

## 小麦成熟胚高频植株再生系统的建立

丁莉萍 何光源\*

华中科技大学中英HUST-RRes作物基因工程和基因组学联合实验室, 武汉 430074

**摘要** 在研究小麦成熟种子不同预处理时间、不同种类和浓度生长调节物质、分化培养基中是否添加  $\text{CuSO}_4$ 、不同外植体类型和不同放置方式对小麦成熟胚愈伤组织诱导和分化的基础上, 建立了一套高效、可靠、重复性好的小麦成熟胚高频植株再生系统。以小麦成熟种子完整胚作为外植体的诱导频率为 100%; 除掉胚的原胚芽部位生长出的芽苗后, 转分化的分化频率达到 42.50%。

**关键词** 小麦; 成熟胚; 植株再生系统; 正交试验

## High Frequency Plant Regeneration from Mature Embryo of Wheat Seeds

DING Li-Ping, HE Guang-Yuan\*

China-UK HUST-RRes Crop Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074

**Abstract** Factors which affected frequencies of the embryogenesis and plant regeneration were studied by using wheat (*Triticum aestivum*) mature seeds in order to obtain a high frequency plant regeneration system. The factors included different pretreatments of the seeds, different concentrations and kinds of hormones, whether the medium added  $\text{CuSO}_4$  and different explants and different placements. The experimental results indicated that the frequency of callus induction from wheat mature embryo was 100%, after removing the buds from the original embryo and transferring them to regeneration medium, its frequency of plant regeneration was 42.50%.

**Key words** *Triticum aestivum*; mature embryo; plant regeneration system; orthogonal test

实践证明, 利用植物基因工程改良小麦品质, 增强抗逆性等优良性状是一项受人关注的途径。转化方法很多, 但转化效率并不乐观。其原因在于建立稳定的小麦再生体系较困难, 而植株的再生频率常是决定小麦遗传转化效率和成败的关键<sup>[1]</sup>。且基因型的依赖性很强, 只有少数几种模式品种再生频率较高, 一些农艺性状较好的栽培品种往往因无法建立良好的再生体系而不能使用。迄今, 人们采用小麦幼胚、幼穗、成熟胚、悬浮系以及原生质体进行离体培养均已获得再生植株<sup>[2]</sup>。从已有报道来看, 认为幼胚是最有效的用于小麦离体培养的转化受体<sup>[3]</sup>, 但其常受季节和时间的限制, 难以重复试验。而小麦成熟胚培养具有取材方便、方法简便、实验周期短、一年四季可做、出愈率高、愈伤组织成长快和一次成苗率高等优点<sup>[4]</sup>, 可能有助于解决这一问题。

本文以湖北省主栽品种鄂麦12为材料, 在探讨多种因素对小麦成熟胚植株再生的影响以及优化小麦成熟胚组织培养条件的基础上, 建立了小麦成熟胚组织培养高频植株再生系统。

## 材料与amp;方法

供试材料小麦(*Triticum aestivum*)品种鄂麦12(EM12), 半冬性、高产、低品质, 为湖北省主栽品种。由湖北省农业科学院粮食作物研究所提供。

取颜色、大小一致的小麦成熟种子, 置于适量清水中, 加数滴Tween80, 搅拌3~5 min, 无菌水洗涤1次, 再加0.01%  $\text{HgCl}_2$ 消毒20 min左右, 以无菌水洗涤3~5次。放置在无菌、铺有吸水海绵的平皿中, 吸胀处理, 露白后, 在无菌条件下将材料按不同接种方式接种于诱导培养基上。

通过混合水平的正交试验设计<sup>[5]</sup>, 将生长调节物质的种类和浓度、种子预处理时间、分化培养基中添加  $\text{CuSO}_4$  对芽苗分化的影响组成3个要素, 采用  $L_{16}(8 \times 2^8)$  正交表<sup>[5]</sup>, 设计了16组平行试验。每组处理至少80个外植体, 进行正交试验, 筛选出以小麦成熟胚为外植体获得高频植株

收稿 2003-09-29 修定 2004-01-15

资助 国家重点基础研究发展计划“九七三”计划(2002-CB111301)。

\* 通讯作者(E-mail:hegy@hust.edu.cn)。

再生系统的条件, 并在此基础上研究不同类型外植体和不同放置方式对小麦成熟胚愈伤组织诱导和分化的影响。因素与水平见表1。

表1 正交试验因素与水平  
Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

因素	水平							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
A	P0.5	P1.0	P1.5	P2.0	D2.0	D4.0	D6.0	D8.0
B	H <sub>12</sub>	H <sub>24</sub>						
C	C <sub>+</sub>	C <sub>-</sub>						

因素A、B、C依次指不同种类和浓度的生长调节物质、种子不同预处理时间和分化培养基中添加CuSO<sub>4</sub>对芽苗分化的影响。其中, P0.5、P1.0、P1.5、P2.0分别表示浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L<sup>-1</sup> picloram, D2.0、D4.0、D6.0、D8.0分别表示浓度为2.0、4.0、6.0、8.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D; H<sub>12</sub>和H<sub>24</sub>为种子在26℃下分别预处理12和24 h; C<sub>+</sub>和C<sub>-</sub>分别表示分化培养基中加和未加CuSO<sub>4</sub>的情况。表2和3同此。

诱导培养基以MSS AA/2<sup>[6]</sup>为基本培养基, 其主要成分为: MS培养基的大量元素, L培养基的微量元素, MS培养基的铁盐及维生素, 100 mg·L<sup>-1</sup>肌醇, 20 mL·L<sup>-1</sup> 3AA(谷氨酸胺、脯氨酸和天冬氨酸), 30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, 8 g·L<sup>-1</sup>琼脂, pH 5.7, 添加2种不同的生长调节物质, 即4-氨基-3,5,6-三氯吡啶甲酸(picloram)或2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D), 以促进愈伤组织的生长。

分化培养基为R<sup>[6]</sup>培养基, 另外添加5 mg·L<sup>-1</sup>和0.01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 并研究加入分化培养基中10 μmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>对植株再生的影响。

由成熟胚诱导而来的愈伤组织主要有两种, 我们认为其中一种来源于胚轴, 另一种来源于胚根。前一种愈伤组织多呈淡黄致密状(图1), 有较强的再生植株的能力; 后一种愈伤组织则多为白至灰色水浸状, 基本上没有分化能力。每次

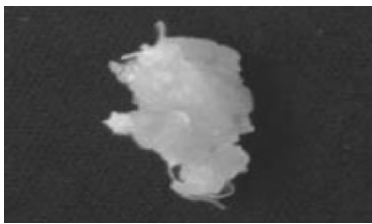


图1 小麦成熟胚诱导的胚性愈伤组织  
Fig.1 Embryogenic calli from wheat mature embryo

均挑取色鲜致密部分传代于相同的培养基上, 在(25±1)℃下暗培养25~35 d后, 统计愈伤组织数, 计算愈伤组织诱导频率; 继而转入分化培养基中, (25±1)℃、光周期16 h光/8 h暗下培养30 d(光照度1 500~2 000 lx)后, 统计生根愈伤组织数、出芽愈伤组织数以及再生植株数。

## 结果与讨论

### 1 不同因素对小麦成熟胚愈伤组织诱导与分化的影响

据观察, 以小麦成熟胚盾片为外植体接种5~7 d后, 开始形成愈伤组织, 形态多为乳白色, 水浸状, 随后愈伤组织继续长大, 颗粒状明显, 颜色加深为乳黄色, 形成团不很大, 比幼胚愈伤组织团小, 转分化后5 d左右就有绿点出现。由表2可见, 以成熟胚盾片为外植体的诱导频率为60.56%~98.00%, 生根频率为12.81%~60.78%, 绿苗频率为10.64%~72.46%, 分化频率为8.32%~33.60%。由统计分析(表3)可知, 各试验因素对小麦成熟胚分化频率的影响程度为: A > C > B。加入诱导培养基MSS AA/2中的picloram和2,4-D, 对小麦成熟胚愈伤组织的诱导分化都有较好的作用, picloram的分化频率稍高于2,4-D。以P1.0和D4.0为宜, 分化频率都达到27%以上; P2.0和D8.0, 分化频率则在10%左右。这正如方差分析<sup>[10]</sup>所表明的, 因素A即生长调节物质的种类和浓度对小麦成熟胚愈伤组织的诱导分化效果差异显著(表3)。由此可见, 调节生长调节物质的浓度对愈伤组织的诱导和分化十分重要。另外, 因素B和C, 即种子预处理时间和分化培养基中添加CuSO<sub>4</sub>对愈伤组织诱导和分化的影响作用较小, 各水平间差异未达到显著水平(表3)。

综上所述, 我们认为获得到小麦品种鄂麦12成熟胚高频植株再生系统的最佳组合为: 成熟种子在26℃下预处理12 h, 诱导培养基为MSSP1.0 (MSS AA/2中添加生长调节物质1.0 mg·L<sup>-1</sup> picloram), 分化培养基中可以不添加CuSO<sub>4</sub>。

### 2 外植体类型和放置方式对小麦成熟胚愈伤组织诱导与分化的影响

以上述系统为基础, 将成熟种子于26℃下预处理12 h后, 以MSSP1.0为诱导培养基, RKT 5.0 mg·L<sup>-1</sup>+0.01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D为分化培养基, 进一步研究完整种子、胚处受伤的完整种子、离体完整胚、盾片4种类型外植体和正放及反放方式对小麦成熟种子愈伤组织诱导和分化的影响。结果(表4)表明, 以离体完整胚作为外植体的, 80个

表2 不同因素影响下小麦成熟胚愈伤组织诱导与分化的正交试验[L<sub>16</sub>(8×2<sup>8</sup>)]  
Table 2 Orthogonal analysis of the data obtained from the experiment of factor affecting on callus induction and plant regeneration from wheat mature embryo cultures

试验编号	因素			诱导频率/%	生根频率/%	绿苗频率/%	分化频率/%
	A	B	C				
1	P0.5	H <sub>12</sub>	C <sub>-</sub>	80.70	25.00	23.21	10.34
2	P0.5	H <sub>24</sub>	C <sub>+</sub>	60.56	34.30	41.82	20.20
3	P1.0	H <sub>12</sub>	C <sub>-</sub>	98.20	42.86	72.46	33.60
4	P1.0	H <sub>24</sub>	C <sub>+</sub>	70.44	30.09	57.87	27.78
5	P1.5	H <sub>12</sub>	C <sub>-</sub>	97.05	40.74	70.37	30.23
6	P1.5	H <sub>24</sub>	C <sub>+</sub>	90.01	12.81	61.90	26.04
7	P2.0	H <sub>12</sub>	C <sub>-</sub>	89.40	34.08	32.20	12.80
8	P2.0	H <sub>24</sub>	C <sub>+</sub>	80.23	29.54	29.89	14.21
9	D2.0	H <sub>12</sub>	C <sub>+</sub>	90.77	50.68	38.69	20.23
10	D2.0	H <sub>24</sub>	C <sub>-</sub>	82.30	48.53	42.08	13.73
11	D4.0	H <sub>12</sub>	C <sub>+</sub>	98.00	60.78	59.67	31.46
12	D4.0	H <sub>24</sub>	C <sub>-</sub>	71.36	42.20	40.40	27.88
13	D6.0	H <sub>12</sub>	C <sub>+</sub>	98.33	52.07	47.44	28.27
14	D6.0	H <sub>24</sub>	C <sub>-</sub>	97.01	49.64	35.38	24.40
15	D8.0	H <sub>12</sub>	C <sub>+</sub>	81.54	27.89	20.04	14.01
16	D8.0	H <sub>24</sub>	C <sub>-</sub>	76.39	13.01	10.64	8.32

表3 正交试验结果的统计分析  
Table 3 The statistical analysis for the results of the orthogonal test

因素	A	B	C
K <sub>1</sub>	30.54	180.94	161.30
K <sub>2</sub>	61.38	162.56	182.20
K <sub>3</sub>	56.27		
K <sub>4</sub>	27.01		
K <sub>5</sub>	33.96		
K <sub>6</sub>	59.34		
K <sub>7</sub>	52.67		
K <sub>8</sub>	22.33		
极差(R=K <sub>max</sub> -K <sub>min</sub> )	39.05	18.38	20.90
方差	897.15	21.11	27.30
F值	10.81*	1.55	2.30

胚中有34个再生成植株,再生频率为42.50%,明显比其它3种外植体的分化效果好。离体完整胚接种于诱导培养基后,2~3 d左右开始出现愈伤组织,5 d内相继全部出现愈伤组织,形态多为淡黄色,成团状,比幼胚愈伤组织大,胚性较好。为了便于区分种子胚上原胚芽部位生长出的芽苗和

表4 外植体类型和放置方式对愈伤组织诱导分化的影响  
Table 4 Effects of different explants and different placements on callus induction and plant regeneration

外植体	放置方式	诱导愈伤组织数/个	生根愈伤组织数/个	绿苗愈伤组织数/个	再生植株数/个
完整种子	正放	40	4	6	1
	反放	39	5	4	2
受伤种子	正放	38	11	9	4
	反放	40	14	10	5
胚	正放	40	27	25	24
	反放	40	11	13	10
盾片	正放	13	3	2	1
	反放	27	15	12	8

接种的外植体均为40个。

愈伤组织分化出的芽苗,我们先切除去部分种子胚上原胚芽部位已长出的芽苗,然后将愈伤组织转入分化培养基中,3 d左右就有绿点产生,30 d再生成植株(图2)。另外,以完整种子和在胚处受伤的完整种子分别接种,诱导3~4 d两者均开始出现愈伤组织,且出愈率高(95%以上),出愈效果优于成熟胚盾片,多呈团状,较小,淡黄色,

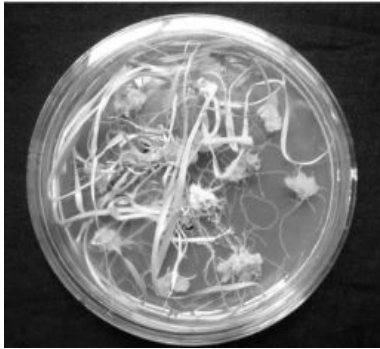


图2 小麦成熟胚分化的苗

Fig. 2 Buds regenerated from wheat mature embryo

但诱导半个月左右, 真菌污染严重, 以至后期分化频率低。此系统不宜用作高频率植株的再生。

另外, 我们又作了这样的试验, 即将完整种子和胚处受伤过的完整种子按腹沟朝下(正放)和腹沟朝上(反放), 离体完整胚按盾片向下、胚芽不直接接触培养基(正放)和盾片向上、胚芽直接接触培养基(反放)各两种方式进行接种。结果(表4)显示, 完整种子和胚处受伤过的完整种子接种后, 放置方式对愈伤组织诱导和分化无明显的影响; 离体完整胚的正放与反放对诱导频率也无明显影响, 正放比反放的分化频率高。这与柳建军等<sup>[7]</sup>的结果一致。接种到诱导培养基上的盾片朝下反放比朝上正放的愈伤组织诱导频率高, 这可能是盾片朝下反放时受伤部位容易吸收培养基中营养, 愈伤组织生长受到促进所致。

总之, 植物遗传转化能否成功, 建立良好的植物受体系统十分重要。Cheng等<sup>[8]</sup>曾以小麦幼胚作为转化受体, 成功获得转基因植株。但迄今还未见用小麦成熟胚为转化材料获得转基因植株的报道。小麦成熟胚有良好的再生能力, 以之作为转化受体, 可大大地缩短实验周期, 比较容易获得转基因植株<sup>[9]</sup>。影响小麦愈伤组织诱导和再生频率的因素很多。如外植体的来源<sup>[10]</sup>、基因型<sup>[11]</sup>和培养基<sup>[12]</sup>等。Özgen等<sup>[13]</sup>通过小麦成熟胚与幼胚比较, 研究基因型影响小麦成熟胚愈伤组织诱导再生的结果表明, 小麦成熟胚的组织培养效果比幼胚好。Delporte等<sup>[14]</sup>认为用分子筛筛选直径小的成熟胚为小麦转化受体的再生频率比未成熟胚的高。另外, 继代培养、胚的接种方式、胚的不同放置方式、成熟胚存放时间、干燥、光照和低温处理均对小麦成熟胚愈伤组织诱导分化有影响<sup>[15]</sup>。本文从诱导培养基中添加不同种类和浓度的生长调节物质、小麦种子预处理时间、分化培养基中添加CuSO<sub>4</sub>、不同外植体类型和不同放置方式着手,

探讨小麦成熟胚愈伤组织诱导分化的最佳条件, 建立了一套小麦鄂麦12成熟胚组织培养高频植株再生系统。

此外, 我们采用小麦成熟种子离体完整胚为外植体的诱导频率达到100%, 分化频率达到42.50%, 比幼胚分化效果好。我们认为其原因有二: (1) 成熟种子原胚芽部位的生长代谢影响了内源激素的自身调节能力, 当内源激素与添加的生长调节物质之间的调节作用达到一定的平衡关系时, 愈伤组织即呈现出良好的分化状态; (2) 成熟种子原胚芽部位的生长代谢物促进了胚轴细胞的脱分化, 继而提高了芽苗分化频率。据此我们认为, 小麦成熟胚可作为外植体用于小麦遗传转化, 其研究潜力可能是广阔的。

### 参考文献

- 1 Vasil V, Casticlo AM, Fromm AE et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technol*, 1992, 10: 667~674
- 2 Maddock SE, Lancaster VA, Risiott R et al. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat. *J Exp Bot*, 1983, 34(144):915~926
- 3 Barcelo P, Lazzeri PA. Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues. In: (Jones H) ed. *Methods in Molecular Biology—Plant Gene Transfer and Expression Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1995, 49:113~123
- 4 李宏潮, 胡道芬, 王虹. 影响小麦成熟胚培养因素的研究. *华北农学报*, 1990, 5(1):22~27
- 5 陈魁. *试验设计与分析*. 北京: 清华大学出版社, 1996
- 6 Barro F, Cannell ME, Lazzeri PA et al. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theor Appl Genet*, 1998, 97:684~695
- 7 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
- 8 Cheng M, Fry JE, Pang S et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 1997, 115:971~980
- 9 曾黎琼, 程在全, 段玉云等. 几种基因转移技术在小麦上的应用. *西南农业学报*, 2000, 13(4):25~29
- 10 Ozias-Akins P, Vasil IK. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). *Protoplasma*, 1983, 117:40~44
- 11 Sears RG, Deckard EL. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci*, 1982, 22:546~550
- 12 Lazar MD, Collins GB, Wian WE. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures. *J Hered*, 1983, 74:353~357
- 13 Özgen M, Türet M, Altinok S et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep*, 1998, 18(3~4):331~335
- 14 Delporte F, Mostade O, Jacquemin JM. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 2001, 67:73~80
- 15 柯遐义, 陈春洪, 杨芳等. 影响小麦成熟胚培养的几种因素研究. *广东农业科学*, 1995, (6):12~14