

影响小麦组织培养效率的重要因素研究

赵永英¹, 李翠香², 苗红梅^{1*}

(1. 河南省农作物新品种重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450052)

摘要: 以郑麦 9023 盾片为材料, 对影响小麦组织培养的 2,4-D, AgNO₃, 蔗糖进行了研究。结果表明, 培养基中附加 0.5 mg/L 2,4-D 有利于胚性愈伤组织的诱导, 添加 5 mg/L 和 10 mg/L 的 AgNO₃ 对根苗的分化有负效应, 蔗糖 30 g/L 对根苗的分化最有利。

关键词: 小麦; 组织培养; 2,4-D; AgNO₃; 蔗糖

中图分类号: S512 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)01-0023-05

Important Factors Affecting Wheat Tissue Culture Efficiency

ZHAO Yong-ying¹; LI Cui-xiang²; MIAO Hong-mei^{1*}

(1. Henan Key Laboratory for New Crop Improvement, Zhengzhou 450002, China;

2. Grain College, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of wheat tissue culture, the effects of 2,4-D, AgNO₃ and sucrose on callus induction and regeneration were studied by culturing the scutella from Zhengmai 9023. The results showed that the medium with 0.5 mg/L 2,4-D was better for the induction of embryogenic callus; additional 30 g/L sucrose was beneficial to wheat green primordium differentiation, while a supplement of 5 mg/L or 10 mg/L AgNO₃ was negative.

Key words: Wheat; Tissue culture; 2,4-D; AgNO₃; Sucrose

小麦是世界上栽培面积最大的重要粮食作物, 进行小麦品种改良无疑具有重要意义。自 20 世纪 80 年代开始研究转基因植物以来, 利用转基因等生物技术对小麦进行抗虫、抗病、抗逆及品质改良等已取得了较大进展^[1]。但转基因技术依赖于有效的小麦组织培养体系, 在小麦组织培养体系中植株再生率低的问题是限制小麦转基因成功和大幅度提高转基因小麦效率的瓶颈^[2]。多年来, 研究者对影响小麦组织培养的因素(基因型、外植体来源、培养基类型及成分等)进行了大量研究^[3-8], 但小麦栽培品种再生困难与转化改良要求之间的矛盾并没有得到根本解决。

小麦属六倍体, 遗传背景复杂, 离体培养影响因子众多。研究表明, 外源激素在诱导愈伤组织方面

起到重要调控作用, 其中 2,4-D 是诱导体细胞发生的重要因素, 特别是对禾本科植物的体细胞发生具有决定性的作用^[9]。蔗糖作为重要的碳源能够影响小麦胚性愈伤组织形成及再生, 在一定浓度下还可以提高愈伤组织活力, 使其从松散状态转变为结构紧密^[10]。另外, AgNO₃ 作为一种较好的乙烯活性抑制剂, 近年来, 有关其促进植物离体培养愈伤组织的器官发生、体细胞胚胎的形成及植株再生的研究已有报道^[11,12]。但 AgNO₃ 对小麦组织培养的作用如何, 鲜有报道。为此, 以河南省广泛种植的优良小麦品种郑麦 9023 为材料, 对 2,4-D, AgNO₃, 蔗糖 3 种影响小麦组织培养的因素进行研究, 以期进一步优化小麦组织培养体系, 推动小麦遗传工程研究的进展。

收稿日期: 2006-07-25

基金项目: 河南省杰出人才创新基金项目(0121000700); 河南省自然科学基金项目(0611032100)

作者简介: 赵永英(1974-), 女, 河南南阳人, 助理研究员, 硕士, 主要从事农作物转基因和植物组织培养研究。

通讯作者: 苗红梅(1974-), 女, 河南商丘人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦基因工程研究。

1 材料和方法

1.1 材料

选用六倍体小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种

郑麦 9023, 种子由河南省农业科学院生物技术研究所提供。材料种植于河南省农科院试验田。

1.2 方法

1.2.1 培养基 培养基种类和配方见表 1。其中,

表 1 培养基配方

培养基名称	基本成分	2,4-D	IAA	ZT	AgNO ₃	蔗糖
诱导培养基(MSD)	MS	1.0 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0)	0	0	0(0, 5.0, 10.0)	30(30, 60, 90)
分化培养基(MSR)	MS	0	1.0	2.0	0(0, 5.0, 10.0)	30(30, 60, 90)

(mg/L)

注: 培养基中均含有 250 mg/L 谷氨酰胺, 200 mg/L 水解酪蛋白, 蔗糖含量为 3%, 琼脂 0.8%, 肌醇 0.1 g/L

括号中为不同浓度试验设置浓度。

1.2.2 材料获得与培养 取大田中开花 10~12 d 的小麦穗, 用 70% 的乙醇进行表面消毒 30 s, 剥出籽粒, 在无菌操作台上用 70% 的乙醇浸泡 30 s, 0.5% 的次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 用解剖刀剥出完整盾片 (0.5~1.0 mm), 盾片向上接种于 MSI 诱导培养基上, 试验每处理设置 3 皿, 每皿外植体均为 20 个。材料在 23~25 °C 下暗培养 28 d, 再转至 MSR 分化培养基上, 在光照 12 h/d, 光强 1200 lx 条件下培养 28 d。

每 14 d 继代一次, 28 d 转到分化培养基时统计愈伤组织的发生类型, 56 d 后统计芽数、根数、苗数和再生植株数, 试验期间不断进行观察和记载。

1.2.3 统计方法 愈伤组织类型参照文献[9]; 出愈率 (%) = (愈伤数/接种数) × 100%; 胚性愈伤率 (%) = (胚性愈伤数/接种数) × 100%; 出苗率 (%) = (有苗愈伤数/愈伤数) × 100%; 再生率 (%) = (再生植株数/愈伤数) × 100%。对统计结果整理后用 Spss 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 对小麦愈伤组织诱导的影响

在诱导培养基中分别添加 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 mg/L 2,4-D。结果表明, 添加 2,4-D 的培养基在接种 3 d 后, 大多数盾片诱导出白色的愈伤组织 (表 2)。2,4-D 浓度在 0.5~2.0 mg/L 盾片的出愈率没有明显区别, 都达到 96% 以上, 胚性率表现有差

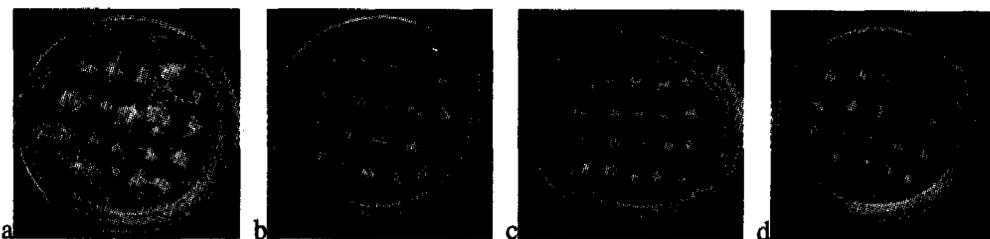
异, 以 0.5 mg/L 2,4-D 最高。还观察到不同处理诱导愈伤组织的颜色、质地、形态及生长状况有很大差别。诱导愈伤组织的状态类型见表 3。其中, 2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 时, 诱导的愈伤组织多为 A 类 (图 1a), 这样的愈伤组织转到分化培养基上时能够迅速分化出芽点, 并且单个愈伤组织分化的芽点数最多, 为胚性愈伤组织。2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 时诱导的愈伤组织多为 B 类 (图 1b), 状态与 0.5 mg/L 时的相近, 但芽点的分化稍慢。2,4-D 浓度为 1.5 mg/L 和 2.0 mg/L 时, 诱导愈伤组织状态多为 C 类 (图 1c, d), 这样的愈伤组织转到分化培养基上, 分化速度慢, 为非胚性愈伤组织。有些芽点最终也不能分化出苗或分化出畸形苗。分析结果表明, 2,4-D 浓度的不同, 在一定程度上主要是影响愈伤组织的质量, 培养基中附加 0.5 mg/L 2,4-D 有利于胚性愈伤组织的诱导。有研究表明, 2,4-D 虽然可以起到诱导作用, 但其对外植体及愈伤组织的伤害作用较大^[13]。较高浓度 2,4-D (1.5 mg/L 和 2.0 mg/L) 影响愈伤的发育可能和 2,4-D 本身对材料的伤害有关。

表 2 2,4-D 对小麦盾片愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	胚性愈伤数 (个)	胚性率 (%)
0.5	200	200	100	156	78
1.0	200	196	98	140	70
1.5	200	200	100	124	62
2.0	200	199	99.5	116	58

表 3 不同 2,4-D 浓度诱导愈伤组织状态

愈伤组织类型	颜色	质地	表面	长势
A	黄色、淡黄色	较硬且触之易碎	干爽, 有小米粒状突起	生长旺盛
B	淡黄色	较硬	较干燥, 小米粒状或瘤状突起	较旺盛
C	暗黄色或发白	疏松、湿软	光滑或少有突起	较差



a: 2,4-D 0.5 mg/L; b: 2,4-D 1.0 mg/L; c: 2,4-D 1.5 mg/L; d: 2,4-D 2.0 mg/L

图1 不同2,4-D浓度诱导愈伤组织的状态

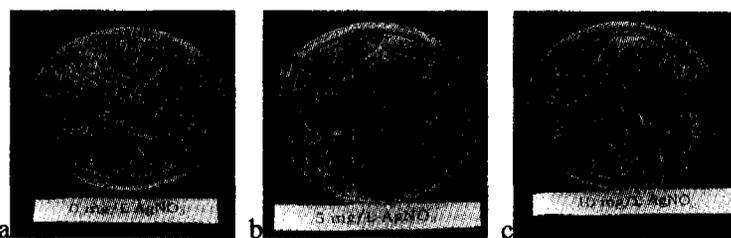
2.2 AgNO₃ 对愈伤组织诱导和苗再生的影响

AgNO₃ 在植物组织培养中的作用一直是研究者关注的重点。一般认为,Ag⁺是一种乙烯合成的抑制剂,它可以通过竞争与细胞膜上的乙烯受体蛋白结合,从而阻止或降低乙烯的作用,降低植物细胞的死亡,促进一些再生困难的形态发生,增加外植体产生不定芽的数目,提高植株再生频率^[14]。本试验中,在诱导和分化培养基中分别加入 AgNO₃ 0, 5, 10 mg/L,结果显示,AgNO₃ 浓度的不同对出愈率没有明显影响,各处理的出愈率都达到 100%,但影响了愈伤组织的分化(表 4)。不同 AgNO₃ 浓度下出苗率和再生率差别较大。方差分析表明,植株再生率差异达到显著水平,培养基中不添加 AgNO₃ 时再生率最高。出苗率虽然没有达到显著差异,但

也是在 AgNO₃ 0 mg/L 时最高。试验中发现,在 AgNO₃ 0 mg/L 时,愈伤分化的芽较多,出苗率和再生率均最高,且苗生长发育正常(图 2a)。AgNO₃ 浓度为 10 mg/L 时,产生的愈伤组织多为深黄色,含水量多,分化的芽较多,但多数畸形,成苗少,再生苗的叶卷曲(图 2c)。AgNO₃ 浓度为 5 mg/L 时分化的苗也多为畸形(图 2b)。

表 4 AgNO₃ 对小麦盾片愈伤组织诱导与分化的影响(%)

硝酸银 (mg/L)	接种数	出愈率	出苗率	再生率
0	200	100	78	78
5	200	100	63	61
10	200	100	71	71

a: AgNO₃ 0 mg/L; b: AgNO₃ 5 mg/L; c: AgNO₃ 10 mg/L图2 培养基中附加不同浓度 AgNO₃ 愈伤分化情况

分析结果表明,培养基中不添加 AgNO₃ 时芽苗的分化最好,附加 5 mg/L 和 10 mg/L 的 AgNO₃ 对郑麦 9023 根苗的分化有负效应,在组织培养时应慎重加入。

2.3 蔗糖对小麦愈伤组织诱导和苗再生的影响

蔗糖在植物组织培养中通常作为碳素来源和能量物质,同时对保持培养基的渗透压也有重要作用。在本次蔗糖浓度试验中,在诱导和分化培养基中分别加入 30, 60, 90 g/L 的蔗糖,结果显示,不同浓度蔗糖对郑麦 9023 盾片愈伤的诱导没有显著差异,但出苗率和再生率差异显著($P < 5\%$, 表 5)。在试验中,各个处理的出愈率达到 100%,但愈伤组织的质量和生长速度有差异。蔗糖浓度 30 g/L 时愈伤质

量较好,黄色,质地疏松干爽,生长迅速,芽点分化较早,成苗多且芽和苗生长正常(图 3a)。随着蔗糖浓度的升高,愈伤组织的颜色变浅,含水量明显增多,发育迟缓,芽点形成少,大部分芽点只是叶绿素的聚积,在以后的继代中不断变褐,并且在蔗糖浓度为 60 g/L 和 90 g/L 时,芽和苗也有出现畸形的现象(图 3b, c)。

表 5 蔗糖对小麦愈伤组织诱导和分化的影响

蔗糖浓度 (g/L)	接种数 (个)	出愈率 (%)	出苗率 (%)	再生率 (%)
30	200	100	95.5	89.9
60	200	100	66.8	52.8
90	200	100	19.0	7.5

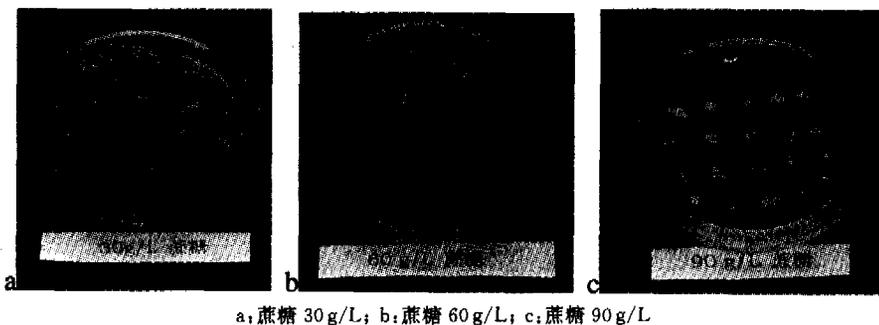


图3 培养基中附加不同浓度蔗糖愈伤组织分化情况

分析结果表明,蔗糖 30 g/L 对根苗的分化最有利,90 g/L 的分化效果最差。可能是蔗糖浓度太高造成细胞内的渗透压增大,引起质壁分离无法复原,从而影响愈伤分化。

3 讨论

3.1 2,4-D 在小麦再生中的适宜浓度

2,4-D 是大多数植物离体培养诱导愈伤组织最有效的物质,它能诱发细胞分裂活动,引起细胞脱分化和无序增殖,产生愈伤组织。在以前的研究报告中,大多认为 2.0 mg/L 2,4-D 是小麦盾片和幼胚脱分化的适宜浓度^[3,15]。而本研究表明,0.5 mg/L 2,4-D 为郑麦 9023 胚性愈伤诱导的适宜浓度。这和 Sonriza Rasco Gaunt 等对 2 个品种的研究结果相一致。Sonriza Rasco Ganut 也认为,盾片在 2,4-D 0.5 mg/L 时的胚性愈伤率和再生率显著优于其他浓度(1,2,3,4,5 mg/L)^[16]。这可能和基因型有关,也可能和小麦离体培养时自身的生理状态有关。有研究结果表明,小麦胚性能力较强的外植体的内源激素含量高于胚性能力较弱的,同时,分化过程中胚性愈伤组织的 ABA, IAA 含量高于非胚性愈伤组织^[17]。而对小麦致密愈伤组织而言,愈伤组织本身的分化潜能似乎要大于外源激素的影响^[4]。因此,小麦在诱导分化过程中内源激素的变化及其作用机制应得到进一步的研究。

3.2 AgNO₃ 在小麦再生中的作用

在培养基中附加 AgNO₃,一方面可以促进植物离体培养器官发生,同时又能对材料引起毒害。不同品种、不同外植体源利用 AgNO₃ 促进器官发生和产生毒害的剂量等都存在差异。在对 AgNO₃ 的研究中发现,其作用明显存在一个临界值,在玉米组织培养中,AgNO₃ 浓度超过 15 mg/L 时,胚性愈伤诱导率会降低^[12];进行水稻组织培养时,在培养基中添加 8~10 mg/L 的 AgNO₃,愈伤组织的诱导率较高,但在分化培养基中添加 AgNO₃ 对愈伤组织

的分化没有明显促进作用。相反,浓度高时(超过 12 mg/L)会起相反的作用^[11]。在本试验中,AgNO₃ 的存在没有正面的促进作用,一方面可能是郑麦 9023 在盾片培养中不适宜添加 AgNO₃,另一方面可能是添加的浓度不合适。有研究表明,AgNO₃ 对小麦幼胚胚性愈伤组织诱导率和绿点率效应随 AgNO₃ 浓度的提高而增加,浓度过高则降低,豫麦 18 号适宜的浓度为 2.5 mg/L,而豫麦 49 号和兰考 906 以 5.0 mg/L 胚性愈伤诱导率和绿点率最高^[18]。因此,有关 AgNO₃ 对小麦组织培养的影响效应有必要做进一步的研究。

3.3 蔗糖在小麦再生中的适宜浓度

在对小麦组织培养幼胚和盾片的研究中,对糖种类和有关适宜浓度的报道不多,一般在培养基中添加 3% 的蔗糖能取得较好的培养效果。这和本研究的结果相一致。也有研究表明,小麦幼胚培养最佳蔗糖浓度为 50 g/L,胚性愈伤组织诱导率和生长势均达到最高,但存在基因型差异^[19]。在对小麦成熟胚的研究中,蔗糖浓度为 3%~9% 时对愈伤组织诱导影响很小,高浓度的蔗糖有利于胚性愈伤组织的形成及再生^[10]。对不同的品种而言,要得到更好的组培效果,培养基中蔗糖浓度应在 3% 上下进行仔细筛选。

小麦愈伤诱导和再生过程是一个复杂的连续的体系,针对一个方面进行单一因素的试验也势必受其他各方面因素的影响。要全面提高小麦再生质量,还应各个方面综合考虑,我们对小麦再生体系的研究也必须更深入,以确立更高效的小麦再生体系。

参考文献:

- [1] 赵慧,徐萍,牛灿芳. 小麦转基因研究现状及展望[J]. 世界科技研究与发展, 2005, 27(3): 32-36.
- [2] 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.
- [3] 余桂荣,尹均,郭天财,等. 小麦幼胚培养基基因型的筛选[J]. 麦类作物学报, 2003, 23(2): 14-18.

(下转第 45 页)

中,大豆产量高于 $2800\text{kg}/\text{hm}^2$ 的组合共有 35 个,3 项农艺措施 X 的编码取值在 $0\sim 1.682$ 的频率最高,其取值范围分别为 $X_1=0.58236\sim 0.85226$, $X_2=0.79726\sim 1.03920$, $X_3=-0.11600\sim 0.25108$ 。由此,3 项农艺措施的最佳组合是:密度为 $215774\sim 225402$ 株/ hm^2 , P_2O_5 用量为 $265.32\sim 291.56$ kg/hm^2 , N 用量为 $167.59\sim 206.87$ kg/hm^2 , 此时黑大豆的平均产量为 $(2945.63\pm 97.97)\text{kg}/\text{hm}^2$ 。

3 结论

1) 通过试验研究,确立了在中等偏高肥力条件下,影响黑大豆生育性状的主要因素是密度和磷;明确了各因素影响黑大豆产量的顺序是:密度 > 磷肥 > 氮肥。

2) 在本试验条件下,通过正交旋转回归模拟寻优,3 项农艺措施的最佳取值范围是:密度为 $215774\sim 225402$ 株/ hm^2 , P_2O_5 用量为 $265.32\sim 291.56$ kg/hm^2 , N 用量为 $167.59\sim 206.87$ kg/hm^2 。采用这套方案,黑大豆的平均产量为 $(2945.63\pm 97.97)\text{kg}/\text{hm}^2$ 。

3) 密度在 $-1.682\sim 1.682$ 之间, N 在 $-1.682\sim$

-1 之间的交互作用为增产作用;当密度在 1 水平下、N 在 0 水平时,产量最高。由此,密度偏高水平和氮肥中等水平时产量较高。如果密度过小,则必须增加氮肥用量,以增加单株产量而获得高产;反之,如果密度过大,则应减小氮肥用量,以防引起黑大豆倒伏,从而增加群体产量。

4) 试验表明,黑大豆对磷较敏感,因此,种植黑大豆应重视磷肥的施用,同时由于磷肥在土壤中的移动性差、易固定,应采取播前沟施,犁底基施或拌种施用,切忌地表撒施。

参考文献:

- [1] 刘忠德,蒋仁棠,谈文瑾,等. 正交优化设计在玉米粗缩病综合防治上的应用研究[J]. 2000,8(1):86-87.
- [2] 梁秀兰,朱芳华. 不同杂交玉米组合的农艺措施效应[J]. 玉米科学,1999,7(3):42-44.
- [3] 刘忠堂. 大豆窄行密植高产栽培技术的研究[J]. 大豆科学,2002,21(5):117-121.
- [4] 胡正元,李宇峰. 双低杂交油菜高产保优制种模式研究[J]. 河南农业科学,2005(1):27-30.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Last D J, Brettell R I S. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium[J]. Plant Cell Report, 1990, 90: 364-371.
- [7] Agarwal D K, Tiwari S. Effect of genotypes and nutrient media on immature of wheat[J]. India J Genet, 1995,55:50-57.
- [8] 吉前华,任正隆. 小麦品种的组培特性和转基因受体选择[J]. 作物学报,2004,30(9):855-860.
- [9] 明凤,胡尚连,李文雄. 小麦胚性愈伤组织发生形态、解剖构造与核酸和蛋白质代谢的关系[J]. 东北农业大学学报,1999,30(4):313-317.
- [10] 李根英,黄承彦,隋新霞,等. 小麦不同外植体的组织培养研究[J]. 麦类作物学报,2006,26(1):21-25.
- [11] 王亚琴,梁承邳. 硝酸银在水稻农杆菌转化中的作用[J]. 湖南大学学报(自然科学版),2004,31(2):28-31.
- [12] 高武军,孙富丛,魏开发,等. 玉米胚性愈伤组织诱导与分化的影响因素[J]. 华北农学报,2005,20(1):27-30.
- [13] 黄璐,卫志明. 不同基因性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.
- [14] 张鹏,傅爱根. 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. 植物生理学通讯. 1997,33(5):376-379.
- [15] 宋国琦,王成社,何培茹. 小麦幼胚培养技术及其应用的研究进展[J]. 西安联合大学学报,2003,6(2):22-27.
- [16] Sonriza Rasco-Ganut, Amanda Riley, et al. Proceuduces allowing the transformation of a range of European elite wheat(*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment[J]. Journal of Experimental Botany, 2001,52(357):865-874.
- [17] 李雪梅,刘熔山. 小麦幼胚胚性愈伤组织诱导及分化过程中内源激素的作用[J]. 植物生理学通讯,1994,30(4):255-260.
- [18] 何盛莲,崔党群,陈军营,等. 小麦幼胚培养特性对外源物质响应的研究[J]. 西北农业学报,2006,15(2):49-53.
- [19] 李尚中,李唯,李胜,等. 小麦胚性愈伤组织诱导研究[J]. 甘肃农业大学学报,2004,39(4):136-140.

(上接第 26 页)