

优良小麦转基因受体品种的筛选及成熟胚半胚培养的研究

叶健¹, 王小霞¹, 符书兰¹, 唐宗祥¹, 吴峰¹, 张怀琼¹, 任正隆^{1,2*}

(1. 四川农业大学植物遗传育种省级重点实验室, 四川雅安 625014; 2. 电子科技大学生命科学与技术学院, 四川成都 610054)

摘要 为了筛选具有良好组织培养特性的优良小麦品种作为转基因受体, 使转基因小麦能尽快得到应用, 对4个小麦品种的幼胚和成熟胚以及7个小麦品系的成熟胚进行离体培养, 考察其组织培养特性。结果表明, 11个品种(系)的成熟胚成愈率都达90%以上, 但不同成熟胚来源的愈伤组织的植株再生率存在很大差异; 7个小麦品系的植株再生率都低于20%, 而4个小麦品种的植株再生率都达35%以上, 幼胚成愈率及植株再生率都分别达90%和62%以上。该研究为小麦的遗传转化提供了几个新的优良受体品种。该研究进行成熟胚培养时, 采用半胚培养的方式, 一方面有效地克服了成熟胚在诱导培养基上直接萌发的现象, 另一方面提高了成熟胚来源的愈伤组织分化为多苗的能力。该再生体系可作为小麦胚培养的参考。

关键词 小麦; 幼胚; 成熟胚; 组织培养特性; 植株再生

中图分类号 S512.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)12-03561-02

Selection of Transgenic Recipients from Elite Wheat Cultivar and Study on the Half Mature Embryo Culture

YE Jian et al (Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Sichuan Agriculture University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract In order to screen elite wheat cultivars with good tissue culture response as recipients of wheat transformation and to speed up the application of transgenic wheat, the immature and mature embryos of four wheat cultivars: Mianyang 11, Chuannong 12, Chuannong 17, Chuannong 18 and seven wheat lines, which were used for area test in Sichuan province in 2004, were cultured in vitro. The results indicated that mean callus induction rate of mature embryos was over 90%. However, significant differences were observed among the calli initiated from these mature embryos. The plant regeneration rate of callus initiated from mature embryo of seven wheat lines were less than 20% and plant regeneration rate of callus initiated from mature embryo of four wheat cultivars were more than 35%. Moreover, the callus induction rate and plant regeneration rate of immature embryos of four wheat cultivars were in excess of 90% and 62%, respectively. So four new elite recipient cultivars for wheat transformation were supplied through this research. Furthermore, in this research, half-mature embryos were cultured, which can efficiently decrease germination of mature embryo in callus induction media and increase the multiple-plantlet regeneration rate of calli from mature embryo. The wheat plant regeneration system could be a reference for other wheat genotypes.

Key words Wheat; Immature embryo; Mature embryo; Tissue culture response; Plant regeneration

转基因方法在小麦的改良中起着重要的作用。然而, 转基因小麦的实际应用还受到限制, 主要原因: 一是不能找到大量合适的外源基因受体; 二是小麦组织培养方案中外植体的选择范围狭窄, 主要集中于幼胚和成熟胚2种外植体。前人在小麦成熟胚的离体培养方面已取得很大进展^[1-2], 然而, 小麦胚的组织培养特性受基因型的影响极大^[3-5], 因此找到某些优良小麦品种的植株再生体系是必要的。笔者考察了11个小麦品种(系)的幼胚及成熟胚的组织培养特性, 建立了一个比较有效的小麦植株再生体系, 旨在为小麦转基因的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 2004年四川省区试中表现高产的7个小麦品系: CP93-17-31、G33、2L-21、SW18155、02048、640002和小观54的种子; 4个小麦品种: 绵阳11、川农12、川农17和川农18的种子和幼胚。

1.2 培养基 愈伤组织诱导培养基和继代培养基: MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.1 g/L 水解酪蛋白 + 30 g/L 蔗糖; 分化培养基: MS + 2 mg/L KT + 0.5 g/L 水解酪蛋白 + 20 g/L 蔗糖; 生根培养基: 1/2 MS + 0.1 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 20 g/L 蔗糖。所有培养基用8 g/L 琼脂固化, pH调至5.8, 121℃下经1.1 kg/m² 高压湿热灭菌20 min。

1.3 小麦成熟胚、幼胚的离体培养 ①成熟胚培养。选择饱满种子, 用75%乙醇消毒5 min, 换以0.1% HgCl₂ 消毒25 min, 无菌水冲洗5~6次, 置于适量无菌水中, 室温下浸泡

14~16 h, 然后剥离成熟胚, 横切为两段, 将含胚芽的一段(以后称为半胚)接种于诱导培养基上。其中一部分胚以完整胚(以后称为全胚)的形式接种, 以便和半胚比较培养效果。②幼胚培养。取开花后14 d的4个小麦品种的幼嫩种子, 用75%乙醇消毒1 min, 再用0.1% HgCl₂ 消毒10 min, 无菌水冲洗5~6次, 剥离幼胚接种于诱导培养基上。每个品种都接种120枚半胚、120枚全胚和120枚幼胚, 3次重复。

将胚放置在(24 ± 2)℃的条件下暗培养以诱导愈伤组织。形成的愈伤组织每隔7 d继代1次, 成熟胚愈伤组织在继代培养基中共培养28 d。幼胚愈伤组织在继代培养基中共培养49 d, 继代时除去直接萌发出芽的愈伤组织, 随后将60枚愈伤组织转入分化培养基中, 于(24 ± 2)℃、光照16 h/d (2 000 lx) 条件下培养, 3次重复。

1.4 数据统计及处理 统计萌发率、出愈率、分化率和多苗率。进行F检验及t检验分析。

2 结果与分析

2.1 小麦胚的成愈率比较 供试的11个小麦品种(系)的半胚、全胚及幼胚的平均成愈率都在90%以上。11个品种(系)间半胚和全胚的成愈率无显著差异(半胚 $F = 0.226$; 全胚 $F = 0.213$, $F_{0.05} = 2.30$), 表明愈伤组织的诱导无基因型差异。同一品种(系)的半胚和全胚的成愈率也无显著差异($F = 0.147$, $F_{0.05} = 2.30$), 表明成熟胚被分为两半后不影响愈伤组织的形成。4个小麦品种的幼胚和半胚间成愈率无显著差异(表1), 表明半胚形成愈伤组织的能力和幼胚相似。

2.2 半胚与全胚发芽率比较 成熟胚在形成愈伤组织的同时, 其胚芽会直接萌发成苗。全胚的萌发现象最严重, 平均萌发率43%以上。半胚的萌发率明显比全胚低, 平均9%以下。全胚和半胚的萌发率存在显著差异($F = 74.199$, $F_{0.05} =$

基金项目 农业部948项目(246); 国家自然科学基金(30170579)。

作者简介 叶健(1982-), 男, 四川乐山人, 硕士研究生, 研究方向: 小麦遗传育种。*通讯作者, 博士, 教授。

收稿日期 2007-01-20

2.30),表明半胚能很好地克服胚直接萌发。11个品种(系)间半胚和全胚萌发率无显著差异(半胚 $F = 0.238$;全胚 $F = 0.441$, $F_{0.05} = 2.30$)。表明11个品种(系)胚直接萌发的现象无基因型影响。

表1 4个小麦品种幼胚和半胚平均成愈率比较

小麦品种	幼胚成愈率//%	半胚成愈率//%	t 值
川农 12	92.78	91.94	0.313 ^{ns}
川农 17	92.50	91.38	1.265 ^{ns}
川农 18	91.94	91.38	0.707 ^{ns}
绵阳 11	95.25	91.94	1.211 ^{ns}

注:ns 表示在 $P = 0.05$ 的水平上差异不显著。

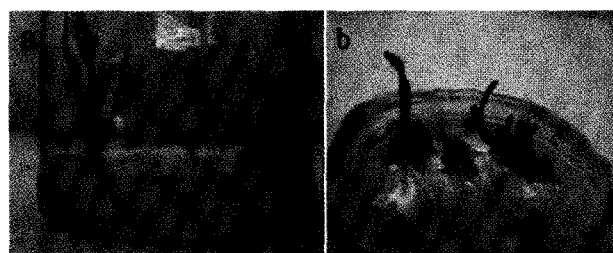
2.3 基因型及不同来源的愈伤组织对植株再生的影响

7个小麦品系的半胚和全胚所形成的愈伤组织,其植株再生率都分别在15%和20%以下,明显低于4个小麦品种,因此未参与比较,说明植株再生率存在基因型差异。4个小麦品种的半胚和全胚的愈伤组织,其植株再生率分别都达35%和47%以上(表2),无显著差异(半胚 $F = 2.458$,全胚 $F = 1.733$, $F_{0.05(3,8)} = 4.07$)。半胚和全胚来源的愈伤组织都能分化出多苗(图1)。尽管全胚愈伤组织的植株再生率比半胚高,且两者间存在明显差异,但半胚来源的愈伤组织分化多苗的能力远高于全胚(表2)。4个小麦品种幼胚形成愈伤组织的植株再生率都在62%以上(表3),且品种间无显著差异($F = 0.247$, $F_{0.05} = 4.07$)。幼胚来源的愈伤组织的植株再生能力比半胚来源的高(表3),且4个品种幼胚来源的愈伤组织全都分化为多苗(图2)。

表2 半胚、全胚愈伤组织植株再生率和多苗率比较 %

品种	植株再生率			多苗率		
	半胚	全胚	t 值	半胚	全胚	t 值
川农 12	37.67	49.44	7.297**	21.11	7.78	16.971**
川农 17	36.67	48.89	11.000**	20.00	8.89	9.998**
川农 18	35.56	47.78	15.556**	18.89	7.77	14.142**
绵阳 11	38.33	50.56	11.000**	21.67	9.44	11.000**

注:** 表示在 $P = 0.01$ 水平上差异极显著。



注:a.半胚愈伤组织上的多苗;b.全胚愈伤组织上的多苗

图1 半胚和全胚愈伤组织上的多苗

表3 4个品种的幼胚和半胚的愈伤组织平均再生率比较

品种	半胚愈伤组织再生率//%	幼胚愈伤组织再生率//%	t 值
川农 12	37.67	63.33	21.927*
川农 17	36.67	62.78	11.750*
川农 18	35.56	62.22	16.971*
绵阳 11	38.33	63.89	17.387*

注:* 表示在 $P = 0.05$ 水平上差异显著。



图2 幼胚愈伤组织上的多苗

3 讨论

为了尽快使小麦转基因得到应用,有必要从大量已审定并推广的优秀小麦品种中筛选具有优良组织培养特性的品种作为转基因受体。该试验表明,供试的11个品种(系)中,4个小麦品种具有较好的组织培养特性,且川农12、川农17和川农18具有高产、抗病、抗衰老等优良农艺性状^[6-7],在小麦转基因研究中具有潜在的优势。供试的4个品种中,绵阳11是其余3个品种的亲本之一^[6-7],这几个品种可以用来进一步研究小麦胚组织培养特性的遗传规律。

在该研究中,虽然幼胚表现出了比成熟胚更好的组织培养特性,但成熟胚取材方便,且表现出较好的组织培养特性,因此,在没有幼胚的情况下,可作为替代幼胚的外植体。对于成熟胚的离体培养,该研究采用了半胚的培养方式,有效地克服了成熟胚在诱导培养基上直接萌发的现象。唐宗祥等建议以提早收获成熟胚的方式克服萌发现象^[8]。但随后的试验表明,提早收获的成熟胚随着存放时间的延长,其成愈率明显下降。另外,以全胚的方式进行培养,形成的愈伤组织绝大多数再生单个植株,这样的植株极有可能是潜伏的胚芽在细胞分裂素作用下直接长成的植株,而不是再分化植株,用这样的愈伤组织接受转化不易得到转基因植株;而以半胚的方式接种,胚芽容易分化形成愈伤组织而不是处于潜伏状态,所以半胚愈伤组织分化多苗的几率高。该研究之所以没有采用含胚根的半胚进行培养,是因为胚根部分形成的愈伤组织分化率极低^[9]。

该试验所选用的再生体系和以往报道的不同^[1,10-11]。尽管该培养体系没有被证明是最好的,但可以作为小麦胚培养的参考。

参考文献

- [1] ÖZGEN M, TüRET M, ALINOK 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: 331 - 335.
- [2] TOMAR P C, PUNIA M S. Callus induction and efficient plant regeneration in wheat [J]. Annals of Agriculture Biology Research, 2003, 8 (1): 1 - 4.
- [3] AHLÖOWALIA B S. Plant regeneration from callus culture of wheat [J]. Crop Science, 1982, 22: 405 - 410.
- [4] KINIZIOS S, TRIANTAFYLLOU M, DROSSOPOULOS J B. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos[J]. Cereal Research Communication, 1996, 24(2): 147 - 153.

黄花株高 120 cm 左右,选定 3 簇群落割除植株地上部分。于开花期(10 月)点查每簇株数,取所有植株地上部分称取鲜重,取 20 株测量株高。测得最终株高 151 cm,鲜重防效 57%。割除植株后会在原桩上长出分枝继续生长,直径较纤细约 0.3~0.8 cm,花序及开花量明显减少,圆锥花序平均高 18 cm,底部直径 16 cm。

3.2 化学防除 采用市场上常见的 3 种除草剂:41%农达水剂、10%草甘磷水剂、13%二甲四氯水剂。对加拿大一枝黄花进行不同药剂、不同施药期、不同药量、不同用药次数、单剂和混剂喷施效果的对比试验。结果表明:①4 月 3 日施 41%农达水剂 4 500 ml/hm² 100 倍液、10%草甘磷水剂、13%二甲四氯水剂,药后 30 d 的株防效分别为 97%、71%、67%;开花期的鲜重防效分别为 67%、54%、1%,从速效性和持效性上

看,41%农达水剂的效果最好。②41%农达水剂 100 倍液 4 500 ml/hm² 4 月 3 日、5 月 3 日、6 月 3 日处理在开花期的鲜重防效分别为 67%、50%、5%,表明 4 月初为化学除该草的最适时期。③41%农达单喷、农达+二甲四氯混喷在药后 30 d 株防效分别为 97%、78%,开花期鲜重防效分别为 67%、37%,41%农达单喷效果要好于农达+二甲四氯混喷。④41%农达 9 750、4 500 ml/hm² 开花期鲜重防效分别为 74%和 67%,41%农达 9 750 ml/hm² 效果佳。⑤1 年中只施药 1 次,可控制植株高度及开花量,但很难将其根除,但植株较 CK 茎秆细小,开花量少于 CK。41%农达 100 倍液 9 750 ml/hm² 苗期、成株期用药 2 次(4 月 3 日和 7 月 3 日),可使 95%以上的植株全株枯死,其余植株青枯,不能复绿,轻拔即出,防效显著(表 2)。

表 2

多种药剂防除加拿大一枝黄花的效果

施药时间	处理	施药前 基数	药后 30 d			开花期				
			株数	株防效//%	株高//cm	株数	株防 效//%	鲜重 kg	平均株 重//kg	鲜重防 效//%
04-03	10%草甘磷 7 500 ml/hm ²	343	101	71	187	186	46	6.6	0.035	54
04-03	13%二甲四氯 4 500 ml/hm ²	326	108	67	215	160	51	12	0.075	1
04-03	41%农达 250 倍液 4 500 ml/hm ² + 13% 二甲四氯 250 倍液 4 500 ml/hm ²	474	104	78	177	208	56	10	0.048	37
04-03	施农达 4 500 ml/hm ²	430	15	97	184	214	50	5.4	0.025	67
05-03	施农达 4 500 ml/hm ²	336	336	0	192	336	0	16.6	0.038	50
06-03	施农达 4 500 ml/hm ²	200	200	0	201	200	0	14.4	0.072	5
04-03	农达 9 750 ml/hm ²	441	14	97	141	203	52	4	0.02	74
04-03,07-03	农达 2 次用药 9 750 ml/hm ²	452	13	97.1	56	23	95	0.18	0.008	
不施药(CK)		268	268		246	268		20.4	0.076	

4 小结与讨论

4.1 生物学特性 加拿大一枝黄花植株平均高度 255 cm,主茎一生平均可着生 340 张叶片,植株生长速度约 1.2 cm/d,叶片生长速度约 1.8 片/d。6 月底至 7 月上旬植株顶部将陆续出现分枝,分枝平均长 33 cm,着生有 72 张叶片,生长速度约 0.3 cm/d,叶片生长速度约为 0.7 片/d。9 月初逐渐过渡到生殖生长期,主茎顶端叶片变小,长出花苞,植株高度增长变缓。分枝开始出现花苞的时间比植株主茎晚 2~3 d。

头状花序 9 月下旬至 10 月上旬陆续开放,每朵花的花期为 11 d 左右。10 月下旬至 11 月上旬种子开始成熟并陆续离开母体。一朵花从开花到种子成熟需 30 d 左右。11 月上旬至中旬,整株花序全部成熟,陆续离开植株后,根状茎开始长出次生苗。从开花到次生苗出土需 40 d 左右。

4.2 药剂防除 ①早春施用 41%农达水剂、10%草甘磷水剂或 13%二甲四氯水剂这 3 种除草剂防除加拿大一枝黄花,以 41%农达水剂的效果最好,用药量 9 750 ml/hm² 效果优于 4 500 ml/hm²。②农达与二甲四氯混用,其防效逊于单用农达,还有待进一步试验探讨。③4 月为化学防除的最适期,用药效果最好。④41%农达水剂 9 750 ml/hm²,1 年用药 1 次可减少加拿大一枝黄花的开花结籽数量;苗期、成株期用药 2 次,可使 95%以上的植株全株枯死,其余植株青枯,不能复绿,轻拔即出,效果显著。

参考文献

- [1] 李扬汉.中国杂草志[M].北京:中国农业出版社,1998:372.
- [2] 沈国辉,钱振官,柴晓玲,等.加拿大一枝黄花的形态特征[J].杂草科学,2004(4):50-51.

- [9] 唐宗祥,张怀渝,张怀琼,等.增强小麦成熟胚脱分化能力的有效方法及其不同部位成愈率植株再生率比较[J].四川大学学报:自然科学版,2005,42(增刊):81-84.
- [10] DELPORT F, MOSTADE O, JACQUEMIN J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat [J]. Plant Cell Tiss Org Cul, 2001, 67: 73-80.
- [11] ZALC J M, WICR H B, KIDWELL K K, et al. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes [J]. Plant Cell Tiss Org Cul, 2004, 76: 277-281.

(上接第 3562 页)

- [5] 余桂荣,尹钧,郭天才,等.小麦幼胚培养基基因型的筛选[J].麦类作物学报,2003,23(2):14-18.
- [6] 任正隆,张怀琼,傅体华,等.高产、抗病、抗衰老的小麦新品种——川农 12 和川农 17[J].麦类作物学报,2003,23(2):97.
- [7] 任正隆,张怀琼,谭飞泉,等.高产抗病优质抗早衰“协调型”小麦新品种——川农 18[J].麦类作物学报,2004,24(4):158.
- [8] 唐宗祥,张怀琼,张怀渝,等.不同小麦成熟胚对愈伤组织形成及萌发的影响[J].麦类作物学报,2005,25(1):33-36.