

# 冬小麦成熟胚高频愈伤组织形成和分化的适宜条件研究

龙素霞, 赵芳华, 许振龙, 肖 凯

(河北农业大学 农学院, 河北 保定 071001)

**摘要:**以4个冬小麦品种的成熟胚为外植体,研究了温度预处理、愈伤组织诱导培养基中2,4-D浓度和分化培养基激素种类及其配比对小麦成熟胚愈伤组织形成和分化的影响。结果表明,与室温25℃相比,低温4℃预处理能明显改善愈伤组织的形成率。适宜愈伤组织形成的诱导培养基中2,4-D浓度以4 mg/L为宜,分化培养基中含有1 mg/L KT + 2 mg/L 6-BA较仅含有1 mg/L KT或2 mg/L 6-BA能明显促进愈伤组织的分化。相同培养条件下,不同品种间的愈伤组织形成和再生能力存在较大差异。因此,进行低温种子预处理、愈伤组织诱导过程中采用适宜的2,4-D浓度,以及分化过程中采用适宜的激素组合是冬小麦高频愈伤组织形成和分化的重要条件。

**关键词:** 冬小麦; 成熟胚; 愈伤组织; 分化

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0026-05

## Studies on Suitable Factors for Callus Formation and Differentiation of Mature Embryo in Winter Wheat with High Efficiency

LONG Su-xia, ZHAO Fang-hua, XU Zhen-long, XIAO Kai

(College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** Using the mature embryos of four winter wheat cultivars to be the explants, the effects of pre-treatments of temperature, 2,4-D concentrations in callus formation medium, and phytohormone types and their combination in callus differentiation medium on callus formation and differentiation were studied. The results showed that low temperature (4℃) pre-treatment could obviously improve the callus formation rate compared to room temperature pretreatment (25℃). Suitable 2,4-D concentration for callus formation in the callus induction medium was 4 mg/L. The combination of phytohormones of 1 mg/L KT + 2 mg/L 6-BA had higher the callus differentiation rate than those in 1 mg/L KT or in 2 mg/L 6-BA, the single type of phytohormone treatment. Under the same culture condition, there were dramatic differences on callus formation and differentiation among the tested cultivars. Thus, low temperature pretreatment, using suitable 2,4-D concentration during the callus induction process, combining the suitable phytohormone combination in callus differentiation are important factors, to improve the callus formation and differentiation, when using the mature embryo to be the plant regeneration explants.

**Key words:** Winter wheat; Mature embryo; Callus; Differentiation

小麦是我国北方地区重要的粮食作物之一,利用细胞全能性,诱发体细胞分化和再生植株,在小麦重要种质资源保存中具有重要作用。体细胞再生植株也是利用基因工程技术创制小麦新型种质或品种的重要前提条件之一<sup>[1,2]</sup>。

迄今,诱导小麦植株再生的外植体通常为具有潜在分裂和分生能力强的部位,包括幼胚、幼穗、幼叶、茎尖、根尖分生组织和花药等<sup>[3-9]</sup>,其中,幼胚和幼穗等生活器官,分裂、分生和再生植株的能力较强,是体细胞植株再生中的适宜外植体<sup>[3,4]</sup>。但在

收稿日期: 2008-01-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)前期专项资助(2007CB116209)

作者简介: 龙素霞(1984-),女,河北邯郸人,硕士,主要从事作物高产优质与分子生物学研究工作。

通讯作者: 肖 凯(1963-),男,河北抚宁人,教授,主要从事作物生理与分子生物学研究工作。

应用中, 幼胚和幼穗外植体仅在植株生长发育至幼穗和幼胚的特定时期才能选用, 因此, 获得上述外植体的时间受到生长季节的很大限制。此外, 由于群体内不同麦穗, 以及同一麦穗不同小穗位、小花位籽粒在生理期上差异较大, 外植体间的再生能力不同会影响到外植体的整体再生效率<sup>[9]</sup>。

与幼胚和幼穗生活器官相比, 来自于成熟种子的胚性组织, 脱分化能力较弱, 愈伤组织形成、分化和植株再生能力差<sup>[7]</sup>。但是, 成熟种子胚性组织的外植体来源不受季节和时间的限制, 如果能通过种子预处理、优化外源激素种类和平衡条件, 改善成熟胚性组织的生理活性, 可能具有改善该类型外植体脱分化能力较弱、愈伤组织形成、分化和植株再生能力差的效果。迄今, 尽管已有采用成熟胚诱导小麦植株再生的报道, 但仍存在着愈伤组织形成和分化率低等问题<sup>[10-12]</sup>。本项研究以目前在华北平原区具有较大种植面积的 4 个小麦品种为材料, 通过种子低温预处理和设置愈伤组织形成和分化期间的激素种类和用量试验, 研究了外在条件对小麦成熟胚愈伤组织形成、分化的影响, 建立了小麦成熟胚高效愈伤组织形成、分化和植株再生的技术体系, 为今后利用小麦成熟胚高效再生植株提供了参考依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

试验采用的小麦品种为河农 822、中科 9818、石麦 12 和师桀 02-1, 种子由作者在上个小麦生长季的试验田中收获, 风干后室内保存。

1.2 种子温度预处理

表 1 温度预处理和诱导愈伤组织培养基 2, 4-D 浓度对不同品种愈伤组织形成率的影响

Tab. 1 The effects of pre-temperature treatments of seeds and 2, 4-D concentrations in callus formation media on formation rate of callus in different wheat cultivars

时间/d Time	2, 4-D 浓度/(mg/L) 2, 4-D concentration	河农 822/% Henong822		中科 9818/% Zhongke9818		石麦 12/% Shimai12		师桀 02-1/% Shiluan02-1	
		25℃	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃
21	2	56.11	68.13	59.26	70.05	53.74	62.44	36.15	42.36
	4	79.24	96.54	83.24	94.00	57.38	66.93	56.38	64.26
	6	76.30	90.66	84.55	98.46	63.54	70.16	52.43	60.63
	8	73.46	88.38	80.24	90.83	60.76	68.35	50.28	58.46
42	2	69.26	79.04	71.66	83.74	62.28	70.55	48.54	54.36
	4	81.43	99.10	86.37	97.15	68.66	72.47	69.29	71.63
	6	79.05	94.33	87.73	99.65	70.83	74.36	65.26	74.74
	8	77.25	92.34	83.55	92.32	68.16	71.28	63.15	69.09
63	2	78.35	88.29	79.23	90.76	63.77	70.11	56.34	62.18
	4	89.64	99.33	88.22	98.68	70.23	76.54	72.26	74.66
	6	86.38	98.22	88.78	99.82	73.12	78.12	70.12	71.23
	8	83.22	94.37	85.23	95.17	70.28	72.06	65.20	70.18

注: 表 1 中时间指成熟胚开始培养至调查时期的持续时间。表 2 与此相同。  
Note: In Table 1, the column "Time" means the duration from mature embryo culture to the date of investigation. Same meanings have in Table 2.

将各品种的种子用 70% 乙醇进行 5 min 表面消毒后, 用灭菌蒸馏水冲洗干净并在灭菌蒸馏水内于不同的温度处理下浸泡 36 h, 设置的温度为 25℃ 和 4℃, 再转入愈伤组织诱导和分化培养基, 研究不同温度预处理对愈伤组织形成和分化的影响。

1.3 愈伤组织诱导的 2, 4-D 浓度处理

将不同温度预处理的种子, 用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 处理 15 min, 然后用无菌水冲洗 4~6 遍, 剥取胚, 接种于愈伤组织诱导培养基上。愈伤组织诱导基本培养基为 MS+ 30 g/L 蔗糖+ 10 g/L 琼脂(pH6.0), 添加的 2, 4-D 设置 4 个浓度梯度, 分别为 2, 4, 6, 8 mg/L。每 3 周继代 1 次, 共继代 2 次, 然后转入分化培养基。在第 1 次继代前, 调查愈伤组织形成数量, 通过该值和接种胚总数计算愈伤组织形成率; 每次继代前, 调查愈伤组织鲜重。

1.4 愈伤组织分化的不同激素及组合处理

将形成的愈伤组织转至含有不同激素或激素组合的分化培养基。分化基本培养基为 MS+ 30 g/L 蔗糖+ 10 g/L 琼脂(pH 6.0), 内部含有的激素或激素组合为 2 mg/L 6-BA、1 mg/L KT 和 2 mg/L 6-BA+ 1 mg/L KT。在分化 21 d 后, 调查愈伤组织的分化率。

各品种种子温度预处理、愈伤组织诱导的 2, 4-D 浓度处理和分化的激素处理均为 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 温度预处理和 2, 4-D 浓度对小麦愈伤组织形成率的影响

随着愈伤诱导时间延长, 各品种在温度预处理

和2,4-D浓度处理下的愈伤形成率均不断提高(表1)。此外,由表1可见,剥取胚性组织以前,对浸泡种子进行不同温度处理对愈伤组织的形成能力具有较大影响。4个小麦品种均表现为,4℃下浸种36h,较在25℃下进行相同浸种时间,成熟胚形成的愈伤数量明显增多。表明,进行种子低温预处理能明显改善成熟胚的愈伤形成能力。诱导愈伤组织培养基中的2,4-D浓度,对成熟胚形成愈伤组织的能力也有较大影响,4个小麦品种愈伤组织的形成数量与2,4-D浓度的关系均呈单峰曲线型,但形成最多愈伤组织的2,4-D浓度在品种间有所不同。其中,河农822和师栎02-1在4mg/L的形成率最高;中科9818和石麦12则在6mg/L最高。在不同温度预处理和2,4-D浓度下,不同品种的愈伤组织形成率也有明显不同,以河农822和中科9818较高,石麦12

和师栎02-1较低(表1)。

### 2.2 温度预处理和2,4-D浓度对小麦愈伤组织鲜质量的影响

在愈伤组织诱导不同时间,各品种温度处理和2,4-D浓度处理下的愈伤组织平均鲜重见表2。可见,各处理的愈伤组织鲜质量值大小表现规律,与各处理成熟胚愈伤组织形成率的表现规律(表1)大体一致。即与室温(25℃)预处理相比,低温(4℃)预处理能增加愈伤组织的鲜质量;不同2,4-D浓度对愈伤组织的鲜质量也有较大影响,以4mg/L(河农822和师栎02-1)或6mg/L(中科9818和石麦12)愈伤组织的鲜质量值最大。不同品种相比,尽管品种间愈伤组织的鲜质量在测定前期(21d)差异较大,但测定后期(60d)差异很小(表2)。

表2 温度预处理和诱导愈伤组织培养基2,4-D浓度对不同品种愈伤组织鲜重的影响

Tab.2 The effects of pretemperature treatments of seeds and 2,4-D concentrations in callus formation media on the fresh weight of callus in different wheat cultivars

时间/d Time	2,4-D 浓度/(mg/L) 2,4-D concentration	河农 822/ % Henong822		中科 9818/ % Zhongke9818		石麦 12/ % Shimai12		师栎 02-1/ % Shiluan02-1	
		25℃	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃
21	2	0.13	0.16	0.18	0.23	0.20	0.22	0.13	0.15
	4	0.23	0.25	0.23	0.25	0.23	0.26	0.22	0.26
	6	0.22	0.24	0.25	0.28	0.25	0.27	0.20	0.24
	8	0.20	0.22	0.23	0.25	0.22	0.24	0.19	0.20
42	2	0.23	0.30	0.32	0.40	0.35	0.41	0.23	0.30
	4	0.42	0.45	0.43	0.50	0.43	0.50	0.40	0.50
	6	0.40	0.43	0.46	0.53	0.46	0.52	0.38	0.45
	8	0.38	0.40	0.40	0.46	0.42	0.44	0.32	0.41
63	2	0.36	0.42	0.46	0.56	0.50	0.54	0.36	0.40
	4	0.56	0.60	0.60	0.60	0.56	0.62	0.54	0.62
	6	0.54	0.58	0.66	0.66	0.60	0.64	0.50	0.58
	8	0.50	0.54	0.56	0.60	0.54	0.58	0.48	0.50

表3 6-BA、KT及其组合对不同品种愈伤组织分化率的影响

Tab.3 The effects of phytohormone 6-BA, KT and their combination in callus formation media on the rate of callus differentiation in different wheat cultivars

激素 Phytohormone	2,4-D 浓度/(mg/L) 2,4-D concentration	河农 822/ % Henong822		中科 9818/ % Zhongke9818		石麦 12/ % Shimai12		师栎 02-1/ % Shiluan02-1	
		25℃	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃
2mg/L 6-BA	2	26.23	26.78	27.22	25.32	19.27	19.87	15.22	15.56
	4	25.32	26.32	26.83	24.23	14.56	15.22	14.86	15.73
	6	24.12	20.42	18.22	18.24	11.32	12.05	13.46	13.26
	8	18.38	17.84	11.56	11.45	10.73	10.36	10.33	11.22
1mg/L KT	2	27.64	28.35	28.36	27.03	14.12	15.22	16.55	18.24
	4	26.08	28.06	27.75	26.68	13.46	14.43	15.28	17.36
	6	22.44	22.72	24.00	20.12	12.73	11.62	12.04	14.42
	8	15.65	16.22	12.44	13.55	10.90	11.18	11.68	12.36
2mg/L 6-BA + 1mg/L KT	2	34.64	35.35	35.36	35.03	23.12	24.22	23.55	25.24
	4	30.08	33.66	34.75	33.68	22.46	23.43	22.28	24.36
	6	34.44	32.72	28.00	30.12	19.73	20.62	19.04	21.42
	8	18.65	20.22	20.44	23.55	16.90	18.18	15.68	16.36

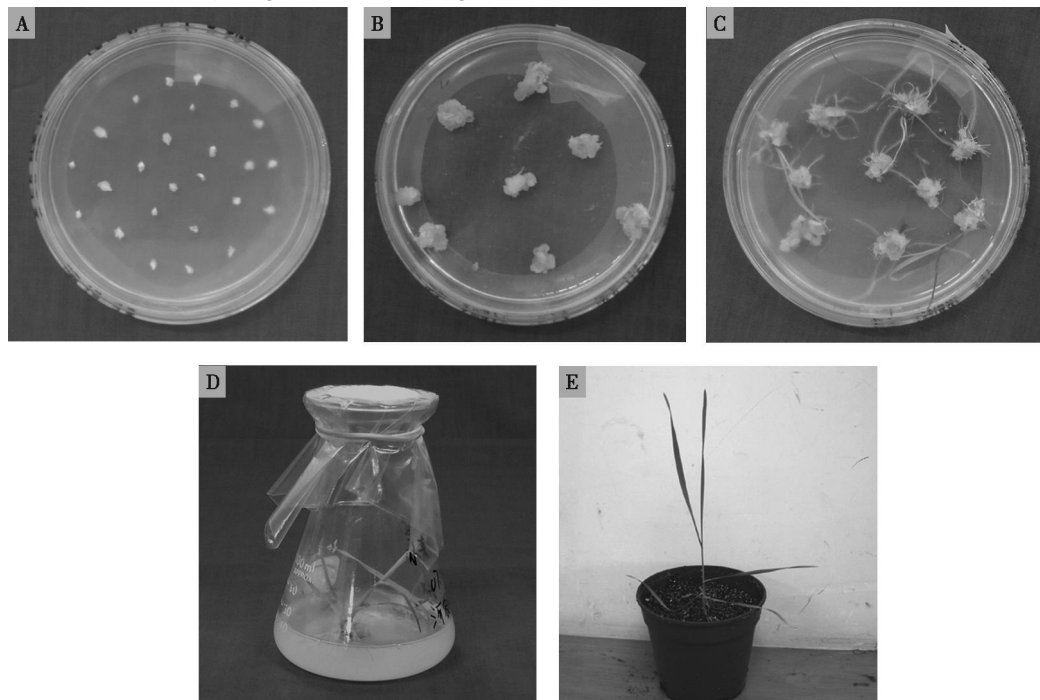
### 2.3 不同激素及组合处理对愈伤组织分化率的影响

小麦品种各处理完成愈伤组织诱导后, 转移至含有不同激素及其组合(2 mg/L 6-BA, 1 mg/L KT 和 2 mg/L 6-BA+ 1 mg/L KT) 的分化培养基上, 进行分化培养。各品种、处理的愈伤组织经过 10 d 左右开始分化出绿色芽点, 20 d 产生绿苗, 分化培养 25 d 测定的愈伤组织分化率见表 3。可见, 不同温度预处理间的愈伤组织分化率差异很小; 但不同愈伤组织诱导培养基 2, 4-D 浓度处理间的分化率具有明显差异, 表现为随着供试 2, 4-D 浓度的增大, 分化率不断下降。表明 2, 4-D 浓度不仅明显影响愈伤组织的形成率, 而且对愈伤组织的分化率也有重要影响。研究发现, 与使用单种激素(2 mg/L 6-BA 和 1 mg/L

KT) 相比, 激素组合(2 mg/L 6-BA + 1 mg/L) 能显著提高愈伤组织的分化率。此外, 不同品种相比, 河农 822 和中科 9818 的分化率显著高于石麦 12 和师栾 02-1(表 3)。

### 2.4 小麦高频愈伤组织形成和分化的适宜技术体系

本研究表明, 小麦成熟胚高频愈伤组织形成和分化的技术体系如下: ①采用愈伤组织形成和分化能力强的种子, 如河农 822、中科 9818 等; ②剥取成熟胚以前, 对种子进行适当时间的低温(4℃) 预处理; ③愈伤组织诱导中采用适宜的 2, 4-D 浓度(4 mg/L); (4) 愈伤组织分化中采用适宜的激素及组合(2 mg/L 6-BA+ 1 mg/L KT)。河农 822 愈伤组织形成、分化和植株再生过程如图 1 所示。



A. 分离的成熟胚; B. 诱导 30 d 的愈伤组织; C. 分化 15 d 的愈伤组织和幼苗; D. 转移至 MS 培养基 15 d 的幼苗; E. 移栽至生长室的幼苗

A. Isolated the mature embryos; B. Callus induced from mature embryos for 30 d; C. Callus and young seedlings differentiated for 15 d;

D. Young seedlings growing in MS medium for 15 d; E. Seedlings growing at the growth room

图 1 河农 822 成熟胚愈伤组织形成、分化和植株再生过程

Fig.1 The process of callus formation, callus differentiation and plant generation from mature embryos of cultivar Henong 822

## 3 讨论

有关低温进行种子预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成率的影响, 不同学者的研究结果不尽相同。廖祥儒等<sup>[11]</sup> 研究发现, 低温处理促进小麦成熟胚愈伤组织的形成, 但曹原等<sup>[12]</sup> 指出, 低温预处理对成熟胚愈伤组织形成率的影响与小麦品种有关, 随品种不同, 表现为促进效应显著和不明显等不同结果。本项研究发现, 种子低温预处理能明显改善所有供试小麦品种愈伤组织形成率的效果。表明, 尽管低温预处理对不同小麦品种(基因型) 愈伤组织形成率

的促进效应存在基因型的差异, 但低温预处理在多数品种(基因型) 成熟胚愈伤组织的诱导中是有益的。

有研究指出, 在小麦愈伤组织形成过程中, 诱导培养基中的 2, 4-D 浓度是影响愈伤组织发生和形成率的重要因素<sup>[12]</sup>。本研究对一定范围 2, 4-D 浓度(2~ 8 mg/L) 对不同小麦品种愈伤组织形成率的影响发现, 2, 4-D 浓度对愈伤组织的形成率具有很大的调控效应, 表现为两者之间存在着单峰曲线的关系, 在 4 mg/L(河农 822 和师栾 02-1) 或 6 mg/L(中科 9818 和石麦 12) 的 2, 4-D 浓度下供试小麦品种的愈

伤组织形成率最高。因此,采用适宜的 2, 4-D 浓度,对于改善小麦成熟胚愈伤组织的形成能力具有重要价值。

研究发现,选用适宜的激素、激素用量和比例,由此调节小麦胚性愈伤组织内源激素的水平,是提高胚性愈伤组织分化的有效途径<sup>[11, 13]</sup>。其中,适宜浓度的 KT 与 6-BA 有利于维持愈伤组织的致密结构,促进芽的再生<sup>[12]</sup>。本研究表明,与采用 KT 或 6-BA 单一激素相比,KT 和 6-BA 组合使用具有明显改善愈伤组织分化能力的效果。此外,本研究对种子温度预处理、愈伤诱导组织培养基不同 2, 4-D 浓度下形成的愈伤分化率研究发现,尽管愈伤组织的形成受到不同温度预处理的影响,但不同温度预处理条件下形成的愈伤组织在分化率上没有明显差异;2, 4-D 浓度则不同,其不仅影响愈伤组织的形成,而且,在分化培养基上的分化率也明显受到先前愈伤组织诱导时 2, 4-D 浓度的制约。表现为较低浓度的 2, 4-D 浓度有利于提高愈伤的分化率。

余桂荣等<sup>[14]</sup>研究发现,不同栽培小麦品种幼胚的愈伤组织诱导、分化和植株再生能力存在明显差异。其他一些学者也有不少类似报道<sup>[15-20]</sup>。表明小麦愈伤组织的形成和分化明显受到基因型的限制。本项研究对河农 822、中科 9818、石麦 12 和师栾 02-1 等 4 个目前河北平原区生产中具有较大种植面积的小麦品种研究发现,尽管各品种均具有采用成熟胚再生植株的能力,但品种间在愈伤组织形成和分化能力上具有明显差异。因此,在采用适当品种(基因型)的基础上,在成熟胚愈伤组织诱导之前,进行种子低温预处理,愈伤组织诱导期间采用适宜的 2, 4-D 浓度,愈伤分化期间采用适当的激素组合和适宜用量,是改善小麦成熟胚愈伤组织形成、分化和植株再生的重要因素。

#### 参考文献:

- [1] 燕 飞, 郑银英, 张文蔚, 等. 农杆菌介导法获得转 *pac1* 基因小麦并表现对大麦黄矮病毒的抗性[J]. 科学通报, 2006, 51(16): 1906-1912.
- [2] 毕瑞明, 贾海燕, 封德顺, 等. 农杆菌介导抗储粮害虫转基因小麦(*Triticum aestivum* L.) 的获得及分析[J]. 生物工程学报, 2006, 22(3): 431-437.
- [3] 林 毅, 高俊山, 李 艳. 不同培养基对小麦幼胚再生能力的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(1): 6-9.
- [4] 覃建兵, 汪越胜, 何光源. 激素对小麦幼穗组织培养效

果的影响研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2005, 39(3): 379-382.

- [5] Rajyalakshmi K, Grover A, Maheshwari N. High frequency regeneration of plantlets from the leaf-bases via somatic embryogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat(*Triticum aestivum*)[J]. Plant Physiology, 1991, 82: 617-623.
- [6] Viertel K, Hess D. Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 44: 183-188.
- [7] Yeung E C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis[M] // Thorpe T A. In vitro Embryogenesis in Plants, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 1995, 20: 205-248.
- [8] Last D J, Brettell R I S. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium[J]. Plant Cell Report, 1990, 90: 364-371.
- [9] 李根英, 黄承彦, 隋新霞, 等. 小麦不同外植体的组织培养效果研究[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 21-25.
- [10] 林德书, 王艳丽, 庄振宏, 等. 小麦成熟胚再生体系及基因枪转化的初步研究[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(2): 141-144.
- [11] 廖祥儒, 郭中伟. 低温和 PEG 预处理对小麦愈伤组织形成及 IAA 氧化的影响[J]. 植物学通报, 2000, 17(3): 257-259.
- [12] 曹 原, 刘志学, 黄晔俊. 冬小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2004, 10(5): 503-507.
- [13] 林 刚, 何勇刚, 刘 勇, 等. 激素对小麦愈伤组织诱导和植株再生的影响[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2005, 39(3): 379-382.
- [14] 余桂荣, 尹 钧, 郭天财, 等. 小麦幼胚培养基因型的筛选[J]. 麦类作物学报, 2003, 23(2): 14-18.
- [15] 安海龙, 卫志明, 黄健秋. 小麦幼胚培养高效成株系统的建立[J]. 植物生理学报, 2000, 26(6): 532-538.
- [16] 梁竹青. 供试种用的小麦未成熟胚离体培养技术研究[J]. 作物学报, 1998, 14(2): 137-142.
- [17] 于晓红, 朱 祯, 付志明. 提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J]. 植物生理学报, 1999, 25(4): 388-394.
- [18] 梁竹青, 高明尉. 不同小麦基因型对体细胞组织培养的反应[J]. 中国农业科学, 1986, (2): 42-48.
- [19] 胡 含, 王恒立. 植物细胞工程与育种[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 1990.
- [20] 祝长青, 李艳红, 赵红艳. 不同基因型小麦成熟胚盾片组织培养效果研究[J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2007, 26(2): 70-73.