

小麦幼胚的脱分化状态及再生性能研究

刘少翔, 王卉, 孙毅, 梁宏, 崔贵梅

(山西省农业科学院农业生物技术研究中心, 山西太原 030031)

摘要:通过对 30 个品种(系)的研究, 确立了小麦幼胚最佳取材时期的种子形态指标: 在幼种子发育到嫩绿色, 脊部由光亮转变为无光泽并具一层绒毛时, 幼胚刚好发育到透明的后期和半透明前期。该时期仅有几个小时。探讨了不同基因型的幼胚的致密愈伤组织诱导状况及其继代保持和分化能力, 并获得了良好的再生体系。使得致密愈伤组织诱导率达到 91%, 在 14 d 时分化频率达到 96.7%, 70 d 时分化频率仍可达 62%。并就温室材料和大田材料以及不同年份大田材料的致密愈伤组织的继代保持和分化能力进行了比较。

关键词: 小麦; 幼胚; 组织培养

中图分类号: S512.103.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0064-04

Dedifferentiation Behavior and Callus Regenerability of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Immature Embryos

LIU Shaor xiang, WANG Hui, SUN Yi, LIANG Hong, CUI Guir mei

(Agri-biotechnology Research Center, Shanxi Academy
of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: Investigated in 30 cultivars (lines) of wheat, the morphologic indexes are established for wheat immature embryos suitable for *in vitro* culture. Immature embryos were cultured between 10-14 d after florescence in the past, but it was too extensive. The immature embryos are subtransparent phase when young seed epidermis becomes light green, raphe becomes hair and glossless. This phase is just the time to culture immature embryos and only lasts for several hours. The genotype is very important for dedifferentiation behaviors and callus regenerability.

Key words: Wheat; Immature embryo; Tissue culture

随着农业生物技术的发展, 转基因双子叶作物已有几十个种类 120 多个品种用于生产实践或已经被批准进入大田实验, 转基因水稻和玉米有若干品种也已用于生产实践, 而转基因小麦还处在建立和优化转基因体系阶段^[1]。造成这种现象的主要原因之一, 是由于小麦的组织培养技术还不过关。在小麦组织培养方面, 虽然成熟胚、叶片、根等诱导的愈伤组织也都能再生植株, 但致密愈伤组织在继代中不易维持并且再生频率低, 而不便于作为转基因受体材料^[2~4]。幼穗作为材料有较高的再生率, 但同幼胚相比, 取材操作困难, 所以研究者主要是对幼胚

材料进行研究^[5~7]。由于再生体系的建立和优化是使用 Bobwhite 等几个非栽培品种形成的, 所以后来的小麦基因转化研究也便集中在这些培养效果理想的基因型上^[8]。因此, 必须在栽培品种中建立良好再生体系, 才能进一步促进小麦外源基因导入研究, 使转基因小麦进入应用阶段。

1 材料和方法

1.1 材料

供试小麦品种(系) 临远 93-4731, 临远 93-4736, 临远 95-5093, 临远 95-5088, 临远 95-6132, 临汾 94

收稿日期: 2002-07-27

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目(981093)

作者简介: 刘少翔(1957-), 男, 山东定陶人, 副研究员, 硕士, 主要从事小麦遗传育种研究工作。

7012, 临汾 94-4293 由山西省农科院小麦所提供; 运丰早 18, 运丰早 20 由山西省农科院棉花所提供; 甘 94 鉴 64, 晋春 9 号, 晋春 13 号, 89-178 由山西省农科院高寒所提供; G15, G54, 京 411 由山西省农科院作物遗传所提供; Calahad, Haren, Mercia, Riband, Dean, Heræwerd, 绵阳 25, 绵阳 26, 莱州 953, 豫麦 21 号由山西省生物所提供; 汾 2175、汾 2223、汾 2360 由山西省农科院经济作物所提供; 扬麦 158 由中科院上海植生所提供。材料种植在大田和温室。

1.2 培养基

诱导愈伤组织培养基的组成为: MB^[9]+ 2, 4 D 2 mg/L+ 蔗糖 20 g/L, pH 值 5. 8。分化培养基为不含激素的上述培养基。

1.3 接种

开花后 10 d 左右, 取 3 种不同发育程度的未成熟种子的幼胚。其 3 种发育中种子的形态为: ①占满颖壳的约 70%, 种皮淡绿、光亮, 胚乳较稀。②占满颖壳 80% ~ 100%, 种皮嫩绿、无光泽、呈茸毛状, 胚乳略浓或初呈胶状。③张开颖壳, 种皮绿色, 脊部中间呈光亮并失去茸毛状。胚乳初呈胶状。

将上述种子于 70% 乙醇中浸 5 min, 0. 1% HgCl₂ 浸 5 min, 无菌水冲洗 3 次。将上述 ①中的幼胚随意接种在诱导培养基上, 将 ②和 ③中的幼胚盾片向上接种。

1.4 继代与分化

每 14 d 继代 1 次, 继代时选择淡黄致密的愈伤组织。进行分化能力检测时, 将继代中的愈伤组织全块整体转接到分化培养基上, 光照 12 h/d, 光强 1 500~ 2 000 lx, 温度 24~ 26 ℃。

2 结果与分析

2.1 未成熟种子形态与幼胚发育的关系

经过几十个品种的试验, 发现幼胚最佳取材时期和未成熟种子的形态有着非常明显的关系。表 1

列出了晋春 9 号从未成熟种子形态到幼胚发育状态, 直至不同愈伤组织的诱导率。一般说来, 半透明、淡黄及乳白色的 0. 5~ 1. 5 mm 的幼胚在实验中均能获得较高比率的致密愈伤组织。然而它们在诱导愈伤组织培养基上培养 14 d 后的表现还是有差异的。首先半透明幼胚诱导的愈伤组织表面仅有几层特化细胞, 而淡黄及乳白色幼胚产生的愈伤组织表面有十几层特化细胞。从这一特点上来看, 用基因枪法导入基因, 半透明比淡黄和乳白色的幼胚的愈伤组织要优越得多。其次, 虽然淡黄及乳白色幼胚愈伤组织诱导率高于半透明幼胚, 但后者产生的致密愈伤组织要高于前者。盾片无色的幼胚致密愈伤组织诱导率最高, 但愈伤组织诱导率低, 并且幼胚很难挑出, 稍不小心便混入较稀的胚乳中。而类型 4 的幼胚发育到后期, 致密愈伤组织少, 并且胚芽在培养基上萌发严重, 不便利用。

在所试材料中, 未成熟种子形态和幼胚发育之间最可靠的指标是种子的颜色、光泽和茸毛。当种子发育到嫩绿色, 并呈有密密的一层茸毛而无光泽时, 是取材最佳时期, 这时的幼胚刚好为半透明, 肉眼刚能较容易观察到。随后种子绿色稍深, 种皮上的茸毛变稀, 这时的幼胚发育为淡黄及乳白。然后种皮绿色更深, 种子脊部的茸毛退去, 种皮发亮, 这时的幼胚已不适于接种。从茸毛出现到变稀, 这一过程仅有几个小时。幼种子的大小与幼胚发育的关系不太绝对, 这一点在不同品种(系)上的表现是有差异的。

2.2 不同小麦品种(系) 幼胚愈伤组织诱导及分化能力

表 2 表明, 愈伤组织诱导率在不同品种(系) 间差异不大, 诱导率均在 90% 以上。但是, 致密愈伤组织的发生率却有着较大差异, 变化范围 30% ~ 91%。而且愈伤组织诱导率高的, 致密愈伤组织不一定高。

表1 未成熟种子的形态与幼胚发育状态间的关系

| 种子形态类型 | 未成熟种子形态 | | | | 幼胚发育状态 | | 接种胚数 (个) | 诱导愈伤组织数(块) | 愈伤组织诱导率(%) | 致密愈伤组织数(块) | 致密愈伤组织诱导率(%) |
|--------|------------|----|----|-----|------------|-------|-------------|------------|------------|------------|--------------|
| | 种子长/颖壳长(%) | 颜色 | 光泽 | 茸毛 | 长度(mm) | 颜色 | | | | | |
| 1 | 70~ 80 | 白色 | 亮 | 无 | 0. 2~ 0. 4 | 无 | 128 | 90 | 70. 3 | 90 | 100. 0 |
| 2 | 80~ 90 | 嫩绿 | 无 | 有 | 0. 4~ 0. 8 | 半透明 | 94 | 91 | 96. 8 | 87 | 95. 6 |
| 3 | 90~ 100 | 嫩绿 | 无 | 稀 | 0. 8~ 1. 5 | 淡黄至乳白 | 107 | 107 | 100 | 93 | 86. 9 |
| 4 | 张开颖壳 | 绿 | 亮 | 脊部无 | 1. 5~ 2. 0 | 白色 | 114 | 114 | 100 | 23 | 20. 2 |

表 2 不同品种(系)幼胚愈伤组织诱导及状态

| 品种(系) | 接胚数 | 诱导愈伤 | 愈伤组织 | 诱导致密愈伤 | 致密愈伤组织 |
|------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| | (个) | 组织数(块) | 发生率(%) | 组织数(块) | 发生率(%) |
| 运丰早 18 | 200 | 191 | 95.5 | 67 | 33.5 |
| 运丰早 20 | 200 | 183 | 91.5 | 52 | 26.0 |
| 临汾 94 7012 | 200 | 197 | 98.5 | 156 | 78.0 |
| 临汾 94 4293 | 200 | 199 | 99.5 | 143 | 71.5 |
| 临远 93 4731 | 200 | 199 | 99.5 | 170 | 85.0 |
| 临远 93 4736 | 200 | 190 | 95.0 | 162 | 81.0 |
| 临远 95 5093 | 200 | 189 | 94.5 | 149 | 74.5 |
| 临远 95 5088 | 200 | 195 | 97.5 | 143 | 71.5 |
| 临远 95 6132 | 200 | 184 | 92.0 | 151 | 75.5 |
| G15 | 200 | 190 | 95.0 | 172 | 86.0 |
| G54 | 200 | 198 | 99.0 | 168 | 84.0 |
| 京 411 | 200 | 195 | 97.5 | 158 | 79.0 |
| 汾 21 75 | 100 | 91 | 91.0 | 81 | 81.0 |
| 汾 22 23 | 100 | 98 | 98.0 | 75 | 75.0 |
| 汾 23 60 | 100 | 95 | 95.0 | 77 | 77.0 |
| 绵阳 25 | 100 | 95 | 95.0 | 30 | 30.0 |
| 绵阳 26 | 100 | 98 | 98.0 | 36 | 36.0 |
| 莱州 95 3 | 100 | 95 | 95.0 | 53 | 53.0 |
| 豫麦 21 号 | 100 | 98 | 98.0 | 31 | 31.0 |
| 扬麦 158 | 200 | 198 | 99.0 | 175 | 87.5 |
| 甘 94 鉴 64 | 200 | 198 | 99.0 | 181 | 90.5 |
| 晋春 9 号 | 200 | 200 | 100.0 | 182 | 91.0 |
| 晋春 13 号 | 200 | 199 | 99.5 | 178 | 89.0 |
| 89-178 | 200 | 197 | 99.0 | 180 | 90.0 |
| Dean | 100 | 100 | 100.0 | 85 | 85.0 |
| Hereward | 100 | 97 | 97.0 | 81 | 81.0 |
| Calahad | 100 | 98 | 98.0 | 78 | 78.0 |
| Haren | 100 | 94 | 94.0 | 75 | 75.0 |
| Mercia | 100 | 98 | 98.0 | 82 | 82.0 |
| Riband | 100 | 95 | 95.0 | 82 | 82.0 |

注: 接种 14 d 后调查

表 3 是不同幼胚的愈伤组织在继代中进行分化测验的情况。70 d 后的致密愈伤组织的分化能力普遍下降到 50% 左右。运丰早 18 和绵阳 25 继代 42 d 后已无致密愈伤组织。因此, 小麦幼胚的脱分化在不同基因型间没有大的差异, 而脱分化后的细胞的

分生能力和再分化能力在不同基因型间差异很大。

2.3 栽培环境对小麦幼胚愈伤组织诱导和分化的影响

表 4 以晋春 9 号为材料, 列出了同一年分别以温室和大田种植材料以及不同年份大田材料的愈伤组织不同继代时间的分化结果。可以看出, 不同年份间的结果差异较大。也就是说, 除了基因型差异造成的培养难度外, 环境条件的改变也能够较大幅度地调整培养结果。

3 讨论

对于小麦幼胚培养再生体系的研究, 主要集中在基因型、幼胚材料和培养基上。

基因型是小麦幼胚培养中表现最突出的问题, 不同的基因型在致密愈伤组织的诱导和继代维持、分化能力及其保持方面均表现出较大差异^[5, 10, 11]。本试验所试 30 个品种(系)中, 同样表现出了这样的结果。要想为小麦基因转化工作奠定扎实的受体再生体系研究, 应该在大面积推广的优良品种和育种中选育的将要推广的优良品系中进行广泛筛选, 并且根据脱分化细胞团的表层细胞特化性状、内部小细胞团之间结构状况、致密愈伤组织保持特点及胚状体形成和器官发生等特点逐一分类深入研究。

在培养基方面, 小麦幼胚培养多年来一直使用 MS 培养基^[12]。本试验使用的 MB 培养基是对 MS 有机成分进行了调整。在诱导愈伤组织和继代中激素普遍使用 2, 4-D 2 mg/L。从本试验结果看, 栽培环境对致密愈伤组织的保持有一定的影响。我们认为可以从小麦幼胚分化及发育的阶段着手研究, 从而为幼胚内部生理生化状态的改变奠定一些基础。因为幼胚形成后毕竟完成了内部的一系列生理生化反应, 只在培养基上下功夫可能有一定缺欠。

表 3 致密愈伤组织继代不同时间的分化能力

| 品种 | 14 d | | | 42 d | | | 70 d | | |
|-----------|----------------|------------|------------|----------------|------------|------------|----------------|------------|------------|
| | 致密愈伤 组织数(块) | 分化数 (块) | 分化率 (%) | 致密愈伤 组织数(块) | 分化数 (块) | 分化率 (%) | 致密愈伤 组织数(块) | 分化数 (块) | 分化率 (%) |
| 晋春 9 号 | 182 | 176 | 96.7 | 50 | 45 | 90.0 | 50 | 31 | 62.0 |
| 晋春 13 号 | 178 | 167 | 93.8 | 50 | 40 | 80.0 | 50 | 25 | 50.0 |
| 89-178 | 180 | 172 | 95.6 | 50 | 43 | 86.0 | 50 | 28 | 56.0 |
| G54 | 178 | 168 | 94.4 | 50 | 39 | 78.0 | 50 | 23 | 46.0 |
| 扬麦 158 | 175 | 165 | 94.3 | 50 | 42 | 84.0 | 50 | 30 | 60.0 |
| 甘 94 鉴 64 | 181 | 172 | 95.0 | 50 | 44 | 88.0 | 50 | 32 | 64.0 |
| 运丰早 18 | 67 | 41 | 61.2 | 50 | | | | | |
| 绵阳 25 | 30 | 15 | 50.0 | 50 | | | | | |

表 4 栽培环境对小麦幼胚愈伤组织诱导和分化的影响

| 栽培环境 | 14 d | | | 42 d | | | 70 d | | |
|-------------|---------|------|-------|---------|------|-------|---------|------|-------|
| | 致密愈伤 | 分化数 | 分化率 | 致密愈伤 | 分化数 | 分化率 | 致密愈伤 | 分化数 | 分化率 |
| | 组织数(块) | (块) | (%) | 组织数(块) | (块) | (%) | 组织数(块) | (块) | (%) |
| 1996 年(温室) | 182 | 176 | 96. 7 | 50 | 45 | 90. 0 | 50 | 31 | 62. 0 |
| 1996 年(大田) | 180 | 170 | 94. 4 | 50 | 41 | 82. 0 | 50 | 28 | 56. 0 |
| 1997 年(大田) | 90 | 96 | 96. 0 | 50 | 36 | 72. 0 | 50 | 17 | 34. 0 |

幼胚的取材时间对培养效果是非常重要的^[13]。一般以小麦开花后 10~ 14 d 取材^[14]。这是一种较为粗放的做法, 不能把握最佳的取材时机。后来改用了拨出幼胚观察是否处于半透明状态^[15, 16]。这是因为从半透明状态过渡到淡黄只有几个小时的时间。但是逐穗从中部拨一个幼胚观察需耗费大量时间。我们经过大量观察发现, 在幼嫩种子的脊部种皮从很淡的绿色光亮状态转变为嫩绿无光泽又有茸毛的状态时, 是一个绝佳的取材时机。此时幼胚处于透明的后期和半透明前期, 也就是表 1 中的类型 2。再发育一步, 脊部的茸毛变稀, 略有光泽感, 这时的幼胚已进入半透明后期和乳白及淡黄, 幼胚略大, 在表 1 中列为类型 3。之后脊部有光泽而退去茸毛, 此时幼胚盾片中部凸起, 已无取材价值。类型 2 和类型 3 的前期仅有几个小时, 所以每天上午、下午各取一次材料。这一形态指标的发现, 为取材节省了大量时间, 取材时只需观察一下种子脊部状态。我们建议尽量取类型 2 的材料。因为小麦幼胚取材时间非常集中, 取较前期麦穗可整穗保湿 4℃保存, 在 7 d 内可陆续接种, 大大减缓了接种压力。

参考文献:

[1] 肖兴国, 张爱民, 聂秀玲. 转基因小麦的研究进展与展望[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2) : 111- 116.

[2] 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[J]. 山东农业大学学报, 1996, 27(4) : 451- 456.

[3] 王万军, 王文芳, 曹建军, 等. 小麦叶片愈伤组织及其再生植株的诱导[J]. 西北植物学报, 1998, 18(3) : 401- 405.

[4] 蔡润, 中田和男, 平井八十一. 小麦根愈伤组织诱导再生植株[J]. 上海农业学报, 1999, 15(4) : 13- 17.

[5] Caman J G, T efferson N E, Campbell W F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects[J]. Plant Cell Tiss Org Cult,

1987, 10: 101- 113.

[6] Fennell S, Bohorova N, Van Ginkel M, *et al.* Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 163- 169.

[7] Mathias R J, Simpson E S. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1986, 7: 31- 37.

[8] Maheshwari N, Rajyalakshmi K, Baweja K, *et al.* *In vitro* culture of wheat and genetic transformation: retrospect and prospect [J]. Cri Rev Plant Sci, 1995, 14: 149- 178.

[9] Xia G M, Chen H M. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel [J]. Plant Sci, 1996, 120: 197- 203.

[10] Maddock S E, Lancaster V A, Risiott R, *et al.* Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. J Exp Bot, 1983, 34: 915- 926.

[11] Sears R G, Deckard E L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration [J]. Crop Sci, 1982, 22: 546- 550.

[12] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473- 479.

[13] He D C, Yang Y M, Bertram J, *et al.* The histological development of the regenerative tissue derived from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Sci, 1990, 68: 103- 111.

[14] Altpeter F, Vasil V, Saivastava V, *et al.* Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants [J]. Plant Cell Rep, 1996, 16: 12- 17.

[15] 刘少翔, 王卉, 孙玉, 等. 小麦偃麦草簇毛麦黑麦四属杂种的幼胚离体培养及植株再生[J]. 华北农学报, 1998, 13(专刊) : 8- 11.

[16] 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.