

研究报告

Research Report

二倍体、四倍体小麦成熟胚组织培养研究初报

毕瑞明^{1,2} 王洪刚^{2*}

1 菏泽学院生命科学系, 菏泽, 274015; 2 国家小麦改良中心泰安分中心, 作物生物学国家重点实验室, 山东农业大学农学院, 泰安, 271018

* 通讯作者, hgwang@sdaa.edu.cn

摘 要 以栽培二粒小麦(*Triticum dicoccum* Schuble)、硬粒小麦(*Triticum durum* Desf.)以及普通六倍体小麦祖先种野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides* Korn.)、野生一粒小麦(*Triticum aegilopides* Bal.) 4 个基因型麦属植物成熟胚(MEs)为外植体, 对成熟胚愈伤组织诱导、分化及植株再生的组织培养效果做了初步研究, 筛选出适合于非六倍体小麦成熟胚组织培养的基因型。结果表明, 不同基因型成熟胚愈伤组织的诱导、分化及植株再生差异显著, 具有很强的基因型效应和基因型依赖性。其中栽培二粒小麦的成熟胚表现出较好的组织培养特性, 它的愈伤组织诱导率、分化率、成苗率以及组培效率分别为 95.00%、90.00%、32.40%、27.70%, 显著高于其它基因型。二倍体、四倍体小麦成熟胚组织培养特性的研究以及组织培养基基因型的筛选, 为遗传转化体系的建立、小麦功能基因的分离和克隆, 以及小麦分子育种工作奠定了基础。

关键词 二倍体小麦, 四倍体小麦, 成熟胚, 组织培养

Primary Studies on Tissue Culture of Mature Embryo from Diploid and Tetraploid Wheat

Bi Ruiming^{1,2} Wang Honggang^{2*}

1 Department of Life Science of Heze University, Heze, 274015; 2 Subcenter of National Wheat Improvement Center, the National Key Laboratory of Crop Biology, Agronomy College of Shandong Agricultural University, Taian, 271018

* Corresponding author, hgwang@sdaa.edu.cn

Abstract The behavior of diploid and tetraploid wheat in their tissue culture response of mature embryo (MEs) callus was primarily studied in this paper. Significant differences were detected in callus induction, embryogenic callus differentiation, plantlet regeneration and culture efficiency when mature embryos of cultivable emmer wheat (*Triticum dicoccum* Schuble), durum wheat (*Triticum durum* Desf.), and the common wheat progenitors *Triticum dicoccoides*, and *Triticum aegilopides* were compared. The results showed that, the genotype dependency was strongly high in tissue culture of mature embryos of these triticum plant genotypes. The genotype, which the efficiency of induction, differentiation and regeneration of mature embryos callus was high, had been screened out. Mature embryo-derived callus of *T. dicoccum* showed better tissue culture response than other genotypes. Its frequency of callus induction, embryogenic callus differentiation, plantlet regeneration and culture efficiency were 95.00%, 90.00%, 32.40%, 27.70% respectively. Plantlets can be regenerated from mature embryos of diploid and tetraploid wheats saving on growth facility resources and time required for the collection of other explants and providing a solid basis for genetic transformation, genes cloning and molecular plant breeding of triticum plants.

Keywords Diploid wheat, Tetraploid wheat, Mature embryo, Tissue culture

小麦基因组庞大, 重复序列多, 重要功能基因的 体小麦(*Triticum aestivum* L.)基因组小, 是进行插入
克隆存在很大困难。二倍体、四倍体小麦较普通六倍 诱变以分离、克隆小麦基因的良好材料。因此, 寻找

组培效率高的二倍体、四倍体小麦基因型,建立简便、高效的二倍体、四倍体小麦植株再生体系和遗传转化体系,是当前学者们的研究热点之一。

国内外研究者发现(于晓红等,1999;覃建兵和何光源,2001),来源于麦属植物幼胚、幼穗的愈伤组织具有较高的分化再生能力,但是幼胚、幼穗取材受到植物体生长发育的严格限制。以成熟胚作为外植体源可以弥补以幼胚、幼穗为外植体源的不足,具有取材时间不受限制、材料充足并且生理状态一致、操作简便等优点。人们曾以普通小麦成熟胚(柳建军等,1996; Ozgen et al., 1998; 唐宗祥等, 2004; Bi et al., 2007)、细小的成熟胚切段(Delporte et al., 2001)、幼芽的分生组织切段(Sharma et al., 2005)等为外植体进行愈伤组织诱导和分化,并获得再生植株。但是,至今关于二倍体、四倍体小麦成熟胚组织培养的报道较少。

本文通过对二倍体、四倍体小麦成熟胚愈伤组织的诱导、分化和成苗的初步研究,筛选出适合于非六倍体小麦成熟胚组织培养的基因型,为非六倍体小麦遗传转化体系的建立、插入诱变分离克隆小麦功能基因以及小麦分子育种研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料有栽培二粒小麦(*Triticum dicoccum* Schuble)、硬粒小麦(*Triticum durum* Desf.)、野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides*)、野生一粒小麦(*Triticum aegilopides*)、由国家小麦改良中心泰安分中心种植保存。

组织培养基本培养基:MS培养基附加水解酪蛋白(CH) 500 mg/L、谷氨酰胺 200 mg/L、天门冬酰胺 150 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂粉 8 g/L。成熟胚愈伤组织诱导培养基:基本培养基附加 2,4-D 2 mg/L、 α -萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L、脱落酸(ABA) 0.1 mg/L。愈伤组织继代培养基:基本培养基附加 2,4-D 2 mg/L、NAA 0.5 mg/L、ABA 0.5 mg/L。分化培养基:基本培养基附加细胞分裂素(KT) 5 mg/L。生根培养基:1/2MS培养基附加蔗糖 20 g/L,用 8 g/L 琼脂粉进行固化。

培养基各成分(除植物生长调节剂)按比例溶解混匀,pH值调至5.8,高压蒸汽灭菌 121℃ 20 min,待培养基温度降至 40~50℃时,过滤灭菌加入植物生长调节剂。

2,4-D、NAA、ABA、KT 购自北京鼎国生物技术

有限责任公司;谷氨酰胺、天门冬酰胺购自上海伯奥生物科技有限公司;琼脂粉购自 Sigma 公司;其它试剂购自上海化学试剂有限公司、北京欣经科生物技术有限公司。

1.2 成熟种子的表面消毒

选取成熟饱满、颜色和大小相对一致的二倍体、四倍体小麦成熟种子,用 70%(V/V)酒精浸泡 5 min,无菌水冲洗 2~3 次,再经 0.1%的升汞(HgCl₂)浸泡 20 min,无菌水冲洗 6~8 次后,置于无菌保湿滤纸上,26℃暗培养 18~20 h。

1.3 成熟胚愈伤组织的诱导和继代

26℃预培养 18~20 h,待种子露白后,用镊子撕破种皮,破坏胚芽和胚根,剥出种胚,接种在诱愈培养基上,26±1℃暗培养 20 d。挑选获得的胚性愈伤组织,每 2~3 周继代一次。

1.4 胚性愈伤组织的分化再生

挑选胚性愈伤组织转入分化培养基,26±1℃暗培养 10 d 后,转入同温条件下光培养,光照强度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间 16 h/d。经过 40 d 的分化培养(每 10 d 更换 1 次新鲜培养基),形成绿芽原基和绿芽,待分化出的绿芽长至 2~3 cm 时,切取绿芽转至生根培养基,使之生根。

1.5 再生植株的春化及移栽

具有正常根系的再生植株长至 6~8 cm 时,4℃冰箱春化 6~8 周(16 h 光周期,光照强度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),敞开培养瓶瓶口,温室中炼苗 1 周,移栽入温室花盆中(26±2℃,16 h 光周期,光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),生长至成熟。

1.6 愈伤组织的观察、记录

成熟胚接种到诱愈培养基 15 d 后,观察愈伤组织出愈质量(Bi et al., 2007),以“+”记录愈伤组织质量等级。“+”表示愈伤组织质量差,重 50~100 mg,直径 1~3 mm,水浸状,质软,苍白色或者褐变,甚至死亡;“++”表示愈伤组织质量中等,重 150~200 mg,直径 3~4 mm,淡黄色,表面不规则,质硬;“+++”表示愈伤组织质量高,重 250 mg 左右,直径 4~5 mm,亮黄色,表面呈不规则颗粒状,质地致密。

1.7 数据的统计、计算及分析

成熟胚接种到诱愈培养基 20 d 后,统计愈伤组

织出愈数量,计算愈伤组织诱导率;愈伤组织接种到分化培养基 40 d 后,统计计算愈伤组织分化率;分化出的绿芽转至生根培养基,20 d 后统计计算愈伤组织成苗率。每次实验接种 100 个(或块),重复 2 次。

诱导率 = 诱导出愈伤组织的外植体数 / 接种的外植体数 × 100%; 分化率 = 分化出绿芽原基或绿芽的愈伤组织块数 / 接种的愈伤组织块数 × 100%; 成苗率 = 成苗数的愈伤组织块数 / 接种的愈伤组织块数 × 100%。

实验数据在 0.05 概率水平上进行方差齐性检验、单因素方差分析、Duncan 多范围检验等,所用统计分析软件为 DPS。

2 结果与分析

2.1 预备实验

在植物组织培养过程中,植物组织的生长发育受到很多因素的影响。小麦成熟胚愈伤组织诱导过程中,光照、温度、培养基 2,4-D 浓度对愈伤组织的诱导及分化影响的预备实验结果表明(数据没有显示),黑暗培养诱导出来的愈伤组织其质量、诱导率、分化率略好于光照培养(16 h 光照/d)诱导出来的愈伤组织,26℃ 条件下以及诱愈培养基 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时,诱导出来的愈伤组织质量、诱导率和分化率较高。因此在以后的诱愈培养中均采用 26℃ 黑暗培养,诱愈培养基 2,4-D 浓度为 2 mg/L。

2.2 二倍体、四倍体小麦成熟胚组织培养反应

将二倍体、四倍体小麦成熟胚剥出,接种到诱愈培养基上,2 d 种胚开始膨大,4 d 左右开始产生白色至淡黄色的愈伤组织。栽培二粒小麦、硬粒小麦出愈时间基本一致,野生二粒小麦、野生一粒小麦出愈时间稍晚。在愈伤组织诱导过程中,栽培二粒小麦愈伤组织生长最快,愈块大,直径多为 4~6 mm,颜色鲜艳,呈淡黄色,表面有不规则颗粒,质地致密(图 1A);硬粒小麦、野生二粒小麦愈伤组织生长快,愈块直径多为 3~5 mm,呈淡黄色,表面有不规则颗粒,质地致密;野生一粒小麦愈伤组织生长缓慢,愈块小,直径多为 1~2 mm,颜色稍暗,呈白色至淡黄色,表面有不规则颗粒,质地较硬。愈伤组织诱导培养 20 d,统计计算各基因型诱导率(表 1)。实验结果表明,二倍体、四倍体各基因型小麦成熟胚在相同的愈伤组织诱导条件下,出愈时间、出愈质量、诱导率均存在明显不同,诱导率之间的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中以栽培二粒小麦出愈时间早,愈伤组织质量好,诱导率较高,为 95.00%。

将二倍体、四倍体小麦各基因型诱导培养 20 d 的成熟胚愈伤组织转移到分化培养基上,经过 8~10 d 培养,栽培二粒小麦分化出绿芽原基,15 d 后开始分化出绿芽(图 1B),其余各基因型分化出绿芽原基和绿芽的时间较晚,且有根的形成。分化培养 40 d,统计计算各基因型分化率(表 1)。把各基因型分化形

表 1 二倍体、四倍体小麦成熟胚愈伤组织的诱导、分化及再生

Table 1 Induction, differentiation and regeneration of callus derived from MEs of diploid and tetraploid wheat

基因型 Genotype	基因组 Genome	起源 Origin	愈伤组织质量 Quality of callus	诱导率(%) Frequency of induction	分化率(%) Frequency of differentiated	成苗率(%) Frequency of regeneration	组培效率(%) Culture efficiency
硬粒小麦 <i>T. durum</i>	AB	加拿大 Canada	++	96.20 a	33.33 b	2.17 c	0.70
栽培二粒小麦 <i>T. dicoccum</i>	AB	不清楚 Not clear	+++	95.00 a	90.00 a	32.40 a	27.70
野生二粒小麦 <i>T. dicoccoides</i>	AB	安替黎巴嫩 Anti-Lebanon	++	73.86 b	40.91 b	8.18 b	2.47
野生一粒小麦 <i>T. aegiloides</i>	A	美索不达米亚 Macedonia	+	68.75 bc	27.27 c	3.19 c	0.60
P				0.0244*	0.0017**	0.0064**	

注: 平均值后面相同的小写字母表示经过方差分析和 Duncan 多范围检验不同处理下百分率在 0.05 概率水平上差异不显著; P: 不同处理下百分率方差分析结果; +: 愈伤组织质量差; ++: 中等; +++: 高

Note: The means of percent presented here were the average and not significantly different according to the analysis of variance and Duncan multiple range test at 0.05 level of probability followed by the same letter; P was result of analysis of variance of percent at different condition; +: Quality of callus was low; ++: Moderate; +++: High

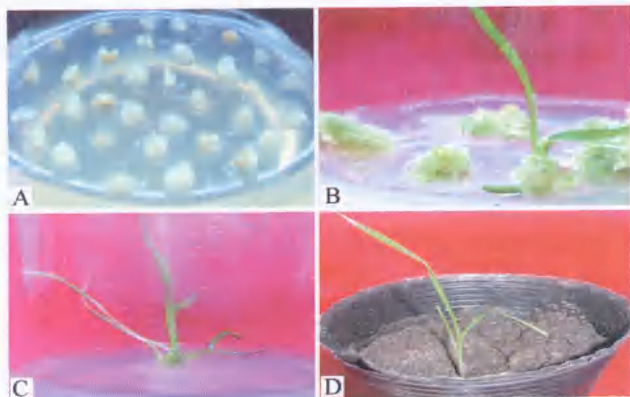


图1 栽培二粒小麦成熟胚组织培养植株再生

注: A: 成熟胚培养形成的愈伤组织; B: 胚性愈伤组织形成的绿芽原基和绿芽; C: 绿芽形成完整小植株; D: 移栽成活再生植株

Figure 1 Plant regeneration derived from MEs tissue culture of *Triticum dicoccum*

Note: A: Calli from MEs; B: Green primordia differentiation structure and green bud from embryogenic calli; C: Regenerative plant; D: Regenerative plant growing in basin

成的绿芽转到生根培养基上进行生根培养(图1C), 20 d后统计计算各基因型成苗率(表1)。具有正常根系的再生植株经春花移栽入温室花盆中, 生长至成熟(图1D)。实验结果表明, 各基因型分化率和成苗率之间的差异具有统计学意义($P < 0.01$), 以栽培二粒小麦分化率和成苗率最高, 分别为90.00%和32.40%。在实验过程中发现, 不同基因型愈伤组织分化产生绿芽原基和根的能力虽有一定差异, 但大部分能分化出绿芽原基和根, 而分化出绿芽和形成幼苗的能力却有明显差异, 即不同基因型诱导出的愈伤组织分化成苗潜力不同。表型观察栽培二粒小麦愈伤组织质量好且分化出苗率高, 说明愈伤组织表型观察质量与分化成苗存在一定的相关性。

栽培二粒小麦综合组培效率最高, 为27.70%, 说明栽培二粒小麦成熟胚具有较高的出愈率和分化再生潜能, 是较好的小麦非六倍体组织培养基型。

3 讨论

前人研究结果表明, 不同基因型普通小麦之间成熟胚愈伤组织诱导能力差别不大, 而愈伤组织分化特别是成苗的能力则有较大的差异(覃建兵和何光源, 2001; 任江萍等, 2003; 余桂荣等, 2003)。我们的实验结果与此一致(表1)。供试的4个二倍体、四倍体小麦基因型, 愈伤组织诱导率在68%以上, 相对于较高的愈伤组织诱导率而言, 愈伤组织分化率、成

苗率低, 并有很强的基因型依赖性。因此, 筛选寻找高效二倍体、四倍体小麦成熟胚植株再生基因型, 具有重要意义; 同时也说明小麦组织培养植株再生的瓶颈在于愈伤组织的分化, 要普遍提高小麦愈伤组织分化率, 还需要做大量深入细致的工作。

参考文献

- Bi R.M., Kou M., Chen L.G., Mao S.R., and Wang H.G., 2007, Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*, *Plant Breed.*, 126(1): 9-12
- Delporte F., Mostade O., and Jacquemin J.M., 2001, Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 67(1): 73-80
- Liu J.J., Yu H.X., and Feng Z.L., 1996, Study on the induction and differentiation of the callus from mature embryos of wheat, *Shandong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shandong Agricultural University)*, 27(4): 451-456 (柳建军, 于洪欣, 冯兆礼, 1996, 小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的研究, *山东农业大学学报*, 27(4): 451-456)
- Ozgen M., Türet M., Altynok S., and Sancak C., 1998, Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, *Plant Cell Rep.*, 18(3-4): 331-335
- Qin J.B., and He G.Y., 2001, Preliminary study on in vitro culture of different wheat genotypes and their explants, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Huazhong Agricultural University)*, 20(6): 522-527 (覃建兵, 何光源, 2001, 不同小麦基因型及其不同外植体离体培养研究初探, *华中农业大学学报*, 20(6): 522-527)
- Ren J.P., Yin J., Shi X.Z., Jiang X.D., and Wang Z.Q., 2003, Optimization of the cultural system of wheat transgenic regenerated plants, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*, 18(1): 22-25 (任江萍, 尹钧, 师学珍, 姜小冬, 王智琴, 2003, 小麦转基因再生植株培养体系的优化, *华北农学报*, 18(1): 22-25)
- Sharma V.K., Hnsch R., Mendel R.R., and Schulze J., 2005, Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments, *Plant Breed.*, 124(3): 242-246
- Tang Z.X., Zhang H.Q., Zhang H.Y., Yan B.J., and Ren Z.L., 2004, Effect of 2, 4-D, KT on callus formation and plantlet regeneration from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos, *Sichuan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Sichuan Agricultural University)*, 22(3): 203-205 (唐宗祥, 张怀琼, 张怀渝, 晏本菊, 任正隆, 2004, 2,4-D、KT对小麦成熟胚愈伤组织形成、分化的影响, *四川农业大学学报*, 22(3): 203-205)

- Yu G.R., Yin J., Guo T.C., and Niu J.S., 2003, Selection of the optimum genotype for immature embryo culture of wheat, Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops), 23(2): 14-18 (余桂荣, 尹钧, 郭天财, 牛吉山, 2003, 小麦幼胚培养基因型的筛选, 麦类作物学报, 23(2): 14-18)
- Yu X.H., Zhu Z., Fu Z.M., An L.J., and Li X.H., 1999, Improvement in plant regeneration from callus in wheat, Zhiwu Shengli Xuebao (Acta Phytophysiologica Sinica), 25(4): 388-394 (于晓红, 朱祯, 付志明, 安利佳, 李向辉, 1999, 提高小麦愈伤组织分化频率的因素, 植物生理学报, 25(4): 388-394)

农学类期刊影响因子排名

《分子植物育种》排名第 11

排序	期刊名称	影响因子	排序	期刊名称	影响因子	排序	期刊名称	影响因子
1	玉米科学	1.525		(农业科学版)		63	热带农业科学	0.275
2	中国水稻科学	1.415	32	西南农业学报	0.472	64	莱阳农学院学报	0.268
3	作物学报	1.355	33	西南农业大学学报	0.471	65	黑龙江农业科学	0.267
4	中国农业科学	1.205	34	北京农学院学报	0.467	66	耕作与栽培	0.262
5	植物病理学报	1.096	35	中国农学通报	0.456	67	甘蔗	0.261
6	果树学报(原果树科学)	0.921	36	作物杂志	0.451	68	吉林农业科学	0.254
7	园艺学报	0.887	37	东北林业大学学报	0.445	69	甘蔗糖业	0.239
8	棉花学报	0.791	38	中国蔬菜	0.435	70	北方园艺	0.232
9	大豆科学	0.771	39	浙江农业学报	0.432	71	长江蔬菜	0.227
10	华北农学报	0.759	40	四川农业大学学报	0.428	72	中国甜菜糖业	0.225
11	分子植物育种	0.713	41	江西农业学报	0.415	73	辽宁农业科学	0.224
12	遗传	0.693	42	茶叶	0.413	74	广西蔗糖	0.214
13	植物保护学报	0.679	43	福建农业科技	0.412	75	中国种业	0.202
14	农业生物技术学报	0.658	44	热带作物学报	0.404	76	安徽农业科学	0.199
15	中国油料作物学报	0.653	45	植物分类学报	0.404	77	茶叶科学技术	0.19
16	植物生理学通讯	0.633	46	福建茶叶	0.397	78	中国棉花	0.166
17	蚕业科学	0.627	47	上海农业学报	0.382	79	福建果树	0.153
18	杂交水稻	0.621	48	种子	0.381	80	北方果树	0.148
19	植物资源与环境学报	0.597	49	新疆农业科学	0.375	81	福建稻麦科技	0.137
20	植物保护	0.578	50	沈阳农业大学学报	0.372	82	中国马铃薯	0.137
21	江苏农业学报	0.573	51	广西农业生物科学	0.359	83	西南园艺	0.127
22	中国稻米	0.559	52	东北农业大学学报	0.353	84	农业新技术	0.126
23	浙江大学学报 (农业与生命科学版)	0.525	53	西北农业学报	0.348		(原北京农业科学)	
24	西北农林科技大学学报 (自然科学版)	0.52	54	湖南农业科学	0.312	85	甘肃农业	0.122
25	中国烟草科学	0.517	55	生命的化学	0.305	86	桉树科技	0.116
26	福建农业学报	0.516	56	新疆农业大学学报	0.302	87	甘肃农业科技	0.109
27	华中农业大学学报	0.514	57	海南大学学报 (自然科学版)	0.3	88	垦殖与稻作	0.105
28	华南农业大学学报	0.494	58	烟草科技	0.3	89	甘肃林业	0.079
29	河南农业大学学报	0.481	59	大豆通报	0.293	90	蚕学通讯	0.077
30	中国野生植物资源	0.477	60	广东农业科学	0.287	91	种子科技	0.064
31	上海交通大学学报	0.473	61	广西林业科学	0.283	92	上海农业科技	0.062
			62	中国糖料	0.278	93	蚕桑茶叶通讯	0.058
						94	当代蔬菜	0.021