

不同预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响

陈军营, 尹海燕, 梁静静, 许海霞, 程西永, 詹克慧, 陈新建*, 崔党群, 吕德彬
(河南农业大学, 河南 郑州 450002)

摘要: 研究了低温、CaCl₂、PEG 3 种预处理对 18 个小麦品种成熟胚愈伤组织形成的影响, 结果表明: 不同预处理对小麦成熟胚愈伤组织的形成有显著影响。PEG 处理对小麦成熟胚愈伤组织的形成具有显著促进作用; 低温和 CaCl₂ 溶液处理对小麦成熟胚愈伤组织的影响和小麦品种关系密切, 品种间差别较大。

关键词: 小麦; 成熟胚; 预处理; 愈伤组织

中图分类号: S512 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2005)01-0019-03

Effect of Different Pretreatment on Callus Formation of Wheat Mature Embryo

CHEN Jun-ying, YIN Hai-yan, LIANG Jing-jing, XU Hai-xia, CHENG Xi-yong,
ZHAN Ke-hui, CHEN Xin-jian*, CUI Dang-qun, LU De-bin
(Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The effect of three different pretreatments including low temperature, CaCl₂ and PEG on callus formation of mature embryos of 18 wheat varieties were investigated. The result showed that the effect of different pretreatments on the callus formation of wheat mature embryos was significantly different. PEG pretreatment promoted the callus formation of wheat mature embryo significantly. But the effect of low temperature and CaCl₂ pretreatment on the callus formation was closely related to wheat cultivars. There are great differences between the varieties.

Key words: Wheat; Mature embryo; Pretreatment; Callus

小麦的组织培养, 特别是胚性细胞系的建立, 作为小麦遗传转化操作的主要基础, 一直受到广泛关注^[1~3]。许多学者已采用小麦的根、茎、叶、幼穗、幼胚、成熟胚(种子)等多个部位为外植体, 研究其愈伤组织分化情况, 发现幼胚愈伤组织具有较高的诱导和再分化能力^[3~6], 但幼胚外植体取材受季节限制较大。而种子具有保存期长、材料丰富、取材方便、操作简单等优点, 用种子的成熟胚进行胚性愈伤组织的诱导则是进行遗传转化的一个好方法。但由于成熟胚脱分化能力较弱、愈伤组织再分化能力差^[7~12], 如果能改变种子的生理状态, 提高愈伤组

织特别是胚性愈伤组织的形成能力, 无疑将有利于小麦胚性细胞系的建立和小麦的遗传转化。本研究采用低温、CaCl₂、PEG 3 种预处理对 18 个小麦品种(系)成熟胚进行诱导培养, 以期探索出小麦不同品种成熟胚愈伤组织形成较有效的预处理方法, 为建立一套高效的培养体系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试 18 个小麦(*Triticum aestivum* L.)品种(系)(表 1), 均由河南农业大学小麦育种研究室提供。

收稿日期: 2004-05-11

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-B-19)

作者简介: 陈军营(1964-), 男, 河南禹州人, 副教授, 硕士, 主要从事农作物遗传育种教学与研究工作。Tel: 0371-3978011

通讯作者: 陈新建(1958-), 男, 河南内乡人, 教授, 博士, 主要从事农作物分子生物学教学与科研工作。

1.2 方法

种子预处理: (1)以常温条件下, 无菌水浸泡的种子为对照; (2)以 4℃冰箱内无菌水浸泡种子为低温处理(LT); (3)常温条件下, 以 250 g/L CaCl₂溶液浸泡种子为 CaCl₂ 处理; (4)常温条件下, 以 300 g/L PEG 溶液浸泡种子为 PEG 处理。浸泡时间均为 12 h。

预处理后, 用无菌水冲洗种子 3~4 次, 然后, 在超净工作台上, 用 75%的乙醇处理种子 1 min, 用 0.1%HgCl₂ 消毒 20 min, 并适当摇荡。消毒后再用无菌水冲洗 3~4 次, 剥出种胚, 盾片向上放置在诱导培养基上。每处理 3 次重复, 每个重复接种 200 个左右成熟胚。诱导培养基以 MS 为基本成分, 添加水解乳蛋白 500 mg/L, L-脯氨酸 500 mg/L, 色氨酸 10 mg/L, 2, 4-D 2 mg/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂粉 7 g/L, pH5. 8, 培养条件为无光照, 温度 26℃。

2 结果与分析

2.1 不同预处理对小麦成熟胚出愈时间的影响

试验表明, 将不同预处理的小麦品种成熟胚接种到诱导培养基上, 第 2 天观察到种胚膨大, 第 4 天开始产生白色至淡黄色的愈伤组织。不同预处理间以及不同品种间出愈时间均无明显差异。

2.2 不同预处理对小麦成熟胚出愈率的影响

不同处理小麦成熟胚出愈率结果见表 1。用形成愈伤组织的种胚的百分数表示出愈率, 所得百分数经反正弦转换后进行方差分析, 结果表明, 品种间(F=1.94; F_{0.05}=1.85; F_{0.01}=2.39)、预处理间(F=8.58; F_{0.05}=3.18; F_{0.01}=5.06)、品种×预处理(F=12.41; F_{0.05}=1.57; F_{0.01}=1.89)间差异均达到显著水平。说明不同小麦成熟胚愈伤组织的形成不仅与小麦品种密切相关, 同时也受不同

表 1 不同预处理对小麦成熟胚出愈率的影响 (%)

品种	ck	LT	较 ck 增减百分点	CaCl ₂	较 ck 增减百分点	PEG	较 ck 增减百分点
周麦 9 号	52.9	19.4	-33.5 **	35.8	-17.1 *	64.7	11.8
豫农 86	22.4	19.02	-3.3	33.5	11.1	55.7	33.2 **
百农 64	16.9	14.5	-2.3	25.8	8.9	54.6	37.7 **
兰考 906	58.8	60.5	1.7	52.5	-6.2	71.7	12.9
绿洲 8785	45.6	8.7	-36.9 **	31.8	-13.8	58.6	13.0
豫农 91	43.9	6.9	-37.0 **	36.3	-7.6	71.5	27.5 **
周 8826	51.0	11.6	-39.4 **	44.1	-6.9	39.1	-11.9
大穗 I	47.0	20.6	-26.4 **	67.4	20.4 *	64.2	17.2 *
咸阳超大穗	49.1	57.6	8.5	46.52	-2.6	55.5	6.3
广太 1 号	50.1	31.9	-18.1 *	54.9	4.8	80.8	30.7 **
郑州 891	31.3	30.0	-1.3	32.3	31.0 **	49.8	18.4 *
豫农 303	42.1	37.7	-4.3	32.1	-9.9	64.3	22.2 **
内乡 187	3.8	7.7	3.8	56.6	52.7 **	45.9	42.1 **
合选 014	40.9	72.2	31.3 **	70.9	30.0 **	54.3	13.4
单冈 843	25.1	13.6	-11.5	41.0	15.8	32.0	6.8
豫农 118	28.4	65.5	37.1 **	32.4	4.0	60.5	32.1 **
豫农 4001	27.7	76.7	49.0 **	37.2	9.5	52.5	24.7 **
豫西 832	9.0	61.6	52.6 **	40.2	31.1 **	63.6	54.5 **
平均	35.9	34.2	-1.6	44.52	8.6	57.74	21.8

注: *表示在 0.05 水平上差异显著, **表示在 0.01 水平上差异显著

预处理条件的影响, 品种与预处理还存在较强的互作。

表 1 表明, 以常温条件下无菌水浸泡的种子为对照, 不同小麦品种成熟胚的愈伤组织诱导率存在较大差异。其中豫农 4001 出愈率最高(为76.7%), 豫西 832 和内乡 187 较低, 分别为 9.0%和 3.8%。

低温、CaCl₂ 溶液和 PEG 溶液 3 种不同预处理对不同小麦品种成熟胚愈伤组织形成的影响差别较大。其中低温处理使周麦 9 号、绿洲 8785、豫农 91、周 8826、大穗 I、广太 1 号品种的出愈率比对照明显下降, 降幅分别达到 18.1~39.4 个百分点。而合选 014、豫农 118、豫农 4001、豫西 832 品种出愈率比对照明显增加, 增幅分别达到 31.3~52.6 个百分点, 而对豫农 86、百农 64、兰考 906、咸阳超大穗、郑州 891、豫农 303、内乡 187 等品种的出愈率则无明显影响。

CaCl₂ 处理使内乡 187、合选 014、郑州 891、豫西 832、大穗 I 品种出愈率比对照显著增加, 增幅分别达到 20.4~52.7 个百分点; 而使周麦 9 号的出愈率明显下降; 其他处理出愈率虽有变化, 但与对照相比均无明显差异。

PEG 处理使周 8826 出愈率下降 11.9 个百分点; 对其他参试品种出愈率的提高都有不同程度的促进作用。除周麦 9 号、兰考 906、绿洲 8785、豫农 86、咸阳超大穗、合选 014、单岗 843 品种的出愈率增幅不显著外, 其他品种的出愈率都比对照有显著增加, 增幅达到 17.2~54.5 个百分点, 尤其是出愈率较低的对照品种, PEG 的处理效果尤为明显。

上述结果表明: PEG 处理对小麦成熟胚愈伤组织形成有积极的促进作用, 是较理想的预处理方法。低温和 CaCl₂ 处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响和小麦品种有密切关系, 品种间差异较大。

3 小结与讨论

与幼胚相比, 成熟胚愈伤组织诱导分化率较低, 至今还没有一套相对成熟的诱导培养方法。本试验采用了 3 种预处理方法, 18 个小麦品种已初步显示出 PEG 处理对小麦成熟胚愈伤组织形成有明显促进作用, 是较理想的预处理方法, 同时不同预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响与小麦品种(即基因型)有密切关系, 这与廖祥儒等的研究^[12, 13]相一致。不同之处在于: 他们的研究认为, 除 PEG 和 CaCl₂ 外, 低温处理方法对小麦成熟胚愈伤组织形

成也有促进作用。而我们的研究发现, 低温处理无明显促进或抑制作用, 品种间差异较大。

我们认为, 出现这种差异的原因可能是: (1) 试验材料不同。他们的研究用的是 2 个冬小麦品种, 而我们选用的 18 个品种大都是半冬性品种, 这可能是造成愈伤组织诱导差异的内在原因。(2) 试验方法不尽相同。如诱导培养基、种子处理时间、CaCl₂、PEG 浓度不同等, 这些可能是造成愈伤组织诱导差异的外在原因。这些问题有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 陈英, 李向辉, 孙勇如. 植物细胞培养与遗传操作[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1992: 254—263.

[2] Maheshwari N, Rajylakshmi K, Baweja K, *et al.* Invitro culture of wheat and genetic transformation: Retrospect and prospect critical review [J]. Plant Sci. 1995, 14: 141—178.

[3] Chin J C, Scott KJ. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures [J]. Ann Bot, 1997, 41: 473—477.

[4] Zaghmout O M F, Trolinder NL. Simple and efficient method for directly electroporating agrobacterium plasmid DNA into wheat callus cell [J]. Nud Acid Res. 1993, 21: 1048—1051.

[5] Zamora A B, Scott KJ. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves [J]. Plant Sci Lett, 1983, 29: 183—186.

[6] 陈璋, 朱秀英. 水稻种胚离体培养的遗传研究[J]. 植物学报, 1992, 34(11): 850—855.

[7] 潘向群, 梁海曼. 大麦成熟胚培养的培养基研究[J]. 作物学报, 1991, 17(4): 267—272.

[8] 周洪生. 甜玉米胚愈伤组织诱导、继代、植株再生的研究[J]. 作物学报, 1993, 19(1): 55—61.

[9] 明凤, 李文雄, 胡尚连. 小麦胚性愈伤组织发生影响因素的研究[J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(1): 1—6.

[10] 柳建军, 于洪欣, 冯兆礼. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的研究[J]. 山东农业大学学报, 1996, 27(4): 451—456.

[11] 柯遐义, 陈家旺. 影响小麦成熟胚培养的几种因素研究[J]. 广东农业科学, 1995(6): 12—14.

[12] 廖祥儒, 杜建芳, 王俊霞, 等. 预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版) 1999, 19(1): 42—44.

[13] 廖祥儒, 郭中伟, 杜建芳, 等. 低温和 PEG 预处理对小麦愈伤组织形成及 IAA 氧化的影响[J]. 植物学通报, 2000, 17(3): 257—259.