

用“对话”试验探索植物组织培养机制并建立适用性广的小麦组织培养方法

王海波¹ 范云六²¹ 河北省农林科学院遗传与生理研究所, 河北石家庄 050051; ² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 以小麦为试材, 以揭示培养因素与培养结果之间的对应关系为目标, 通过用类似“对话”试验的方法探索了基因型、外植体类型、培养基、培养条件等在植物组织培养中的作用和影响。结果表明, 基因型不影响愈伤组织的形成, 只影响和决定愈伤组织的质量。外植体既影响愈伤组织的形成, 又影响愈伤组织的质量。由外植体类型造成的愈伤组织质量差异并不亚于由基因型所造成的差异, 但其作用主要表现在离体培养的早期阶段。培养基除了向培养物提供营养外, 不同培养基之间的差别更主要地表现为对愈伤组织质量的不同调控效应。一般情况下, 2,4-D 和 NH_4^+ 对细胞分裂、愈伤组织生长表现为促进作用; 细胞分裂素和 NO_3^- 对细胞分裂、愈伤组织生长表现为抑制作用。光照具有类似细胞分裂素的效应。温度变化对愈伤组织质量也具有调控作用。各培养因素的作用实际上均转化为生理生化效应。借助这种认识, 所有培养因素的作用均可在生理生化水平得到解释。据此, 植物组织培养的可预见性和可控性得到大幅度增强。通过本研究, 为小麦组织培养建立了有较广泛适用意义的方法。

关键词: “对话”试验; 组织培养因素; 愈伤组织质量; 小麦组织培养

中图分类号: S512

Researching the Mechanism in Plant *in vitro* Culture via “Communication” Experiment and to Establish the Methods Widely Used for Tissue Culture of WheatWANG Hai-Bo¹ and FAN Yun-Liu²¹ Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, Hebei; ² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Plant *in vitro* culture has a history of more than one hundred years, but it is still unable to be predicted and inferred. There are 4 kinds of elements for plant *in vitro* culture: genotype (genetic elements), explant-type (physiological elements), medium (chemical elements), culture-conditions (physical elements). In order to find out the effects of these elements and the mechanisms in plant *in vitro* culture, a series of “communication” experiments aimed at revealing the relationship between culture-elements and culture-results were conducted. Wheat was used as the main materials (Table 1). Callus induction, subculture and callus quality improvement and evaluation were carried out with mature and immature embryos of different varieties on different media (MS, LS, N6, C17 etc.) under different conditions (Table 2, 3). The effects of genotype, explant-type, medium, culture-conditions to plant tissue culture were studied systematically. The results showed that: Genotype only determined the quality but did not limit the induction of callus. Explants affected both the formation of callus and its quality at early stage. The difference of callus quality originated from explants was no less than that from genotypes. Despite of providing nutrients, medium also played a very important role in regulating the quality of callus. Generally, 2,4-D, NH_4^+ usually accelerated cell division and the growth of callus but cytokinin, NO_3^- showed opposite effects. Light had the similar effects to cytokinins. Temperature variation played an influential role to callus too. These results were also improved with corn, rice, millet, cotton and so on. All the functions from these elements in *in vitro* culture can be considered or imagined as the effects at physiological and biochemical levels and they can be managed as coadjutant factors according to the needs of callus quality improvement. With this idea, plant *in vitro* culture comes to be more controllable. Through this study, a series of methods widely used for wheat tissue culture was established.

Key words: Communication experiments; Tissue culture elements; Callus quality; Tissue culture of wheat

基金项目: 河北省农林科学院自由探索项目和中国农业科学院自由探索项目。

作者简介: 王海波(1958-), 男, 博士, 研究员, 主要从事生物技术和遗传育种研究。Tel: 0311-87652006; E-mail: nkywanghb@yahoo.com.cn
Received(收稿日期): 2005-08-31; Accepted(接受日期): 2006-01-15.

在植物离体培养技术的探索上,不少研究者曾采用正交实验法或类似的思路做了大量的工作,其中有的较成功(如王培、陈玉蓉对 C_{17} 培养基的研制等^[1]),但更多的不成功(如在解决禾本科植物原生质体培养的问题上,有的研究者设计了几万种甚至十几万种处理,也未组合出所期望的结果^[2-4])。离体培养是一种复杂而多变的体系,涉及的因素非常多。按照正交实验的思路进行试验,不仅工作量异常庞大,而且常因为难取到一致的试材而无法进行。笔者认为,解决植物组织培养的问题,不应先把寻找最佳方案作为目标,而应先探索各培养要素的作用性质和方式,然后再以此为依据设计所求的方案并通过验证加以确定。为此,笔者构思了一种“对话”式的试验方法,即先以需了解的主要问题为核心进行试验,在观察、分析、比较的基础上,将阶段性结果及时反馈于进一步的试验,在试验结果和试验处理之间形成交叉、互动关系,通过步步推进,全面了解需了解的各种问题,进而解决所要解决的问题。植物离体培养虽已有 100 多年的历史^[5],但仍存在着难以预见和可控性差的问题。基因型(遗传因素)、外植体类型(生理因素)、培养基(化学因素)、培养条

件(物理因素)是影响离体培养的 4 方面要素,它们如何影响培养结果,目前尚无系统研究。揭示它们的作用机制,对提高植物离体培养的可预见性和可控性具有重要意义。本研究以小麦为试材,对组织培养的全过程(即愈伤组织诱导、继代和植株再生)进行了“对话”式的试验与分析,揭示了“培养因素”与“培养效果”之间的对应关系,明确了植物组织培养的一些机制,并为小麦的愈伤组织诱导、继代、质量改造等提供了一系列具有较广泛适用性的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料详见表 1,由河北省农林科学院粮油作物研究所李杏普、方仁、王培提供。其中,A 组仅用成熟胚诱导愈伤组织,B 组仅用未成熟胚诱导愈伤组织,C 组既用成熟胚也用未成熟胚诱导愈伤组织。另外,在用未成熟胚诱导愈伤组织的材料中还有 36 个育种中间材料,因它们在遗传上还不稳定故未列入表中。用于成熟胚愈伤组织诱导的种子,除 Valley 存放 3 年外,其他均存放了 7 个多月。

表 1 试验材料
Table 1 Wheat cultivars (lines) used in the study

组别 Group	名称 Name
A	冀麦 6 号,冀麦 15,冀麦 19,冀麦 20,晋麦 11,徐州 211,豫原 1 号,昌乐 5 号,洛夫林 10,早 5,农大 139,科遗 26,小红芒,红秃头,13WS180, Valley, 蓝粒代换系, AH-小黑麦 Jimai 6, Jimai 15, Jimai 19, Jimai 20, Jinmai 11, Xuzhou 211, Yuyuan 1, Changle 5, Lovrin 10, Zao 5, Nongda 139, Keyi 26, Xiaohongmang, Hongtutou, 13WS180, Valley, Lanli Substitution Line, AH-triticale
B	监 11, 监 17, 津丰 1 号, 石 5418, 欧选白, 临漳麦, 6N 小黑麦 Jian 11, Jian 17, Jinfeng 1, Shi 5418, Ouxuanbai, Linzhangmai, 6N-triticale
C	冀麦 7 号, 石 5201, 向阳 4 号, Z124, 丰抗 13, 小偃 6 号, 宝丰 7228 Jimai 7, Shi 5201, Xiangyang 4, Z124, Fengkang 13, Xiaoyan 6, Baofeng7228

Notes: Group A was used for mature embryo's callus initiation; Group B was used for immature embryo's callus initiation; and Group C was used for mature and immature embryo's callus initiation.

1.2 试验方法

1.2.1 成熟胚愈伤组织的诱导 具体处理为:

(1)将干种子消毒后直接接种于培养基;(2)将干种子切去胚根和茸毛部分,然后消毒接种于培养基;(3)将干种子浸泡 10 h,消毒后①直接接种于培养基、②挖取胚接种于培养基、③切去胚根腹沟茸毛接种于培养基。消毒方法为清水涮洗 3 遍,70%酒精处理 30 s,0.1% $HgCl_2$ 处理 10~15 min,无菌水涮洗 4 遍。培养基为 N_6 、 C_{17} 、LS 和 MS,添加 2 mg/L 2,4-D、30 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂,pH 5.8,高压灭菌。培养条件为 25~28℃,每天 12 h 散射光光照,1 年后改为

暗培养。

1.2.2 未成熟胚愈伤组织的诱导 取大田扬花后 15~18 d 的未成熟籽粒,消毒后剥取幼胚接种于培养基。消毒方法同上,只是将 $HgCl_2$ 处理时间减至 5 min。培养基为 N_6 、 C_{17} 和 MS,添加 2 mg/L 2,4-D、30 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂,pH 5.8,高压灭菌。培养条件同上。

1.2.3 愈伤组织的继代 首先调查愈伤组织的形成时间;培养 20 d 后,调查愈伤组织的形成率及在各培养基上的生长状况;培养到第 40 天时,统计有芽分化能力的愈伤组织数量,并转移到新的培养

基上继代。最初 3~5 次继代,仍用原培养基配方,把 2,4-D 水平降到 1 mg/L,每 30 d 继代一次;转移时不做任何淘汰,但将有芽分化和无芽分化的愈伤组织分开培养。随时比较培养物生长状况,分析其与培养基、培养条件之间的关系。以后的继代,根据愈伤组织的质量及变化情况区别对待,对质量差的愈伤组织实施改良。具体措施为:(1)改换培养基或调整培养基成分。首先从所用的培养基中选出使愈伤组织长得最好的培养基,然后根据愈伤组织在不同培养基上的反应推测不同培养基成分的作用进而做出调整。(2)调整外源激素的水平或种类。主要是变换 2,4-D 的浓度,并试用细胞分裂素 KT、6-BA 和另一种生长素 NAA。(3)添加植物提取物。选择易培养且植株分化率高的基因型,将其种子(105 粒)萌发,去掉胚根和叶芽,留下易形成良好愈伤组织的部分,分成三等份分别在少量的 0.1 mol/L HCl、0.1 mol/L KOH、无水乙醇中研碎,加入 7 倍(W/W)的去离子水,然后将三者混合,于 4℃ 过夜。第二天将抽提液 pH 调至 5.6,过滤灭菌后滴加于愈伤组织上。(4)调节光温条件。

1.2.4 植株再生 愈伤组织的分化培养基为 MS + NAA(0.5 mg/L) + KT(0.2 mg/L)。改良愈伤组织的植株再生,用不含任何激素的 MS 培养基。

1.3 研究策略

试验过程中,通过分析不同基因型、不同外植体类型在相同培养基和培养条件下的表现,确定基因型、外植体类型及其生理状态的作用性质;通过比较同一基因型和同类外植体在不同培养基、不同培养条件下的表现,确定培养基和培养条件的作用性质。进而揭示植物组织培养各要素的作用机制。

2 结果分析

2.1 不同外植体愈伤组织的形成及其质量状况

2.1.1 成熟胚 每个参试材料的成熟胚,一般培养 5 d 后都能在 MS、LS、N₆ 和 C₁₇ 培养基上形成明显可见的愈伤组织。在愈伤组织的形成能力上,不同基因型、不同培养基之间没有明显差别。成熟胚愈伤组织的形成率与种子活力有关,和种子的发芽率相吻合。只要挑选了好的种子,消毒时又不把种胚杀死,出愈率可达 100%。

不同基因型之间的愈伤组织生长状况差异明显,不同培养基之间的差异也较明显。培养 40 d 后,凡是分化芽点的愈伤组织,一般都表现为活力

强、色泽鲜、质地脆密。由成熟胚诱导愈伤组织,仅少数基因型的个别愈伤组织块表现较好,绝大多数的质量都很差,将其转到 MS + NAA(0.5 mg/L) + KT(0.2 mg/L)的分化培养基上后不能分化出苗,只形成大量的根状物。对这样的愈伤组织若不进行改良,难以继代培养。Valley(老种子)的愈伤组织比其他种子的愈伤组织生长状况差。

成熟胚愈伤组织形成于胚芽、胚轴和胚根部分,其盾片不形成愈伤组织。靠近胚芽处比靠近胚根处形成的愈伤组织质量好。由胚根和胚根鞘形成的愈伤组织稀软透明,既不能分化植株,也不能持续增殖。发育一段时间的胚根和再生根,能形成旺盛而持续增长的愈伤组织,但都不能形成再生植株。

用萌动的种胚比用干胚直接接种出愈快,且形成的愈伤组织质量高。切去种子的胚根和茸毛,不仅容易消毒,而且形成愈伤组织的质量也较高。但消毒时间不宜超过 10 min。直接用种子接种和挖胚接种相比,起初在愈伤组织形成上没有明显差别,但后来的生长情况表明带一定的胚乳有利于提高愈伤组织的活力。接种后种胚萌芽,是种子活力强的标志,应在芽长度不超过 1.5 cm 时去芽,否则不仅不利于形成好的愈伤组织,而且会导致大量的根相伴而生,进而形成大量源自根的不分化植株的愈伤组织。接种前把胚的结构破坏,可在一定程度上避免出芽,但这样做会使愈伤组织的增殖速度减慢,愈伤组织的质量也会受到一定影响。所有出芽后及时去芽所得到的愈伤组织,都比不出芽或出芽后不去芽得到的愈伤组织质量高。因此,以成熟胚诱导愈伤组织时,应在接种前先使种子萌动或接种后令其长一长芽再去芽(包括去根)。

2.1.2 未成熟胚 处在适宜时期的小麦未成熟胚是最易形成愈伤组织的外植体类型。所有参试材料都能在 MS、C₁₇ 和 N₆ 培养基上形成愈伤组织。一般接种后第 2 天便可看到胚的膨大,第 3 天就能形成可见的愈伤组织,1 周后整个胚就基本愈伤化。愈伤组织的形成及起初的生长状况,不同基因型、不同培养基之间没有明显差异,但在植株再生能力上不同培养基、不同基因型及不同外植体个体之间均有明显差异。值得注意的是,同一纯合基因型不同状态的幼胚间表现出了较大的差异,而几种 F₁ 植株上的幼胚,因接种时选择的胚的状态较为一致,却未表现出差异。

处在刚好完成由透明向不透明过渡的幼胚(乳

白而脆嫩)最有利于诱导出好的愈伤组织(对于长在温室的材料也适用)。具体做法是,扬花 10 d 后(环境温度高于 20℃时可提前 1~2 d),经常到取材地点对胚的发育状态进行监测(原则上每天 1 次),一旦发现刚好完成状态转变的胚时立即取材。这种通过“动态监测”取材的方法,比记录胚龄和看胚体积的做法^[6-9]更为准确,而且方便实用。

2.1.3 成熟胚、未成熟胚愈伤组织的诱导及生长情况比较 对于同一基因型,所有来自未成熟胚的愈伤组织的活力和质量都远比来自成熟胚的好,而且这种由外植体类型造成的差异甚至超过了基因型间的差异。但是这些差异只在愈伤组织的诱导和早期几次继代中表现明显,随着继代次数的增加,两种外植体来源的愈伤组织会趋于一致。本研究中,达到趋于一致状态的时间是 8~20 个月。这种时间差异的形成,与基因型有关,更与所用的培养基有关。成熟胚与未成熟胚之间的这种差异可能是由于内源

化学物质的差异所致,即在成熟胚中不利于细胞分裂的物质较多、有利的较少,而在未成熟胚中有利于愈伤组织生长的物质较多、不利的较少。随着继代次数的增加,这种由外植体类型决定的内含物格局会被冲淡。

2.2 不同培养基及其成分对愈伤组织诱导与继代的影响

用成熟胚诱导愈伤组织时,一般是 N₆、C₁₇ 培养基好于 LS、MS 培养基(表 2)。但继代时情况则恰恰相反,以 MS 为最好,LS 次之;在 N₆ 上继代 2 次后,特别是将 2,4-D 水平降低,并加少量的 KT(0.2 mg/L)时,几乎所有材料的愈伤组织都会褐化死亡;在 C₁₇ 上继代时,愈伤组织的状况也不好,只是变坏的速度比在 N₆ 上略慢一些。所有材料的愈伤组织在 MS、LS 培养基上继代时,不仅生长快,质量也好。即使经 N₆、C₁₇ 继代已生长得不好的愈伤组织,转到 MS、LS 上后也能得到一定的改善和恢复。

表 2 培养基、基因型在小麦成熟胚愈伤组织培养中的效应

Table 2 Effects of genotypes and media on callus induction from mature embryos of wheat

品种名称 Cultivar (line)	培养基 Culture medium				品种效应 Effect of genotype
	MS	LS	N ₆	C ₁₇	
冀麦 6 号 Jimai 6	+ (2)	++ ⁺ (6)	++ ⁻ (4)	++ (5)	4.25
冀麦 7 号 Jimai 7	+ (2)	+ (2)	++ ⁺ (6)	++ ⁺ (6)	4.0
冀麦 15 Jimai 15	++ ⁻ (4)	++ ⁻ (4)	+++ (8)	++ ⁺ (6)	5.5
冀麦 19 Jimai 19	++ (5)	++ ⁺ (6)	+++ (8)	++ (5)	6.0
冀麦 20 Jimai 20	+ (2)	+++ ⁺ (9)	+++ ⁺ (9)	+++ (8)	7.0
晋麦 11 Jinmai 11	/	++ ⁺ (6)	++ ⁺ (6)	+ (2)	4.66
徐州 211 Xuzhou 211	+++ (8)	++ ⁺ (6)	+++ (8)	++ ⁺ (6)	7.0
宝丰 7228 Baofeng 7228	++ (5)	++ ⁺ (6)	+++ ⁺ (9)	++ (5)	6.25
豫原 1 号 Yuyuan 1	++ (5)	++ (5)	+++ (7)	+++ (6)	5.75
昌乐 5 号 Changle 5	++ ⁺ (6)	++ (5)	+++ (8)	+++ ⁻ (8)	6.75
丰抗 13 Fengkang 13	+ ⁺ (3)	+++ ⁻ (7)	+++ ⁺ (9)	+++ ⁻ (7)	6.5
洛夫林 10 Lovrin 10	+ (2)	+++ (8)	+++ (8)	+++ (8)	6.5
早 5 Zao 5	+++ (8)	+ (2)	+++ (8)	+++ ⁻ (9)	6.25
向阳 4 号 Xiangyang 4	+++ ⁻ (7)	++ (5)	+++ (8)	+++ ⁺ (9)	7.25
农大 139 Nongda 139	+ ⁺ (3)	++ (5)	+++ ⁻ (7)	++ (5)	5.0
科遗 26 Keyi 26	+ (2)	++ (5)	++ ⁺ (6)	++ (5)	4.5
小偃 6 号 Xiaoyan 6	++ ⁻ (4)	++ (5)	+++ (8)	++ (5)	5.5
小红芒 Xiaohongmang	+ ⁺ (3)	+ (2)	+ ⁺ (3)	++ (5)	3.25
红秃头 Hongtutou	+ (2)	++ (5)	+++ (8)	++ (5)	5.0
13WS180	++ (5)	++ (5)	++ ⁺ (6)	++ ⁺ (6)	5.5
Vally	+ (2)	++ (5)	++ (5)	++ ⁺ (6)	4.5
石 5201 Shi5201	+ ⁺ (3)	+ ⁺ (3)	+++ (6)	+++ (6)	4.5
蓝粒代换系	+++ (6)	+++ (6)	+++ (8)	+++ (6)	6.5
Lanli Substitution Line					
Z124	+ (2)	+ ⁺ (3)	+++ (6)	++ (5)	4.0
6N 小黑麦 6N-triticale	+ ⁺ (3)	+++ (6)	+++ ⁻ (7)	+++ (6)	5.5
培养基效果 Effect of medium	3.92	5.08	6.8	5.92	5.83*
愈伤组织质量 Quality of callus	+++ ⁺ > +++ > ++ ⁺ > ++ ⁻ > ++ > ++ ⁻ > + ⁺ > + > + ⁻ (performance)				
	(9)	(8)	(7)	(6)	(5) (4) (3) (2) (1) (scores)

注:+++⁺ (9):生长旺盛、色泽鲜艳、质地较稚嫩、体积大;+⁻ (1):出愈后的愈伤组织几乎不长,色泽暗淡、质地松软、缺乏活力;其余符号表示的是以上二者之间的过渡态。括号中的数字是相应于符号所表示的生长状况的分值。不同试验中所用符号表示的意义无可比性,如本表中“+”表示的愈伤组织质量与表 3 中“+”所表示的含义有着很大的不同。* 总平均数。

Notes:+++⁺ (9):Growing vigorously, fresh, tender and crisp, big in size;+⁻ (1):Growing very slowly, dullness, loose and soft, small in size. The others are the transitional types between them. The digits in the brackets are the scores for the growth and quality of calli, to the corresponding symbols. The meaning of the symbols is different in different tables, e.g. the “+” in Table 2 is quite different from “+” in Table 3. * The total average.

在未成熟胚愈伤组织的诱导上, N_6 、 C_{17} 、MS 培养基之间没有明显差别(表 3), 但随着培养时间的延长, 特别是继代次数的增加, 多数材料的愈伤组织在 N_6 培养基上逐渐褐化, 只有少数材料能够继续生长, 在 C_{17} 培养基上的愈伤组织也会变得色泽暗淡, 只有在 MS 培养基上表现最好。后来进一步使用 LS 和 1/2 MS 进行继代, 结果也均不如 MS 好。诱导培养 40 d 后调查, 49 份参试材料中, 在 MS 上诱导出有芽再生能力的 19 个, N_6 上有 9 个, C_{17} 上只有 4 个, 而且在 MS 上产生的有芽分化潜力的愈伤组织比率也明显比在 N_6 、 C_{17} 上高。

表 3 培养基、基因型在小麦未成熟胚愈伤培养中的效应

Table 3 Effects of genotypes and media on callus induction from immature embryos of wheat

品种名称 Cultivar (line)	培养基 Culture medium		
	N_6	C_{17}	MS
监 11 Jian 11	++	++	++
监 17 Jian 17	++	++	++
石 5201 Shi 5201	++	++	++
石 5418 Shi 5418	++	++	++
丰抗 13 Fengkang 13	++	++	++
津丰 1 号 Jinfeng 1	++	++	++
冀麦 7 号 Jimai 7	++	++	++
Z214	++	++	++
向阳 4 号 Xiangyang 4	++	++	+++
欧选白 Ouxuanbai	++	++	++
小偃 6 号 Xiaoyan 6	+++	++	+++
宝丰 7228 Baofeng 7228	+++	++	+++
6N 小黑麦 6N-triticale	+++	+++	+++
小偃 693 Xiaoyan 693	+	++	++

注: 愈伤组织均为乳白色, 绝大多数质地都鲜密。在生长速度上表现为, +++ > ++ > +。

Notes: All the callus are milk white in colour and most of them are fresh and compact in texture. The speed of growth +++ > ++ > +.

与 MS 相比, LS 缺少 VB_6 、烟酸和甘氨酸, C_{17} 、 N_6 的铵态氮水平较低, C_{17} 有生物素。用 MS 继代效果比 LS 好, 用 N_6 和 C_{17} 的效果都不好, 但用 C_{17} 比 N_6 变坏的速度慢的结果说明维生素等可能对愈伤组织质量有益。为此笔者设计了一种新培养基——MC, 其中无机成分同 MS, 有机成分为甘氨酸 2 mg/L、 VB_1 0.55 mg/L、 VB_6 0.5 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、生物素 0.75 mg/L、肌醇 250 mg/L。用 MS、MC 进行对比试验表明, 愈伤组织在 MS 上易形成长、弯、空的细胞(衰败细胞), 而在 MC 上则形成胚性愈伤比率较高的鲜脆致密结构。所有参试愈伤组织, 无论来自成熟胚还是未成熟胚, 都在 MC 培养基上得到了一定改善。

比较 MS、 N_6 、 C_{17} 、1/2 MS 的成分, 可以看出, NH_4^+ 有提高愈伤组织活力的作用, NO_3^- 有抑制愈伤组织活力的作用。在 NH_4^+ 水平高时, NO_3^- 的作用不明显; 而当 NH_4^+ 浓度低时, 随着 NO_3^- 水平的升

高, 愈伤组织生长会受到抑制。表明氮源除供应培养基氮素营养外, 其类型和用量可成为影响愈伤组织质量的调节因子。

2.3 继代过程中 2,4-D 的作用

2.3.1 降低 2,4-D 水平的结果

在成熟胚愈伤组织的继代培养中, 将 2,4-D 由原来诱导培养时的 2 mg/L 降到 1 mg/L 和 0.5 mg/L, 那些未有芽再生现象的愈伤组织总也改变不了暗淡的颜色和蓬松的结构, 只是个别基因型中个别愈伤组织分化出很少的苗。鉴于此, 后来在转移愈伤组织时, 有意识地用镊子将那些愈伤组织外部的衰败细胞(即外部的疏松部分)去掉, 并将内部致密的部分(镜检表明, 它们的细胞为近等径、核比较大、质比较浓)切碎, 也只在起初几天的颜色上略微变得鲜艳了些, 以后仍旧形成以前的样子。降低 2,4-D 浓度, 不仅没能获得胚性愈伤组织, 而且随继代时间的延长愈伤组织内部致密的部分变得更加坚硬(分裂能力降低), 外部疏松的部分变得更加暗淡。

在未成熟胚愈伤组织的继代中, 降低 2,4-D 水平在早期(5~8 代以内)确实有利于形成金黄、鲜亮、致密的类型, 而且在有光照的条件下形成大量的绿色丛生芽。但是将愈伤组织长期继代于 2,4-D 水平较低的培养基, 则不仅增殖很慢, 且不能再生出正常植株, 已分化出的芽状物会变成扭曲的叶状体, 愈伤组织变得实硬、褐黄、缺乏活力。

借鉴陈东方等在棒头草组织培养上的一些作法^[10], 让 2,4-D 水平按 2 mg/L、1.0 mg/L、0.5 mg/L 循环变换, 但未能改变外部总是形成大量衰败细胞和内部形成木质化内核的状况, 只是在出现时间上稍延迟些。另外, 在 2,4-D 水平较低的培养基上继代, 那些一开始就质量很差的愈伤组织总也不会向好的方向发展。

2.3.2 升高 2,4-D 的作用

将继代在 2,4-D 水平较低(0.5~1.0 mg/L)的培养基上表现为越来越实硬和质地疏松、色泽暗淡的愈伤组织, 转到 2,4-D 水平为 5 mg/L 的培养基上后, 很快会变得色泽鲜艳起来, 生长速度加快。经过 1 代(30 d)或几代的培养, 那些质地实硬、不能出苗的愈伤组织变得鲜艳而富有活力, 当再将其放到降低或去掉 2,4-D 的培养基上后便分化出正常植株; 而那种质地疏松、质量较差的类型, 在远离培养基的部位也出现了鲜、密、脆的愈伤组织, 对这部分愈伤组织进行镜检发现, 基本由等径或近等径、质较浓、核较大、壁较薄的细胞组成。

2.3.3 根据愈伤组织状态变换 2,4-D 水平的继代

为了探讨不同水平的 2,4-D 对愈伤组织的影响

和2,4-D的有效使用方法,本研究设3、4、5、10、20 mg/L 5种浓度的处理,对来自几种基因型的状态一致的愈伤组织进行继代培养。结果表明,这几种水平的2,4-D虽未能彻底摆脱衰败细胞的产生,但5 mg/L时胚性愈伤组织的比率最高,10 mg/L时胚性愈伤组织的绝对量最高。后来以更多的材料进行类似的试验表明,将2,4-D水平设定在8 mg/L更为合适。但这种不同2,4-D水平上的表现仅仅是继代1次或少数几次时的结果,若连续几代一直使用较高的2,4-D水平,愈伤组织会变成色泽鲜艳、结构疏松、膨大型衰败细胞比率增高的类型。由此可见,继代时并没有一个固定的永远合适的2,4-D水平。为此本研究建立了变换2,4-D水平进行继代的方法,即以转移前愈伤组织所在培养基的2,4-D水平为基础,若愈伤组织生长良好(鲜嫩、致密、有较强的植株再生潜力),则维持原来的2,4-D水平;若愈伤组织生长过旺(色泽鲜艳、质地松软,像沙西瓜瓤样),则降低2,4-D水平(至0.5~1 mg/L);若愈伤组织的色泽虽然鲜艳,但质地仍然很坚硬,生长缓慢、易分化,则增加2,4-D的用量(4~8 mg/L);若愈伤组织结构蓬松、色泽不鲜(甚至暗淡或黄褐)、内部有趋于硬化的愈伤组织核,增加2,4-D的用量水平(8 mg/L)。通过这种方法,那些以前难以继代的愈伤组织均能够继代了,那些一开始质量很差的愈伤组织也得到了改良。另外,用此方法还将一些活力变得较差、不分化植株的小麦花粉愈伤组织和经长期培养只分化绿点或绿色小子房、不分化正常植株的小麦幼穗无性系,改造得分化出了大量的正常苗。

2.4 其他激素及光照对愈伤组织的作用

NAA虽也是生长素,但一般情况下(0.5 mg/L)只是促进小麦愈伤组织产生根状物,尤其是与KT配合时根发生情况更重,而且在这种培养基上培养时间一长,愈伤组织就会变成黄褐色。当2,4-D水平较高时,附加0.2 mg/L的KT有利于维持愈伤组织的致密结构和芽分化,附加0.2 mg/L的6-BA也有类似效果。较高水平的KT、6-BA(1~2 mg/L)对愈伤组织生长不利,极易导致活力降低或褐化。即使以0.2 mg/L的水平(且与2,4-D配合的情况下),长期使用细胞分裂素,也会使愈伤组织慢慢变坏或变得极易长根状物。在光照条件下培养时,细胞分裂素的效应会表现得更加明显,愈伤组织褐化现象出现得早且程度重;若暗培养,褐化现象则出现得晚,且程度也轻。在幼胚愈伤组织的前1~2代继代中,当2种细胞分裂素都用并各为1 mg/L时,在遮光的条件下只表现了使愈伤组织致密和使分化率提高的

作用。不用细胞分裂素,只使用光照也会表现为一定程度的类似使用了细胞分裂素的效应。

2.5 愈伤组织在每个继代周期内的变化

培养过程中的愈伤组织是不断变化的。对徐州211、宝丰7228、向阳4号进行重点观察表明,不管什么样的愈伤组织,在转到新培养基上后,前几天都会变成水淋淋、脆而软的样子,随着时间的推移(一般20 d后)才逐渐表现出人们常描述的那种在色泽、质地、结构方面的典型特征。因此,评价愈伤质量,应注意这种动态的变化。另外,即使同一块愈伤组织,不同部位的状态也不相同,往往是远离培养基的部分质地致密,靠近培养基的部分质地松软。

2.6 植物提取物对愈伤组织的影响

大多数起初不分化出植株的成熟胚、未成熟胚愈伤组织,改用MS或MC培养基和变换2,4-D水平继代后,质量得到改进,最后分化出植株。但仍有少数基因型不能分化植株。这种愈伤组织表现为质地疏松、脆软、含水多、生长快。将其堆积成直径约1.5 cm的愈伤组织堆,把来自于植株再生能力强的基因型的萌发胚提取物慢慢滴加在上面,每堆约加1~1.5 mL,每7~10 d滴加一次。1个多月后,这些过去从未出现过致密硬块的愈伤组织有的开始变硬,并于2个月后分化出少量的植株或芽。而那些未经这样处理的愈伤组织仍保持原来的老样子,不能分化出植株。

2.7 低温及温度变化对愈伤组织的影响

小麦组织培养中常遇到两类问题,一是许多愈伤组织随着继代次数的增加极易形成大量的根或根状物(若不及时将其彻底去除,由其脱分化形成的愈伤组织往往比能再生芽的愈伤组织还竞争力强。而且这种愈伤组织似乎还产生着可导致其他愈伤组织朝易长根的方向发展的物质,使不长根的愈伤组织也跟着变坏)。二是有些愈伤组织总是过旺地生长,呈结构疏松、质地脆软、水淋淋的状态。多年来,人们一直没有找到控制这两类愈伤组织的办法。

本研究表明,降低培养温度(至16~20℃)对这两类愈伤组织的质量改进有一定的积极作用。较低的温度,对愈伤组织主要表现为抑制作用,但对不同类型的愈伤组织抑制程度不同,对易长根的愈伤组织抑制较重,对易长芽的愈伤组织抑制较轻。不过,这种小幅度降低温度的效果在短时间内不易显现出来,特别是对那些既不长根、也不长芽的旺长型愈伤组织尤其不明显。但利用冬季条件,在玻璃室内(白天 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、夜间 $\geq 10^{\circ}\text{C}$)对两类愈伤组织进行变温、变光照(自然光变化)处理,20 d后便都开始呈现

差异化变化。1个多月后,那些原先看上去无差别易长根的愈伤组织,变出了“深黄致密”和“灰白透明”两种类型;那些生长过旺、质地脆软的愈伤组织,也出现了一些深黄色的颗粒或硬点。

2.8 基因型在组织培养中的效应

用成熟胚诱导愈伤组织时,基因型的差异表现在愈伤组织活力差异和植株再生能力2个方面(表2)。培养8个月后,冀麦6号、冀麦7号、冀麦15、冀麦20、徐州211、豫原1号、昌乐5号、丰抗13、洛夫林10、向阳4号、小偃6号、蓝粒代换系12个基因型的愈伤组织再生出了植株。但在这12个基因型中,早期(即诱导后3个月内)只有蓝粒代换系、向阳4号、徐州211再生了植株,其他9个是经过5个月的继代改造后才再生植株的。

用未成熟胚诱导愈伤组织时,所有基因型的愈伤组织都活力较旺(表3),基因型的效应主要表现在植株再生能力的差别上。在所有参试的纯合基因型中,除石5418未分化出植株、监17只分化出根外,其余都再生出了植株。但随着继代次数的增多,由基因型决定的愈伤组织生长状况差异则越来越明显地表现出来。

基因型的效应虽然在各种处理中都能明显地表现出来,但其程度和性质常随外植体类型、培养基、培养条件的不同而改变。如宝丰7228、Z124,用其未成熟胚诱导的愈伤组织都再生出了植株,而用其成熟胚诱导的愈伤组织就都没有再生出植株。绝大多数基因型的成熟胚愈伤组织,一开始都不能再生植株,而是经过一定的继代改造后才有了较多的基因型再生植株。在未成熟胚愈伤组织中,一些基因型(如冀麦7号、丰抗13等)的植株再生也是经过继代改造的改造后获得。而这种改造,主要是通过改变培养基成分和培养条件实现的。所有在早期甚至经过一段时间的改造还未再生植株的基因型,经过进一步的改造,最后都长出了小植株,即25个基因型的成熟胚愈伤组织和49个基因型的未成熟胚愈伤组织最终都再生了植株。但是,这种改造的难易程度,不同基因型之间存在明显的差异。

3 讨论

本研究,虽然在形式上体现为以小麦为试材建立具有广泛适用性的组织培养方法,并且也达到了这一目的(即将所有的参试基因型均都再生出了植株,这在国内外尚未见过报道),但着力探索的是植物组织培养机制,回答的是植物组织培养中的一些具全局性意义的问题,旨在对植物组织培养技术的

发展做出较大的推进。

国内外几十年来关于组织培养的最主要经验是选择易培养的基因型。但这条经验用起来十分蹩脚。因为组织培养的目的是为了克隆或改造某个品种(基因型),而这个品种不一定正好就是易培养的基因型。

组织培养中的基因型效应是普遍存在的,这已为许多工作所证实^[11-23]。但如何理解基因型在组培培养中的作用?相当多的研究者常将其分为可培养和不可培养的类型,认为那些不能再生植株的基因型即使改变培养基及培养条件等也不会再生植株。然而,从组织培养研究的发展历史来看,这种观点在不断地被否定。许多过去认为不能培养的植物种类或基因型,经过努力都变成了可培养的,而且这种转变又主要是通过改变外界因素实现的。

人们之所以得出不可培养的结论,可能是因为有些基因型确实经过多年努力没有分化出植株。笔者认为,在组织培养上不同基因型之间只存在培养难易的不同,没有不可培养的问题。植株再生的困难,主要是愈伤组织质量不佳所致。任何植物都是由单细胞发育而来的,细胞的全能性是本来就存在的,离体培养只不过是把在体内实现的个体发育过程在体外表现出来。从生物自身的发育来讲,生长点的形成、胚的发育等都是系列生理生化变化的结果。基因型的作用也是通过一定的生理生化过程来实现。所有基因型,都具有完成个体发育的全部特性,都可在离体培养体系中接受人为干预。不同基因型在离体培养上表现出的差别,可能是在某些发育环节上存在着一些由基因型决定的不利于外界培养因子发挥作用的机制。来自基因型的这种“毛病”,可通过调节可控因素给予适当配合而得以化解。本研究的结果在这方面提供了证据。

组织培养是一种人工控制体系。在这一体系中,培养基、培养条件都是调控培养物的外在因子,基因型的作用、外植体的生理状态都可以理解为内在因素。因此,认识植物组织培养的机理首先需要认识基因型、外植体类型及其状态、培养基、培养条件在组织培养中的作用性质。成功地认识这些因素的作用,需要有好的实验构思和设计,如本文表2中把“品种效应”和“培养基效应”用符号和分值表示出来,就为认识基因型和培养基的作用提供了很大的方便。这种做法的意义,在于把所有培养要素的作用都放在生理生化水平来理解,以便帮助操作者更好地发挥人为调控作用提供突破口和可遵循的规律。

综合本研究的结果,不难发现,(1)基因型通过

由其相应的遗传基础决定的生理、生化机制及发育进程,影响和控制培养对象,一般表现为培养的难易不同。(2)外植体通过由其类型和生理状态所决定的内源活性物质,影响起始愈伤组织的质量和早期继代培养的结果。此阶段,由外植体类型造成的愈伤组织质量差异并不亚于由基因型所造成的差异。(3)培养基不仅仅向培养物提供营养,还以提供外源调控因子的方式影响、调控愈伤组织的状态。不同的培养基,从营养上讲都能满足植物的需要,它们之间的差异更主要反映在对培养物的不同调控效应上。一般情况下,2,4-D、 NH_4^+ 对细胞分裂、愈伤组织生长表现为促进作用;细胞分裂素、 NO_3^- 对细胞分裂、愈伤组织生长表现为抑制作用。(4)培养条件以物理因子的方式,通过对培养物生理生化活动过程及其机制进行调控而影响愈伤组织的状态。施以光照具有一定程度的类似使用细胞分裂素的效应。低温的作用,由于主要表现为抑制细胞分裂,也有一定程度的类似使用细胞分裂素的效应。

用玉米、水稻、谷子、高粱、棉花等进行验证表明,也基本都支持上述结论,特别是在细胞水平上的培养试验几乎百分之百地支持这些结论。其中,细胞分裂素在离体培养(特别是细胞培养)中表现为抑制细胞分裂的结果,与生理学教科书中所讲的内容出入较大,这可能和过去确定该类激素性质时实验的局限性有关。细胞培养中细胞分裂素抑制细胞分裂的结论已为大量的实验所验证。为何 NO_3^- 表现为抑制细胞分裂?可能和硝酸还原酶形成有关。对大多数植物来说,其硝酸还原酶的形成可能扮演了一种限制因素。但在水稻中的情况有些出入,有的基因型表现为使用 NO_3^- 更有利于细胞分裂而不是 NH_4^+ 。因此,进行水稻组织培养时,应先确定所培养的材料是否属于 NO_3^- 喜好型。另外, NH_4^+ 对细胞膜有一定的毒害作用,当外植体的体积较小时,如花药培养时的花粉,这种毒害作用会淹没其在细胞分裂上的积极作用,具体操作时应予注意。

另外,“对话试验”的意义并不仅局限于植物组织培养,而是有着广阔的应用前景,如复合药物的研制等。“对话”试验法的策略是减少“横向”工作的量,增强“纵向”工作间的联系,用较少的试验解决较多的问题。其关键是,发挥好设计、观察、比较、分析的作用,安排好试验结果与试验处理之间的交叉与互动,以实现对话的意图。

References

[1] Wang P(王培), Chen Y-R(陈玉蓉). A study on the application of C₁₇

- medium for anther culture. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1986, 28(1): 38-45 (in Chinese with English abstract)
- [2] Potrykus I, Harms C T, Lörz H. Problems in culturing cereal protoplasts. In: Dudits D ed. *Cell Genetics in Higher Plants*. Akademiai Kiado, Budapest, 1976. pp 129-140
- [3] Potrykus I, Harms C T, Lörz H. Multiple-drop-array (MDA) technique for the largescale testing of culture media variations in hanging microdrop cultures of single cell systems: I. The technique. *Plant Sci Lett*, 1978, 14:231-235
- [4] Vasil I K. The story of transgenic cereals: The challenge, the debate, and the solution—A historical perspective. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2005, 41:577-583
- [5] Gautheret R J. History of plant tissue and cell Culture: A personal account. In: Vasil I K eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol.2. Academic Press. Inc, 1985. pp 2-59
- [6] Shimada T, Yamada Y. Wheat plants regenerated from embryo cell cultures. *Jpn J Genet*, 1979, 54:379-385
- [7] Zhang L-J(章力建). A preliminary study on the induction of green plantlets from wheat immature embryos. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1987, 14(3):175-178 (in Chinese with English abstract)
- [8] Cai T-S(蔡体树), Tian H-Q(田慧琴), Lin S-K(林书康), Li J-M(李俊明). Effects of genotype and embryo age on wheat immature response *in vitro* culture. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1989, 16(2):81-88 (in Chinese with English abstract)
- [9] An H-L(安海龙), Wei Z-M(卫志明), Huang J-Q(黄健秋). High efficiency regeneration of wheat plants from immature embryos. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 2000, 26(6):532-538 (in Chinese with English abstract)
- [10] Chen D-F(陈东方), Xia Z-A(夏镇澳). Somatic embryo formation and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Polypogon fugu*. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1986, 12(4): 333-341 (in Chinese with English abstract)
- [11] Oziasakins P, Vasil I K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 1982, 110:95-105
- [12] Scars R G, Deckard E L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci*, 1982, 22:546-550
- [13] Hanzel J J, Millor J P, Brinkman, M A, Fendos E. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Sci*, 1985, 25:27-31
- [14] Tomes D T, Smith O S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize germplasm. *Theor Appl Genet*, 1985, 70:505-509
- [15] Hodges T K, Kamo K K, Imbrie C W, Becwar M R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology*, 1986, 4:219-223
- [16] Lai K L, Liu L F. Further studies on the variability of plant regeneration from young embryo callus cultures of rice plants. *Jpn J Crop Sci*, 1986, 55(1):41-46
- [17] Jain R K, Chowdhury J B. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant culture of some *Brassica species*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1988, 14:197-206
- [18] Mikami T, Kinoshita T. Genotypic effects on the callus formation from different explant of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1988, 12:311-314
- [19] Szakacs E, Kovacs G, Pauk J, Barnabas B. Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat. *Plant Cell Rep*, 1988, 7:127-129
- [20] Faure J D, Vittorioso P, Santoni V, Fraiser V, Prinsen E, Barlier I, Van Onckelen H, Camboche M, Bellini C. The *PASTICCINO* gene of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development*, 1998, 125:909-918
- [21] Huang L(黄璐), Wei Z-M(卫志明). Differences in regeneration capacity between five elite varieties of maize (*Zea mays* L.) and the DNA differences between embryogenic callus nonembryogenic callus. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1999, 25(4):332-338 (in Chinese with English abstract)
- [22] Du J(杜娟), Chang G-Q(常国权), Ji J(季静), Wang G(王罡). Observation with scanning electron microscope and analysis of RAPD on tissue culture and embryogenesis of inbreds of *Zea mays* L. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, 28(2):282-285 (in Chinese with English abstract)
- [23] Zhang L(张林), Pu X-Y(普晓英). Gene transfer effect of high regeneration ability from seed-callus in rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(11):1528-1530 (in Chinese with English abstract)