

# 不同基因型小麦成熟胚盾片组织培养效果研究

祝长青, 李艳红, 赵红艳

(新疆师范大学 生命与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)\*

**摘 要:** 不同基因型及其外植体的愈伤组织诱导和植株分化研究是建立高效植株再生和遗传转化系统的基本条件。文章首次以去胚的成熟胚盾片为外植体材料, 对 10 个小麦基因型进行了离体操作。结果显示: 愈伤组织诱导率平均可达 96.5%, 10 个基因型的愈伤组织都能分化出绿苗, 分化频率最高可达 10.5%, 没有白苗化现象; 根的分化与绿点、绿苗的分化之间具有显著的相关性; 鄂恩 1 号的植株再生能力显著优于其它基因型, 其植株再生系统已具备了遗传转化的基本要求。

**关键词:** 小麦; 成熟胚; 盾片; 出苗

**中图分类号:** 2253.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1008-9659-(2007)-02-0070-04

植物组织培养技术在过去的 40 年里得到了迅猛的发展, 该技术不仅可为植物遗传工程提供理想的受体材料, 而且可为常规的植物改良程序提供一种新的手段, 是高效产生植物新种质、改变植物遗传特性和规模化应用生产的有效技术途径。

小麦是世界上最重要的三大作物之一, 其种植面积和产量均高居榜首, 也是唯一一种含有高分子量蛋白并形成面筋的作物, 但小麦的遗传转化研究却远远滞后于水稻和玉米。虽然现代分子生物学发展快速, 但小麦的基因转化效率却不容乐观<sup>[1]</sup>, 因为转化效率主要取决于转化条件、受体材料和高效植株再生体系的确立等, 其中高效植株再生体系的建立是实现植物遗传转化的前提和基础。可以说, 滞后的小麦细胞和组织培养技术是阻碍小麦基因转移的重要因素。随着现代组织培养技术的发展, 科学工作者已从小麦幼胚、花粉等外植体材料获得了再生植株, 并对这些植株的特征进行了研究<sup>[2]</sup>, 但由于选取相同生理状态的幼胚和花粉材料相当困难, 很难确定目标材料处在同一个发展阶段, 同时, 小麦的播种还受季节、取材时间等诸多因素的限制, 因而很难做出系统的比较和研究。众多原因导致了小麦组织培养方面的研究受到了很大的局限性, 使其技术不能得到有效快速的发展。小麦成熟胚具有方便廉价、不受季节时间限制和易比较等众多优点, 同时在转化过程中还可作为一种有效的标记系统材料。因此文章以我国主栽小麦品种为对象, 通过小麦成熟胚盾片的组织培养, 对建立小麦植株再生系统进行了探索研究, 为实现优良农艺性状基因在我国小麦品种中的遗传转化奠定坚实的理论基础。

## 1 材料和方法

所用小麦种子由湖北省农业研究所李梅芳教授友情提供。种子在 70% 的乙醇和 0.1% 的汞中分别浸泡 1mins 和消毒 20mins, 用无菌水洗滌 3 遍, 24℃ 保湿培养 24h, 从无菌种子上仔仔细去除种子胚, 剥取成熟胚盾片, 盾片向上接种于诱导培养基上进行培养。

基本培养基中加入浓度为 1 mg/L 2,4-D 为研究采用的诱导培养基<sup>[3]</sup>。接种盾片的诱导培养基存放

\* [收稿日期] 2006-10-29

[作者简介] 祝长青(1966-), 男, 新疆乌鲁木齐人, 实验师, 主要从事生物化学与分子生物学的教学实验与研究。

在温度 24℃ 的黑暗环境中进行愈伤组织的诱导 3—4 周。分化培养基的基本成分同诱导培养基, 含 0.01mg/L 2,4-D 和 3mg/L 的 KT, 分化培养温度 24℃, 光照 3000lux(12h/d), 持续 3—4 周, 统计分析。

## 2 统计方法

愈伤组织诱导率 = 愈伤组织诱导团数 / 接种成熟胚盾片数;

生根率 = 生根愈伤组织团数 / 接种成熟胚盾片数;

出苗率 = 出苗愈伤组织团数 / 接种成熟胚盾片数;

显著分析采用 *Duncan* 新复极检验法,  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果和讨论

文章以成熟胚盾片为试验材料, 可有效避免胚轴来源的假阳性再生植株。研究结果显示(见表 1): 被测试的 10 个基因型在接种的第 4 天开始出愈, 一周以后都能有效诱导出愈伤组织, 愈伤组织诱导频率最高可以达到 99.5%, 颜色偏白; 在分化过程中, 愈伤组织都在分化培养一周后都能分化出绿点, 部分分化出芽, 三周后 10 个基因型都有绿苗的分化, 没有白化苗现象的产生; 不同基因型绿苗分化能力比较显示, 鄂恩 1 号显著优于其它基因型, 绿苗分化频率可达 10.6%, 基本满足下一步基因枪遗传转化的要求; 不同基因型之间愈伤组织的诱导频率不存在显著的差异, 但是植株的再生、根和绿点的分化频率却都存在显著的基因型效应。

在小麦组织培养研究中, 小麦基因型的筛选非常重要, 因为基因型既是细胞分化能力, 也是细胞选择和遗传转化的重要内在因素<sup>[4-6]</sup>。文章实验结果验证了小麦组织培养过程中愈伤组织的分化能力具有显著的基因型效应。

在靶材料不是盾片的研究中 *Ozgen et al.* (1998)<sup>[5]</sup> 发现愈伤组织诱导和出苗之间是相互独立的, 成熟胚有较高的愈伤组织诱导率和分化能力。以成胚盾片为材料, 显示了很高的愈伤组织诱导率, 但是出苗率不高; 同时揭示了愈伤组织的诱导与根的形成、绿点和出苗形成之间没有相关性, 并对此进行了相系数检测。用皮尔森相关系数检测( $\alpha=0.05$ )得知生根和植株再生之间有很高的相关性( $r=0.576$ ), 生根和产生绿点之间亦有很高的相关性( $r=0.498$ )。结合 *Larkin* 等人(1984)的发现, 他们认为愈伤组织的诱导可为特定的基因所控制, 研究结果可以初步推断愈伤组织诱导相关基因与生根、出苗和绿点分化相关基因不同或不相关的位点上, 这些结论与 *Bullockd* 等的报道<sup>[7]</sup> 完全一致。

为研究小麦细胞和组织培养, 从 *Chu* 等人开始出现了很多关于小麦愈伤组织诱导和出苗研究的报道<sup>[2,8,9]</sup>, 这些研究表明影响小麦组织培养的主要因素是外植体、基因型和培养基等。目前研究报道的小麦外植体主要包括幼胚、花、幼叶、种子、顶端分生组织、成熟胚等, 结果显示幼胚是公认最好外植体来源, 因为其植株再生能力最高<sup>[10-12]</sup>。但即使是很好的外植体, 也很难在一年中随时得到幼胚, 因为其有效生理状态总受季节的严格限制, 且一年中获得材料的时间太短而不足以进行重复试验。如果能将小麦成熟胚作为外植体在组织培养和转化中应用, 就可以解决上述众多问题。尽管已有对成熟胚组织培养的研究报道<sup>[2,4,5,13-20]</sup>, 但结果却很不令人满意, 主要原因是没有一个连续有效的愈伤组织诱导和植株再生过程, 没有绿点、苗的产生, 因此当时应用成熟胚作为转基因靶材料还不成熟。

对于小麦组织培养, 除了外植体来源和生理状态的影响之外, 已经发现了利用外源激素提高小麦植株的再生频率, 特别是愈伤组织的诱导到出苗早期这个阶段, 合适有效的激素及浓度会大大提高组织培养过程中植株的再生频率和生根率<sup>[2]</sup>。在小麦细胞和组织培养过程中必须加入也是最有效的激素是 2,4-D, 它浓度的有效范围非常广, 但是浓度太高会减少愈伤组织的成活率, 明显阻碍组织培养过程中不同器官的分化, 同时不同浓度的维生素 B1 和肌醇对出苗率有重大影响<sup>[2,3]</sup>。培养基中无机物的组成对成熟胚组织培养中愈伤组织的诱导和分化同样也具有很大的影响<sup>[20]</sup>。后来发现高浓度的糖和硝酸银可以提高面包小麦植株的出苗率, 原因是它减小了在转化过程中对外植体的伤害<sup>[1]</sup>。

文章首次采用小麦成熟胚盾片作为目标材料,通过组织培养途径虽然获得了很好的结果,满足了下一步遗传转化的基本要求,但是植株的分化频率仍然不是很理想,因此研究培养环境对成熟胚盾片的影响还有待于进一步深入研究。

表 1 小麦成熟胚组织培养愈伤组织形成和出苗表格:

基因型	成熟胚个数	愈伤组织诱导率(%)	生根率(%)	绿点率(%)	出苗率(%)
华麦 8 号	216	81.481±5.180 e	19.444±5.278e	10.648±4.114 fg	0.463±0.905 c
鄂恩 1 号	180	91.110±4.158 de	50.556±7.304 a	28.333±6.583 abcd	10.556±4.489 a
鄂麦 12 号	273	93.407±2.944 cd	23.077±4.998 de	20.513±4.790 de	2.564±1.875 b
荆 G35	205	98.049±1.893 abc	48.780±6.843 a	26.829±6.065 bc	0.976±1.346 b
48359	200	97.500±2.164 bc	26.000±6.079 cde	12.500±4.584 fg	1.500±1.685 bc
YANG 87-158	200	99.500±0.978 a	43.500±6.871 ab	37.000±6.691 a	1.500±1.685 bc
鄂麦 11 号	217	98.157±1.790 abc	30.876±6.147 bc	25.346±5.788 bcd	0.461±0.901 c
HAN4589	180	97.778±2.153 bc	17.778±5.585 e	16.111±5.371 ef	0.556±1.086 c
DONG FEN611	199	98.995±1.386 ab	24.121±5.944 de	33.166±6.541 abc	0.503±0.983 c
55072	77	98.701±2.529abc	28.571±10.090 cde	6.494±5.504 g	1.299±2.529 bc

注:相同的上标表示没有显著差异。

#### 参考文献:

- [1] He G. Y., Rooke L., Cannell et al. Current status of transformation in bread and durum wheats and modifications of gluten quality[J]. *Acta Agronomica Hungarica*, 1998, 46(4): 449-462.
- [2] 彭曹华, 毛延林. 小麦成熟胚愈伤组织诱导与植株再生[J]. *北京农业大学学报*, 1989, 15(4): 397-401.
- [3] Barro F., Cannell M. E., Lazzeri P. A. et al. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 684-695.
- [4] zgen M, T ret M, zcan S et al. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes[J]. *Plant Breed*, 1996, 115: 455-458.
- [5] zgen M, T ret M, Altinok 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.
- [6] Machii H. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures[M]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 53: 67-74.
- [7] Bullock WP, Baenziger PS, Schaeffer GW, Bottino PJ. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1982, 65: 155-159.
- [8] Chu CC, Wang CC, Sun CS, Chien NP, Yin KC & Hsu C. Investigation on the induction and morphogenesis of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1973, 15: 1-11.
- [9] 柯遐义, 陈传宏, 杨帆等. 几个影响小麦成熟胚组织培养因素的研究[J]. *广东农业科学杂志*, 1995, 6: 12-14.
- [10] Maddock SE. Cell culture, somatic embryogenesis, and regeneration in wheat, barely, oats, rye, and triticales. In: Bright SWJ, Jones MGK (eds) *Cereal tissue and cell culture*[J]. Nijhoff/Junk, Dordrecht. 1985: 131-174.
- [11] Tuberosa R, Ravaglia S, Lucchese C. Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat[J]. *Agric Med*, 1988, 118: 361-365.
- [12] Redway FA, Vasil V, Lu D, Vasil IK. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 79: 609-617.
- [13] Gosch-Wckerle. Induction, culture and differentiation of callus from immature rachises, seeds and embryos of *Triticum*, [J]. *Phianzenphysiol*, 1979, 91: 267-278.
- [14] akamura, C. Plant regeneration from inflorescence culture of Hexaploid *Triticale*[J]. *Plant Sci. Letters*, 1982, 24: 275-280.
- [15] Ozias-Akins P, Vasil IK. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat)[J]. *Protoplasma*, 1983, 117: 40-44.

- [16] Heyser JW, Nabors MW, MacKinnon C et al. Long-term, high-frequency plant regeneration and the induction of somatic embryogenesis in callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Z Pflanzenzucht*, 1985, 94: 218-233.
- [17] 李宏潮, 胡道芬, 王鸿. 小麦成熟胚组织培养影响因素研究[J]. *中国农业科学*, 1990, 5(1): 22-27.
- [18] 范光年, 王培, 方荏等. 小麦成熟胚诱导再生体系在农业中的应用[J]. *物学通报*, 1991, 8(2): 39-42.
- [19] Kato K, Chowdhury SH, Harada S. Effect of culture condition on plant regeneration capacity of mature embryo derived callus in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Wheat Inf Serv*, 1991, 72: 95-97.
- [20] Deleon JLD, Garibaldimeza C. Potential practical applications of in-vitro culture of mature wheat embryos[J]. *Cereal research communications*, 1995, 23(1-2): 19-25.

## Screening wheat genotypes (*Triticum aestivum*) for high callus induction and regeneration capability from mature embryo cultures

ZHU Changqing, ZHAO Hongyan, LI Yanhong

(*School of Life and Environment Sciences, Xinjiang Normal University, Urumuqi Xinjiang 830054*)

**Abstract:** The callus induction and the plant regeneration from the different genotype and its explant with the method of tissue culture are the important factors in establishing cell selection and genetic transformation systems. Mature embryo scutellum (without embryo) explants, of 10 Chinese wheat (*Triticum aestivum*) varieties were used to screen genotype to obtain high frequencies of callus induction and plant regeneration in vitro. It shows: the average callus induction rate can reach 96.5%; 10 genotypes regenerated green plants; the genotype with a high regeneration capability was 10.5%; No genotypes produced albino plants; and the callus formation is independent from rooting, plant regeneration and green spot. There were significant correlations between rooting and green plants, rooting and green spots.

**Key words:** Wheat (*Triticum aestivum*); mature embryo culture; scutella; plant regeneration

