

# 小麦愈伤组织原生质体培养 高频率细胞分裂及愈伤组织形成

程增书 高志强 方 仁

(河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄 050031)

**摘 要** 从小麦 CK89、102、113 的花药和花冬的幼穗诱导愈伤组织的继代培养中, 选择致密颗粒型愈伤组织, 转入附加 2,4-D  $2\sim 4\text{ mg/L}$  改良 MS 固体培养基上进行继代培养, 6~10 周后形成生长迅速的胚性愈伤组织, 这种愈伤组织分离原生质体得率为  $1\sim 3.7\times 10^7$  个/g。原生质体于 PCM<sub>2</sub> 培养基上琼脂糖包埋培养, 3~5 天出现第一次细胞分裂, 7~14 天进行第二、第三次细胞分裂, 两周后形成大量细胞团, 细胞分裂频率达 20.3%~73.3%, 4~6 周后形成肉眼可见愈伤组织。供试 4 个基因型中, CK89、102 和花冬均形成再生愈伤组织, 仅 113 形成多细胞团。愈伤组织增殖分化实验尚在进行中。

**关键词** 小麦 胚性愈伤组织 原生质体培养

小麦原生质体培养研究自 1988 年首次获得再生植株<sup>[6]</sup>后, 发展很快, 国内外先后又有几个实验室报道了原生质体再生植株培养成功<sup>[1~4,12]</sup>, 原生质体作为细胞融合、外源基因转化的良好实验体系日益受到人们的重视。但是, 目前小麦原生质体培养受基因型限制大, 实验周期长, 频率低, 重复性差, 一定程度上限制了原生质体技术在作物改良上的应用。因此, 探讨快速、高效、重复性好的原生质体培养体系势在必行。我们通过对愈伤组织的选择、培养基及培养技术的改进, 在短时间内建立起几个基因型适宜分离原生质体的胚性细胞系, 原生质体培养高频率细胞分裂并形成愈伤组织。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为 CK89[(R85×新引 57)F<sub>1</sub>]、113[(88H<sub>3</sub> 旱 90×88H<sub>3</sub> 旱 290)F<sub>1</sub>]、102[(花 326×C<sub>6</sub>09/5418)F<sub>1</sub>] 三个杂交系花药培养, 小麦品种花冬幼穗培养的愈伤组织, 均由本所花培组提供。

### 1.2 愈伤组织的继代改良及胚性细胞系的建立

从 4 个基因型材料继代培养的愈伤组织中, 选择致密颗粒型愈伤组织, 转移到改良

MS 培养基( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  850mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  500mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  14.6mg/L 附加 2,4-D 2mg/L)上,在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下进行培养,待长出新的愈伤组织后,于 2,4-D 浓度调整在 2~4mg/L 的原培养基进行继代培养,每 10~15 天转继代培养一次,继代 7~8 次以后,形成松散颗粒状胚性愈伤组织。在  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  温度下进行愈伤组织的快速增殖,建立起胚性细胞系。以后胚性愈伤组织于 2,4-D 为 2~4mg/L 的各种 MS 培养基上,每 10~15 天转继代一次,长期继代胚性愈伤组织状态良好。

### 1.3 原生质体的分离和培养

取转继代后 5~15 天的胚性愈伤组织 1.0g 于 10~15ml 酶解液中。酶液组成为 2% Cellulase“Onozaka”RS, 0.2% Pectolyase Y23, PCW 液(11%甘露醇、1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1% MES、0.5% 小牛血清, pH 值 5.6~5.8) 配成,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  黑暗、静置酶解 2.5~12h。200 目、400 目双层筛过滤,除去大块和未消化的愈伤组织,滤液于 10ml 离心管中,500r/min,离心 5min。用 PCW 液同样条件下重复洗涤 3 次,最后用 PCM 原生质体培养液洗涤一次。

纯净的原生质体,根据预先确定的密度用原生质体培养液制成悬浮液,与 1.2% 低融点琼脂糖 1ml:0.5ml 混匀,接种于 35mm×10mm 平皿中,于  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱中,黑暗、静置培养。培养密度在 3.0~5.0 个/ml 之间。原生质体培养基见结果部分。培养过程中定期观察原生质体生长情况,于 10~15 天统计细胞分裂频率。再生愈伤组织于不含激素的 MS 培养基上增殖并进行分化实验。

## 2 结果

### 2.1 胚性细胞系的建立和原生质体的分离

CK89、102、113 和花冬 4 个基因型的致密颗粒型愈伤组织,通过调整继代培养基的离子强度,缩短继代周期,提高培养温度和变化生长素水平等措施,经过两个多月愈伤组织的定向改造,建立起多个适宜分离原生质体的胚性细胞系。这些胚性系的共同特点是:细胞呈圆形,核大,壁薄,细胞质浓,生长快,细胞团大部分是由十几个至上百个细胞组成的小细胞团,极易解离。在附加 2,4-D 2mg/L MS 固体培养基上,每 10~15 天转继代一次,已继代几个月,愈伤组织的胚性状态保持良好。

用转继代后 5~15 天的材料酶解分离原生质体,一般都能获得大量原生质体。多次实验的结果表明,以 6~10 天的材料分离原生质体效果最好,原生质体得率可达  $1 \sim 3.7 \times 10^7$  个/g,分离的原生质体一般不需要漂洗即可用于培养,再生细胞活力强,分裂频率高,并能很快形成细胞团和愈伤组织。

### 2.2 原生质体培养及再生愈伤组织形成

**2.2.1 不同培养基对原生质体培养的反应** 用 MS<sup>[10]</sup>、MB、NB、 $\text{KM}_8\text{P}$ <sup>[8]</sup> 和 RM<sup>[6]</sup> 5 种基本培养基分别进行 CK89 原生质体培养实验。原生质体在 5 种培养基上均能再生新壁,但能观察到细胞分裂的仅有 MS、MB 和 NB 培养基,并以 MB 培养基为最好,细胞分裂开始早,分裂频率较高。但均不能持续分裂形成大细胞团。调整 MB 培养基的无机盐为  $\text{PCM}_2$ ,不仅保证了细胞团的持续分裂,并进一步形成愈伤组织。培养基配方列于表 1。

表 1 原生质体培养基

(单位:mg / L)

组成		培养基					
		MS <sup>[10]</sup>	MB	NB	KM <sub>8</sub> P <sup>[8]</sup>	RM <sup>[6]</sup>	PCM <sub>2</sub>
基本成分	无机盐	MS	MS	N <sub>6</sub>	KM <sub>8</sub> P	RM	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 880 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 600 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 340
	铁盐	MS	MS	MS	KM <sub>8</sub> P	RM	1 / 2MS
	有机物	MS	B <sub>5</sub>	B <sub>5</sub>	KM <sub>8</sub> P	RM	B <sub>5</sub>
附加物	甘氨酸	2	2	2			2
	谷氨酰胺	200	200	200			200
	天门冬氨酸	150	150	150			150
	水解酪蛋白	250	250	250			250
	酵母提取物	100	100	100	KM <sub>8</sub> P	RM	100
	MES	950	950	950			950
	Ficoll	5000	5000	5000			—
	小牛血清	0.8%	0.8%	0.8%			0.8%
	葡萄糖	0.52M	0.52M	0.52M			0.52M
	蔗糖	10000	10000	10000			10000
植物激素	2,4-D	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	NAA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	KT	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	pH 值	5.6~5.8	5.6~5.8	5.6~5.8	5.6~5.8	5.6~5.8	5.6~5.8

以后用 PCM<sub>2</sub> 培养基进行 102、113、花冬原生质体培养均获得比较好的效果。

**2.2.2 植物激素对原生质体培养的效应** 以 PCM<sub>2</sub> 为基本培养基, 其他植物激素相同, 比较了 2, 4-D 在 0.5~8mg / L 间 7 个不同浓度对 CK89 原生质体培养的影响 (表 2)。结果表明, 2,4-D 浓度在 0.5~6mg / L 之间时, 随着 2, 4-D 浓度增加, 细胞分裂频率和小细胞团形成频率均增加; 当 2, 4-D 浓度为 8mg / L 时, 细胞分裂明显受到抑制。当 2, 4-D 浓度为 4~6mg / L 时, 培养 5 天, 一次细胞分裂达 33.3%, 培养 7 天时, 细胞分裂频率最高达 50% 左右。但较高的 2, 4-D 浓度对细胞团进一步发育和大细胞团形成不利, 只有 2, 4-D 浓度为 2.5~4mg / L 的处理持续分裂形成了大细胞团和愈伤组织。

不同基因型对 2, 4-D 的反应不同。本实验中, 102 以 2, 4-D 浓度 1mg / L, 113 以 1~2mg / L, 花冬以 0.5mg / L 比较合适。

以 PCM<sub>2</sub> 为基本培养基, 2, 4-D 浓度相同, 比较了 NAA、KT、ZT 和 6-BA 对 102

原生质体培养的影响(表3)。结果表明, 2, 4-D 1mg/L、NAA 0.2mg/L、KT 0.2mg/L 组合最适合 102 原生质体培养, 细胞分裂频率达到 66.7%。

表2 2,4-D 浓度对原生质体培养的影响(CK89)(mg/L)

2,4-D 浓度	起始分裂	形成细胞团	再生愈伤组织
0.5	+	-	-
1.0	+	+	+
1.5	+	+	+
2.5	+	++	++
4.0	++	++	++
6.0	++	++	-
8.0	-	-	-

注: - 差; + 一般; ++ 较好。

2.2.3 不同基因型之间原生质体分裂速度、分裂频率的差异 不同基因型之间原生质体培养再生细胞起始分裂时间、分裂进度和分裂频率存在明显差异(表4)。4个基因型都在3~5天内出现第一次细胞分裂, 7~14天进行第

表4 不同基因型原生质体培养的比较

基因型	一次分裂 (天)	二、三次 分裂(天)	形成愈伤 组织(周)	分裂频率 (%)
CK89	3	7	5	20.5
102	3~4	7~8	4~5	73.3
113	3	7	-	63.3
花冬	5	10~14	6	30.3

二、三次细胞分裂。细胞分裂频率在 20.5%~73.3%之间。4个基因型中, CK89、113 前期分裂快, 而形成细胞团以后到形成愈伤组织, 以 102 进展最快; 花冬在整个过程中都慢。除 113 仅能形成多细胞团外, 其他三个基因型都形成愈伤组织。4~6 周后形成 1mm 以上愈伤组织, 转移到不含激素的 MS 培养基上迅速增殖。

### 3 结论

在小麦原生质体培养中, 原生质体主要来自于合适的愈伤组织<sup>[2,3]</sup>或由其建立的悬浮系<sup>[1,4,12]</sup>。通过对外植体选择几乎所有小麦基因型都能诱导出愈伤组织, 但要获得适宜原生质体培养的好的基因型或建立一个理想的胚性细胞系十分困难<sup>[9]</sup>。即使一个好的基因型, 通常也要经过繁杂的悬浮培养过程方能建起比较好的胚性细胞系<sup>[1,4,12]</sup>, 其实验周期一般需要一年至几年。如此长的培养过程不仅增加了材料的变异, 分化能力减弱, 而且也延缓了这一技术的应用。我们通过对愈伤组织的定向改造, 用于实验的 4 个基因型均在短期内转变成成为松散的胚性细胞系。实验结果表明, 我们的方法快速有效, 分离原生质体得率高, 原生质体分裂频率高, 并能持续分裂形成大细胞团和愈伤组织。因此可以认为, 本方法经进一步改进后, 将会大大缩短目前小麦原生质体培养周期, 从愈伤组织诱导到原生质体再生愈伤组织仅需 3~4 个月时间, 有可能使原生质体培养整个过程在半年内完成, 这在理论和应用上都有很大意义。

表3 植物激素对原生质体培养的影响(102)

植物 激素	浓度 (mg/L)			
	A	B	C	D
2,4-D	1.0	1.0	1.0	1.0
NAA	0.2	0.2	0.2	0
KT	0.2	0	0	0.2
ZT	0	0	0.2	0
6-BA	0	0.1	0	0.1
分裂频率(%)	66.7	23.5	43.0	39.6

原生质体培养基是影响小麦原生质体培养的重要因素。从目前小麦原生质体培养的报道看, 不仅所用培养基各不相同, 而且都是在常规组织培养基上改进过的<sup>[1~4,6,12]</sup>。我们的实验也表明, 参试的 5 种基本培养基无一能获得持续分裂的大细胞团, 而在 MS、B<sub>5</sub> 培养基基础上经改进而配制成的 PCM<sub>2</sub> 培养基, 不仅获得持续分裂的大细胞团, 而且能形成愈伤组织。PCM<sub>2</sub> 培养基的一个特点是在 MS 无机盐的基础上, 提高 Ca<sup>2+</sup> 的浓度, 降低 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和铁盐的浓度, 这和 Yamada 等在水稻上<sup>[11]</sup>, Imprie-Milligan 等在玉米原生质体培养方面的结果是一致的<sup>[7]</sup>。另外, 就高频率原生质体分裂和再生愈伤组织形成而言, 在培养基中加入植物激素也是一个重要因素。一般认为, 禾谷类原生质体培养基必须加入生长素, 尤其是 2,4-D, 它不仅在起始分裂阶段至关重要, 而且对原生质体形成的细胞团和愈伤组织的增殖也是必要的<sup>[5]</sup>。我们的实验结果也表明, 只有一定浓度的 2, 4-D 的存在才能获得高频率细胞分裂、大细胞团及愈伤组织形成。同时, 2, 4-D 与其他植物激素配合也影响原生质体的分裂频率。我们的实验以 2, 4-D 与 NAA、KT 配合效果最好, 但不同基因型原生质体培养所需植物激素的浓度和配比又各不相同。

## 参 考 文 献

- 1 王海波, 李向辉, 孙勇如等. 小麦原生质体培养——高频率的细胞团形成及植株再生. 中国科学 (B 辑), 1989, (8): 828~835
- 2 任延国, 贾敬芬, 李名扬等. 小麦幼穗愈伤组织原生质体再生植株. 科学通报, 1989, 34 (9): 693~695
- 3 郭光沁, 夏光敏, 李忠谊, 陈惠民. 小麦原生质体再生细胞直接形成体细胞胚和再生植株. 中国科学 (B 辑), 1990, (9): 970~974
- 4 李宏潮, 郭仲琛, 杨晓辉等. 冬小麦原生质体培养及植株再生. 植物学报, 1991, 33 (9): 706~711
- 5 贾敬芬. 禾谷类植物原生质体培养和融合. 见: 孙敬三, 陈维伦主编. 植物生物技术和作物改良. 北京: 中国科学技术出版社, 1990, 70~82
- 6 Harris R, Wright M, Byrne M et al. Callus formation and plantlet regeneration from protoplast derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum*). Plant Cell Rep, 1988, 7: 337~340
- 7 Imbrie-Milligan CW and Hodges TK. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. Planta, 1986, 168: 395~401
- 8 Kao KN and Michaluk MR. Nutritional requirement for growth of *Vicia faba* cell and protoplasts at very low population density in liquid media. Planta, 1975, 126: 105~110
- 9 Maddock SE. Suspension and protoplast culture of *Triticum aestivum* L. Plant Cell Rep. 1987, 6: 23~26
- 10 Murashige T and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 1962, 15: 473~497
- 11 Yamada Y, Yang ZQ and Tang DT. Plant regeneration from protoplast-derived culture of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Rep, 1986, 5: 85~88
- 12 Yasuyuki H et al. Wheat protoplast culture: Embryogenic colony formation from protoplasts. Plant Cell Rep, 1986, 7: 414~417

# High Frequency Cell Division and Callus Formation in the Culture of Protoplast Derived from Embryogenic Callus of Wheat

Cheng Zengshu      Gao Zhiqiang      Fang Ren

(Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031)

**Abstract**      The compact and granular calli were selected from anther-induced calli of wheat varieties CK89, 102, 113 and immature inflorescence-induced calli of Huadong, respectively. While these calli were cultured in the modified MS medium with 2–4 mg/L 2,4-D, a friable fast-growing type of embryogenic calli was obtained after 6 to 10 weeks. The high yield protoplasts were isolated from the culture and the protoplast yield was 1 to  $3.7 \times 10^7$  / g calli. The isolated protoplasts were cultured in PCM<sub>2</sub> medium solidified with 0.4% agarose. The first division occurred 3–5 days after plating. The second and third divisions were identifiable during 7 to 14 days. A large number of cell aggregates emerged after two weeks culture, and the division frequency was 20.3%–73.3%. After 4–6 weeks plating, the microcalli formed. The calli were obtained from wheat varieties CK89, 102 and Huadong, and cell aggregates were obtained from 113. An experiment on calli differentiation is under way. A few factors affecting the protoplast cultures were also studied.

**Key words:** Wheat; Embryogenic calli; Protoplast culture; Protoplast-derived calli