

小麦成熟胚的组织培养

毕瑞明^{1,2}, 王洪刚²¹ 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)

摘要:【研究目的】为了筛选出小麦(*Triticum aestivum* L.)成熟胚(MEs)培养和遗传转化受体材料的优良基因型,【方法】以27份优良普通小麦冬性主栽品种或高代育种品系为试材,采用整粒切胚诱愈方法(endosperm-supported method),对小麦成熟胚进行组织培养研究。【结果】结果表明,在成熟胚培养过程中光照、温度、培养基2,4-D浓度、基因型等因素对小麦成熟胚组织培养影响较大;同时小麦成熟胚组织培养存在着较强的基因型依赖性,不同基因型愈伤组织诱导率、分化率、成苗率的差异具有统计学意义($P < 0.01$)。通过研究从27个小麦基因型中筛选出了3个适合于成熟胚整粒切胚诱愈的基因型,即山农2618、泰山021、河北341,他们的成苗率分别达到了15.38%、25.27%、21.33%。【结论】小麦成熟胚组织培养优良基因型的筛选,为以后小麦的遗传转化和应用基因工程技术进行遗传改良奠定了基础。

关键词: 小麦;成熟胚;组织培养

中图分类号:Q813.1

文献标识码:A

Study on Tissue Culture of Mature Embryo from Wheat

Bi Ruiming^{1,2}, Wang Honggang²¹ 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, Tai'an 271018)

Abstract: 【OBJECTIVE】In order to select out the optimum wheat (*Triticum aestivum* L.) genotype for tissue culture of mature embryo (MEs) and receptor of genetic transformation, 【METHOD】27 winter-type superior cultivars wheat of Chinese northern region or breeding lines of hexaploid common wheat were used as test material and the method of callus induction of endosperm-supported was utilized in this paper. The effect of many factors on tissue culture of wheat MEs had been studied. 【RESULTS】The results indicated that, light, temperature, concentration of 2,4-D and genotype were important influence factors for tissue culture of wheat MEs. The genotype dependency was strongly high in tissue culture of Mes of these genotypes. Differences of frequency of induction, differentiation and regeneration of callus from mature embryos of 27 wheat genotypes by endosperm-supported method were respectively significant ($P < 0.01$). The efficiency of induction, differentiation and regeneration of mature embryos callus was high in genotypes screened out. Mature embryo-derived callus of SN2618, TS021, HB341 showed better tissue culture response than other genotypes. Their frequency of regeneration were 15.38%, 25.27%, 21.33% respectively. The regenerated plants could be obtained in 30~40 d. 【CONCLUSION】The work provided a solid basis for tissue culture of wheat Mes, genetic transformation and molecular plant breeding of wheat.

Key words: Wheat, Mature embryo, Tissue culture**基金项目:** 国家农业部农业结构调整重大技术研究专项(04-02-05B)资助项目。**第一作者简介:** 毕瑞明,女,1968年出生,山东菏泽市人,博士,副教授,主要从事植物基因工程与遗传改良方面的研究。通信地址:274015 山东省菏泽学院生命科学系。Tel:13853026168, E-mail:biruiming@126.com。**通讯作者:** 王洪刚,男,1955年出生,山东枣庄市人,教授,博士研究生导师,主要从事作物生物技术与遗传改良方面的研究。通信地址:271018 山东农业大学农学院。Tel:0538-8242141, E-mail:hgwang@sdau.edu.cn。**收稿日期:** 2007-07-09, 修回日期:2007-07-10。

0 引言

研究者发现^[1,2],来源于小麦(*Triticum aestivum* L.)幼胚、幼穗的愈伤组织具有较高的分化再生能力,迄今为止获得的转基因小麦多以幼胚、幼穗及其愈伤组织为受体,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、操作简便等许多优点。人们曾以小麦成熟胚^[3-6]、细小的成熟胚切段^[7]、幼芽的分生组织切段^[8]等为外植体进行愈伤组织的诱导和分化,并获得再生植株。但是,小麦成熟胚培养一般耗时长,组培效率低,限制了成熟胚在小麦组织培养和遗传转化中的应用。因此采用新的组培方法,寻找高效的小麦成熟胚培养基型,是小麦研究工作者的重要课题。

笔者以 27 个小麦基因型成熟种子为试材,采用整粒切胚诱导方法,筛选出高效的小麦成熟胚培养基型,为小麦的遗传转化和基因工程遗传改良奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2005 年 6 月至 2006 年 12 月在山东农业大学国家小麦改良中心泰安分中心组培室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 植物材料 六倍体普通小麦 (*Triticum aestivum* L., AABBDD, $2n=6x=42$) 济麦 20 (Jimai 20)、烟农 19 (Yannong 19)、豫麦 18 (Yumai 18)、豫麦 54 (Yumai 54)、兰考 906 (Lankao 906)、京 411 (Jing 411)、中优 9507 (Zhongyou 9507)、京花 1 号 (Jinghua 1)、高优 503 (Gaoyou 503)、陕 225 (Shan 225) 是中国北方麦区优良主栽冬性品种; T9817、TS021、YN2801、4072、SN2618、SN020422-12、SN03J44、SN03J102、03 Z17、H92-112、CB032、HB188、HB215、HB341、H91-26 是选育的小麦冬性高代品系; st 2422/464 为国外引进的种质材料; 中国春 (Chinese spring) 为小麦研究模式材料。以上供试材料由国家小麦改良中心泰安分中心种植保存。

1.2.2 培养基 小麦成熟胚整粒诱导愈伤组织培养液: 2,4-D 8mg/L 溶液。组织培养基本培养基: MS 培养基附加水解酪蛋白 (CH) 200 mg/L、谷氨酰胺 20 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂粉 8g/L。分化培养基: 基本培养基附加 2,4-D 0.5 mg/L、细胞分裂素 (KT) 0.1 mg/L。生根培养基: 1/2MS 培养基, 用 8 g/L 琼脂粉进行固化。培养基的配制参见文献^[9]。

1.2.3 试验试剂 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。

1.2.4 试验仪器 PHG-280BX 型恒温光照培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、SHA-C 水浴恒温振荡器 (江苏恒丰仪器厂)、YX400Ⅲ全自动电热蒸汽消毒器 (上海三申)、SW-CI-IC 净化工作台 (上海三申)、723 可见分光光度计 (上海分析仪器三厂)、HR-7751MS 微波炉 (青岛海尔)。

1.3 实验方法

1.3.1 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 27 个小麦基因型成熟种子, 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, 33℃ 黑暗条件下预培养 2 h。

1.3.2 成熟胚愈伤组织的诱导和继代 待种子露白, 用解剖刀在胚上纵切一刀, 横切两刀, 腹沟向下接种在诱导培养液浸润的滤纸上, (26±1)℃ 暗培养 8 d。挑选胚性愈伤组织, 每 2~3 周继代一次。

1.3.3 胚性愈伤组织的分化再生 选取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 μmol/(m²·s), 光照时间 16 h/d。经过 40 d 的分化培养 (每 10 天更换 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。

1.3.4 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 w (16 h 光周期, 光照强度为 40 μmol/(m²·s)), 然后敞开培养瓶瓶口, 温室中炼苗 1 w, 移栽入温室花盆中 [(26±2)℃, 16 h 光周期, 光照强度为 80 μmol/(m²·s)], 生长至成熟。

1.3.5 组织培养反应的观察、记录 成熟胚接种到诱导培养液 8 d 后, 观察愈伤组织出愈质量, 以“+”记录愈伤组织质量等级^[6]。“+”表示愈组质量差, 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; “++”表示愈组质量中等, 重 150~200 mg, 直径 3~4 mm, 淡黄色, 表面不规则, 质硬; “+++”表示愈组质量高, 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。

1.3.6 数据的统计、计算、分析 成熟胚接种到诱导培养液 8 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 60 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 $\times 100\%$;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 $\times 100\%$;成苗率=成苗数的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数 $\times 100\%$ 。

试验数据在 0.05 或 0.01 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 预备试验

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,光照条件对愈伤组织的诱导及分化影响的预备试验结果表明(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,因此在以后的诱愈培养中均采用黑暗培养。

小麦成熟种子愈伤组织诱导过程中,诱愈温度设置 14、18、22、26℃ 4 个处理,诱愈 8 d,然后愈伤组织

表 1 温度和 2,4-D 浓度对小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的影响

温度 (℃)	温度			2, 4-D			
	诱导率 (%)	愈伤组织质量	分化率 (%)	2,4-D 浓度 (mg/L)	诱导率 (%)	愈伤组织质量	分化率 (%)
14	82.58 a	+	26.52 c	0	10.00 d	+	0.00 c
18	87.50 a	++	28.57 bc	2.0	27.50 cd	+	38.00 bc
22	83.34 a	+++	48.69 ab	4.0	45.00 bc	+	34.29 cd
26	82.50 a	+++	55.85 a	6.0	69.17 ab	+++	52.28 b
				8.0	85.46 a	+++	72.50 a
				10.0	76.67 a	++	31.25 d
P	0.7071		0.0397 *		0.0019**		0.0005 **

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。

在分化培养条件一致的情况下培养 20 d。以豫麦 18 为试材,实验重复 1 次,每次每处理接种 40 个外植体。实验结果(表 1)表明,诱愈时的温度对诱导出的愈伤组织质量及以后的分化有显著影响($P<0.05$),但对愈伤组织的诱导率影响不显著($P>0.05$)。随着诱愈温度的升高(在实验范围内),愈伤组织的质量和分化率越来越高。26℃条件下诱导出的愈伤组织分化率最高,为 55.85%,是 14℃条件下诱导出的愈伤组织分化率的 2 倍多。因此在以后的愈伤组织诱导中诱愈温度采用 26℃。

小麦成熟种子愈伤组织诱导过程中,诱愈培养液 2,4-D 浓度设定为 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/L,诱愈 8 d,然后愈伤组织在条件一致的情况下分化培养 20 d。以豫麦 18 为试材,实验重复 1 次,每次每处理接种 40 个外植体。统计分析结果(表 1)表明,诱愈培养液 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导率、愈组质量和分化率具有极显著性影响($P<0.01$),以 2,4-D 浓度为 8 mg/L 时诱导率(85.46%)、愈组质量和分化率(72.50%)最高。因此在以后的愈伤组织诱导中诱愈培养液 2,4-D 浓度采用 8.0 mg/L。

2.2 27 个小麦基因型成熟胚组织培养反应

将 27 个基因型小麦种子表面消毒,切割成熟胚,

然后进行成熟胚组织培养,实验结果及统计分析结果见表 2。结果表明,27 个基因型小麦成熟胚愈伤组织诱导率、分化率、成苗率之间的差异分别具有统计学意义($P<0.01$)。综合各个基因型小麦成熟胚诱导出来的愈伤组织的质量、诱导率、分化率、成苗率 4 个方面,从 27 个小麦基因型中筛选出 3 个适合于小麦成熟胚组织培养的优良基因型,他们是山农 2618、泰山 021、河北 341,成苗率分别为 15.38%、25.27%、21.33%。

3 讨论

幼胚是小麦组织培养和遗传转化中效果较好的起始外植体源,但却存在着取材受到严格限制、受体单一等一些难以克服的缺点。以成熟胚为起始外植体可以有效克服这些缺点,但成熟胚的组织培养、植株再生以及遗传转化比较困难。笔者采用整粒切胚诱愈方式对多个小麦基因型成熟胚进行组织培养研究,筛选出了适合于小麦成熟胚组织培养的基因型。

前人研究结果表明,不同基因型小麦之间成熟胚的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^[2,10,11]。笔者的实验结果与此一致(表 2)。供试的 27 个小麦基因型,大部分愈伤组织诱导率在 70%以上,只有极个别基因型诱导率偏低。相对于普遍较高的愈伤组织诱导率而言,愈伤组

表 2 27 个小麦基因型成熟胚整粒切胚诱导愈伤组织的诱导、分化与植株再生

基因型	诱导率 (%)	愈伤组织质量	分化率 (%)	成苗率 (%)
Jimai 20	94.48 a	+++	68.75 b	6.25 c
Yannong 19	84.92 b	++	53.33 bc	6.67 c
Yumai 18	80.06 b	++	15.79 d	10.53 b
Yumai 54	97.42 a	+++	89.59 a	6.26 c
Lankao 906	98.69 a	+++	82.61 ab	2.17 d
Jing 411	92.32 ab	+++	82.36 ab	2.95 d
Zhongyou 9507	77.14 bc	+	33.33 cd	0 d
Jinghua 1	93.85 ab	++	85.71 a	7.14 bc
Gaoyou 503	86.43 b	++	46.04 cd	7.15 bc
Shan 225	77.07 bc	+	63.34 bc	0 d
SN2618	98.15 a	+++	84.62 a	15.38 ab
SN020422-12	90.77 ab	+++	33.83 cd	0 d
SN03J44	63.40 d	++	78.25 ab	3.58 cd
SN03J102	76.10 bc	+	12.50 d	0 d
4072	96.01 a	+++	100.00 a	8.01 b
TS021	97.78 a	+++	89.48 a	25.27 a
T9817	97.18 a	+++	92.00 a	0 d
YN2801	82.61 b	++	10.53 d	5.26 c
03Z17	92.03 ab	+++	17.65 d	5.88 c
H91-26	62.89 d	+	31.25 cd	6.25 c
H92-112	76.08 c	++	57.14 bc	2.86 d
HB188	100.00 a	+++	35.10 cd	2.77 d
HB215	89.17 ab	+++	76.93 b	8.01 b
HB341	98.57 a	+++	87.50 a	21.33 a
CB032	43.78 ef	+	33.33 cd	5.56 c
st 2422/464	71.26 cd	++	9.09 d	9.09 b
Chinese spring	53.05 e	+	33.33 cd	6.67 c
P	0.0001		0.0037	0.0022

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。

织分化率低,并有很强的基因型依赖性。因此,筛选寻找高效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。

该研究应用整粒切胚诱导方式进行小麦成熟胚愈伤组织的诱导,在诱导过程中,愈伤组织形成所需要的营养物质来源于成熟胚自身的胚乳,而非人工配制的培养基,营养更加全面、合理;同时,在预培养过程中成熟胚的生长代谢产生一些内源激素,这些内源激素可能对切伤的成熟胚细胞的快速脱分化起到了促进作用。在合理的营养条件和内、外源激素作用下,整粒切胚诱导愈伤组织出愈快、质量高、分化成苗潜能大,比其他成熟胚诱导方式^[6]有更多的优越性。^{zgen}等^[4]通

过小麦成熟胚整粒切胚诱导愈伤组织培养与幼胚组织培养的比较研究,发现前者比后者组织培养效果更好。小麦整粒切胚诱导愈伤组织培养周期短(可在 30~40 d 内获得再生植株)、成本低、操作相对简便,是一种快速而有效的小麦成熟胚组织培养方法。

参考文献

- [1] 于晓红,朱祯,付志明,等.提高小麦愈伤组织分化频率的因素.植物生理学报,1999,25(4):388-394.
- [2] 覃建兵,何光源.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,2001,20(6):522-527.
- [3] 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.山东农业大学学报,1996,27(4):451-456.
- [4] ÖZGEN M, Tü RET M, ALTıYNOK S. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat

- (Triticum aestivum L.) genotypes. Plant Cell Reports, 1998,18: 331-335.
- [5] 唐宗祥,张怀琼,张怀渝,等.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,2004,22(3):203-205.
- [6] BIR M, KOU M, CHRN L G, et al. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of Triticum. Plant Breeding, 2007,126:9-12.
- [7] DELPORTE F, MOSTADE O, JACQUEMIN J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell Tiss. Org. Cult, 2001,67:73-80.
- [8] SHARMA V K, HNSCH R, MENDEL R R. 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 Breeding, 2005,124:242-246.
- [9] BI R M, JIA H Y, FENG D S, et al.. Production and analysis of transgenic wheat (Triticum aestivum L.) with improved insect resistance by the introduction of cowpea trypsin inhibitor gene. Euphytica, 2006,151:351-360.
- [10] 任江萍,尹钧,师学珍,等.小麦转基因再生植株培养体系的优化.华北农学报,2003,18(1):22-25.
- [11] 余桂荣,尹钧,郭天财,等.小麦幼胚培养基基因型的筛选.麦类作物学报,2003,23(2):14-18.

(责任编辑:陶冶之)