麦类作物学报 2014,34(8):1044-1048
Journal of Triticeae Crops doi:10.7606/j.issn.1009-1041.2014.08.04

网络出版时间:2014-8-6
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7606/j.issn.1009-1041.2014.08.04.html

2,4-D、Dicamba 和 KT 对小麦成熟胚离体培养的影响

刘扬洋,马 丽,周玉霞,刘雪琴,王令强

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,华中农业大学植物科学技术学院;
华中农业大学生物质与生物能源中心,湖北武汉 430070)

摘 要:为了建立优良小麦品种遗传转化的高效组织培养体系,以扬麦 158 和郑麦 9023 成熟胚为外植体,探讨了 Dicamba 和 2,4-D 及 KT 对小麦成熟胚愈伤组织诱导和再生的影响。结果表明,Dicamba 和2,4-D 的愈伤组织诱导率最低为 88.7%,最高可达 95.1%,处理间无显著差异。不同激素诱导的愈伤组织在添加 KT 的培养基上分化时,再生率存在显著差异。两种基因型小麦用 Dicamba 诱导的愈伤组织比 2,4-D 诱导的愈伤组织具有更高的再生率。在分化培养时,培养基中添加 5 mg·L^{-1} KT 比添加 3 mg·L^{-1}的分化效果更好,但不同浓度 KT 对愈伤组织分化的效果因诱导激素的配比和基因型而异。扬麦 158 的综合指标更优,平均再生率可达 20.1%,比郑麦 9023 高 6.6%;采用 4 mg·L^{-1} Dicamba 进行愈伤组织诱导,配合 5 mg·L^{-1} KT 分化培养更有利于小麦成熟胚离体培养。

关键词:小麦;成熟胚;愈伤组织;激素配比

中图分类号:S512.1;S330 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2014)08-1044-05

Effect of 2,4-D, Dicamba and KT on the In Vitro Culture of Mature Wheat Embryo

LIU Yangyang, MA Li, ZHOU Yuxia, LIU Xueqin, WANG Lingqiang

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, College of Plant Sciences and technology, Biomass and Bioenergy Research Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: The effects of different hormone combination on the callus induction and plant regeneration from mature embryos of two elite winter genotypes (Yangmai 158 and Zhengmai 9023) were studied. High frequency of callus induction (over 88% with the maximums 95.1%) was achieved on MS medium supplemented with different concentrations of 2, 4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) or Dicamba (3,6-dichloro-O-anisic acid). Although little difference was found in the ability of callus induction with the treatments of 2,4-D or Dicamba, there were quite differences in the differentiation rate among different concentrations of these two auxins after transferring of the callus to the medium supplied with KT (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) (3 mg·L^{-1} and 5 mg·L^{-1}). The relative higher number of regenerated plants (maximum 29%) was observed at the callus induced with Dicamba (4 mg·L^{-1} and 8 mg·L^{-1}) and further growth on the medium with 5 mg·L^{-1} of KT in both genotypes. Compared with Zhengmai 9023, callus form mature embryos of Yangmai158 had a higher plant regeneration rate. The combination of Dicamba (4 mg·L^{-1}) with 5 mg·L^{-1} of KT was optimum for the high efficiency of the callus induction and pant regeneration from these two wheat genotypes in this study.

收稿日期:2014-03-17 修回日期:2014-04-10
基金项目:国家自然科学基金项目(31171524);中央高校创新基金项目(2011PY047);国家大学生创新项目(201310504012)
第一作者 E-mail:liuyyxinlang@sina.com
通讯作者:王令强(E-mail:lqwang@mail.hzau.edu.cn)

Key words: Wheat; Mature embryo; Callus; Hormone proportions

小麦遗传转化的关键在于建立稳定高效的组织培养再生体系。目前,在小麦中常用的外植体是幼胚和成熟胚。幼胚的诱导和再生效率都较高,但适宜转化的生理状态难以掌握,取材受季节限制,难以满足常年工作需要。小麦成熟胚取自成熟种子,不受季节限制,生理状态基本一致,可常年大量获得,是组织培养和遗传转化的理想外植体。小麦成熟胚高效再生体系的研究主要集中在成熟胚基因型选取、培养基类型以及在培养基中添加的激素种类和浓度等方面,并取得了一定的进展,但仍存在再生率较低等问题,需进一步优化[1-3]。2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和激动素(KT)分别是小麦成熟胚愈伤组织诱导和分化阶段常用的激素,其使用浓度在不同的研究中有所不同[4-7]。有研究认为较低浓度的 2,4-D 有利愈伤组织的分化,但最适浓度因基因型而异;不同浓度的 2,4-D 对小麦成熟胚愈伤组织诱导无显著差异,对其分化影响较大[6-7]。KT 的作用是促使细胞分裂,同时使得细胞朝着器官分化的方向进行。麦草畏(Dicamba)是一种植物生长调节剂,在小麦幼胚和成熟胚的愈伤组织诱导和分化方面都有较好的效果[8-10]。

郑麦 9023 和扬麦 158 均为高产、优质和多抗的春性小麦,是华北、华中地区和长江中、下游麦区的主栽品种。目前,其组织培养和遗传转化研究的公开报道不多。已有的少量研究主要以幼胚为外植体的组织培养体系,探讨了愈伤组织诱导、分化和生根壮苗培养基的条件。赵永英等[11]研究了 $AgNO_3$ 和蔗糖对郑麦 9023 根苗分化的影响,并发现 2,4-D 有利于其幼胚盾片胚性愈伤组织的形成。邢莉萍等[12]研究表明扬麦 158 是优良的转基因受体,并初步建立了其再生体系。在成熟胚方面,有报道探讨了 MS 培养基中添加 NH_4NO_3 的浓度对郑麦 9023 组培的影响及高渗处理在转化过程中的作用[13]。本研究选用扬麦 158 和郑麦 9023 为实验材料,探讨 2,4-D、Dicamba 以及 KT 对小麦成熟胚离体组织培养的影响,以期为小麦遗传转化研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　植物材料

实验材料为 2013 年田间收获的扬麦 158 和郑麦 9023 种子,由湖北省农科院提供。

1.2　培养基

诱导培养基:MS 培养基+酪蛋白 CH(500 mg·L^{-1})+ 2,4-D(2、4、8 mg·L^{-1})

MS 培养基+酪蛋白 CH(500 mg·L^{-1})+ Dicamba(2、4、8、12 mg·L^{-1})

分化培养基:MS 培养基+酪蛋白 CH(500 mg·L^{-1})+ KT(3、5 mg·L^{-1})

生根培养基:1/2MS 培养基

以上所有培养基均添加 30 g·L^{-1} 蔗糖和 8 g·L^{-1} 的琼脂粉,用 NaOH 将 pH 值调至 5.8～5.9,在 121℃下经 1.1 kg·cm^{-2} 高压湿热灭菌 20 min。

1.3　种子处理和培养方法

1.3.1　种子消毒和浸种处理

选用成熟、饱满、颜色和大小相对一致的种子。用 70%酒精对种子消毒 5 min,无菌水清洗 2～3 次;再用 0.1%升汞处理 15 min,无菌水清洗 5 次,用无菌水浸泡 14～16 h;再用 0.1%升汞消毒 5 min,无菌水清洗 5 次。

1.3.2　成熟胚培养

用解剖刀剥取成熟胚,切碎,置于诱导培养基上,每个处理重复 3 次,25℃ 暗培养 2 周。2 周后统计出愈率,并将愈伤组织转至分化培养基中,25℃ 暗培养 10 d,再转至同温条件下光照培养,光强 2 000 lx,光照时间 16 h·d^{-1},每两周继代一次[14]。随时观察,及时剔除褐化和污染的愈伤组织。光照培养 4 周后统计愈伤组织的再生率。

1.4　数据处理和分析

出愈率=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数)×100%;再生率=(分化出再生苗的愈伤组织数/接种愈伤组织总数)×100%。

以上指标计算均除去污染和褐化的愈伤组织。采用 SPSS 统计分析软件用 LSD 法进行方差分析,采用 OriginPro 8 作图。

2　结果与分析

2.1　2,4-D 和 Dicamba 对小麦成熟胚愈伤组织诱导的影响

成熟胚在诱导培养基上生长 2～3 d 后即可产生愈伤组织,2 周时愈伤组织比接种时膨大 4 倍以上,此时统计愈伤组织出愈率。结果(表 1)

表明，两种基因型小麦成熟胚在添加 2,4-D 和 Dicamba 的养基上都有较高的诱导效率。采用 2,4-D 进行诱导时，扬麦 158 平均出愈率达 93.6%，郑麦 9023 平均达 90.7%。采用 Dicamba 诱导时，扬麦 158 平均出愈率达 91.0%，郑麦 9023 平均达 90.3%。扬麦 158 和郑麦 9023 分别在添加 2 mg·L^{-1}和 4 mg·L^{-1}的 2,4-D 培养基中出愈率最高。方差分析表明，两个小麦品种在两种激素处理间的愈伤组织诱导率差异不显著。总体来看，2,4-D 诱导效率略高于 Dicamba，扬麦 158 的愈伤组织诱导率高于郑麦 9023。

表 1 2,4-D 和 Dicamba 对小麦成熟胚愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 2,4-D and Dicamba on the callus induction of mature embryos

激素 Auxin	浓度 Dose /(mg·L^{-1})	扬麦 158 Yangmai 158			郑麦 9023 Zhengmai 9023			平均诱导率 Mean induction rate /%
		接种胚数 No. of embryos	出愈数 No. of callus	诱导率 Induction rate/%	接种胚数 No. of embryos	出愈数 No. of callus	诱导率 Induction rate/%	
2,4-D	2	267	254	95.1	298	268	89.9	92.5
	4	283	268	94.7	267	244	91.4	93.1
	8	168	153	91.1	189	174	91.5	91.3
Dicamba	2	285	257	90.2	256	234	91.4	90.8
	4	290	264	91.0	278	248	89.2	90.1
	8	268	247	92.2	283	251	88.7	90.5
	12	150	136	90.7	160	145	90.1	90.4
平均 Mean/%				92.1			90.5	

表 2 KT、2,4-D 和 Dicamba 激素配比对小麦愈伤组织再生率的影响

Table 2 Effects of the different combination of KT, 2,4-D and Dicamba on plant regeneration %

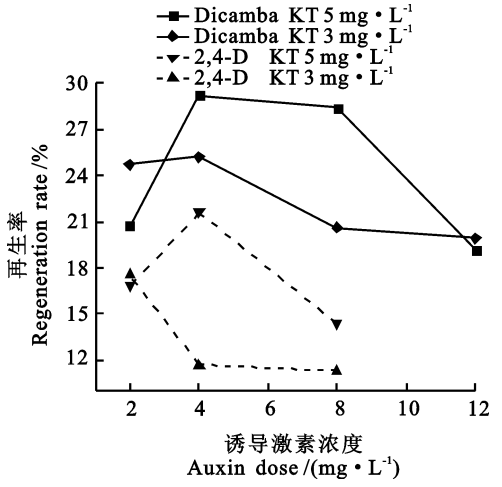
激素 Auxin	浓度 Dose /(mg·L^{-1})	扬麦 158 Yangmai158			郑麦 9023 Zhengmai 9023		
		3 mg·L^{-1} KT	5 mg·L^{-1} KT	平均 Mean	3 mg·L^{-1} KT	5 mg·L^{-1} KT	平均 Mean
2,4-D	2	17.5 acg	16.8 acd	17.2 ad	14.2 abcd	11.5 abcd	12.9 ab
	4	11.7 ad	21.6 bc	16.7 ab	17.5 abcd	14.3 abcd	15.9 a
	8	11.3 ad	14.4 de	12.9 a	7.8 abc	4.0 b	5.9 b
Dicamba	2	24.7 bfg	20.7 bce	22.7 bc	16.3 abcd	19.0 abcd	17.7 a
	4	25.2 bfg	29.2 f	27.2 c	17.4 acd	20.3 cd	18.9 a
	8	20.6 bcd	28.4 fg	24.5 ce	18.1 acd	20.4 d	19.3 a
	12	19.9 bcd	19.2 bce	19.6 bde	6.2 ab	7.2 ab	6.7 b
平均 Mean		18.7	21.5	20.1	13.9	13.8	13.9

数字后无相同字母表示在 0.05 水平上差异显著

Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level

2.2 2,4-D 和 Dicamba 对小麦成熟胚愈伤组织再生的影响

将诱导出的愈伤组织分别转至不同浓度 KT 的培养基中进行分化培养，再生率统计结果见表 2。从表 2 可见，在诱导阶段添加不同激素及浓度诱导出的愈伤组织，在分化培养基上的再生率表现出较大差异。采用 2,4-D 诱导愈伤组织时，扬麦 158 和郑麦 9023 均在 4 mg·L^{-1}浓度时出现最高再生率（分别为 21.6%和 17.5%）。采用 Dicamba诱导愈伤组织时，随着其浓度的增加，两个小麦品种的愈伤组织再生率出现先增加后降低的趋势（图 1 和图 2）。扬麦 158 和郑麦 9023 分别在 4 mg·L^{-1}和 8 mg·L^{-1}的 Dicamba 诱导时，愈伤组织的再生率最高（分别为 29.2%和 20.4%）。本实验中，两种激素在最高浓度时，两个品种的再生率都降低，表明较高浓度的 2,4-D 和 Dicamba 进行成熟胚离体培养，不利于愈伤组织的分化。扬麦 158 在各诱导培养基上诱导出的愈伤组织平均再生率均高于郑麦 9023。与2,4-D 相比，两个小麦品种的成熟胚采用 Dicamba 诱导愈伤组织，分化时有较高的再生率。综合培养效率认为，采用 4 mg·L^{-1}浓度的 Dicamba 更适合扬麦 158 和郑麦 9023 的成熟胚离体组织培养。



Dicamba KT 5 mg·L^{-1}表示用不同浓度 Dicamba 进行愈伤组织诱导,添加 5 mg·L^{-1} KT 进行分化培养;其他三个组合同理。图 2 同

Dicamba KT 5 mg·L^{-1} mean callus induction with different concentrations of Dicamba and regeneration with 5 mg·L^{-1} KT; the other three combinations are similar. The Fig 2 are as the same

图 1　KT、2,4-D 和 Dicamba 激素配比对扬麦 158 愈伤组织再生的影响

Fig. 1　Effects on the plant regeneration of callus induced from Yangmai 158 treated with different combination of KT, 2,4-D and Dicamba

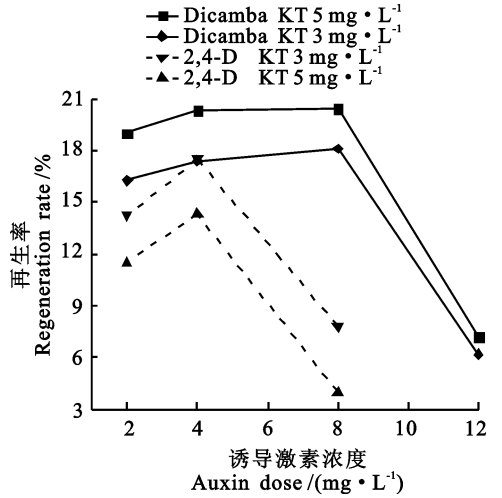


图 2　KT、2,4-D 和 Dicamba 激素配比对郑麦 9023 愈伤组织再生的影响

Fig. 2　Effects on plant regeneration of callus induced from Zhengmai 9023 treated with different combination of KT, 2,4-D and Dicamba

2.3　不同浓度 KT 对小麦成熟胚愈伤组织再生的影响

不同浓度的 KT 对愈伤组织的分化表现出不同的效果(表 2)。由表 2 和图 1 可见,对于扬麦 158,在 2,4-D 和 Dicamba 浓度分别为 4 mg·L^{-1} 和 8 mg·L^{-1}培养基中诱导的愈伤组织,转至不同浓度 KT 的培养基中,5 mg·L^{-1} KT 促进愈伤组织的再生效果显著优于 3 mg·L^{-1}。对于郑麦 9023,来自相同培养基诱导的愈伤组织转至不同浓度 KT 的分化培养基上,愈伤组织的再生率没有显著差异,采用 2,4-D 诱导愈伤组织时,在添加 3 mg· L^{-1} KT 的分化培养基上愈伤组织再生率较高,采用 Dicamba 诱导时,在添加 5 mg· L^{-1} KT 的分化培养基上愈伤组织再生率较高。其中,在 4 mg·L^{-1}和 8 mg·L^{-1}的 Dicamba 下诱导的愈伤组织在 5 mg·L^{-1} KT 的培养基上进行分化,具有最高的植株再生率(图 1、图 2)。在不同浓度 KT 的分化培养基上,扬麦 158 愈伤组织的平均再生率均高于郑麦 9023。

3　讨 论

本研究表明,诱导激素及其浓度、分化激素浓度、小麦基因型对小麦成熟胚离体培养都有影响。2,4-D 是在植物组织培养中广泛使用的一种激素。有研究表明,以成熟胚为外植体采用胚乳支撑法接种时,2,4-D 在 8 mg·L^{-1}浓度时有较好的诱导效果[15]。在郑麦 9023 幼胚培养中,有报道认为 0.5 mg·L^{-1}的 2,4-D 有利于胚性愈伤组织的诱导[11]。本实验采用剥胚法接种发现,2,4-D 的浓度为 2 mg·L^{-1}和 4 mg·L^{-1}时培养效果较好,这与多数研究报道是一致的[5-6]。

Mariag[8]首次运用 Dicamba 对小麦成熟胚进行离体培养,愈伤组织再生比 2,4-D 有更好的效果,且在 4 mg·L^{-1}浓度时诱导的愈伤组织有最高的再生率。Ren 等[9]用周麦 18 和豫麦 34 为材料,在诱导培养基中添加 4 mg·L^{-1} Dicamba 和 1.5 mg·L^{-1} ABA,在分化培养基中添加 0.1 mg·L^{-1} IAA 和 5.0 mg·L^{-1} ZT,也获得了较高的分化率。本研究在扬麦 158 和郑麦 9023 的成熟胚组织培养中也发现,Dicamba 比 2,4-D 具有更优的效果,且在 4、8 mg·L^{-1}浓度时诱导出的愈伤组织有较高的再生率。在小麦幼胚离体培养和成熟胚胚乳支持法接种研究中也发现 Dicamba 的效果比 2,4-D 好,分别在 2 mg·L^{-1}和 12 mg·L^{-1}浓度时诱导的愈伤组织有较高的分化率[10,19]。作者在研究中也曾采用胚乳支持法接种,发现用 Dicamba 诱导愈伤组织时胚容易生芽,而采用胚离体培养时发芽率很低。因此在小

麦组培中用 Dicamba 诱导小麦胚离体培养具有更好的使用效果。

本研究在愈伤组织分化时采用两种浓度的 KT，对于扬麦 158，在 2，4-D 和 Dicamba 浓度分别为 4 mg·L^{-1}和 8 mg·L^{-1}培养基中诱导的愈伤组织，转至不同浓度 KT 的培养基中再生率有显著差异。对于郑麦 9023，来自于相同诱导培养基的愈伤组织在不同浓度 KT 的分化培养基上的再生率无显著差异。有研究利用川农 17、川农 12 和山农 2618 为材料，发现 3、5 mg·L^{-1}浓度的 KT 对愈伤组织分化效果有显著差异，并且均在 KT 为 5 mg·L^{-1}浓度时有利于愈伤组织的再生[6,20]。用 2，4-D 诱导愈伤组织时，扬麦 158 和郑麦 9023 分别在 KT 浓度为 5 mg·L^{-1}和 3 mg·L^{-1} 时有较高的再生率；而用 Dicamba 诱导愈伤组织时，均以 5 mg·L^{-1}为佳。这说明不同浓度 KT 对愈伤组织分化的效果和诱导激素的配比与基因型有很大的关系。邢莉萍等[12]曾经研究了 20 个材料的幼胚愈伤组织诱导率、分化率和生根率，发现扬麦 158 综合指标最优。本研究发现，在成熟胚培养中，扬麦 158 的平均再生率显著高于郑麦 9023，平均高出 6.6%，表明扬麦 158 是转基因的优良受体。本实验中，培养基中只添加了单一的激素进行诱导和分化，探寻适宜的激素配比、优化小麦成熟胚的再生体系有待进一步的研究。

参考文献：

[1]Liang J J(梁静静)，Lv D B(吕德彬)，Chen J Y(陈军营)，*et al*. Effect on induction of the callus from mature embryos and plant regeneration in different genotypes of wheat [J]. *Journal of Henan Agricultural University*(河南农业大学学报)，2003，37(2)：107-114 (in Chinese with English abstract).

[2]Chen J N(陈俊男)，Deng Z Y(邓志英)，Tian J C(田纪春). Optimization of regeneration culture system from mature embryos and its influencing factors [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报)，2012，32(2)：197-202 (in Chinese with English abstract).

[3]Wang X G(王新国)，Ren J P(任江萍). Effect of different media and hormone proportioning on the in vitro culture of mature wheat embryo [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*(安徽农业科学)，2008，36(6)：2240-2242 (in Chinese with English abstract).

[4]Zhang D W(张东武)，Liu H(刘 辉)，Zhao H X(赵惠贤). Optimization of regeneration system of tissue culture from mature embryos and screening of wheat genotypes with high regeneration frequency [J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报)，2011，31(5)：847-852 (in Chinese with English abstract).

[5]Li W Y(李伟艳)，Liu X L(刘新伦)，Chen C H(陈春环)，*et al*. Study on the conditions of wheat embryonic callus induction from mature embryos [J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报)，2011，31(6)：1020-1024 (in Chinese with English abstract).

[6]Tang Z X(唐宗祥)，Zhang H Q(张怀琼)，Zhang H Y(张怀渝)，*et al*. Effect of 2，4-D，KT on callus formation and plantlet regeneration from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报)，2004，22(3)：203-205 (in Chinese with English abstract).

[7]Lin G L(林国梁)，Li J C(李佳春)，Wang X Z(王兴珍)，*et al*. Effects of 2，4-D and desiccation on callus induction and differentiation of wheat mature embryos [J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报)，2012，32(5)：858-862 (in Chinese with English abstract).

[8]Maria G M，Heidi F K. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biololgy-Plant*，2002，38：39-45.

[9]Ren J P，Wang X G，Yin J. Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat [J]. *Agricultural Sciences in China*，2010，9(1)：31-37.

[10]Tao L L(陶丽莉). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation using the immature embryo introduction of genes coding HMW-GS derived from alien species in common wheat[D]. Master Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences(中国农业科学院)，2009：27 (in Chinese with English abstract).

[11]Zhao Y Y(赵永英)，Li C X(李翠香)，Miao H M(苗红梅). Important factors affecting wheat tissue culture efficiency [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*(河南农业科学)，2007(1)：23-26 (in Chinese with English abstract).

[12]Xing L P(邢莉萍)，Wang H Z(王华忠)，Jiang Z N(蒋正宁)，*et al*. Optimization of regeneration culture system from immature embryos and selection of the suitable genotype as transformation acceptor in wheat [J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报)，2008，28(2)：187-192 (in Chinese with English abstract).

[13]Li Y C(李砚川). Agrobacterium-mediated transformation of wheat mature embryo tissues [J]. *Hubei Agricultural Sciences*(湖北农业科学)，2011，50(17)：3637-3639 (in Chinese with English abstract).

[14]Chen L G(陈立国). Establishment of genetic transformation system of mature embryos of common wheat by A. tumefacienen and research of transformation[D]. Master Dissertation of Shandong Agricultural University(山东农业大学)，2007：17 (in Chinese with English abstract).

[15]Bartok T，Sagi F. A new，endosperm-supported callus induction methods for wheat [J]. *Plant Cell，Tissue and Organ Culture*，1990，22：37-41.

[16]Murat A，Metin T，Kamil H. Plant regeneration in wheat mature embryo culture [J]. *African Journal of Biotechnology*，2011，10(70)：15749-15755.

[17]Mikhail F，Dmitry M，Darya V，*et al*. The effect of auxins，time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis form mature embryos of wheat [J]. *Plant Cell，Tissue and Organ Culture*，2006，84：213-222.

[18]Satyavathi V V，Jauhar P P，Elias E M，*et al*. Effects of growth regulators on in Vitro plant regeneration in durum wheat [J]. *Crop Science*，2004，44：1839-1846.

[19]Panpenfuss J M，Carman J G. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin [J]. *Crop Science*，1987，27：588-593.

[20]Hou M(后 猛). The establishment of wheat transformation system by A. tumefaciens and the studies on transgene[D]. Master Dissertation of Shandong Agricultural University(山东农业大学)，2008：35-36 (in Chinese with English abstract).