

胚龄、NAA 浓度、基因型对杂交小麦及其亲本幼胚培养的影响

栗现芳,马守才,张改生*,牛娜

(西北农林科技大学,陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室,陕西 杨凌 712100)

摘要: 以杂交小麦西杂一号、西杂五号及其亲本 Fp1, Mp1, Fp2, Mp2 为试材,采用幼胚培养一步成苗法研究了胚龄、NAA 浓度、基因型对小麦幼胚培养成苗率及生长情况的影响。结果表明,幼胚培养最适宜的胚龄为 16d;最适宜的 NAA 浓度为 0.13 mg/L;杂交小麦幼胚出苗率明显高于自交小麦幼胚,自交小麦品种中 Fp2 培养成苗效果较佳。因此,胚龄、NAA 浓度及基因型对小麦幼胚组织培养具有明显的调节作用。在实践中应协调这些因素的作用,提高组织培养效率,从而缩短育种年限,加速育种进程。

关键词: 小麦;胚龄;NAA;幼胚;组织培养

中图分类号: S512.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)06-0031-04

Effects of Embryo Age, NAA and Genotype Difference on the Tissue Culture of Immature Embryos from Hybrid Wheat and Its Parents

LI Xian-fang, MA Shou-cai, ZHANG Gai-sheng*, NIU Na

(Shaanxi Key Laboratory of Crop Heterosis, Northwest A & F University, Yangling, 712100, China)

Abstract: As an experimental material, XZ1, XZ5 and their parents, uses immature embryos of wheat tissue culture. The effects of age of immature embryos, NAA and different wheat cultivars on the frequency of seedling and growth of the tissue culture from immature embryos of wheat were reported in this paper. The experiment results indicated that the age of immature embryos for its tissue culture was 16d; The optimum concentration of NAA was 0.130 mg/L; The rate of germination of hybrid wheat embryo significantly higher than that of self-wheat embryo; In self-wheat varieties, Fp2 results better cultured seedlings. From all these accounts, we can safely say that the age of immature embryos, concentration of NAA and genotype obviously took regulative effects on the tissue culture from immature embryos of wheat. In practice, the integrating of these effects was not only helpful to increase the efficiency of the tissue culture from immature embryos of wheat, but also helpful to shorten the breeding period and promote the breeding process.

Key words: Wheat; Embryo age; NAA; Immature embryo; Tissue culture

小麦育种周期过长一直是困扰小麦育种的中心问题。关于加速育种进程、缩短育种年限的研究,以

前主要是利用品种特性、特殊的地理环境或温室加代,受环境因素影响较大。随着组织培养技术的发

收稿日期:2007-01-04

基金项目:陕西省“十五”科技攻关项目(2004-2005K01-G4);国家杨陵农业生物技术育种中心专项基金项目(99-1A)

作者简介:栗现芳(1981-),女,河北魏县人,在读硕士研究生,主要从事小麦杂种优势利用及品质改良研究。

通讯作者:张改生(1951-),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事小麦杂种优势利用研究。

展,利用该技术进行缩短小麦发育周期的研究日益增多。可用于小麦组织培养的外植体几乎遍及整个植株,如叶片、叶鞘、种子、幼穗、幼胚、分生组织、原生质体和小花等^[1]。自上世纪90年代以来,以幼胚为外植体进行小麦组织培养的方法越来越受到人们的重视^[2~4]。但小麦幼胚的培养再生过程往往表现出明显的基因型差异^[5~8]。而影响小麦幼胚组织培养效率的因素除基因型外,还有碳源、氮源、无机盐、温度、光照、pH值、幼胚胚龄、激素等。因此,研究幼胚组织培养的影响因素,并优化组织培养条件是提高小麦幼胚组织培养效率的关键。本研究以杂交小麦西杂一号、西杂五号及其亲本共6个小麦品种为材料,在其他影响因素一致的条件下研究了胚龄和激素(NAA)对小麦品种幼胚组织培养一步成苗的作用,以及基因型不同对小麦幼胚培养效果的影响,以便更有效的利用小麦幼胚培养一步成苗法缩短杂交小麦的育种年限。

1 材料和方法

1.1 供试材料

杂交小麦西杂一号(XZ1)、西杂五号(XZ5)及其亲本 Fp1, Mp1, Fp2, Mp2。

1.2 供试培养基

以MS培养基为基础,分别设置不同浓度的NAA,同时所有处理均加入6-BA 0.05 mg/L、蔗糖30 g/L、琼脂6 g/L, pH值5.8,高温(121℃)高压

蒸汽(1.1 kg/cm²)灭菌20 min。

1.3 幼胚消毒与接种方法

在小麦开花时选取 Fp1, Mp1, Fp2, Mp2 的典型穗挂牌标记,组合 Fp1×Mp1, Fp2×Mp2 进行母本去雄、杂交、挂牌标记,每天观察胚的发育情况。并于授粉后10, 12, 14, 16 d进行田间取样,用自来水冲洗后剥取籽粒,移到超净工作台,置于75%的乙醇浸泡30 s,无菌水漂洗3~4次,然后用0.1%的升汞消毒12 min,无菌水漂洗3~5次,放在垫有无菌滤纸的培养皿中,用镊子剥取幼胚,用解剖刀接种于培养基上。幼胚尖端向下,每瓶接种幼胚5枚。

1.4 一步成苗培养方法

接种后置于恒温培养箱暗培养,温度为25℃,培养直到幼胚萌发,约1~2周。然后调至20~22℃光培养,光照16 h/d,光强为9000~10000 lx,培养10~15 d。室温开口炼苗2~3 d后移栽。培养期间统计出苗率和幼苗生长状况。约培养2周后幼胚发育成完整植株。

1.5 数据统计

幼胚接种15 d后统计成苗数、叶长、根长、根数、生根苗数、污染率等。

2 结果与分析

2.1 胚龄对小麦成苗率及幼苗生长状况的影响

不同胚龄对小麦幼胚组织培养的作用效果明显不同,结果见表1。

表1 胚龄对小麦幼胚组织培养的影响

胚龄(d)	成苗数(株)	接种数(个)	成苗率(%)	平均叶长(cm)	平均根长(cm)	生根苗数(株)	生根苗比例(%)	平均每苗根数(条)
10	25	120	20.8	2.2	5.5	13	52.0	2.4
12	64	120	53.3	4.1	4.2	41	64.1	2.6
14	82	120	68.3	6.0	4.1	63	76.8	2.4
16	100	120	83.3	7.9	4.8	83	83.0	2.9

由表1可知,幼胚在10~16d胚龄时均能培养成苗,12, 14, 16d胚龄时成苗率明显高于10d胚龄,分别为53.3%, 68.3%, 83.3%;其平均叶长分别为4.1 cm, 6.0 cm, 7.9 cm;平均根长分别为4.2 cm, 4.1 cm, 4.8 cm;另外,14d和16d胚龄生根苗比例明显高于10d和12d胚龄,而不同时期胚龄在平均每苗根数上差异不明显。无论从成苗率还是各项生长指标来看,16d幼胚培养效果优于14d胚龄,且根叶生长健壮,移栽后较易成活。因此,综合考虑胚龄对出苗率及幼苗健康状况的影响,幼胚组织培养效果最好的胚龄为16d。至于胚龄继续延长是否幼胚培养效果更好,作者认为,16d胚龄成苗率

已达到83.3%,且胚龄过长反而不能有效的缩短育种年限。

2.2 NAA浓度对小麦幼胚组织培养的作用

在试验中对NAA浓度进行了不同水平的配比,以寻求较高成苗率的NAA浓度配比,按照设计,在胚龄为10d设置了4个浓度梯度。培养15d后观察统计其生长状况,结果见表2。

由表2可知,培养基中加入不同浓度的NAA对小麦幼胚组织培养的作用效果明显不同。在培养基中加入0.05 mg/L 6-BA的基础上,加入NAA浓度为0.13 mg/L和0.40 mg/L时成苗率明显高于其他浓度,分别为28.8%, 27.5%。由于本试验

表2 NAA对小麦幼胚组织培养的影响

NAA浓度 (mg/L)	成苗数 (株)	接种数 (个)	成苗率 (%)	平均叶长 (cm)	平均根长 (cm)	生根苗数 (株)	生根苗比例 (%)	平均每苗根数 (条)
0.02	25	160	15.6	1.8	5.3	9	36.0	2.5
0.13	23	80	28.8	3.5	3.8	20	87.0	2.6
0.40	22	80	27.5	1.6	1.5	18	81.8	3.6
0.67	16	80	20.0	2.4	1.4	12	75.0	3.8

的幼胚均取于10d胚龄,各浓度水平的成苗率都不理想。NAA浓度为0.02mg/L时成苗率显著下降且植株生长不良,表现为根系生长健壮,能成苗,但植株细弱瘦小;从平均叶长、平均根长、生根苗比例等生长指标来看,NAA浓度为0.13mg/L时,明显好于其他浓度水平,生长状况表现为苗大根壮,移栽后100%成苗。虽然NAA浓度为0.40mg/L时成苗率和生根苗比例与浓度为0.13mg/L时差异不大,但表现苗小、根小、根多等不良生长现象。另外,随着NAA浓度的不断增加,每苗平均根数也不断增加,但根数过多严重影响根、叶的伸长和幼苗的健康生长,植株生长细弱,移栽后较难成活。部分幼胚萌动不久后即停止发育,最后死亡;部分幼胚只有胚根或胚芽鞘发育;部分幼胚胚根、胚芽鞘发育,但胚芽不发育;部分幼胚发育成畸形苗;部分植株根系发

育不良。这些不良现象可能是NAA过量且不易被分解破坏所致。因此,小麦幼胚组织培养适宜的NAA浓度不易过高,最佳为0.13mg/L。

2.3 不同基因型对小麦幼胚培养特性的影响

2个不同基因型杂交组合F₁和4个自交亲本幼胚培养一步成苗效率的结果见表3。

由表3可知,在最适胚龄和同一幼胚培养条件下,6个不同基因型小麦幼胚的成苗率及生长指标均有一定差异,杂交组合小麦幼胚成苗率明显高于亲本自交小麦幼胚,分别为97.5%,92.5%。其中XZ1的成苗率、生根苗比例最高,幼苗生长健壮。亲本自交中Fp2幼胚培养成苗效果较佳。成苗率由高到低的顺序为XZ1,XZ5,Fp2,Mp2,Fp1,Mp1。平均每苗根数除Mp1表现较多外,其他5个品种均无较大差异。

表3 不同品种基因型对小麦幼胚组织培养的影响

品种	成苗数 (株)	接种数 (个)	成苗率 (%)	平均叶长 (cm)	平均根长 (cm)	生根苗数 (株)	生根苗比例 (%)	平均每苗根数 (条)
XZ1	39	40	97.5	9.0	5.0	35	89.7	2.7
XZ5	37	40	92.5	5.5	3.8	30	81.1	3.0
Fp1	25	40	62.5	7.4	3.9	21	84.0	2.6
Mp1	23	40	57.5	5.6	4.7	17	73.9	3.9
Fp2	31	40	77.5	5.4	5.2	24	77.4	2.8
Mp2	26	40	65.0	8.9	4.5	19	73.1	2.5

2.4 污染率

在幼胚接种15d后统计所有幼胚污染数,算出污染率,结果见表4。

表4 接种幼胚数、污染幼胚数和幼胚污染率

品种	幼胚数(个)	污染幼胚数(个)	幼胚污染率(%)
XZ1	160	5	3.1
XZ5	160	3	1.9
Fp1	140	6	4.3
Mp1	140	0	0.0
Fp2	140	0	0.0
Mp2	140	7	5.0

从消毒效果来看,Mp1,Fp2幼胚无污染;Fp1×Mp1,Fp2×Mp2,Fp1幼胚的污染率仅为3.1%,1.9%,4.3%;Mp2幼胚的污染率最高,为5.0%。此次,所有接种幼胚污染率平均为2.4%。这一结果表明,该消毒方法对污染的控制较好,可用于杂交

小麦XZ1,XZ5及其亲本幼胚的一步成苗培养。建议每瓶接种不易过多,避免接种时间过长导致污染率的增加。每个三角瓶(100mL)的接种幼胚数不多于5个为宜。另外,接种过程中刀片上粘有胚乳汁或其他种子内含物时,接种的幼胚容易发霉,导致接种后污染。这一点同陈升位的研究结果一致^[9]。所以,取胚时应尽量减少带出胚乳或其他种子内含物。

3 讨论

成苗率是小麦幼胚培养的关键环节,它对幼胚培养的成功与否具有决定作用,本文报道的幼胚的成苗率达到了97.5%,92.5%,而且生根苗比例达到了73%以上,每苗平均根数为2~4。从成苗率、平均叶长、平均根长、生根苗比例、平均每苗根数5

个指标来看,本研究采用的MS培养基附加0.05mg/L 6-BA,0.13mg/L NAA及培养条件可用于杂交小麦XZ1,XZ5及其亲本幼胚的一步成苗培养。

影响小麦幼胚组织培养的因素除了有碳源、氮源、无机盐、温度、光照、pH值,还有幼胚胚龄、激素、基因型等^[4],幼胚的发育成熟程度在很大的程度上影响到培养工作的成败和培养成效的高低。丁晓义等认为,将幼胚培养的胚龄提前至10d是完全可行的,以12~14d最为适宜^[10]。赵占军等以扬麦158为试验材料,研究了胚龄对小麦幼胚组织培养的作用,认为幼胚组织培养最适宜的胚龄为14~16d^[4]。章力建认为,春小麦的最适胚龄为16~18d,冬小麦为19~22d^[11]。Altpeter等报告幼胚取材时期以花期后10~14d大小在0.5~1.5mm的小麦未成熟胚为好^[12]。可见不同品种、不同栽培条件最佳胚龄会有所差异。本研究结果表明,幼胚组织培养适宜的胚龄为16d,由于10d胚龄幼胚与胚乳粘连在一起,取出时易带出胚乳或其他种子内含物,不便于操作并造成接种后污染率高、成苗率低。12d胚龄幼胚与胚乳较易脱离,14d,16d胚龄幼胚更便于操作。相对来说16d胚龄幼胚培养的各项指标好于14d胚龄。至于胚龄继续延长是否幼胚培养效果更好有待于进一步研究,不过我们认为,胚龄过长反而不能有效缩短育种年限。

在小麦幼胚培养中,激素水平也是影响培养成效的主要因素。由于NAA可大批量人工合成,耐高温高压,不易被分解破坏,所以广泛用于生根,并与细胞分裂素互作促进茎的增殖。有关报道显示人们对NAA的最佳使用浓度有不同的认识。有人认为,NAA0.2mg/L诱导生根效果较好^[13,14]。丁晓义^[10]建立的适合幼胚培养的PM培养基中附加NAA的浓度为0.02mg/L。安海龙等在生根培养基中附加大量元素减半的MS培养基,其生根频率始终稳定在90%以上^[15]。本试验分别研究了0.02mg/L,0.13mg/L,0.40mg/L,0.67mg/L 4个浓度水平的NAA对6个不同小麦品种幼胚组织培养的影响。结果表明,在6-BA浓度为0.05mg/L的情况下,适宜的NAA浓度为0.13mg/L。

从成苗率、平均叶长、平均根长、生根苗比例、平均每苗根数等指标来看,杂交小麦品种XZ1和XZ5幼胚培养效果明显好于其亲本自交幼胚;在自交小麦品种中,Fp2培养效果最好。在同一幼胚培养条

件下,6个不同基因型小麦幼胚的成苗率及生长指标均有一定差异。因此,不同品种即基因型不同对小麦幼胚培养效果有一定的影响。在组织培养实践中,综合协调影响小麦幼胚组织培养的因素,可以提高组织培养效率,使其更加有利于杂交小麦快速育种。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程,[M].第2版,北京:科学出版社,2002:344-359.
- [2] 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.
- [3] 肖兴国,张爱民,聂秀玲.转基因小麦的研究进展与展望[J].农业生物技术学报,2000,8(2):111-116.
- [4] 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.
- [5] 李娜,焦滇,谷运红,等.小麦组织培养研究进展[J].河南农业科学,2005(8):11-14.
- [6] Sears R G,Deckard E L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration[J]. Crop Sci,1982,22:546-550.
- [7] Lazar M D, Collins G B, Vian W E. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures[J]. Heredity,1983,74:35-357.
- [8] Carman F G,Jefferson N E,Campbell W F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. quantification of genotype and culture medium effects[J]. Plant Cell Tiss Org Cult,1987,10:101-113.
- [9] 陈升位,张琼仙,毛孝强,等.小麦一簇毛麦6VS/6AL易位材料幼胚一步成苗培养技术集成[J].云南农业大学学报,2006,21(11):20-23.
- [10] 丁晓义,姜鸿明,王丽,等.小麦一年五代快速发育技术研究[J].麦类作物学报,2005,25(2):135-137.
- [11] 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,1987,14(3):175-178.
- [12] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, et al. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants[J]. Plant Cell Rep,2002,16:1217.
- [13] 于晓红,朱祯,付志明,等.提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J].植物生理学报,1999,25(4):388-394.
- [14] 尹钧,任江萍,宋丽,等.基因枪转化小麦幼胚的再生培养与转基因植株的获得[J].西北植物学报,2003,23(9):1565-1570.
- [15] 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.