

吴晓军,胡喜贵,陈向东,等. 小麦成熟胚再生体系优化效果评价及高再生率基因型筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):74-77.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.015

# 小麦成熟胚再生体系优化效果评价 及高再生率基因型筛选

吴晓军, 胡喜贵, 陈向东, 姜小苓, 丁位华, 李 淦, 茹振钢

(河南科技学院小麦中心/河南省现代生物育种协同创新中心, 河南新乡 453003)

**摘要:**为了对小麦成熟胚的再生优化体系进行培养效果评价及筛选高再生率基因型,以 7 个小麦品种成熟胚为材料,采用常规和优化 2 种培养基体系,研究 3 种胚处理方式对成熟胚出愈率、分化率及再生率的影响。结果表明:优化培养基体系组织培养效果显著优于常规培养基体系;胚处理方式与基因型之间可能存在一定的互作关系,特定基因型品种采用不同胚处理方法,其组织培养效果差异明显,且不同品种的最适胚处理方式可能不同。在供试的 7 个品种中,矮抗 58、济麦 22、百农 419、百农 160 和周麦 22 在经完整胚法处理,分化率均达到 50% 以上,再生率均达到 25% 以上,其中以矮抗 58 和百农 160 最优,再生率分别达到 51.74%、43.84%。而采用纵半切略带胚乳法时,宝丰 7228 和中麦 175 的分化率和再生率均较完整胚法有了较大提升,分别达到 62.89%、56.79% 和 26.88%、36.75%。说明特定基因型品种须要找到最适合的胚处理方法,以充分挖掘其再生能力,获得的高再生率小麦品种可用于遗传转化研究。

**关键词:**小麦;成熟胚;基因型;再生体系;再生率;分化率

**中图分类号:** S512.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)11-0074-04

小麦是世界主要粮食及饲料作物之一,不断改善小麦营养品质和提高产量潜力始终是小麦遗传改良的中心任务,而相关有利基因的发掘和利用是关键环节。目前,随着小麦全基因组序列的公布,大量基因被挖掘出来,迫切须要进行功能

鉴定和利用研究。因此,建立稳定高效的组织培养再生体系将会极大地推进小麦功能基因组学和遗传转化研究。

不同外植体对组织培养再生有很大影响,目前小麦幼穗、盾片、幼叶、根尖分生组织、花药、幼胚、成熟胚等都被成功应用于小麦组织培养中<sup>[1-2]</sup>,其中小麦幼胚是最常用的外植体,它具有操作简单、愈伤诱导及植株再生能力强的特点,被认为是最为理想的组织培养材料,然而小麦幼胚的获得受时间、空间和季节条件的限制,并且难以判断籽粒发育阶段是否一致;另外,小麦幼胚周年利用须要使用人工气候室,建造和维持成本较高,这在一定程度上限制了幼胚在遗传转化中的应用<sup>[3]</sup>。而小麦成熟胚具有发育状态一致、不受季节限制、可以大量获取的优点,是进行小麦遗传转化最为方便利用的受体材料。

目前,对小麦成熟胚的组织培养研究主要集中于种子预

收稿日期:2018-02-08

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0100705);河南省高等学校重点科研项目(编号:16A210047);河南省新乡市科技重大专项(编号:ZD17005);河南科技学院引进高层次人才科研启动项目(编号:201010615002)。

作者简介:吴晓军(1980—),男,河南固始人,博士,讲师,主要从事小麦单倍体育种技术研究。E-mail:jdfs30@163.com。

通信作者:茹振钢,教授,硕士生导师,主要从事小麦遗传育种和杂种优势利用研究。E-mail:rzgh58@163.com。

[7] Hao J, Xue C, He L, et al. Bioinformatics insight into the spike glycoprotein gene of field porcine epidemic diarrhea strains during 2011—2013 in Guangdong, China[J]. Virus Genes, 2014, 49(1): 58-67.

[8] Tian P F, Jin Y L, Xing G, et al. Evidence of recombinant strains of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2013[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(10): 1735-1738.

[9] Li Z L, Zhu L, Ma J Y, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in South China[J]. Virus Genes, 2012, 45(1): 181-185.

[10] 田野, 苏丹萍, 蒋 伟, 等. 华南地区猪流行性腹泻病毒的分离鉴定及其 S 基因抗原表位片段的遗传变异分析[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(5): 3-5, 8.

[11] 孙东波, 陈建飞, 时洪艳, 等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白受体结合域的分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(4): 528-532.

[12] Sun D B, Feng L, Shi H Y, et al. Spike protein region (aa 636-789) of Porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of

neutralizing antibodies[J]. Acta Virologica, 2007, 51(3): 149-156.

[13] Sun D B, Feng L, Shi H Y, et al. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 131(1/2): 73-81.

[14] 郑逢梅, 霍金耀, 赵 军, 等. 2010—2012 年华中地区猪流行性腹泻病毒分子特征和遗传进化分析[J]. 病毒学报, 2013, 29(2): 197-205.

[15] Du L, Zhao G, Kou Z, et al. Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development[J]. Journal of Virology, 2013, 87(17): 9939-9942.

[16] Gao Y Y, Kou Q W, Ge X N, et al. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China[J]. Archives of Virology, 2013, 158(3): 711-715.

[17] Belouzard S, Millet J K, Licitra B N, et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein[J]. Viruses, 2012, 4(6): 1011-1013.

处理温度<sup>[4-5]</sup>、胚切割接种方式<sup>[1,6-9]</sup>、愈伤诱导培养基成分<sup>[10-12]</sup>、外源激素种类及浓度配比<sup>[13-14]</sup>等方面,获得了一些研究进展。然而,成熟胚愈伤组织的分化率普遍低于幼胚,能够用于遗传转化研究的小麦基因型还很少,这些仍然是小麦成熟胚组织培养需要解决的主要问题。本研究以 7 个小麦品种为材料,在优化再生体系的基础上,探讨成熟胚切割方式对不同基因型小麦植株再生的影响,筛选其中的高再生率基因型,以期建立稳定高效的小麦成熟胚组织培养再生体系提供一些科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2017 年 6—11 月在河南科技学院内进行。供试材料为近年来适宜黄淮海区种植的 7 个优良小麦品种,包括百农矮抗 58、周麦 22、济麦 22、百农 419、百农 160、中麦 175、和宝丰 7228,均由河南科技学院杂交小麦工程中心提供。

本研究使用 2 套培养基体系。一是常规培养基体系,包括诱导(MSI)、继代(MSS)、分化(MSD)、生根(MSR) 4 种培养基,主要以 MS 为基本成分,辅加 500 mg/L 水解酪蛋白。MSI 培养基,MS + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 2 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂,pH 值为 5.8;MSS 培养基,MS + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂,pH 值为 5.8;MSD 培养基,MS + 500 mg/L 水解酪蛋白 + 2 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂,pH 值为 5.8;MSR 培养基,1/2MS + 20 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂,pH 值为 5.8。

二是优化培养基体系,包括 Adi 诱导培养基<sup>[12]</sup>、继代(SM)培养基、分化(DM)培养基、生根(RM)培养基。Adi 诱导培养基,MS(不含维生素) + 2 mg/L 2,4-D + 5 mg/L 谷氨酰胺 + 0.5 g/L 水解酪蛋白 + 15 g/L 山梨醇 + 15 g/L 甘露醇 + 0.75 g/L MgCl<sub>2</sub> + 维生素 B5(10 mg/L 维生素 B1 + 1 mg/L 维生素 B6 + 1 g/L 维生素 B3) + 2 mg/L 甘氨酸 + 4 mg/L 硝酸银 + 40 mg/L 半胱氨酸 + 100 mg/L 维生素 C + 39 mg/L 乙酰丁香酮 + 20 g/L 葡萄糖 + 7 g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8;SM 培养基,MS(不含维生素) + 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L 甘氨酸 + 0.5 mg/L 维生素 B1 + 0.25 mg/L 维生素 B6 + 0.25 mg/L 维生素 B3 + 100 mg/L 肌醇 + 20 g/L 蔗糖 + 4 mg/L 硝酸银 + 7 g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8;DM 培养基,MS(不含维生素) + 5 mg/L ZT + 0.5 mg/L IAA + 0.5 mg/L 维生素 B1 + 0.25 mg/L 维生素 B6 + 0.25 mg/L 维生素 B3 + 2 mg/L 甘氨酸 + 100 mg/L 肌醇 + 4 mg/L 硝酸银 + 20 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8;RM 培养基,1/2MS(不含维生素) + 0.5 mg/L 多效唑(MET) + 0.2 mg/L IAA + 0.5 mg/L 维生素 B1 + 0.25 mg/L 维生素 B6 + 0.25 mg/L 维生素 B3 + 1 mg/L 甘氨酸 + 50 mg/L 肌醇 + 20 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉,pH 值为 5.8。

### 1.2 种子灭菌及组织培养方法

选取外观健康、籽粒饱满、大小一致、当年收获的小麦种子,在实验室自来水下冲洗干净,加入 70% 乙醇处理 1 min、灭菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1% 氯化汞处理 5 min,无菌水冲洗 4~5 次,处理完毕后加入适量无菌水,用封口膜封口,过夜浸泡 15~20 h。次日,在超净台上用 70% 乙醇处理 1 min、灭

菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1% 氯化汞处理 5 min,无菌水冲洗 4~5 次,放置于存有无菌滤纸的培养皿内备用。

剥胚处理采用 3 种方法:(1)完整胚法。用镊子和解剖刀剥取完整胚,盾片向上接种。(2)纵半切略带胚乳。先沿胚轴切约 1/2,取胚时带一小块胚乳,盾片向上接种。(3)成熟胚刮碎法。使用解剖刀将成熟胚刮碎接种。

本研究使用常规培养基体系和优化培养基体系,将胚接种在诱导培养基(MSI 或 Adi)上,在 25℃ 条件下,暗培养 10 d 诱导愈伤,然后转移到继代培养基(MSS 或 SM)上培养 2 周(12 h 光照/12 h 黑暗,25℃),挑选淡黄色、致密的胚性愈伤组织转移至分化培养基(MSD 或 DM)上(14 h 光照/10 h 黑暗,25℃),2 周继代 1 次,待分化成苗后转移至生根壮苗培养基(MSR 或 RM)上进行生根培养。

本研究首先对 4、25℃ 下小麦种子预处理再生效果进行评价,具体是将周麦 22、百农矮抗 58 各接种 150 粒于常规培养基体系进行培养,试验结果确定 4℃ 过夜浸泡处理效果较好。后续试验均在 4℃ 下进行小麦种子预处理,每个处理接种 60 个左右的成熟胚,重复 3 次。

### 1.3 统计分析方法

试验采用 3 种剥胚处理方法,各品种每个处理接种 3 瓶,每瓶约 20 个成熟胚,设置 3 个重复。使用 DPS 7.05 软件进行数据处理,方差分析采用 Turkey 检验。3 个统计项目出愈率、分化率和再生率的计算方法如下:

出愈率 = 形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数 × 100%;

分化率 = 分化绿芽的外植体数/接种外植体数 × 100%;

再生率 = 再生苗数/接种愈伤组织块数 × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浸种温度和不同胚处理方式对愈伤诱导及分化的影响

以小麦品种矮抗 58 和周麦 22 成熟胚为材料,采用常规培养基体系进行培养,研究并验证不同浸种温度、不同胚处理方式对小麦成熟胚再生培养的影响。

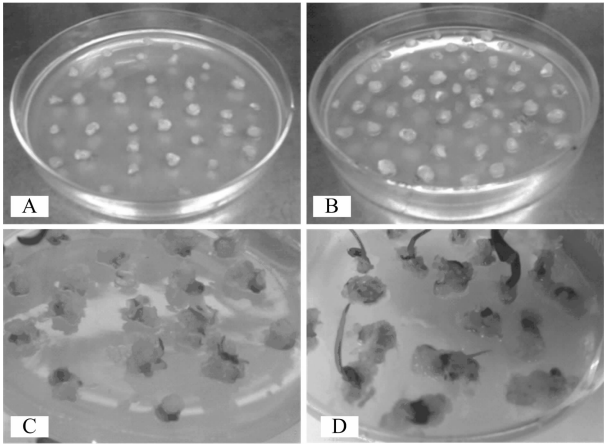
2 个品种在 4、25℃ 下进行预处理,取完整胚进行接种培养,结果(表 1、图 1)显示,经 4℃ 预处理后,2 个品种的出愈率和分化率均高于 25℃ 预处理。再将 2 个品种种子进行 4℃ 过夜浸泡,采用完整胚法、纵半切略带胚乳法和成熟胚刮碎法处理,再生培养结果显示,纵半切略带胚乳法的愈伤诱导率和分化率均略高于完整胚法,成熟胚刮碎法最低(表 2)。可以看出,基于常规培养基体系,小麦种子经 4℃ 预处理 15~20 h,采用纵半切略带胚乳法取胚是最优培养方法。然而,2 个品种的分化率都还较低,无法满足成熟胚再生培养和遗传转化研究的需要。

表 1 不同温度下浸泡对成熟胚愈伤组织诱导及分化的影响

品种	4℃		25℃	
	出愈率(%)	分化率(%)	出愈率(%)	分化率(%)
矮抗 58	96.14	11.09	93.18	8.34
周麦 22	93.19	12.85	92.10	7.48

### 2.2 小麦成熟胚再生体系优化和优良基因型的筛选

为了进一步探索更适于小麦成熟胚组织培养的培养基体系、接种前胚处理方法及筛选高再生率小麦基因型,本研究采



A—常规培养基体系中愈伤诱导情况；B—优化培养基体系中愈伤诱导情况；C—常规培养基体系中分化情况；D—优化培养基体系中分化情况

图1 不同培养基体系中矮抗 58 成熟胚的愈伤诱导及分化效果

用改进的优化培养基体系,以矮抗 58、周麦 22、济麦 22、百农 419、百农 160、中麦 175、和宝丰 7228 7 个小麦品种为材料,进行 3 种胚处理方式下的再生培养效果和影响研究,以期建立高效广适的小麦成熟胚再生体系提供参考。

研究结果(表 3、图 1)显示,除中麦 175(完整胚法)、百农 419(纵半切略带胚乳法)和百农 160(成熟胚刮碎法)出愈率较低外,其他品种の出愈率均在 85% 以上。在不同胚处理方法下,7 个品种分化率为 34.97% ~ 80.11%,其中矮抗 58 采用完整胚法时最高,为 80.11%。除百农 160(纵半切略带胚乳法)及矮抗 58、济麦 22、百农 419、百农 160、周麦 22(成熟胚刮碎法)再生率较低外,其他品种的再生率均在 20% 以上,其中矮抗 58 最高,达 51.74%。此外,采用常规培养基和优化培养基培养,矮抗 58 和周麦 22 の出愈率无明显差异,均达到 90% 以上;而与常规培养基相比,分化率在优化培养基中获得较大提高,提高幅度分别达到 71.22% 和 26.79%(完整胚法)、45.52% 和 33.29%(纵半切略带胚乳法)、45.12% 和

表 2 不同胚处理方式对成熟胚愈伤组织诱导及分化的影响

品种	完整胚法		纵半切略带胚乳法		成熟胚刮碎法	
	出愈率(%)	分化率(%)	出愈率(%)	分化率(%)	出愈率(%)	分化率(%)
矮抗 58	92.78 ± 3.14	8.89 ± 3.42	93.99 ± 2.04	10.38 ± 3.37	89.07 ± 2.79	7.10 ± 3.09
周麦 22	91.67 ± 4.08	11.11 ± 2.08	92.35 ± 2.79	12.02 ± 2.04	88.89 ± 4.16	7.78 ± 2.83

表 3 不同取胚方式对不同基因型小麦植株再生的影响

品种	完整胚法			纵半切略带胚乳法			成熟胚刮碎法		
	出愈率(%)	分化率(%)	再生率(%)	出愈率(%)	分化率(%)	再生率(%)	出愈率(%)	分化率(%)	再生率(%)
矮抗 58	93.01 ± 1.52a	80.11 ± 2.01a	51.74 ± 3.83a	89.23 ± 1.26a	55.90 ± 1.92abc	23.60 ± 2.47bc	88.33 ± 2.72ab	52.22 ± 2.08a	14.57 ± 1.70bc
济麦 22	96.72 ± 1.34a	60.66 ± 3.54b	29.36 ± 3.36bc	92.47 ± 2.01a	63.44 ± 4.02a	25.63 ± 3.36bc	87.43 ± 2.04ab	42.08 ± 2.79ab	10.71 ± 3.23c
百农 419	91.53 ± 1.98a	56.08 ± 4.55bc	25.52 ± 6.14c	75.76 ± 2.27b	50.30 ± 5.21bc	22.05 ± 0.45bc	86.79 ± 4.08ab	47.17 ± 1.54ab	15.30 ± 2.67bc
百农 160	93.89 ± 2.08a	61.11 ± 2.83b	43.84 ± 2.50ab	88.71 ± 2.28a	48.92 ± 2.74c	15.13 ± 0.96c	79.89 ± 1.98b	36.51 ± 3.89b	10.56 ± 2.24c
中麦 175	80.51 ± 2.61b	47.18 ± 3.84c	22.31 ± 3.23c	87.65 ± 3.81a	56.79 ± 0.87abc	36.75 ± 3.87a	90.20 ± 3.20a	50.98 ± 4.80a	24.57 ± 1.84a
宝丰 7228	93.99 ± 2.04a	44.81 ± 4.09c	21.67 ± 3.95c	93.71 ± 0.89a	62.89 ± 4.71ab	26.88 ± 5.23ab	91.67 ± 2.40a	46.79 ± 6.35ab	21.66 ± 2.34ab
周麦 22	92.06 ± 2.24a	53.44 ± 2.70bc	37.90 ± 9.13abc	91.15 ± 1.47a	45.31 ± 4.60c	21.18 ± 2.49bc	93.44 ± 3.54a	34.97 ± 2.04b	11.65 ± 1.19c
平均值	91.67A	57.63A	33.19A	88.38A	54.79AB	24.46AB	88.25A	44.39B	15.57B

注:使用 Turkey's 法进行方差分析;表中数据均为样本均值;同列数据后不同小写字母表示不同小麦基因型之间在 0.05 水平差异显著;最后一行均值后的不同大写字母表示 3 个统计项目的不同取胚方式之间在 0.05 水平差异显著。

27.19%(成熟胚刮碎法)。综合以上结果表明,小麦成熟胚基于优化培养基体系的再生培养效果全面优于常规培养基体系,且优化培养基体系对大多数小麦基因型的再生培养具有相对较好的通用性。

本研究中各处理内部进行了方差齐性检验,结果显示,P 值均大于 0.05,可进行方差分析。由表 3 可以看出,7 个品种的平均出愈率在不同胚处理方式间差异并不显著;完整胚法的平均分化率、平均再生率均与成熟胚刮碎法差异达到显著水平,纵半切略带胚乳法与其他 2 种胚处理方法差异均不显著。综合分析表明,7 个品种的平均出愈率、分化率及再生率为完整胚法 > 纵半切略带胚乳法 > 成熟胚刮碎法;不同小麦基因型的最适胚处理方式可能不同,具体来说,矮抗 58、济麦 22、百农 419、百农 160 和周麦 22 适于采用完整胚法处理,中麦 175 和宝丰 7228 适于采用纵半切略带胚乳法处理;成熟胚刮碎法还须进一步摸索再生培养条件和影响因素。

3 讨论与结论

目前,小麦遗传转化研究中成功应用且农艺性状较优的受体材料相对较少,育种利用较为困难,因此,在生产推广品种中筛选同时具有高再生能力和优良农艺性状的小麦基因型具有重要价值。

当年收获的小麦经脱粒晒干后,其成熟胚与胚乳结合紧密且较为干瘪,剥取困难,一般都须采取过夜浸种处理,这个过程中种子吸水膨胀、从休眠状态恢复到生长状态。栗聪等在 4、25 ℃ 温度下对小麦种子分别进行 6、25 h 浸种处理,结果显示接种前 4 ℃ 处理 15 h 再生效果最佳<sup>[15]</sup>。李映辉等在 4 ℃ 温度下对小麦进行了 4 个时间水平(0、12、24、48 h)的浸种处理,发现经 12、24 h 低温处理的小麦成熟胚诱导愈伤再生效果最好<sup>[9]</sup>。本研究的结果与上述研究一致,经 4 ℃ 过夜处理 15 ~ 20 h 的小麦品种比 25 ℃ 处理有更好的诱导再生效

果。但也有研究发现,未经浸泡的干种子剥胚接种后的再生效果优于浸泡过的种子<sup>[10]</sup>。因此,作为建立高效诱导再生体系的一个环节,有必要进一步扩大样本量,对干种子直接剥胚与低温浸泡处理的诱导再生效果进行评价和比较,明确成熟胚的最佳预处理方式。

培养基提供外植体材料再生所需的营养物质,同时具有渗透调节和支撑作用。为了进一步提高再生培养效率,对培养基中的成分进行优化十分必要。本研究使用了 2 套培养基体系,在成分组成上具有较大差异。优化培养基体系中的愈伤诱导培养基为 Adi 培养基<sup>[12]</sup>,与原培养基成分相比,笔者用 2,4-D 替换麦草畏(Dicamba)以降低培养基成本。在优化培养基中添加  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Ag}^+$  具有抑制乙烯对多胺合成的干扰作用,能够间接促进多胺的合成积累,改善愈伤褐化情况,提高植物再生效率<sup>[16]</sup>。一些研究表明,在组织培养的诱导培养基中加入  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  等金属离子对小麦愈伤组织分化发生具有积极的正向作用<sup>[17-18]</sup>。

在小麦成熟胚再生体系完善过程中,胚处理方式是一个重要的研究内容。最初的研究多采用完整胚法进行接种,植株再生频率较低<sup>[19]</sup>。于是研究者们逐渐发展出成熟胚切割接种<sup>[6,11]</sup>、胚乳支撑接种<sup>[1,4]</sup>、成熟胚刮碎<sup>[5,20]</sup>等方法,获得了较完整胚接种法更好的组织培养效果。小麦基因型是影响胚性愈伤组织诱导及再生的重要内在因素之一。Henry 等的研究表明,小麦愈伤组织再生能力是受多个基因调控的复杂数量性状<sup>[21]</sup>。Özgen 等的研究认为,胚性愈伤率、分化率和再生率受到基因型的影响<sup>[22]</sup>。本研究的结果显示,基于相同培养,不同基因型小麦品种的出愈率一般差异不明显,而分化率、再生率品种之间可能差异显著;在某一特定胚处理方式下分化率、再生率表现较好的品种,采用另一种胚处理方式的再生培养效果可能表现一般,存在胚处理方式与基因型的互作现象。如本试验中矮抗 58、济麦 22、百农 419、百农 160 和周麦 22 采用完整胚法时表现较好,分化率达到 50% 以上,而中麦 175 和宝丰 7228 表现一般;采用纵半切略带胚乳法时,中麦 175 和宝丰 7228 的分化率、再生率较完整胚法均有较大提升,表现较好。因此,本研究认为,基因型是影响成熟胚再生能力的主要因素之一,但胚处理方式与基因型之间可能存在着一定的互作关系,对特定基因型品种须要进行多种胚处理方式下的再生效果评价,找到最适合的胚处理方法,以将基因型的再生能力最大化,这为遗传转化研究提供了更多的受体材料,进一步促进小麦遗传育种研究。

## 参考文献:

- [1] Özgen M, Türet M, Altınok S, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18(3/4): 331-335.
- [2] Mendoza M G, Kaeppler H F. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant), 2002, 38(1): 39-45.
- [3] Birsin M A, Ozgen M. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (*Xtriticosecale Wittmack*) [J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2004, 9(2): 353-361.
- [4] Özgen M, Türet M, Özcan S, et al. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes[J]. Plant Breeding, 1996, 115(6): 455-458.
- [5] Ding L P, Li S C, Gao J M, et al. Optimization of *Agrobacterium* - mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(1): 29-36.
- [6] Delporte F, Mostade O, Jacquemin J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 67(1): 73-80.
- [7] 陈军营, 尹海燕, 梁静静, 等. 不同预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响[J]. 河南农业科学, 2005, 34(1): 19-21.
- [8] 廖祥儒, 郭中伟, 杜建芳, 等. 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.
- [9] 李映辉, 宋娜, 王瑜晖, 等. 小麦成熟胚培养方法的优化及其在小麦遗传转化中的应用[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(1): 6-12.
- [10] Yu Y, Wang J, Zhu M L, et al. Optimization of mature embryo - based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China [J]. Plant Breeding, 2008, 127(3): 249-255.
- [11] Zale J M, Borchardt - Wier H, Kidwell K K, et al. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2004, 76(3): 277-281.
- [12] Yin G X, Wang Y L, She M Y, et al. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(1): 9-17.
- [13] Filippov M, Miroshnichenko D, Vernikovskaya D, et al. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2006, 84(2): 213-222.
- [14] 张伟. 小麦组织培养再生体系及单倍体植株诱导技术优化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [15] 栗聪, 雒景吾, 张磊, 等. 小麦成熟胚再生体系优化及优良受体基因型筛选[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(5): 583-590.
- [16] Zhang P, Fu A G, Wang A G. Role and possible mechanism of  $\text{AgNO}_3$  in plant culture *in vitro* [J]. Plant Physiology Communications, 1997, 35(5): 376-379.
- [17] 杨筱, 孟亚雄, 马小乐, 等.  $\text{CuSO}_4$  和 EDTA-Fe 对小麦成熟胚再生体系的影响[J]. 分子植物育种, 2016, 14(3): 679-686.
- [18] 杨素欣, 王振镒. 盐胁迫下小麦愈伤组织生理生化特性的变化[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(2): 48-51.
- [19] Delporte F, Li S R, Jacquemin J M. Calluses initiated from thin mature embryo fragments are suitable targets for wheat transformation as assessed by long-term GUS expression studies [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2005, 80(2): 139-149.
- [20] 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.
- [21] Henry Y, de Buyser J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1985, 4(6): 307-310.
- [22] Özgen M, Türet M, Avci M. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of callus from winter wheat mature embryos [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 64(1): 81-84.