

文章编号:1001-4829(2006)05-0806-05

生长素对小麦幼胚组织培养的影响

李 琴,江千涛,魏育明,颜泽洪,郑有良

(四川农业大学小麦研究所,四川 都江堰 611830)

摘要:以川农 16、川麦 42 和良麦 2 号为供试材料,探讨了三种生长素对其幼胚组织培养的影响,并在此基础上筛选出相对较好的受体材料。结果表明,三种生长素在幼胚的诱导率、胚发芽率和胚发根率上存在极显著差异。2,4,5-T 和 NAA 在诱导小麦幼胚培养基,其胚芽、胚根发生严重;而 2,4-D 在诱导率、胚发芽率和胚发根率这三方面相对优于 2,4,5-T 和 NAA,适用于小麦幼胚的组织培养,且适宜浓度范围在 2.0~2.5 mg/L。基因型对小麦幼胚组织培养的诱导率没有影响,对胚发芽率有一定影响,而对胚发根率有较大影响。在三种基因型中,以川农 16 在诱导率、胚发芽率和胚发根率这三方面表现相对突出,可作为转化受体材料。

关键词:幼胚;生长素;基因型;组织培养;小麦

中图分类号:S512.1 **文献标识码:**A

Effect of auxins on the tissue culture from immature embryos of wheat

LI Qin, JIANG Qian-tao, WEI Yu-ming, YAN Ze-hong, ZHENG You-liang

(Triticaceae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Sichuan Dujiangyan 611830, China)

Abstract: To screen out the desirable genotypes and auxins for tissue culture, the influences of 3 auxins on the tissue culture from the immature embryos of 3 genotypes (ie. Chuannong 16, Chuanmai 42 and Liangmai 2) were investigated. It was found that 3 auxins had the significant effects on the frequency of immature embryos callus induction, germination and rootage. The addition of 2,4,5-T and NAA in the media resulted in a great deal of immature embryos germination and rootage. It was observed that 2,4-D was superior to 2,4,5-T and NAA in the frequency of immature embryos callus induction, germination and rootage. Optimum content of 2,4-D for the tissue culture for the immature embryos of wheat was 2.0~2.5 mg/L. Genotype had no effect on frequency of immature embryos callus induction, while it had the significant effect on frequency of germination, and frequency of rootage. Among the 3 genotypes, Chuannong 16 had the best performance in the frequency of immature embryos callus induction, germination and rootage, thus it could be used in the wheat genetic transformation.

Key words: immature embryos; auxins; genotypes; tissue culture; wheat

小麦组织培养是进行小麦遗传转化、快速育种等的基础工作^[1~4];而在小麦组织培养中,愈伤组织诱导频率和植株再生频率一般受外植体^[5~8]、基因型^[9~12]和培养基类型^[12~14]的影响。通过基因枪法介导外源 DNA 已获得水稻、燕麦、大麦、小麦等作物的转基因植株^[15~18]。然而,有效的再生植株常被限制在少数几种具有很强再生能力的特定模式基因型中。目前,在小麦中所获得的转基因植株仅限于 Bobwhite 等少数基因型中,推广品种更为鲜见^[19]。

培养基成分对小麦组织培养效果有很大影响。Lazar 等认为最优的培养基成分中包含 0.5 mg/L

2,4,5-T(2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-三氯苯氧乙酸)和 0.1 mg/L KT(kinetin, 激动素)^[13]。章力建认为以 2,4,5-T 代替 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-二氯苯氧乙酸)对诱导小麦幼胚产生及改进愈伤组织的质地具有高效性^[20]。赵占军等报道小麦幼胚组织培养适宜的 2,4-D 浓度为 1.5~2.5 mg/L;适宜的 IAA(indole-3-acetic acid, 吲哚乙酸)浓度为 2.0~3.0 mg/L;适宜的 6-BA(6-benzylaminopurine, 6-苄氨基嘌呤)浓度为 0.1~0.8 mg/L;适宜的 KT 浓度为 0.5~1.5 mg/L^[21]。

本文以 2,4-D、2,4,5-T、NAA(naphthalene acetic acid, 萘乙酸)等 3 种生长素和 3 个主要推广品种为研究对象,旨在找出最优的培养基组合,同时筛选出优良的基因型。

收稿日期:2005-06-11

基金项目:高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200357 和 200458)

作者简介:李 琴,女,在读硕士研究生,研究方向为小麦遗传育种。

1 材料与方法

1.1 供试材料

当前四川麦区具有优良农艺性状的 3 个小麦新品种川农 16、川麦 42 和良麦 2 号为供试材料,并于 2003 年 10 月至 2004 年 1 月分期播种于四川农业大学实验田。

1.2 培养基

所有培养基均以 MS 为基本培养基^[22],附加 3 种不同激素 2,4-D、2,4,5-T 和 NAA,以不同浓度水平(即 2,4-D 为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L;2,4,5-T 为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L;NAA 为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L)组成 15 种培养基。并在所有培养基附加 KT 0.1 mg/L,谷氨酰胺 500 mg/L,脯氨酸 500 mg/L,天门冬酰胺 150 mg/L,肌醇 100 mg/L,水解酪蛋白 300 mg/L,蔗糖 60 g/L,琼脂粉 10 g/L,pH 为 5.8。经高压灭菌,在 1.1 kg/cm²(121 ℃)下维持 15 min。

1.3 方法

待幼种子发育到嫩绿色,脊部由光亮转变为无光泽并具有一层绒毛时,幼胚刚好发育到透明后期和半透明前期^[23],取幼穗,剥出幼种子,用 70 % 的乙醇浸泡 1 min,再将其放在 1‰ 的升汞中表面灭菌 7~8 min,再用无菌水冲洗 3~5 次,放于无菌滤纸培养皿中用解剖刀取出幼胚,盾片朝上放于培养基表面。同一基因型在同一种培养基上接 3 皿,每皿放 30 个左右的幼胚。将接种好的幼胚在 25±2 ℃ 下进行暗培养。

1.4 数据统计

幼胚接种 15 d 后统计诱导率,30 d 后统计胚发芽率和胚发根率。诱导率=产生愈伤组织的幼胚数/接种的幼胚数×100 %;胚发芽率=产生胚芽的幼胚数/接种的幼胚数×100 %;胚发根率=产生胚根的幼胚数/接种的幼胚数×100 %。实验数据利用 DPSv 6.05 注册版进行 Duncan 新复极差检验法分析^[24]。

2 结果与分析

2.1 基因型对幼胚组织培养的影响

3 个供试材料的幼胚分别放置在 15 种诱导培养基上,培养 15 d 后均诱导出愈伤组织,其诱导频率均较高,平均值在 99.00 % 以上,变幅为 93.34 %~100.00 % (数据未列出)。由表 1 和表 2 可知,在愈伤组织诱导频率上,基因型间不存在显著差异,即基因型对诱导率没有影响。

幼胚培养 30 d 后统计胚发芽情况,3 个基因型的幼胚发芽均比较严重,平均在 57.21 % 以上,变化幅度较大,为 0.00 %~93.88 %。由表 1 和表 2 可知,基因型间的胚发芽率差异显著。这说明基因型对胚发芽有一定影响。

幼胚培养 30 d 后统计的发根情况表明,各个基因型间的差异极显著(表 1),其平均胚发根率在 22.77 % 以上,变幅为 0.00 %~85.24 %。由表 2 可看出,川麦 42 胚发根情况相对较轻,川农 16 相对较重,而良麦 2 号居中。由此可见,幼胚发根率受基因型的影响较大。

表 1 基因型与生长素试验方差分析

Table 1 Analysis of variance between genotypes and auxins

变异来源 Source variance	自由度 df	诱导率 Frequency of immature embryos callus induction		胚发芽率 Frequency of immature embryos germination		胚发根率 Frequency of immature embryos rootage	
		均方 MS	F 值 F value	均方 MS	F 值 F value	均方 MS	F 值 F value
基因型 (Genotype, G)	2	0.0008	2.18	0.0404	3.60 *	0.0383	3.88 *
激素 (Auxin, A)	2	0.0029	7.81 * *	3.9163	349.06 * *	2.6369	267.41 * *
激素浓度 (Concentration, C)	4	0.0001	0.36	0.0763	6.80 * *	0.1534	15.56 * *
基因型×激素 (G×A)	4	0.0011	2.88	0.1472	13.12 * *	0.0735	7.45 * *
基因型×激素浓度 (G×C)	8	0.0004	1.07	0.0232	2.07	0.0083	0.84
激素×激素浓度 (A×C)	8	0.0002	0.59	0.0627	5.60 * *	0.0525	5.32 * *
基因型×激素×激素浓度 (G×A×C)	16	0.0004	1.06	0.0181	1.62	0.0073	0.74
误差 (Error)	90	0.0004		0.0112		0.0099	

注: * 和 * * 分别代表 0.05 和 0.01 显著水平。

Note: * and * * represent the significance at 0.05 and 0.01 level, respectively.

表 2 基因型间差异显著性测验

Table 2 Difference of genotypes by Duncan's test

基因型 Genotype	诱导率(%) Frequency of immature embryos callus induction			胚发芽率(%) Frequency of immature embryos germination			胚发根率(%) Frequency of immature embryos rootage		
	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level
川农 16	99.71	a	A	59.68	ab	A	28.55	a	A
川麦 42	99.48	a	A	63.17	a	A	22.77	b	B
良麦 2 号	98.89	a	A	57.21	b	A	26.33	ab	AB

表 3 激素间差异显著性测验

Table 3 Difference of auxin by Duncan's test

激素 Auxins	诱导率(%) Frequency of immature embryos callus induction			胚发芽率(%) Frequency of immature embryos germination			胚发根率(%) Frequency of immature embryos rootage		
	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level
2,4-D	99.93	a	A	26.00	b	B	1.01	c	C
2,4,5-T	98.44	b	B	75.46	a	A	27.29	b	B
NAA	99.70	a	A	78.59	a	A	49.36	a	A

2.2 激素在幼胚组织培养中的效应

对 2,4-D、2,4,5-T 和 NAA 3 种激素在培养中的诱导率、胚发芽率和胚发根率的影响进行了研究,结果(表 1、表 3)表明,幼胚的诱导率、胚发芽率和胚发根率均存在极显著差异。在诱导率上,2,4-D 在 3 种激素中最高,均值为 99.93 %。NAA 低于 2,4-D,而 2,4,5-T 最低,均值为 98.44 %。NAA 和 2,4,5-T 的胚发芽率均较高,均值在 75.00 % 以上,2,4-D 较低为 26.00 %。从胚发根率来看,在添加 2,4-D 的培养基上几乎没有胚根的发生,其均值为 1.01 %,而添加 NAA 和 2,4,5-T 的培养基上胚根发生相对都较严重。

由此可见,2,4-D 在三种激素中,其诱导率、胚发芽率和胚发根率均优于 2,4,5-T 和 NAA(图 1),可作为小麦幼胚组织培养的首选生长素。

2.3 激素浓度水平对幼胚培养的反应

在本实验以 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mg/L 等 5 种浓度水平来研究生长素对幼胚组织培养的影响。由表 1 和表 4 可知,不同浓度水平激素在诱导率上不存在显著差异,均值在 99.00 % 以上,也就是说,不论浓度高低均能诱导出愈伤组织。然而,在胚发芽率和胚发根率上却存在极显著差异,随着浓度的升高,发芽和发根情况有所减轻,这可能是由于高浓度激素能抑制胚芽和胚根的发生。

2.4 2,4-D 对幼胚组织培养的反应

2,4-D 更适合用于小麦幼胚的组织培养,故以 2,4-D 为基础找出最适激素浓度和优良基因型。由表 5 可知,在诱导率和胚发根率上,三种基因型间均不存在显著差异,而在胚发芽率上存在极显著差异,川麦 42 和良麦 2 号的发芽情况均较严重,均值分别



图 1 2,4,5-T(A)、NAA(B)和 2,4-D(C)对小麦幼胚组织培养的影响

Fig. 1 Effect of 2,4,5-T(A), NAA(B) and 2,4-D(C) on the tissue culture of immature embryos in wheat

表 4 激素浓度间差异显著性测验

Table 4 Difference of concentration of auxin by Duncan's test

激素 Auxins	诱导率(%) Frequency of immature embryos callus induction			胚发芽率(%) Frequency of immature embryos germination			胚发根率(%) Frequency of immature embryos rootage		
	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level
	0.5	99.14	a	A	65.85	a	A	37.65	a
1.0	99.64	a	A	64.14	a	AB	28.61	b	B
1.5	99.38	a	A	60.56	ab	ABC	23.73	bc	BC
2.0	99.51	a	A	56.59	bc	BC	20.45	c	C
2.5	99.14	a	A	52.95	c	C	19.00	c	C

表 5 2,4-D 对三种基因型幼胚组织培养的差异显著性测验

Table 5 Difference of 2,4-D on the tissue culture of immature embryos in wheat by Duncan's test

基因型 Genotype	诱导率(%) Frequency of immature embryos callus induction			胚发芽率(%) Frequency of immature embryos germination			胚发根率(%) Frequency of immature embryos rootage		
	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level
川农 16	99.79	a	A	15.18	b	B	0.23	a	A
川麦 42	100.00	a	A	30.64	a	A	1.53	a	A
良麦 2 号	100.00	a	A	32.19	a	A	1.27	a	A

为 30.64 % 和 32.19 % ,而川农 16 的发芽情况较轻,均值为 15.18 % 。由此可见,川农 16 可作为一种优良的受体,用于遗传转化实验。

3 结 论

在小麦离体培养中,影响诱导率、胚发芽率以及胚发根率的因素较多,充分探讨和综合协调这些因素对小麦幼胚组织培养的作用,可以提高组织培养效率,使其有利于生物学研究、遗传转化和快速育种等工作^[21]。同时,基因型的局限性是限制小麦遗传转化和应用的关键因素之一。筛选培养力高而农艺

性状好的基因型作为受体,对于促进转基因小麦的研究和发展具有重要意义^[25]。

本试验研究了 2,4-D、2,4,5-T 和 NAA 三种激素对小麦幼胚组织培养的影响,以及川农 16、川麦 42 和良麦 2 号三种基因型对附加不同生长素的培养基的反应。结果表明,基因型在愈伤组织诱导率上不存在显著差异,而在胚发芽率和胚发根率上存在显著差异,这种结果和 Maddoch 等报道的结果一致^[6],与 Sears 和 Deckard 报道的结果不符^[9]。从诱导率、胚发芽率和胚发根率三方面来看,2,4,5-T 和 NAA 并不适合用来作为小麦幼胚的诱导,其胚发芽

表 6 2,4-D 各个浓度水平间差异显著性测验

Table 6 Difference of the concentration of 2,4-D on the tissue culture of immature embryos in wheat by Duncan's test

激素 Auxins	诱导率(%) Frequency of immature embryos callus induction			胚发芽率(%) Frequency of immature embryos germination			胚发根率(%) Frequency of immature embryos rootage		
	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level	均值 Mean	0.05 水平 0.05 level	0.01 水平 0.01 level
	0.5	100.00	a	A	42.81	a	A	4.7	a
1.0	99.65	a	A	32.92	b	AB	0.00	b	B
1.5	100.00	a	A	29.02	b	B	0.35	b	B
2.0	100.00	a	A	15.08	c	C	0.00	b	B
2.5	100.00	a	A	10.19	c	C	0.00	b	B

和胚发根严重,2,4-D 更适合用于进行小麦幼胚的组织培养。由表 3 和表 6 可知,2,4-D 对小麦幼胚的诱导率在三种生长素中居首位,胚发芽和胚发根都相对比较轻,甚至在几个浓度水平上没有胚根的发生。根据差异显著性比较,2,4-D 在 2.0~2.5 mg/L 水平上均适合用作小麦幼胚组织培养,与赵占军等的报道浓度范围较一致^[21]。

章力建^[20]指出,以 2,4,5-T 代替 2,4-D 的小麦未成熟胚的愈伤组织诱导率高达 85%~100%,表明 2,4,5-T 对诱导小麦幼胚产生愈伤组织的质地具有高效性。Lazar 等认为在培养基中加入 1.0 mg/L 2,4,5-T 与加入 2.0 mg/L 2,4-D 相比,2,4,5-T 能促进愈伤组织的增殖^[13]。本试验使用 2,4,5-T 和 NAA 后,胚芽和胚根的发生均较严重,影响胚性愈伤组织进一步发展,这可能是由于基因型等原因引起的。可见,NAA 和 2,4,5-T 并不适合用来诱导小麦幼胚愈伤组织。就基因型来说,本文先从总体上讨论了基因型间的差异,再从最优的生长素出发,分析了不同基因型的差异,结果表明川农 16 在诱导率、胚发芽率和胚发根率三方面表现的相对突出,可以考虑用作遗传转化的受体材料。

参考文献:

- [1] Franzone P M, Rios R D, Procopiuk A M, et al. Genetic analysis of in vitro regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Genetics and Breeding, 1998, 52(3): 195-201.
- [2] Vasil V, Srivastava V, Castillo A M, et al. Rapid production of transgenic wheat plant by direct bombardment of cultured immature embryos [J]. Biotechnology, 1993, 11: 1553-1558.
- [3] 赵虹, 李名扬, 裴炎. 小麦遗传转化研究进展 [J]. 生物技术, 2001, 11(3): 33-37.
- [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] Ozias-Akins P, Vasil I K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): evidence for somatic embryogenesis [J]. Protoplasma, 1982, 110: 95-105.
- [6] Maddock S E, Lanchester V A, Risiott R, et al. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. J Exp Bot, 1983, 34: 915-926.
- [7] Zhang L J, Seilleur P. A simple and fast method to obtain high frequency of plant regeneration from mature and immature wheat embryos [J]. Bull Rech Agron Gembloux, 1987, 22: 187-189.
- [8] Redway F A, Vasil V, Lu D, et al. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1990, 79: 609-617.
- [9] Sears R G, Deckard E L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration [J]. Crop Sci, 1982, 22: 546-550.
- [10] Tuberosa R, Ravaglia S, Lucchese C. Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat [J]. Agric Med, 1988, 118: 361-365.
- [11] Chowdhury S H, Kato K, Yamamoto Y, et al. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars [J]. Jpn J Breed, 1991, 41: 442-450.
- [12] Fennel S, Bohorova N, Ginkel M, et al. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 267-278.
- [13] Lazar M D, Collins G B, Wian W E. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures [J]. J Hered, 1983, 74: 253-357.
- [14] Mathias R J, Simpson E S. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) callus [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1986, 7: 31-37.
- [15] Christou P, Ford T L, Kofron M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos [J]. Biotechnology, 1991, 9: 957-962.
- [16] Somers D A, Rines H W, Gu W, Kaeppler H F, Bushnell W R. Fertile, transgenic oat plants. Biotechnology, 1992, 10: 1589-1594.
- [17] Weeks J T, Anderson O D, Blechl A E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077-1084.
- [18] Wan Y, Lemaux P G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants [J]. Plant Physiol, 1994, 104: 37-48.
- [19] 安海龙, 卫志明, 黄健秋. 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.
- [20] 章力建. 小麦未成熟胚诱生大量绿苗的研究初报 [J]. 遗传学报, 1987, 11(3): 175-178.
- [21] 赵占军, 陈茂盛, 王贵娟. 胚龄和激素对小麦幼胚组织培养的影响 [J]. 生物技术, 2003, 13(5): 7-8.
- [22] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol. Plant, 1962, 15: 473-479.
- [23] 刘少翔, 王卉, 孙毅, 等. 小麦幼胚的脱分化状态及再生性能研究 [J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 64-67.
- [24] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 65-68.
- [25] 贾海燕, 王洪刚. 小麦愈伤组织诱导及其再生能力影响因素的研究 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2003, 34(1): 9-14.

(责任编辑 雷波)