

普通小麦基因转化中良好受体系统的建立^{*}

陈耀锋¹, 曹团武¹, 丁云姣², 李春莲¹, 郭月霞¹,
韩德俊¹, 任惠莉¹, 郭东伟¹, 奚亚军¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中共陕西省委党校, 陕西 西安 710000)

[摘 要] 对影响小麦幼胚愈伤组织高频率再分化的条件进行了研究。结果表明, 暗培养条件下诱导的小麦幼胚愈伤组织的再分化频率显著高于散光和 2 000 lx 光照条件; 大田生长的小麦比温室盆栽小麦的幼胚脱分化和再分化频率高。小麦主茎穗部的幼胚组织脱分化和再分化特性显著高于小麦分蘖茎穗部的幼胚组织。不同年份、不同基因型小麦品种, 及不同胚龄幼胚组织的脱分化和再分化特性有一定差异。通过诸多因素的优化和最适幼胚组织的选择, 可建立小麦基因转化中不依赖于基因型的良好受体系统。

[关键词] 小麦; 幼胚组织; 再分化; 受体系统

[中图分类号] S512 103 53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0001-03

小麦是世界上播种面积、总产量和贸易量最大的谷类作物。在我国小麦是仅次于水稻的第二大粮食作物, 同时我国也是世界上第二大小麦进口国, 小麦生产状况对国民经济发展具有举足轻重的作用。品种改良是小麦生产中最经济、有效的措施之一。基因工程育种是近年来在分子生物学基础上发展起来的新的作物育种技术, 与常规育种方法相比, 其具有基因资源来源广泛(可来自于植物、动物、微生物及人工合成等), 能定向、快速的改良作物等特点, 因此发展很快, 并已在棉花、大豆、玉米、番茄、烟草等重要作物上培育出了一批重要的优良品种。而小麦基因转化研究相对滞后, 作为基因转化的主要受体——离体培养的小麦细胞的再生特性差, 已成为影响小麦基因转化的瓶颈。本研究通过小麦幼胚培养中培养条件的选择、供体材料生理状态及幼胚发育时期的选择研究, 旨在建立不依赖于供体植株基因型的普通小麦高频率的体细胞离体培养再生技术体系, 为小麦基因转化研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为西北农林科技大学细胞工程实验室试验田种植的黄淮麦区 12 个优良品种(系): 小偃 22, 9848, 千斤早, 阎良 8911, 陕 253, 花育 888, 新麦 9

号, 豫麦 29, 周麦 13, 9023, 内乡 188 和陕 160。

1.2 试验方法

大田材料于试验田同等条件下种植, 随机区组设计, 重复两次。9848 和小偃 22 两品种温室的盆栽试验, 当年 6 月播种, 春化处理。在供试小麦品种(系)灌浆期, 剥取不同发育时期的幼胚组织, 接种到脱分化培养基中, 脱分化培养基为 MS + 2.0 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L KT + 3.0% Su + 0.5% Ag。接种的幼胚组织在脱分化培养基中培养 20 d 后, 统计计算愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率 = 形成愈伤组织的幼胚数/接种幼胚数 × 100%), 然后将被诱导的幼胚愈伤组织转入再分化培养基 (MS + 0.5 mg/L KT + 2.5% Su + 0.5% Ag) 中, 待愈伤组织分化出苗后, 统计计算不同处理愈伤组织的再分化频率(再分化频率 = 再分化愈伤组织数/转分化愈伤组织数 × 100%)。

试验设计了不同脱分化条件、不同生理状态及 12 种基因型品种不同的幼胚发育时期, 对比研究了不同处理中小麦幼胚脱分化和再分化的特性。

2 结果与分析

2.1 脱分化培养条件的选择

不同光处理对小麦幼胚组织脱分化和再分化特性的影响结果(表 1)表明, 3 种光照培养条件对小麦

^{*} [收稿日期] 2004-03-24

[基金项目] 国家 863 项目(2001AA 241037); 国家转基因研究与产业化开发专项(JY03-B-23-02); 陕西省科技攻关项目(2003K03-G1-04)

[作者简介] 陈耀锋(1956-), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种、农业生物技术研究。

幼胚愈伤组织的诱导率无显著影响,但对被诱导愈伤组织的质量有显著影响,在暗培养条件下诱导的小麦幼胚愈伤组织再分化频率,显著高于自然光和2 000 lx 光照条件。

表 1 脱分化培养中不同光处理对小麦幼胚脱分化和再分化特性的影响

Table 1 Effect of culture condition on dedifferentiation and redifferentiation characteristic of wheat immature embryo

培养条件 Culture condition	接种幼胚数 No. of immature embryos planted	愈伤组织诱导率/% Induction frequency of callus	愈伤组织再分化频率/% Redifferentiation frequency of callus
暗培养 Dark	600	100.0	63.1
散光培养 Nature light	680	98.2	48.7
2 000 lx 光照 2 000 lx light	500	99.6	46.5

2.2 供试材料的生理状态

由表 2 可以看出,供试材料的生理状态对愈伤组织诱导率影响不大,但通过影响被诱导愈伤组织的质量而显著影响幼胚愈伤组织再分化频率。在供试的两个品种中,大田生长的小麦比温室盆栽小麦具有更好的生理状态,其幼胚脱分化和再分化特性显著高于温室盆栽小麦。小麦主茎穗部的幼胚组织脱分化和再分化特性显著高于小麦分蘖茎穗部的幼胚组织。供试两个品种的表现有相同趋势。

表 2 不同生理状态的小麦品种幼胚组织的脱分化和再分化特性

Table 2 Dedifferentiation and redifferentiation characteristic of wheat immature embryo under different culture condition

供试品种 Varieties	栽培条件 Culture condition	幼胚来源 Source of immature embryos	接种幼胚数 No. of immature embryos planted	愈伤组织诱导率/% Induction frequency of callus	愈伤组织再分化频率/% Redifferentiation frequency of callus
9848	温室盆栽 Greenhouse	主茎 Main stem	62	100.0	62.9
		分蘖 Tiller	78	99.7	51.3
	大田 Field	主茎 Main stem	106	100.0	84.0
		分蘖 Tiller	118	100.0	76.3
小偃 22 Xiaoyan 22	温室盆栽 Greenhouse	主茎 Main stem	52	100.0	69.2
		分蘖 Tiller	30	100.0	56.7
	大田 Field	主茎 Main stem	72	100.0	81.9
		分蘖 Tiller	98	100.0	77.6



图 1 小偃 22 胚性愈伤组织

Fig. 1 Xiaoyan 22 embryonic callus

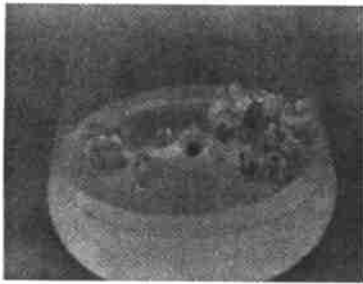


图 2 9848 胚性愈伤组织

Fig. 2 9848 embryonic callus



图 3 千斤旱胚性愈伤组织

Fig. 3 Qianjinzhao embryonic callus

2.3 供试品种及幼胚发育时期的选择

不同年份(2002, 2003 年)、不同基因型小麦品种(12 个优良品种、系)、不同胚龄幼胚组织的脱分化和再分化特性研究结果表明,不同年份、不同基因型、不同胚龄对小麦幼胚组织的脱分化和再分化特性都有重要影响。2002 年小麦灌浆期阴雨较多,胚发育迟缓,诱导幼胚组织脱分化和再分化的最适胚龄为 14~ 18 d; 2003 年小麦灌浆期阳光充足,胚发育较快,诱导幼胚组织脱分化和再分化的最适胚龄为 12~ 16 d。不同基因型最适胚龄有一定的差异,12 个基因型品种在最适胚龄时的小麦幼胚愈伤组织诱导率以 9848 品系最高,达 84.0%,最低为阎良 8911,为 39.8%,有 10 个品种的幼胚愈伤组织再分化频率达到 60.0% 以上。

2.4 小麦基因转化中良好受体系统的建立

通过脱分化培养条件的优化、不同基因型品种幼胚最适时期的选择,用大田栽培植株主茎穗部的幼胚组织进行离体培养,已建立了 10 个不同基因型

品种良好的体细胞受体体系(图1~3), 其中有4个品种的胚性细胞系的再生特性已保持1年以上。

3 讨 论

小麦体细胞胚性无性系在小麦遗传饰变^[1,2]及基因转化^[3,4]中具有重要的应用价值, 但这一体系的建立受诸多因素的影响。激素对小麦体细胞胚性无性系影响的研究已有大量报道^[5,6], 并已积累了大量的资料, 但其他因素影响的研究报道不多。本研究结果表明, 小麦幼胚组织的脱分化条件、供试材料的生理状态对其脱分化和再分化特性都有重要影响, 暗培养条件下诱导的小麦幼胚愈伤组织的再分化频率显著高于自然光和2 000 lx光照条件; 大田生长的小麦比温室盆栽小麦具有更好的生理状态, 其幼胚脱分化和再分化特性显著高于温室盆栽小麦; 小麦主茎穗部幼胚组织脱分化和再分化特性显著高于小

麦分蘖茎穗部的幼胚组织。

胚龄大小也是影响小麦幼胚组织脱分化和再分化的重要因子, 在目前衡量幼胚大小的两个标准中, 以授粉后胚发育天数衡量胚龄大小时若不同年份小麦胚发育时期气候差异较大, 授粉后胚发育到一定天数时胚发育的大小不一样, 而以胚的直径衡量胚龄大小时, 不同基因型品种发育到同一胚龄时其大小有差异, 这可能使不同条件下按相关指标获得的胚并不是最佳时期的胚, 而胚龄对小麦幼胚组织脱分化和再分化影响很大。本研究认为, 同一基因型品种在不同年份表现在脱分化和再分化特性上的差异, 及某些品种脱分化和再分化特性差, 部分原因可能是胚龄大小的把握不够准确。因此, 在小麦体细胞高频再生体系建立上, 离体培养小麦幼胚胚龄大小的选择至关重要, 建立更精确的胚龄衡量指标也是必要的。

[参考文献]

- [1] Karadimov M. Increasing characterization of wheat tolerance to NaCl by selected *in vitro* [J]. *In vitro Plant*, 1993, 29: 180- 188
- [2] 陈耀锋, 韩德俊, 李春莲, 等. 普通小麦抗赤霉细胞工程育种研究 I. 抗镰刀菌毒素细胞系的分离 [J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(3): 217- 221
- [3] Cheng M, Fry J E, Pang S. Genetic transformation of wheat mediated *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiol*, 1977, 115: 971- 980
- [4] 叶兴国, Shirley S, 徐惠君. 小麦农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测 [J]. *中国农业科学*, 2001, 34(5): 467- 474
- [5] Caman J G, Jefferson N E, Campbell W F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli I, II [J]. *Plant Cell Tissue, Organ Culture*, 1987, 10(2): 101
- [6] 叶新荣, 余毓君. 小麦幼胚培养中的体细胞胚胎发生 [J]. *武汉植物学研究*, 1999, 8(1): 75- 78

Establishment of transgenic acceptor system in wheat (*Triticum aestivum* L.)

CHEN Yao-feng¹, CAO Tuan-wu¹, DING Yun-jiao², LI Chun-lian¹,
GUO Yue-xia¹, HAN De-jun¹, REN Hui-li¹, GUO Dong-wei¹, XI Ya-jun¹

(1 College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Party Institute of CCP, Xi'an, Shaanxi 710000, China)

Abstract: Effect of few factors on wheat immature embryo callus redifferentiation ability were studied. The results showed that the redifferentiation frequency of wheat immature embryo callus induced in dark culture was higher than that of wheat immature embryo callus induced in nature light and 2 000 lx light. The callus redifferentiation frequency of immature embryos obtained from field was higher than that of immature embryos obtained from greenhouse. The callus redifferentiation frequency of immature embryos obtained from main stem was higher than that of immature embryos obtained from tiller. Different genotype varieties and different development stage embryos were different in the redifferentiation characteristic of immature embryo callus. Wheat transgenic acceptor system has been established using optimization of culture factor and dedifferentiation culture of wheat immature embryo.

Key words: wheat; immature embryo; redifferentiation; acceptor system