附加物对体胚的诱导是有利的。

综上所述, 体细胞胚的发生已被认为是植物界的普遍现象, 小麦的多种外植体在组织培养条件下都可分化出胚状体,^[21] 外源激素和有机附加物对小麦体细胞胚的发生、提高小麦胚的诱导率有着重要的影响。关于其对小麦体细胞胚培养的影响作用有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Y. Henry, J. L. Marcotte, J. de Buyser The effect of aneuploidy on karotype abnormalities in wheat plant regenerated form short — and long — term somatic embryogenesis Plant Science 114 (1996): 101-109.
- [3] S. satoch, H. Kamada, H. harada & T. Fujii Auxin controlled glycoprotein release into the medium of embryogenetic carrot cells. Plant Ohysiol, 1986, 81: 931-939.
- [4] 汪丽虹, 王亚馥, 崔凯荣. 石刁柏非胚性细胞与体细胞胚胚体细胞的超微笑结构的研究西北植物学报 1995, 15 (5): 11-14.
- [5] 杨金玲, 桂耀林, 杨映根, 等. 白杆体细胞胚发生及其植株再生植物学报 1997, 39 (4): 315-321.
- [6] 王亚馥, 崔凯荣, 陈克明, 等. 小麦组织培养中体细胞胚胎发生的细胞胚胎学及淀粉消长动态的研究实验生物学报 1993, 26 (3): 259-262.
- [7] Vasil J. G Jefferson N. E. Induction of embryogenic Triticum aestivum L. calli I, II [J]. Plant Cell Tissue, Organ Culture, 1987, 10(2): 101.
- [8] 王睿辉, 陈耀锋. 激素对小麦幼胚胚性无性系高效率诱导的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29 (1).

增加,应从以下几个方面着手:一是完善制度,制止不良债务增加。在清理原债务的前提下,坚决制止新债务的增加,严格审批开支,建立完善借(贷)款制度,资产管理制度,财务公开制度,干部任期离任审计制度等。建立产权明晰,权责明确,民主监督,科学管理的集体资产运营机制。二是启动债权,收欠还债。对村级现有债权要逐单位、逐户、逐笔核实清楚,结合实际区别对待,分类处理,必要时可通过法律程序,依法清收。三是积极增收,化解债务包袱。立足于现有基础,因地制宜,大力发展农村经济,减轻农民负担,增加农民收入,发展壮大集体经济,这是清理和控制村级债务的根本途径。

(四) 强化体系建设,振兴农经事业

农经管理工作在农村经济发展的重要作用和负担的职能

是其它部门难以替代的。面对我县目前农经体系建设中的四个不适应,今后在加强农经体系建设方面应做到:一是强化农经管理部门的行政管理职能,把农经工作列入各级党委政府工作的重要议事日程,在此基础上,农经部门要适应形势的变化,强化行政执法等各项职能,大胆工作,发挥出应有作用,以此提升地位,增强工作的权威性。二是加强农经人员素质建设,应把提高广大农经人员的素质真正纳入重要日程,既要重视农经业务培训,政策、法规培训,更要重视农经人员的政治素质培训,把我们农经队伍建设成一支农民群众满意,各级领导放心,自身素质过硬的专业队伍。三是改善工作条件。为保证农经工作顺利开展,县级财政部门应将农经部门开展正常业务工作所需的人员工资、差旅费、办公费、培训费等业务经费纳入财政预算,并足额按时拨给。

(上接第141页)

- [9] 崔凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 科学出版社, 2000.
- [10] M. Y. Zheng, C. F. Konzak Effect of 2, 4-dichloroophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat. *Plant Cell Reports*, 1999, 19: 69-73.
- [11] 周俊彦, 郭扶兴. 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚胎发生中的作用 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32 (4): 425-431.
- [12] Caman J, Heyser JW et al. Long duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures [J]. *Planta*, 1983, 157 (5): 385-391.
- [13] L. Zhang J. J. Rybczynski W. G. Langenberg A. Mitra R. French An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 241-250.
- [14] 王颖, 刘春朝, 陈秀兰. ABA促进针叶树体细胞胚胎分化 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38 (3) 273-277.
- [15] P. Hatzopoulos, F. Fong & T. H. D. Ho. Modular nature of abscisic acid response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 1996, 8: 1107-1119.
- [16] 崔凯荣, 任红旭, 刑更生, 等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚胎发生相关性研究 [J]. *兰州大学学报*, 34 (3): 93-99.
- [17] 任慧莉, 李春莲, 韩德俊, 等. 蔗糖与激素对小麦幼穗体细胞无性系形成及生长特性的影响研究 [J]. *西北植物学报*, 1999 (6).
- [18] 王亚馥, 崔凯荣, 陈克明. 小麦幼胚培养中体细胞发生和植株再生 [J]. *植物学通报*, 1992 (9): 29.
- [19] 张树录. 禾本科植物组织培养中的体细胞胚胎发生 [J]. *植物生理学通讯*, 1985 (6): 15-20.
- [20] 郭向云, 尹钧, 余桂荣, 等. VB1和干燥处理对小麦幼胚愈伤组织培养的影响 [J]. *华北农学报*, 2003, 18 (4): 19-22.
- [21] 崔凯荣, 刑更生, 周攻克, 等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. *遗传*, 2000, 22 (5): 349-254.