

小麦不同外植体的组织培养效果研究

李根英^{1,2,3}, 黄承彦³, 隋新霞³, 何中虎^{2,4}, 孙其信¹, 夏先春²(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100084; 2. 中国农科院作物科学所/国家小麦改良中心, 北京 100081;
3. 山东省农科院作物研究所, 济南 250001; 4. 国际小麦玉米改良中心中国办事处, 北京 100081)

摘要:良好的组织培养效果是提高植物基因转化效率的基础。以山东省近年来育成并大面积推广的 10 个优良品种(系)为材料, 对这些品种的花药、幼穗、幼胚和成熟胚的组织培养效果进行研究, 旨在筛选每一基因型最适合于组织培养的外植体类型, 为应用基因工程技术进行小麦遗传改良提供基础材料。结果表明, 愈伤诱导率和再生苗率与基因型和外植体类型(花药、幼穗、幼胚和成熟胚)密切相关。8802 在花药和成熟胚培养中表现突出, 花药出愈率达 119.5%, 愈伤分化成苗率 19.9%; 烟农 19 的幼穗愈伤直接分化成苗率最高, 达 43.5%; 8802、烟农 19 和潍麦 8 号三个基因型的幼胚培养效果差异不显著, 其愈伤分化成苗率分别为 26.3%、24.5% 和 24.8%。蔗糖浓度在 3%~9% 之间, 对成熟胚的愈伤组织诱导率影响很小, 高浓度蔗糖降低愈伤生长速度。在一定蔗糖浓度下, 愈伤诱导率与 2,4-D 浓度密切相关, 高浓度的 2,4-D 对愈伤组织再生不利。MS+4 mg/L 2,4-D 对于成熟胚的脱分化相对较好, MS 和 MS+0.4 mg/L NAA + 0.6 mg/L KT 作为成熟胚的愈伤组织再生培养基, 对不同基因型具有一定的适用性。

关键词:普通小麦; 花药; 幼胚; 幼穗; 成熟胚; 愈伤诱导; 植株再生**中图分类号:** S 512.1; S 336**文献标识码:** A**文章编号:** 1009-1041(2006)01-0021-05

Tissue Culture Efficiency of Different Explants from Wheat

LI Gen-ying^{1,2,3}, HUANG Cheng-yan³, SUI Xin-xia³, HE Zhong-hu^{2,4}, SUN Qi-xin¹, XIA Xian-chun²

(1. College of Agronomy & Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. National Wheat Improvement Center/Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

3. Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100, China;

4. CIMMYT China Office, Beijing 10081, China)

Abstract: High frequency of callus induction and plant regeneration of recipients are very important for genetic transformation. Ten wheat cultivars and advanced lines were used to compare their tissue culture response. Significant differences were observed in callus induction and plant regeneration capacity of different genotypes and different explants. Line 8802 had the highest induction rate of embryogenesis and green plant regeneration, immature inflorescences from Yannong19 had the highest plant regeneration capacity. Immature embryos culture efficiency among the cultivars of 8802, Yannong 19 and Weimai 8 were similar, i. e., 26.3%, 24.5%, 24.8%, respectively. Sucrose concentration of medium ranging from 3% to 9% had no significant effects on callus induction of mature embryos. Higher concentration of sucrose decreased the growth of callus, concentration of 2,4-D in induction medium was associated with green plant regeneration. Medium of MS+4mg/L 2,4-D showed comparable callus induction capacity than other media, plant regeneration of callus from mature embryos on media MS and MS+0.4 mg/L NAA + 0.6 mg/L KT had no significant differences.

Key words: Common wheat; Anther; Immature embryo; Immature inflorescence; Mature embryo; Callus induction; Plant regeneration

外植体是影响基因转化效率的重要因素, 应用于小麦基因转化的外植体有花药、幼穗、幼胚、成熟胚、茎尖、根尖分生组织、叶片和原生质体

等^[1~9]。诱导胚性愈伤组织是禾本科植物组织培养中获得再生植株的通用方法。研究表明, 基因型对愈伤组织的形成影响较小, 只决定愈伤组织质

收稿日期: 2005-05-16

修回日期: 2005-08-13

作者简介: 李根英(1968—), 女, 副研究员, 主要从事小麦生物技术育种研究。

通讯作者: 何中虎(1963—), 男, 研究员, 主要从事小麦遗传育种研究。

量;外植体既影响愈伤形成,又影响愈伤组织质量,由外植体类型引起的愈伤组织质量差异并不亚于基因型,但其影响主要表现在早期阶段^[10,11]。关于小麦花药、幼穗、幼胚、成熟胚培养方面的报道很多,多数研究集中在少数几个基因型^[1~14],这些材料的农艺性状较差,以其作为基因改良的受体,得到的转基因后代很难在生产上应用。本研究以山东省近年来育成并大面积推广的 10 个优良的品种(系)为材料,进行了花药、幼穗、幼胚和成熟胚培养,对这些品种的不同外植体进行组培效果研究,筛选出烟农 19、潍麦 8 号、济麦 19 和 8802 等一批适宜于基因转化的品种和高代品系,确定了每一品种最理想的外植体种类。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 普通小麦品种(系) 济麦 19、济麦 20、烟农 19、潍麦 8 号、鲁麦 21、鲁原 301、泰山 9818、4072、8044 和 8802 共 10 个品种(系)于 2001~

2002 年播种于山东省农业科学院作物研究所试验农场,行长 2 m,行宽 0.25 m,两行区,3 次重复。

1.1.2 培养基 花药培养用 C17 分化和脱分化培养基;幼穗培养用 MS 改良培养基;幼胚脱分化用 MSE,再分化用 MSR 培养基;应用于小麦成熟胚脱分化和再分化培养基^[15,16]列于表 1。

1.2 方法

1.2.1 花药培养 根据各品种(系)的发育时期,取单核靠边期的花药接种于 C17 脱分化培养基上,28~29℃暗培养 4 week 左右。将产生的胚状体分批挑出,接种于 C17 分化培养基上,于 25℃、日光照时间 10 h 下诱导分化。

1.2.2 幼穗培养 取长度 0.5~1.0 cm 左右的幼穗,接种于 MS+2 mg/L 2,4-D 诱导培养基上 25℃暗培养,每隔 3 d 观察一次愈伤生长情况。接种后 28 d 将形成的愈伤组织转移到再分化培养基上,于 25℃日光照 10 h 下诱导愈伤组织分化,再分化培养基为附加不同激素的 MS 培养基。

表 1 用于成熟胚培养的脱分化和分化培养基
Table 1 Callus induced and regeneration media for mature embryo culture

培养基编号 Code of media	培养基成分 Component of media	培养基编号 Code of media	培养基成分 Component of media
01	MS+3 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 2,4-D	19	MS+2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L NAA+0.3 mg/L Kt
02	MS+5 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 2,4-D	20	MS+4 mg/L 2,4-D
03	MS+7 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 2,4-D	21	MS+0.5 g/L pro+0.5 mg/L 对氨基苯甲酸+0.5 mg/L 泛酸钙+0.5 mg/L 核黄素+40 g/L 蔗糖+1.0 mg/L 2,4-D
04	MS+9 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 2,4-D	22	MS+0.5 g/L pro+0.5 mg/L 对氨基苯甲酸+0.5 mg/L 泛酸钙+0.5 mg/L 核黄素+40 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 2,4-D
05	MS+3 g/L 蔗糖+2.5 mg/L 2,4-D	23	MS+0.5 g/L pro+0.5 mg/L 对氨基苯甲酸+0.5 mg/L 泛酸钙+0.5 mg/L 核黄素+40 g/L 蔗糖+2.5 mg/L 2,4-D
06	MS+5 g/L 蔗糖+2.5 mg/L 2,4-D	24	MS+2 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L Kt
07	MS+7 g/L 蔗糖+2.5 mg/L 2,4-D	25	MS+2 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L Kt
08	MS+9 g/L 蔗糖+2.5 mg/L 2,4-D	26	MS+3 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L Kt
09	MS+3 g/L 蔗糖+3.0 mg/L 2,4-D	27	MS+10 mg/L 2,4-D
10	MS+5 g/L 蔗糖+3.0 mg/L 2,4-D	28	MS
11	MS+7 g/L 蔗糖+3.0 mg/L 2,4-D	29	MS+2 mg/L 2,4-D+IBA 0.5 mg/L
12	MS+9 g/L 蔗糖+3.0 mg/L 2,4-D	30	MS+2 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L Kt
13	MS+3 g/L 蔗糖+4.0 mg/L 2,4-D	31	MS+1 mg/L NAA+0.2 mg/L 6BA
14	MS+5 g/L 蔗糖+4.0 mg/L 2,4-D	32	MS+0.4 mg/L NAA+0.6 mg/L Kt
15	MS+7 g/L 蔗糖+4.0 mg/L 2,4-D	33	MS+1 mg/L 6BA
16	MS+9 g/L 蔗糖+4.0 mg/L 2,4-D	34	MS+2 mg/L 6BA
17	MS+2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L Kt	35	MS+2 mg/L Kt+IBA 0.5 mg/L
18	MS+2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L Kt		

1.2.3 幼胚培养 取授粉后 10 d 左右、大小为 0.5~1.0 mm 的幼胚,盾片朝上接种于 MSE 脱分化培养基上,25℃暗培养诱导愈伤组织的产生,每隔 3 d 观察一次愈伤生长情况。接种后 28 d 将形成的愈伤组织转移到 MSR 再分化培养基上,25℃光照 10 h 诱导绿苗产生。

1.2.4 成熟胚培养 将小麦干种子用 75%酒精浸泡 5 min,1% NaClO 处理 20 min,无菌水冲洗 5 次,转入灭菌的培养皿中浸泡 6 h,剥胚,纵切,盾片朝上接于脱分化培养基上,25℃暗培养诱导愈伤组织产生,每隔 3 d 观察一次愈伤生长情况。接种后 28 d 将形成的愈伤转移到再分化培养基

上,25℃光照 10 h 诱导绿苗产生,分化和脱分化培养基配方列于表 1。

2 结果与分析

2.1 不同基因型的花药培养效果

共接种花药 9 240 枚,得到胚状体 2 392 个,再生成绿苗 268 株,10 个不同品种(系)的花药出愈率差异显著(表 2),8802 的出愈率最高(119.5%),其次是 4072(40.3%),济麦 19 的出愈率最低,仅为 6.2%。出愈率与其愈伤成苗率相关性较小,参试的 10 个品种(系)中,愈伤成苗率以 8802 最高(19.9%),其次是 8044(14.3%)。4072 的出愈率居第二位,但其愈伤成苗率最低(1.7%)。若以成苗数与接种花药数的相对比例来计算,8802 的花药成苗率最高(23.8%),其余品种的花药成苗率由高到低依次为烟农 19、鲁原 301、潍麦 8 号、济麦 20、8044、鲁麦 21、泰山 9818 和济麦 19。

2.2 不同基因型的幼穗培养效果

诱导培养 7 d 左右,幼穗周围出现突起状的愈伤组织,不同品种的愈伤组织状态及生长速度差异显著,烟农 19 生长速度明显慢,形成的愈伤较坚实。各品种的表现列于表 3。将诱导产生的愈伤组织分为两部分,一部分用于继代,一部分转移

至再分化培养基上诱导绿苗产生,结果表明,不同品种的绿色芽点形成快慢、绿色芽点发生率及成苗率差异显著。绿色芽点形成较快的潍麦 8 号和 8802 只用 3 d,最慢的济麦 20 在 45 d 时才形成绿色芽点;愈伤形成绿色芽点频率最高的基因型为 8802、4072、烟农 19,达 100%,最低的济麦 19 只有 15%;烟农 19 成苗率最高(43.5%),其次为潍麦 8 号(37.5%),济麦 20、8804 和鲁麦 21 的愈伤组织不能直接分化成苗。继代时,根据不同品种(系)及其愈伤生长状态进行培养基配方调整,以诱导较多的胚性愈伤产生,济麦 20、8804 和鲁麦 21 的愈伤组织经过继代改造,分化成苗率分别提高 5、6.8 和 0.9 个百分点。4072、8802、鲁原 301 和泰山 9818 四个品种(系)的幼穗愈伤组织在继代后分别有不同程度提高,提高幅度因品种而异。而直接分化成苗率较高的潍麦 8 号和烟农 19,其愈伤组织经过继代后再生频率有不同程度的下降,烟农 19 由 43.5%下降到 25.0%,潍麦 8 号由 37.5%降到 20.0%。但继代培养可以扩大愈伤组织群体,提高单位幼胚的利用效率,因此,不仅幼穗愈伤组织直接成苗率较高的烟农 19 和潍麦 8 号可作为基因转化的首选材料,而经过继代改造取得良好再生频率的 8802 和济麦 19,其幼穗也是较为理想的转基因受体材料。

表 2 不同小麦品种(系)的花药培养结果
Table 2 Anther culture capacity of different cultivars

品种 Cultivar	接种花药数 No. of anther	产生愈伤组织数 No. of callus	愈伤诱导率(%) Callus induction rate	分化成苗数 No. of plant regeneration	愈伤成苗率(%) Callus regeneration rate	花培效率(%) Anther culture capacity
济麦 19 Jimai 19	1 400	87	6.2	3	3.5	0.21
济麦 20 Jimai 20	620	51	8.2	6	11.8	0.97
烟农 19 Yannong 19	900	240	26.7	15	6.25	1.67
潍麦 8 号 Weimai 8	770	87	11.3	8	9.2	1.03
鲁麦 21 Lumai 21	670	75	11.2	5	6.7	0.75
鲁原 301 Luyuan 301	900	238	26.4	13	5.5	1.44
泰山 9818 Taishan 9818	850	159	18.7	6	3.8	0.71
4072	1 000	403	40.3	7	1.7	0.70
8044	1 320	84	6.4	12	14.3	0.91
8802	810	968	119.5	193	19.9	23.8
合计 Total	9 240	2 392	25.9	268	11.2	2.9

2.3 不同基因型的幼胚培养效果

取受粉后 10 d 左右、大小为 0.5~1.0 mm 的幼胚,盾片朝上接种于 MSE 脱分化培养基上,25℃暗培养诱导愈伤组织的产生,4 周左右愈伤组织由湿润透明逐渐转变成干爽乳白,此时将愈伤组织转移到 MSR 再分化培养基上诱导绿苗产生,10 个品种(系)的幼胚在 MSE 培养基上脱分化率达 100%,愈伤成苗率在不同品种之间存在显著差异(表 4),8802 的成苗率最高(26.3%),其

次为潍麦 8 号(24.8%)、烟农 19(24.5%)、济麦 19(22.0%),成苗率最低的鲁麦 21,其成苗率仅为 3.0%。

2.4 不同基因型的成熟胚培养效果

2.4.1 蔗糖和 2,4-D 浓度对小麦成熟胚脱分化的影响 济麦 19、花培 1 号、鲁原 301、8802 和 4072 五个品种(系)的成熟胚在不同蔗糖和 2,4-D 浓度配比的 16 个培养基上(表 1)诱导愈伤组织的产生,结果表明,不同品种的成熟胚脱分化能

力不同,同一品种的成熟胚在不同培养基上脱分化能力差异显著。花培 1 号和济麦 19 在 01、02、03、05 和 06 五种培养基上都成功脱分化,芽生成量少,形成的愈伤组织乳黄透明,质感较好;而在 07 号培养基上愈伤组织表面有白色绒毛状突起,似有老化现象;在 08 号培养基上生长较慢,但愈伤较坚实;在 04 号培养基上诱导产生的愈伤组织,质地致密,干爽,表面有球状突起,愈伤再生能力高于 01、02 和 03 号培养基上诱导的愈伤组织,说明较高浓度的蔗糖有利于胚性愈伤组织形成及再生。8802、4072 和鲁原 301 在 01 至 12 号培养基中芽生成率高,形成的愈伤组织疏松透明、色微

黄,无胚性突起。进一步增加 2,4-D 浓度,在 13 号培养基上愈伤形成率很高,形成的胚性突起紧密,不透明。将这种愈伤转移到再分化培养基上,2 周左右出现绿色幼苗,进一步提高 2,4-D 浓度至 10 mg/L,则愈伤诱导率与 13 号培养基无明显差异,但所形成的愈伤再生能力明显降低,说明高浓度的 2,4-D 对愈伤组织的再生不利。本实验表明蔗糖浓度在 3%~9% 之间时,对成熟胚的愈伤组织诱导率影响很少,高浓度的蔗糖有利于胚性愈伤组织形成,在一定的蔗糖浓度下,愈伤诱导率与 2,4-D 浓度密切相关。成熟胚的愈伤组织诱导率及愈伤状态与基因型密切相关。

表 3 不同小麦品种(系)的幼穗培养结果
Table 3 Immature inflorescence culture capacity of different cultivars

品种 Cultivar	愈伤直接再生成苗 Regeneration from callus					愈伤继代后分化成苗 Regeneration from second culture			
	愈伤 状态 Status	愈伤 诱导数 Callus No.	绿点形成 时间(d) Day of green spots formation	直接成苗数 No. of direct regenerated plantlets	成苗率 (%) Regeneration frequency	继代愈伤数 No. of callus for secondary culture	胚性愈伤数 No. of embryogenesis regeneration callus	分化成苗数 No. of regeneration plantlet	分化成苗率 (%) Regeneration frequency
济麦 19 Jimai 19	I	40	7	3	7.5	80	240	40	16.7
济麦 20 Jimai 20	I -	50	45	0	0.0	60	160	8	5.0
烟农 19 Yannong 19	I	58	4	27	43.5	42	120	30	25.0
潍麦 8 号 Weimai 8	I -	40	3	15	37.5	34	100	20	20.0
鲁麦 21 Lumai 21	II	60	9	0	0.0	56	210	2	0.95
鲁原 301 Luyuan 301	I +	80	7	2	2.5	29	78	6	7.6
泰山 9818 Taishan 9818	I +	30	4	3	10.0	58	157	21	13.4
4072	I +	52	7	3	5.7	61	220	30	13.6
8044	II	50	3	0	0	35	88	6	6.8
8802	I +	64	3	3	4.7	24	90	17	18.9
平均 Average		52.4	9.2	5.6	11.1	47.9	146.3	18.0	12.8

注: I. 愈伤表面有明显的球状突起,干爽易于分离,色乳白; II. 愈伤表面有不规则突起,较干爽,部分细胞粘连,色白透明;

III. 愈伤松软,不易分离,湿滑,色白透明。

Note: I. The ball-like callus is white and friable, dry and easy to be isolated; II. unshaped callus, comparatively dry, some stick together, white and transparent; III. the callus is wet and soft, white and transparent, difficult to be isolated.

表 4 不同小麦品种(系)的幼胚培养结果
Table 4 Immature embryos culture capacity of different cultivars

品种 Cultivar	接种的 胚数 No. of induced embryo	诱导愈伤数 No. of callus cultured number induced	分化愈伤数 No. of regeneration plantlet	愈伤分化率 (%) Callus regeneration rate
济麦 19 Jimai 19	400	400	88	22.0
济麦 20 Jimai 20	400	400	32	8.0
烟农 19 Yannong 19	400	400	98	24.5
潍麦 8 号 Weimai 8	400	400	99	24.8
鲁麦 21 Lumai 21	400	400	12	3.0
鲁原 301 Luyuan 301	400	400	25	6.3
泰山 9818 Taishan 9818	400	400	75	18.8
4072	400	400	68	17.0
8044	400	400	59	14.8
8802	400	400	105	26.3
平均 Average	4000	4000	661	16.5

2.4.2 成熟胚分化培养基的筛选及愈伤组织的再生 表 1 中 17~27 号培养基为脱分化培养基,将成熟胚分别接种于这些脱分化培养基,诱导愈伤组织的产生。结果表明,不同品种的成熟胚对培养基的反应不同。除 20 号和 27 号培养基外,济麦 19、花培 1 号、鲁原 301、8802 和 4072 的成熟胚脱分化率在其余的 9 种脱分化培养基上都很低,具体表现为成熟胚直接萌发成苗,基部出现少量的愈伤组织白而透明、水样不致密,继代后生成大量毛根。济麦 19 和 4072 在 22 和 23 号培养基上脱分化率较高,但形成的愈伤透明疏松,无胚性;27 号培养基上成熟胚脱分化率达 100%,愈伤生长迅速,软而透明,不易剥离。5 个品种在 20 号培养基上诱导的愈伤组织外观较致密干爽,形成不规则状突起,易于分离,愈伤状态较为理想。

将 20 号培养基诱导产生的愈伤组织接种于

分化培养基上,平均成苗率在各品种之间差异显著。花培 1 号的平均成苗率最高(5.5%),其次是 8802(2.3%)、4072(1.5%)、济麦 19(1.3%)和鲁原 301(0.8%)。不同培养基对愈伤组织再生有显著影响,5 个品种在 29 号和 35 号培养基上仅形成绿色芽点,不能再生成植株;济麦 19 在 33 号和 34 号培养基上愈伤组织则发生褐变死亡,4072 仅有绿色芽点发生,不能再生成苗;5 个品种的愈伤组织在 30 号和 31 号培养基上都发生褐变死亡,而在 28 号和 32 号培养基中均有绿苗产生,因此,28 号(MS)和 32 号培养基(MS+0.4 mg/L NAA+0.6 mg/L KT)作为成熟胚愈伤组织再生培养基对于不同基因型具有一定的适用性。

3 讨论

本研究表明,品系 8802 的不同类型外植体在组织培养中都有良好表现,花药和幼胚培养效果居参试 10 个品种之首,成熟胚培养效果居第 2 位。花培 1 号的成熟胚培养效果居第 1 位,而花培 1 号的亲本之一就是 8802。花培 1 号是山东省农科院作物新近育成的高代品系,耐寒性强,起身晚,但后期灌浆速度快,对倒春寒具有良好的抗性。烟农 19 是山东省目前的主栽品种之一,它的幼穗愈伤组织直接再生频率达 43.5%,其花药培养和幼胚培养效果在 10 个品种中居第 2 位。潍麦 8 号的幼穗和幼胚培养效果居 10 个品种的第二位,它是 2003 年山东省新定名的品种,大穗大粒、丰产性好,已大面积推广。良好的组培性能和优秀的遗传基础,使上述 3 个品种(系)有望成为小麦基因转化的理想受体。

小麦成熟胚是已经完全分化的器官,细胞具有很强的极性,诱导成熟胚产生理想的胚性细胞具有一定困难,本研究设计了 35 个培养基配方,对 5 个品种进行了成熟胚培养,取得了初步进展,但小麦成熟胚的胚性愈伤组织诱导及再生频率与幼胚、幼穗和花药相比还有很大差距。

参考文献:

- [1] An H L, Wei Z M, Huang J Q. High efficiency regeneration of wheat plants from immature embryos[J]. *Acta Phytophysiol. Sin.*, 2000, 26: 532—538.
- [2] Caswell K L, Leung N L, Chibbar R N. An efficient method for in vitro regeneration from immature inflorescence explants of Canadian wheat cultivars[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 60: 69—73.
- [3] 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: 73—80.
- [4] Folling L, Olesen A. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment[J]. *Plant Cell Report*, 2001, 20: 629—636.
- [5] Harvey A, Moisan L, Suzanne L, et al. Wheat regenerated from scutellum callus as a source of material for transformation [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 57: 153—156.
- [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] Rajyalakshmi K, Grover A, Maheshwari N, et al. 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.
- [8] Yeung E C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis [A]. In: Thorpe TA (ed), *In vitro Embryogenesis in Plants, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* [C]. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 1995, 20: 205—248.
- [9] Mathias R J, Simpkin E S. The interaction of cultivar and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) callus [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1986, 7: 31—37.
- [10] 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, 9: 364—371.
- [11] Ozias-Akins P, Vasil I K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): Evidence for somatic embryogenesis [J]. *Protoplasma*, 1982, 110: 95—105.
- [12] Ozias-Akins P, Vasil I K. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat) [J]. *Protoplasma*, 1983, 117: 40—44.
- [14] Pastori G M, Wilkinson M D, Steele S H, et al. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 52: 857—863.
- [15] Davies P J. The plant hormone concept: concentration, sensitivity and transport [A]. In: Davies P J (ed), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* [C]. London, UK: Kluwer Academic Publishers, 1995. 13—38.
- [13] Murashige M T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures [J]. *Plant Physiology*, 1962, 15: 473—497.