

# 冬小麦原生质体培养的胚状体直接发生

葛台明

(湖北民族学院园艺系 恩施 445000)

章荣德 秦发兰 余毓君 谢岳峰

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 冬小麦品种‘京花一号’胚性愈伤组织在改良的 N<sub>6</sub> 培养基(NBD 培养基)上继代得到易碎型胚性愈伤组织,转入改良 MS 液体培养基(MSDL 培养基)后得到胚性悬浮系,分离的原生质体在改良的 MS 培养基(MSDP 培养基)上培养,再生细胞直接产生体细胞胚胎,并再生出完整植株。体细胞胚胎形成过程与小麦合子胚的形成过程十分相似。

**关键词** 冬小麦 京花一号 原生质体培养 体细胞胚胎直接发生 植株再生

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0609-05

原生质体培养是利用遗传操作改良作物的基础。自 1988 年 Harris 等<sup>[1]</sup>利用小麦推广品种“Chris”花药培养的胚性愈伤组织建立胚性悬浮系,分离原生质体培养获得再生植株以来,小麦的原生质体培养研究已取得了巨大的成功,总计十多个小麦品种(系)的原生质体培养已获得了再生植株<sup>[2]</sup>。然而,大多数报道均是由再生细胞产生愈伤组织,再通过愈伤组织的体细胞胚胎发生方式产生再生植株。由原生质体再生细胞直接产生体细胞胚并萌发出再生植株的报道还不多<sup>[3]</sup>。本文报道了典型冬小麦‘京花一号’胚性悬浮系分离原生质体培养直接形成体细胞胚和植株再生的结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料与胚性愈伤组织的诱导

本研究所用小麦材料京花一号由中国科学院遗传研究所欧阳俊闻研究员提供。取处于雌雄蕊分化与形成期的 0.5~1.0 cm 的幼穗,切成 0.3 cm 左右的切段接种于 MSD 培养基上,1 个月后将愈伤组织转移至 NBD 培养基上继代培养,并注意筛选易碎型、生长迅速、表面湿润、呈细颗粒状的胚性愈伤组织(II 型胚性愈伤组织)用于建立胚性悬浮系。培养基、培养方法和条件见文献[4]。

### 1.2 悬浮系的建立、继代和分化

按文献[4]的方法,取胚性愈伤组织 1~2 g,置

于含 20 mL MSDL 液体培养基的 100 mL 无菌三角烧瓶中,在摇床上进行悬浮培养;植株分化采用 NBDR 转 MSD<sub>3</sub> 的方法进行。

### 1.3 原生质体的分离与培养

酶液的组成见表 1。0.45 μm 过滤除菌。原生质体分离、培养、植株分化及培养基同文献[5]。

表 1 酶液组成

Table 1 Composition of enzyme solutions

Composition	Enzyme solution 1	Enzyme solution 2
Cellulase onozuka R-10	1%	0.5%
Cellulase onozuka RS	0	0.5%
Pectinase serva	1%	1%
Pectolyase Y23	0.025%	0.1%
Mannitol	0.5 mol·L <sup>-1</sup>	0.5 mol·L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mmol·L <sup>-1</sup>	10 mmol·L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7 mmol·L <sup>-1</sup>	0.7 mmol·L <sup>-1</sup>
MES	3.0 mmol·L <sup>-1</sup>	3.0 mmol·L <sup>-1</sup>
pH	5.7±0.05	5.7±0.05

## 2 实验结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导、悬浮培养及悬浮系的分化

共计培养了 306 个幼穗切段,愈伤组织的诱导率分别为 100%。愈伤组织在 NBD 培养基上易于

形成易碎型胚性愈伤组织。幼穗愈伤组织经 8 个月的继代培养和筛选,得到了 4 块易碎型胚性愈伤组织,分别编号为 J1 至 J4。

易碎型胚性愈伤组织转入 MSDL 培养基后能很快分散,经 2~4 周液体培养就能形成稳定的悬浮培养物。培养物由数十至数百个细胞的细胞团组成(图版 I-1),无或基本上无较大的愈伤组织块,细胞

呈圆形,细胞壁薄,胞质浓,液泡无或不发达,基本上看不到长形的厚壁细胞,静置片刻后,培养物能很快沉于瓶底,颜色淡黄、鲜艳,上清液透明,瓶壁上基本没有附着物。共得到小麦胚性悬浮系 7 个,分别与易碎型胚性愈伤组织相对应。

检测了 J1 和 J2 两个胚性悬浮系的植株分化,结果见表 2。可见 J2 悬浮系具较高的植株再生能力。

表 2 小麦胚性悬浮系的植株分化

Table 2 Plant regeneration of wheat suspension cultures

Suspensions	No. of calli transferred to regeneration medium	No. of regenerated plantlets	Rate of plant regeneration/%	No. of calli only regenerated roots	Rate of root regeneration/%
J1	30	11	36.7	5	16.7
J2	30	15	50.0	2	6.7

## 2.2 原生质体分离

悬浮细胞转入酶液后 1 h 左右即开始有原生质体释放出来。在酶液 1 中 5~7 h,酶液 2 中 5 h 后悬浮细胞基本上完全酶解,仅剩下一些比较大的颗粒不能酶解,此时原生质体达到最高产量。继续延长酶解时间对于提高原生质体产量没有明显的效果,反而促使原生质体发生自发融合。原生质体产率一般可达每毫升  $1 \times 10^7$  个悬浮细胞以上。两种酶液在原生质体产率上无太大差别,但酶液 1 中自发融合的比例较高,有时可以见到由超过数十个原生质体融合在一起的巨型原生质体,这可能是由于酶液 1 中果胶酶含量偏低的缘故。酶液 2 中基本上看不到巨型原生质体,但仍可见到由 2 至数个原生质体融合在一起的大原生质体。看来酶液中果胶酶活性不足可能是产生高度自发融合的一个重要原因。

刚刚游离出来的小麦原生质体呈淡黄色,球形,细胞质浓厚,质膜光亮,有些原生质体中能较清晰地看到细胞核,无明显的液泡(图版 I-2)。

## 2.3 原生质体的培养与体细胞胚胎发生

培养 24 h 后,大多数原生质体开始再生细胞壁,细胞体积增大并伸长成卵圆形。第 3~4 天开始出现第 1 次分裂,此时少数原生质出现出芽的现象。培养 5~7 d 开始第二次分裂,10 d 左右进行第 3 次分裂。有趣的是,一些液泡化程度较高的再生细胞往往率先分裂(对称)形成类似输导组织的丝状体(图版 I-3、4、5),而那些细胞质比较浓、液泡不明显的再生细胞先积累细胞质内含物,并在稍晚些时开始第 1 次分裂,而且,如果第 1 次分裂是对称的,往往最终形成愈伤组织(图版 I-6、7),如果第 1 次分裂

是不对称的,则在以后的分裂过程中逐渐产生胚状体,其形成过程与小麦合子胚的发育过程十分类似<sup>6</sup>(图版 I-8、9,图版 II-1~7)。

15 d 左右,原生质体形成小细胞团,有些分裂比较快的能肉眼可见。以后,这些细胞团迅速增大,到 30~40 d 时,许多细胞团的直径超过了 1 mm(图版 II-8),可转入分化培养基进行植株分化培养。

第 15 天统计原生质体分裂频率,一般在 8%~15% 之间,很难见到分裂频率低于 8% 的情形,要么就根本没有分裂。

## 2.4 原生质体再生胚状体和愈伤组织的分化

从 30 d 起,将直径在 1 mm 左右的再生胚状体和愈伤组织转入 MSD<sub>3</sub> 培养基进行植株分化培养。转入 MSD<sub>3</sub> 培养基后,胚状体迅速萌发出再生植株(图版 II-9)。一般从转入 MSD<sub>3</sub> 培养基到萌发成再生植株仅需 2 周左右的时间,最短的可在第 10 天萌发成植株。再生愈伤组织在分化培养基上分化植株的速度明显较胚状体慢,而且易于继续增殖,产生细砂状次生愈伤组织。这些愈伤组织经更换新鲜分化培养基后,部分愈伤组织能继续分化出再生植株。

## 3 讨 论

目前,小麦原生质体培养技术已取得了较大的突破,小麦体细胞杂交工作也开始有所报道<sup>7~9</sup>。小麦原生质体培养再生植株有两条途径:愈伤组织途径和胚状体发生途径,我们曾发现这两条途径的并存,并认为悬浮细胞状态可能是决定原生质体再生植株途径的原因<sup>5</sup>,本文首次在典型冬性小麦品种“京花一号”上实现了原生质体培养再生细胞

的胚状体直接发生,这再次说明小麦原生质体培养中,再生细胞直接形成胚状体的途径可能是形成再生植株的一条普遍途径。原生质体培养中再生细胞通过直接体细胞胚胎发生的方式形成再生植株有着重要的意义,可显著缩短从原生质体分离到植株再生的过程,减少培养过程中的无性系变异。

在我们的实验中很少观察到分裂率低于 8% 的情况,要么就根本不发生分裂,这可能是原生质体培养的密度效应所造成的。我们推测,在密度效应中,除总密度外,能进行分裂的原生质体可能也有一个

最小密度。只有当不低于 8% 左右的原生质体[相当于每毫升培养基中有  $(2.4 \sim 4.0) \times 10^4$  个原生质体]具有启动分裂的潜能,再生细胞才能启动并进行持续分裂,最终发育成再生胚状体(或愈伤组织);当具有分裂潜能的原生质体数低于这个比例时,即使总密度达到了培养要求,也不能启动分裂,从而产生分裂频率只在 8% ~ 15% 之间波动的现象。这一推测也有助于说明为什么只有在悬浮系继代后 3 d 左右分离原生质体较有利于原生质体启动分裂。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Harris R, Wright M, Byrne M *et al.* *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 337~340
- [ 2 ] 刘文轩, 刘大钧. 国外农学——麦类作物, 1994, 6: 34~37
- [ 3 ] LI Z Y, XIA G M, CHEN H M, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28: 79~85
- [ 4 ] 葛台明, 余毓君. 武汉植物学研究, 1995, 13(3): 193~197
- [ 5 ] 朱根发, 葛台明, 余毓君. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 315~321
- [ 6 ] 胡适宜. 被子植物胚胎学, 北京: 高等教育出版社, 1982, pp. 184~185
- [ 7 ] 葛台明, 余毓君, 谢岳峰等. 华中农业大学学报, 1997, 16(2): 105~111
- [ 8 ] CHEN H M, XIA G M, In: XU Z H, CHEN Z H. (eds), *Plant Biotechnology for Sustainable Development of Agriculture——Proceedings of 2nd Asia-Pacific Conference on Plant Cell and Tissue Culture*, China Forestry Publishing House, Beijing, 1996, pp. 97~103
- [ 9 ] 周爱芬, 夏光敏, 陈惠民. 科学通报, 1995, 40(6): 575~576

## Direct Embryogenesis from Protoplast of Winter Wheat

GE Tai-Ming

(Department of Horticulture, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000)

ZHANG Rong-De QIN Fa-Lan YU Yu-Jun XIE Yue-Feng

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** Friable embryogenic calli were obtained on a modified  $N_6$  medium (NBD medium) from a winter wheat cultivar "Jinghua No. 1" (*Triticum aestivum* L. cv. Jinghua No. 1) and were transferred to a modified MS liquid medium (MS-DL medium) to initiate embryogenic suspension cultures. Protoplasts were isolated from the suspensions and cultured on a modified MS medium (MSDP medium). The somatic embryoids were formed directly from the protoplasts and germinated into entire plants. The development of the somatic embryoids was very similar to that of zygotic embryos of wheat.

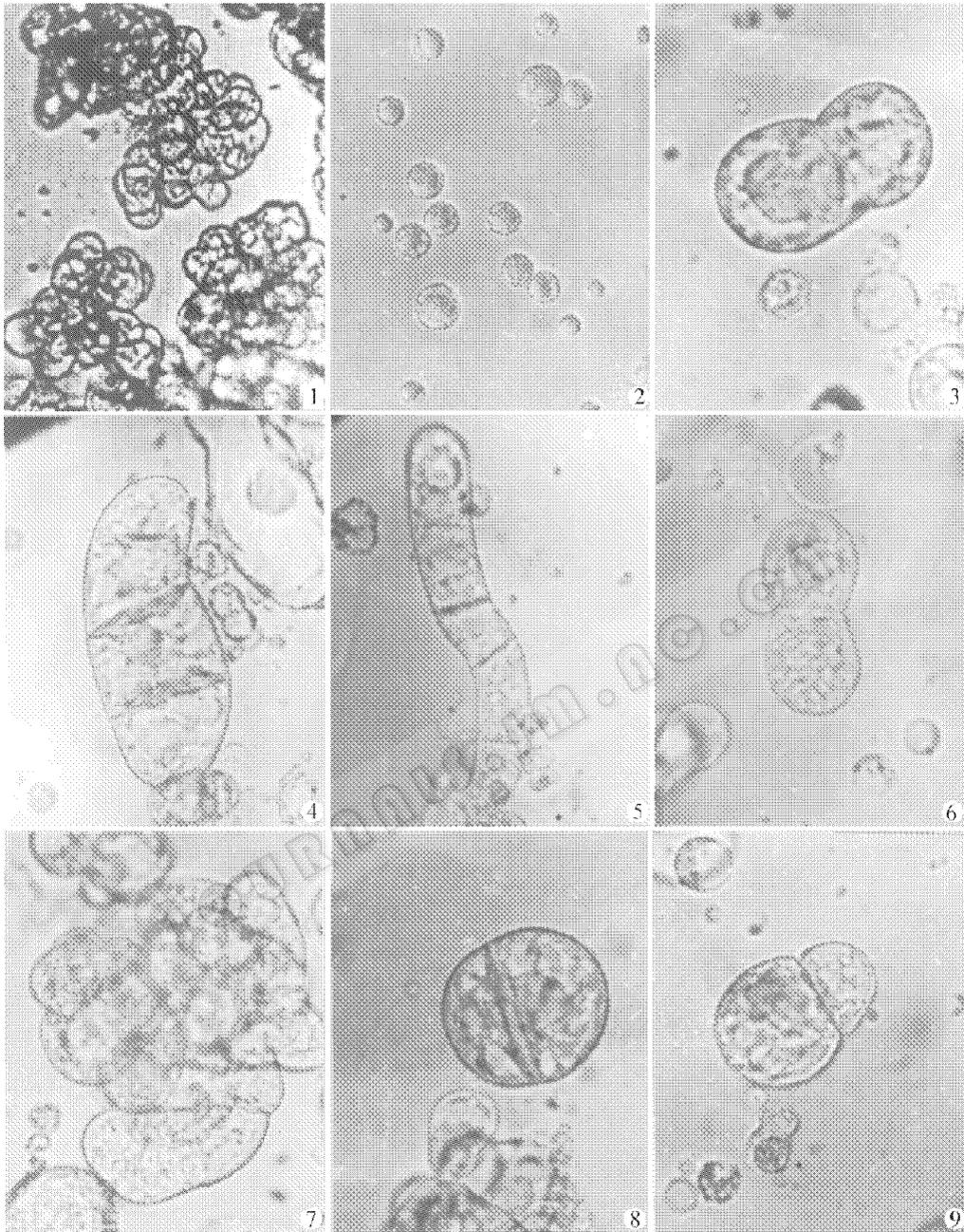
**Key words** Winter wheat (*Triticum aestivum* L.), Jinghua No. 1, protoplast culture, direct somatic embryogenesis, plant regeneration

## 葛台明等:冬小麦原生质体培养的胚状体直接发生

图版 I

GE Tai-Ming *et al.* Direct embryogenesis from protoplast of winter wheat

Plate I



图版说明:图1:分离原生质体前的悬浮细胞;图2:刚刚游离的原生质体;图3、4、5:液泡化程度较高的再生细胞的第一次分裂,分裂面与再生细胞纵轴垂直(图3),第二次分裂的分裂面与第一次分裂相同,形成直线排列的4个子细胞(图4),进一步分裂形成丝状体(图5);图6、7:内含物较丰富的再生细胞的第一次对称分裂(图6),最终形成愈伤组织(图7);图8:内含物丰富的再生细胞的第一次对称分裂,进一步可能形成致密的胚性愈伤组织或球形的胚状体(见图版II-6b);图9:不对称的第一次分裂,分裂面与纵轴不垂直

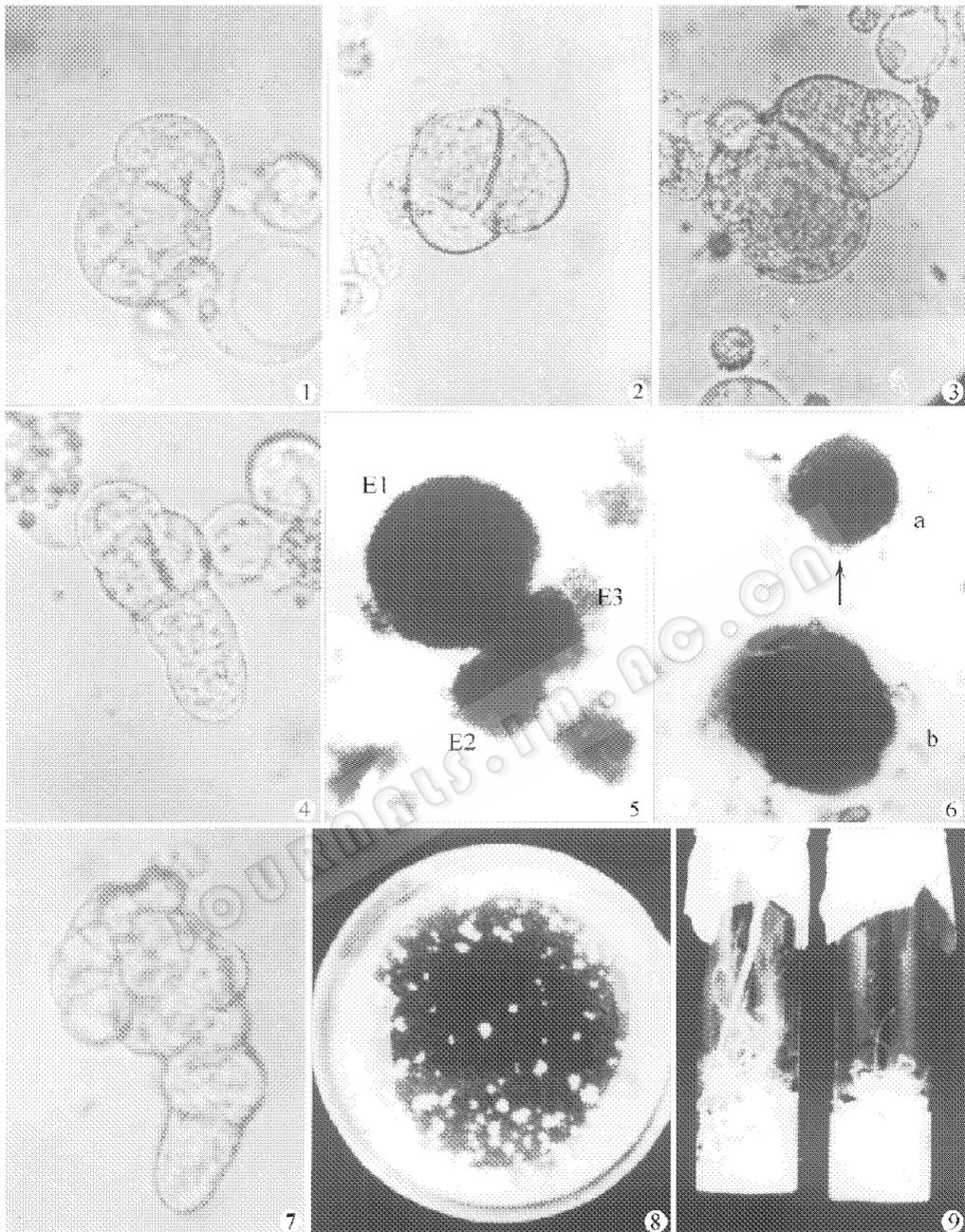
Explanation of Plate I: Fig. 1: Suspension cells before protoplast isolation. Fig. 2: Freshly isolated protoplasts. Fig. 3~5: Division of the vacuolized cells. Fig. 3: First division, the new wall was vertical to the cell axle. Fig. 4: Second division, the origination of the second division was the same to the first division. Fig. 5: Third division, the 4 cells were line up, filamentary structure. Fig. 6~7: Callus formation. Fig. 6: First equal division of a cell that was rich in cytoplasm. Fig. 7: Callus from the division. Fig. 8: First equal division of a cell. Fig. 9: First unequal division of a cell. The new wall was not vertical to the cell axle.

葛台明等 :冬小麦原生质体培养的胚状体直接发生

图版 II

GE Tai-Ming *et al.* Direct embryogenesis from protoplast of winter wheat

Plate II



图版说明 : 图 1 : 另一个细胞的不对称的第一次分裂 , 分裂面与纵轴不垂直 ; 图 2、3、4、7 : 第一次不对称分裂的第二次分裂 , 分裂面与第一次分裂的分裂面垂直 , 子细胞呈“ T ”形排列 ( 图 2、3 ) ; 顶部的细胞进行第三次分裂 ( 图 4 ) , 并进一步形成原胚 ( 图 7 ) ; 图 5 : 簇状联体胚状体 ( E1 : 主胚状体 ; E2、E3 : 次生的胚状体 ) ; 图 6 : 球形胚状体 ( 箭头示胚柄结构 ) ; 图 8 : 肉眼可见的再生结构 ; 图 9 : 再生植株

Explanation of Plate II : Fig. 1 ~ 4、7 Embryoid formation. Fig. 1 : Another example of first unequal division. Fig. 2、3 Second division led to form T-shaped 3-cell proembryos. Fig. 4 : Third division of the T-shaped proembryo. Fig. 7 : A proembryo with a suspensor. Fig. 5 : Multiembryoid ( E1 : the main embryoid ; E2、E3 : secondary embryoids ). Fig. 6 : Globular embryoids ( the arrow indicates the suspensor ). Fig. 8 : Visible embryoids and calli from protoplast. Fig. 9 : Regenerated plants.