

小麦成熟胚愈伤组织诱导条件优化的研究

吴美金, 史文娟, 王敏* (安徽农业大学, 安徽合肥230036)

摘要 [目的] 筛选小麦成熟胚愈伤组织诱导的最适培养条件。[方法] 采用正交设计试验, 以2个小麦品种扬辐2号和皖麦41的成熟胚为外植体, 研究不同基本培养基和激素配比对愈伤组织诱导的影响。[结果] 在MS、1/2 MS、N₆ 3种基本培养基中, 1/2 MS对小麦成熟胚愈伤组织诱导效果最好。IAA对扬辐2号成熟胚愈伤组织诱导有一定的影响, KT对皖麦41成熟胚愈伤组织诱导作用显著。1/2 MS+2,4-D 4.0 ng/L, 愈伤组织质量最好。不同小麦品种成熟胚离体培养力存在着差异, 皖麦41优于扬辐2号。[结论] 该研究为小麦成熟胚离体培养提供了参考。

关键词 小麦; 成熟胚; 愈伤组织; 正交设计

中图分类号 S336 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06663-03

Studies on Optimizing the Culture Condition of Wheat Mature Embryo in vitro

WU Mei-jin et al (Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The aim of this study was to optimize the culture condition of wheat mature embryo in vitro. [Method] Two wheat varieties were used to study the factors affecting callus induction of mature embryos from different media and hormone proportions by using orthogonal design. [Result] Among three basic medium of MS, 1/2 MS and N₆, 1/2 MS was the optimal medium for callus induction of mature embryo in wheat. IAA had better effect for Yangfu 2 and KT for Wannai 41. The optimum medium for quality of callus was 1/2 MS + 2,4-D 4.0 ng/L. There were differences in callus induction of mature embryos among different genotypes. And the induction activity of Wannai 41 was better than that of Yangfu 2. [Conclusion] The study provided basis for culture of wheat mature embryo in vitro.

Key words Wheat; Mature embryo; Callus; Orthogonal design

通过组织培养诱导小麦产生突变体或进行转基因的研究越来越受到科研工作者的重视^[1-3]。人们多以小麦的幼胚、幼穗作为外植体进行离体培养, 因其愈伤组织的诱导率较高, 分化成苗能力也较强^[4-6]。小麦成熟胚的愈伤组织诱导率较低, 且难以分化成苗。但小麦成熟种子保存期长, 取材不受季节、时间及发育阶段的限制, 以成熟胚作为外植体进行离体培养有一定的应用价值。笔者采用正交设计研究不同基本培养基和激素配比对小麦成熟胚愈伤组织诱导的影响, 以期筛选出最适培养条件, 为小麦生物技术育种及相关研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 以扬辐2号和皖麦41的成熟胚为材料。

1.2 试验设计 以1/2 MS、MS和N₆为基本培养基, 添加0.5g/L水解乳蛋白和30g/L蔗糖, pH值5.8。3种激素为2,4-D、KT、IAA。试验因素和水平见表1。

表1 L₉(3⁴) 正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A(基本培养基 Basic medium)	B (2,4-D)	C (KT)	D (IAA)
1	1/2 MS	4.0	0	0
2	MS	6.0	2.0	0.5
3	N ₆	8.0	4.0	1.0

注: 激素浓度单位为 ng/L。

Nte: The unit of hormone concentration is ng/L.

1.3 接种及培养 选取籽粒饱满、大小一致、无病虫的小麦种子, 用自来水冲洗数次。75%酒精消毒5 min, 再用0.1%升汞消毒25 min, 无菌水冲洗6次后继续浸泡18 h。在超净工

作台上对吸胀的种子用75%酒精消毒2 min, 0.1%升汞消毒15 min, 无菌水冲洗4次, 剥取成熟胚, 划伤胚芽、胚根, 盾片向上接种于培养基。每个处理重复6次, 每瓶接种10枚成熟胚, (25±2) 暗培养。

$$1.4 \text{ 数据分析} \quad \text{出愈率}(\%) = \frac{\text{形成愈伤组织块数}}{\text{接种成熟胚数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{愈伤组织平均鲜重}(\text{g/块}) = \frac{\text{愈伤组织总重}}{\text{愈伤组织块数}} \quad (2)$$

采用Excel进行数据处理, 试验设计和统计分析参考文献[7]进行。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件对成熟胚出愈率的影响

2.1.1 不同培养条件对扬辐2号成熟胚出愈率的影响。 以小麦品种扬辐2号的成熟胚为外植体接种于表2中9种培养基上, 接种后3 d开始产生愈伤组织, 5 d可见明显的愈伤组织块, 最高出愈率达到98%以上。由表2可知, 当基本培养基为1/2 MS时, 扬辐2号的出愈率最高, 为95.0%~98.3%; 在MS培养基上, 出愈率为90.0%~95.0%; 在N₆培养基上, 出愈率较低, 为75.0%~86.7%。2,4-D浓度为4.0、6.0、8.0 ng/L时, 平均出愈率分别为92.8%、90.5%、87.8%。KT浓度为0、2.0、4.0 ng/L时, 平均出愈率分别为91.1%、89.4%、90.6%。IAA浓度为0、0.5、1.0 ng/L时, 平均出愈率分别为87.2%、92.8%、91.1%。对出愈率进行直观分析, 由极差R大小可知影响出愈率因素的重要程度, 4个因素依次为基本培养基(A) > IAA(D) > 2,4-D(B) > KT(C)。对试验结果进行方差分析(表3), A因素(基本培养基)间的差异达0.01显著水平, 其余因素不显著。由多重比较结果可知, 在9个处理组合中, A₁B₂C₂D₂出愈率最高, 为98.3%; 其次为A₁B₁C₁D₁, 达96.7%; A₁B₃C₃D₃和A₂B₁C₂D₃出愈率均达到95.0%。

2.1.2 不同培养条件对皖麦41成熟胚出愈率的影响。 以小麦品种皖麦41的成熟胚为外植体接种于9种培养基上, 接种后5 d最高出愈率达到100%以上。由表4可知, 当基本培养

基金项目 安徽省教育厅自然科学重点项目(2006KJ055A); 安徽农业大学大学生创新基金项目。

作者简介 吴美金(1969-), 男, 江苏响水人, 在读硕士, 中教一级, 从事细胞工程及分子育种方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-04-07

表2 扬辐2号成熟胚出愈率正交试验结果

Table 2 The orthogonal test results of the callus rate of mature embryo in Yangfu 2

处理号 Treatment No.	A	B	C	D	出愈率 % Callus rate
1	1	1	1	1	96.7 abA
2	1	2	2	2	98.3 aA
3	1	3	3	3	95.0 abAB
4	2	1	2	3	95.0 abAB
5	2	2	3	1	90.0 abAB
6	2	3	1	2	93.3 abAB
7	3	1	3	2	86.7 abAB
8	3	2	1	3	83.3 bAB
9	3	3	2	1	75.0 bB
K ₁	290.0	278.4	273.3	261.7	
K ₂	278.3	271.6	268.3	278.3	
K ₃	245.0	263.3	271.7	273.3	
\bar{K}_1	96.7	92.8	91.1	87.2	
\bar{K}_2	92.8	90.5	89.4	92.8	
\bar{K}_3	81.7	87.8	90.6	91.1	
R	15.0	5.0	1.7	5.6	

注:不同小写、大写字母分别表示差异在0.05、0.01水平显著。下同。

Note: Different lowercases and capital letters mean significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same as below.

表3 扬辐2号成熟胚出愈率方差分析

Table 3 Variance analysis on the callus rate of mature embryo in Yangfu 2

变异来源 Variation source	df	SS	MS	F
区组间 Among blocks	5	81.48	16.30	0.14
A	2	2181.48	1090.74	9.52**
B	2	225.92	112.96	0.99
C	2	25.92	12.96	0.11
D	2	292.59	146.30	1.28
误差 Error	40	4585.20	114.63	
总 Total	53	7392.59		

注:*、**分别表示差异达0.05、0.01显著水平。下同。

Note: * and ** stand for the significant difference at 0.05 and 0.01 level. The same as below.

基为1/2 MS、MS、N₆时,平均出愈率分别为96.7%、93.3%、91.1%。2,4-D浓度为4.0、6.0、8.0 ng/L时,平均出愈率分别达95.0%、94.4%、91.7%。KT浓度为0、2.0、4.0 ng/L时,平均出愈率分别达95.5%、94.4%、91.1%。IAA浓度为0、0.5、1.0 ng/L时,平均出愈率分别为93.9%、93.9%、93.3%。对出愈率进行直观分析,由极差R的大小可知影响出愈率的重要程度,4个因素依次为基本培养基(A) > KT(C) > 2,4-D(B) > IAA(D)。对试验结果进行方差分析(表5),A因素(基本培养基)和C因素(KT)差异达0.05显著水平,其余2个因素不显著。由多重比较结果可知,在9个处理组合中,A₁B₁C₁D₂出愈率最高,为100%;其次为A₁B₂C₂D₂,出愈率达98.3%;A₂B₁C₂D₃的出愈率达到95.0%。

2.2 不同培养条件对成熟胚愈伤组织平均鲜重的影响

2.2.1 不同培养条件对扬辐2号成熟胚愈伤组织平均鲜重的影响

由表6可知,A因素的极差最大。4个因素对愈伤组织平均鲜重的影响依次为基本培养基(A) > IAA(D) > KT(C) > 2,4-D(B)。当培养条件为1/2 MS + 2,4-D 8.0 mg/L +

IAA 0.5 mg/L时,愈伤组织平均鲜重最高,为0.130 g。

表4 皖麦41成熟胚出愈率正交试验结果

Table 4 The orthogonal test results of the callus rate of mature embryo in Wannai 41

处理号 Treatment No.	A	B	C	D	出愈率 % Callus rate
1	1	1	1	1	100.0 aA
2	1	2	2	2	98.3 abAB
3	1	3	3	3	91.7 bAB
4	2	1	2	3	95.0 abAB
5	2	2	3	1	91.7 bAB
6	2	3	1	2	93.3 abAB
7	3	1	3	2	90.0 bB
8	3	2	1	3	93.3 abAB
9	3	3	2	1	90.0 bB
K ₁	290.0	285.0	286.6	281.7	
K ₂	280.0	283.3	283.3	281.6	
K ₃	273.3	275.0	273.4	280.0	
\bar{K}_1	96.7	95.0	95.5	93.9	
\bar{K}_2	93.3	94.4	94.4	93.9	
\bar{K}_3	91.1	91.7	91.1	93.3	
R	5.6	3.3	4.4	0.6	

表5 皖麦41成熟胚出愈率方差分析

Table 5 Variance analysis on the callus rate of mature embryo in Wannai 41

变异来源 Variation source	df	SS	MS	F
区组 Blocks	5	503.7	100.74	3.79*
A	2	281.48	140.74	5.30*
B	2	114.82	57.41	2.16
C	2	192.59	96.30	3.62*
D	2	3.70	1.85	0.07
误差 Error	40	1062.97	26.57	
总 Total	53	2159.26		

表6 扬辐2号成熟胚愈伤组织平均鲜重直观分析

Table 6 Intuitionistic analysis on the average fresh weight of calli of mature embryos in Yangfu 2

因素 Factor	K ₁	K ₂	K ₃	\bar{K}_1	\bar{K}_2	\bar{K}_3	R
A	0.376	0.242	0.206	0.125	0.081	0.069	0.056
B	0.263	0.279	0.282	0.088	0.093	0.094	0.006
C	0.264	0.292	0.268	0.088	0.097	0.089	0.009
D	0.302	0.234	0.288	0.101	0.078	0.096	0.023

2.2.2 不同培养条件对皖麦41成熟胚愈伤组织平均鲜重的影响

由表7可知,4个因素对愈伤组织平均鲜重的影响依次为基本培养基(A) > 2,4-D(B)、KT(C) > IAA(D);当培养条件为MS + 2,4-D 4.0 mg/l + KT 2.0 mg/l + IAA 1.0 mg/l时,愈伤组织平均鲜重最高,为0.233 g。

2.3 不同小麦品种成熟胚愈伤组织诱导的差异

由图1可知,扬辐2号、皖麦41成熟胚平均出愈率分别为90.4%、93.7%,后者比前者高3.3%。在不同培养条件下,2个小麦品种的出愈率基本接近,差异不是太大。但是2个品种愈伤组织质量有较大的差异,扬辐2号、皖麦41成熟胚愈伤组织平均鲜重分别为0.091、0.169 g/块。由图2可知,在9个试验

表7 皖麦41 成熟胚愈伤组织平均鲜重直观分析

Table 7 Intuitionistic analysis on the average fresh weight of calli of mature embryos in Wannai 41

因素 Factor	K_1	K_2	K_3	\bar{K}_1	\bar{K}_2	\bar{K}_3	R
A	0.604	0.591	0.327	0.201	0.197	0.109	0.092
B	0.558	0.486	0.478	0.186	0.162	0.159	0.027
C	0.463	0.544	0.515	0.154	0.181	0.172	0.027
D	0.464	0.530	0.528	0.155	0.177	0.176	0.022

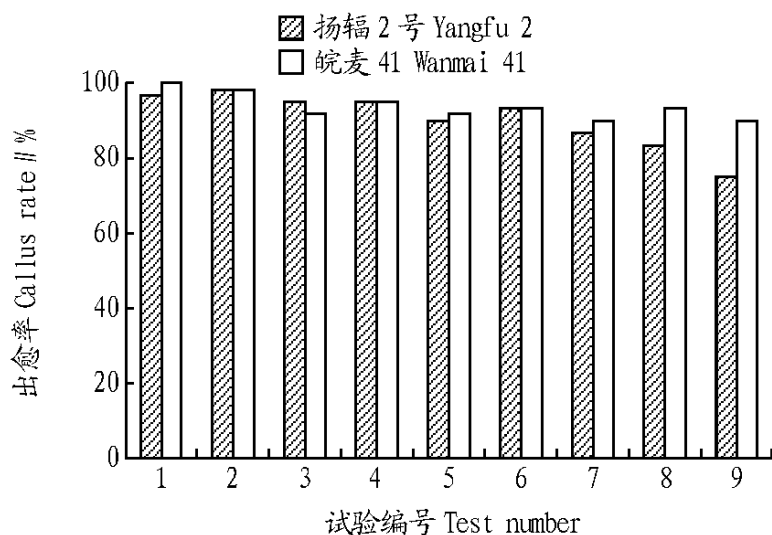


图1 不同培养条件对扬辐2号和皖麦41 出愈率的影响

Fig.1 Effects of different culture conditions on the calli rate of Yangfu 2 and Wannai 41

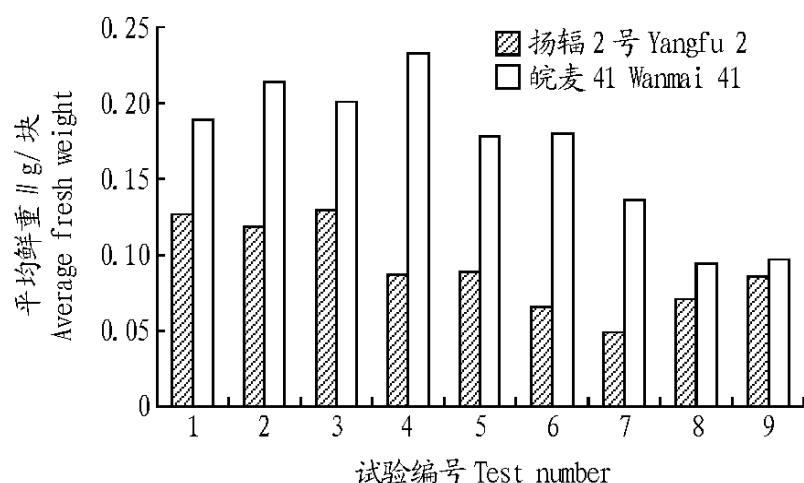


图2 不同培养条件对扬辐2号和皖麦41 愈伤组织平均鲜重的影响

Fig.2 Effects of different culture conditions on the average fresh weight of calli in Yangfu 2 and Wannai 41

(上接第6662 页)

[35] 王萍,王罡,季静,等.农杆菌介导大豆未成熟子叶的遗传转化[J].大豆科学,2004,23(2):86-90.

[36] IUH K, YANG C, WEI Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. *Hata*, 2004, 219: 1042-1049.

[37] NEWELL C A, LUU H T. Protoplast culture and plant regeneration in *Glycine canescens* F.J. Horn[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1985, 4: 145-149.

[38] 卫志明.大豆原生质体培养再生植株[J].植物生理学通讯,1988(2):53-54.

[39] 黄健秋,卫志明,许智宏.GUS基因在大豆未成熟子叶原生质体中的表达[J].植物学报,1992(34):26-30.

[40] WEI Z M, XU Z H. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Hart Cell Rep*, 1988, 7: 348-351.

[41] 罗希明,赵桂兰,简玉瑜.大豆原生质体的植株再生[J].植物学报,1990,32:616-621.

[42] DHR S K. Transformation frequencies of foreign genes in soybean an cell cultures[J]. *Hart Cell Reports*, 1991, 10: 97-101.

[43] 卫志明,许智宏.大豆原生质体培养和再生植株[J].植物学报,1990,32(8):582-588.

[44] 卫志明,黄健秋,徐淑萍,等.植物遗传国家重点实验室年报[R].

处理中皖麦41 愈伤组织鲜重都明显高于扬辐2号。由所观察的愈伤组织颜色和组织的组织质量可知,2 个小麦品种在1/2 MS + 2,4-D 4.0 ng/L 培养条件下愈伤组织质量较好,颜色呈乳黄色。

3 结论与讨论

(1) 小麦成熟胚愈伤组织的诱导受多种因素的影响。基本培养基是最重要的影响因素,而激素类型和对比对诱导效果也有一定的影响。试验结果表明,基本培养基对2 个小麦品种成熟胚愈伤组织诱导影响最大,在所采用的3 种基本培养基中1/2 MS 培养效果最好。对于激素类型和配比,不同小麦品种有不同的要求。该试验中,IAA 对扬辐2 号成熟胚愈伤组织的诱导有一定的影响,KT 对皖麦41 的作用明显。

(2) 不同培养条件对小麦成熟胚愈伤组织质量有很大的影响。在不同基本培养基和不同激素水平下,小麦成熟胚愈伤组织质量存在明显差异。其中,以1/2 MS 为基础培养基、4.0 ng/L 2,4-D 时,诱导的愈伤组织质量最好。

(3) 综合2 个小麦品种成熟胚愈伤组织诱导率和愈伤组织质量的试验结果,初步认为适合2 个品种的基本培养条件为1/2 MS + 2,4-D 4.0 ng/L。在此基础上,可依据不同品种对不同激素的反应,适当调节其他激素水平。

(4) 不同小麦品种成熟胚离体培养力存在着差异,皖麦41 成熟胚离体培养力优于扬辐2 号。因此,筛选适合小麦成熟胚组织培养的品种对愈伤组织的成功诱导非常重要。

参考文献

[1] 陆伟忠,程顺和,沈晓蓉,等.细胞工程在小麦抗赤育种中的利用[J].江苏农业学报,1998,14(1):9-14.

[2] 吴丽芳,李红,宋道君,等.建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得GUS基因植株[J].遗传学报,2000,27(11):982-991.

[3] 徐涛,赵保存,葛荣朝,等.利用基因枪法将Tagk1基因导入小麦敏感成熟胚愈伤组织提高其耐盐性的研究[J].生物工程学报,2006,22(2):211-214.

[4] 乔亚科,李桂兰,高书国,等.小麦幼胚愈伤组织诱导及植株再生[J].河北职业技术学院学报,2002,16(2):1-5.

[5] 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):22-26.

[6] 覃建兵,汪越胜,何光源.激素对小麦幼穗组织培养效果的影响研究[J].华中师范大学学报:自然科学版,2005,39(3):380-382.

[7] 杨德.试验设计与分析[M].北京:中国农业出版社,2002:171-201.

[8] 1996:36-37.

[45] 南相日,刘文萍,刘丽艳,等.PEG介导B基因转化大豆原生质体转基因植株[J].大豆科学,1998,17(4):326-330.

[46] IVER D R, PALMER R C, FEHR W R. Arther culture in soybean[J]. *Crop Science*, 1974, 14: 891-893.

[47] 刘德璞,赵桂兰.大豆花粉离体培养获得愈伤组织[J].大豆科学,1986(1):49-55.

[48] 叶兴国,王连铮.大豆花药培养研究进展[J].大豆科学,1995(14):350-354.

[49] 赵桂兰,刘艳芝,尹爱平.大豆花药培养中胚状体萌发的研究[J].科学通报,1998(43):1512-1516.

[50] KUIRKA D T, COLBURNS M, HINCHEE MA, et al. Interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with soybean leaf explants in tissue culture[J]. *Can J Genet Cytol*, 1986, 28: 808-817.

[51] 程林梅,孙毅,岳焕荣.大豆生物工程研究进展[J].大豆科学,2001,20(1):66-70.

[52] 薛仁锦,刘淑兰,韩碧文.大豆再生植株研究[J].延边农学院学报,1994(16):1-5.

[53] 王升吉,吴元华,王洪岩,等.大豆不同外植体组织培养及再生研究[J].沈阳农业大学学报,1999,30(3):255-259.

[54] 程林梅,孙毅,刘少翔,等.大豆不同外植体植株再生的研究[J].中国油料作物学报,1998,20(2):21-24.