

小麦成熟胚组织培养及遗传转化研究进展

陶丽莉¹,殷桂香^{2,1},叶兴国¹

(1. 中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物遗传育种重点实验室/国家基因资源与遗传改良重大科学与工程,北京 100081;
2. 长江大学农学院,湖北荆州 434025)

摘要: 小麦成熟胚转化体系的建立对促进小麦基因工程研究和功能基因组研究具有重要意义。小麦成熟胚具有取材方便、不受季节限制等优点,已成功应用于小麦组织培养及遗传转化研究,可望取代幼胚成为小麦遗传转化的方便受体。本文就目前小麦成熟胚组织培养及遗传转化研究进行了综述,目的是为进一步建立和完善小麦成熟胚再生体系和转化体系提供参考。目前国内外采用较多的小麦成熟胚培养方式主要有完整成熟胚培养、胚乳支撑成熟胚培养、成熟胚刮碎培养和成熟胚切割培养等。对培养基中激素种类、浓度配比的优化也进行了较多研究,并取得了一定结果。利用基因枪轰击法和农杆菌介导法转化小麦成熟胚均成功获得了转基因植株,证明小麦成熟胚及其愈伤组织作为受体进行遗传转化研究具有可行性。

关键词: 小麦;成熟胚;组织培养;遗传转化

中图分类号:S512.1;S336

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2008)04-0713-07

Progress Outline of Wheat Tissue Culture and Genetic Transformation by Using Wheat Mature Embryos As Explants

TAO Li-li¹, YIN Gui-xiang^{2,1}, YE Xing-guo¹

(1. National Key Facilities for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Key Laboratory for Crop Genetics and Breeding of Agricultural Ministry, Crop Sciences Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
2. Agronomy College of Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: Wheat mature embryo has been regarded as a high potential explants for plant regeneration and genetic transformation because of some distinguish advantages such as easy collection all the year round, consistent physiological status and economic experiment process. In the last ten years a great success has been achieved on the tissue culture and transformation of wheat by using mature embryos worldwide. To get good regeneration system, the mature embryos are tested to be cultured by several ways including whole embryo culture, endosperm-supported embryo culture, thin embryo fragments culture, and cutting embryo culture treatments. The effects of concentrations and combinations of various growth regulators on callus induction and plant regeneration have also been studied, and some available results obtained. Using the mature embryos as target tissues, transgenic plants have been reported mediated with Agrobacterium technique and biolistic particle approach, proving the bright possibility of the explants employed in wheat transformation. We summarized here the progress of wheat mature embryo culture and transformation to provide reference for the optimization of the both systems. Efficient systems of the wheat mature embryo culture and transformation will remarkably promote wheat genetic engineering improvement and functional genomics study.

Key words: Wheat; Mature embryos; Tissue culture; Transformation

收稿日期:2008-02-05 修回日期:2008-05-20

基金项目:国家“863”项目(2007AA10Z129)。

作者简介:陶丽莉(1982-),女,硕士研究生,主要从事小麦组织培养和遗传转化研究。E-Mail:taolili19820401@sina.com

通讯作者:叶兴国(1963-),男,研究员,主要从事小麦生物技术育种研究。E-mail:yexg@mail.caas.net.cn

小麦是世界上最重要的粮食作物之一,小麦品种的遗传改良工作一直受到科学家的广泛关注。传统常规育种方法存在着周期长、改良进程缓慢等缺点,利用转基因手段将特定的外源基因导入小麦中,从而定向改良小麦品种,为小麦遗传育种提供了一条新途径。随着生物技术的发展,转基因小麦的研究取得了一定进展。虽然已建立了各种转化小麦的方法,但目前仍存在一些问题。限制其发展的一个最主要因素是缺乏便捷、高效和稳定的组织培养体系,植株再生频率低。所以,建立高效的再生体系已成为小麦遗传转化的关键所在^[1~3],外植体选择是其重要环节。

到目前为止,小麦组织培养成功的外植体包括幼胚、幼穗、花药、成熟胚、幼叶、子叶中层、种子、悬浮细胞、子房、茎尖、根尖分生组织和原生质体等^[2~4]。其中,幼胚被认为是最理想的外植体材料,愈伤组织诱导率和植株再生率都比较高,获得转基因小麦植株的报道基本以幼胚为受体。而小麦幼胚取材受时间、空间和季节的限制,合适的取材时期难以把握,所取材料生理状态、发育阶段的一致性也不能很好保障,在一定程度上制约了转基因小麦的有效开展与应用。小麦成熟胚取材方便,不受季节、植株发育阶段等因素限制,能保证不同个体间生理状态的一致性,是开展小麦遗传转化最为方便实用的受体^[2~4]。但是,小麦成熟胚植株再生率目前还非常低,探索并优化小麦成熟胚组织培养条件,建立高频率的植株再生体系,对小麦转基因工作的开展将有巨大的推动作用。本文就目前小麦成熟胚培养及遗传转化的研究进展作一概述,旨在为广大科研工作者提供有价值的参考。

1 小麦成熟胚组织培养研究进展

为了建立小麦成熟胚组织培养体系,人们对成熟胚培养方式和培养基中激素种类、浓度、配比等进行了研究。

1.1 小麦成熟胚培养方式及特点

在成熟胚处理方面,最初采用完整胚直接接种,再生效果很差,再生植株频率很低,多数基因型不能得到再生植株。后来逐步发展了胚乳支撑接种、成熟胚刮碎接种、成熟胚切割接种等,再生植株频率得到了一定提高。

1.1.1 完整成熟胚培养效果研究 Chin 等^[5]从萌动 48 h 的种子上剥离成熟胚培养,即将成熟胚从吸胀的成熟种子中取出,盾片向上接种在愈伤组织诱导培养基上。成熟胚形成愈伤组织比较缓慢,初期形成的愈伤组织结构松软、半透明、水分含量比较高,经过几次继代培养后才能产生具有一定分化能力的颗粒状愈伤组织。王海波等^[6]将干种子浸泡 10 h,然后取成熟胚接种,发现培养效果不及直接用干种子接种。Bi 等^[7]先切去种子胚芽和胚根,再将胚剥离后培养,对 31 个小麦品种的培养发现成熟胚培养具有很强的基因型依赖性,不同的基因型在愈伤组织诱导、胚性愈伤组织分化、植株再生和培养效率方面存在显

著差异。Yu 等^[8]用此方法研究了部分小麦品种成熟胚再生效果,得到了较高的植株再生率,并对培养基组分进行了优化,表明 MS 培养基添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) 诱导愈伤组织效果最好,继代培养基中添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA (Naphthaleneacetic acid) 能够显著促进胚性愈伤的发生,分化培养基中加入 AgNO_3 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能有效促进植株再生, CuSO_4 能促进根的形成。另有研究表明,在诱导和分化培养基中加入低浓度 TDZ (Thidiazuron, N-苯基-N'-1,2,3-噻二唑-5-脲) 有一定正向效果^[9]。Ding 等^[10]用完整成熟胚接种,比较了 2, 4-D 和 Picloram (4-amino-3, 5, 6-trichloropicolinic acid) 在胚状体形成和再生过程中的作用,发现 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Picloram 处理中胚性愈伤组织诱导率和植株再生率均为最高,植株再生率达 30.6%。

1.1.2 成熟胚切割培养效果研究 在灭菌后过夜浸泡的小麦籽粒上将成熟胚均匀纵向切成两部分,并将其从籽粒上剥离,切面向上接种于诱导培养基上进行培养。利用此方法接种的成熟胚诱导愈伤组织比较缓慢,且胚尖部位容易出现实生芽,需要及时去掉。初期形成的愈伤组织质地疏松、略带水浸状、无胚性,继续培养后部分愈伤组织逐步生长出白色、结构紧密、干燥、颗粒状胚性愈伤组织,具有较强的分化能力。Wan 等^[11]将 Bobwhite 成熟胚纵切后先在 MS 附加 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 和 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Picloram 培养基上培养,然后在 2, 4-D 浓度降低到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Picloram 浓度不变的培养基上继代培养,最后在 MSO 培养基上分化植株,丛生芽诱导率高达 90% 以上,初步建立了 Bobwhite 成熟胚的再生体系。Zale 等^[12]的研究表明,该方法能较好诱导胚性愈伤组织和再生植株,而且对模式品种 Bobwhite 和农艺性状较好的品种都适用。Tang 等^[13]则将小麦成熟胚横切为两段,用含有胚芽的一段诱导愈伤组织,也得到了比较理想的再生效果。

1.1.3 胚乳支撑成熟胚培养效果研究 Özgen 等^[2,3]利用胚乳提供营养的方式培养小麦成熟胚获得了再生植株,为小麦成熟胚离体培养开辟了新途径,即用解剖刀将吸胀种子的胚与胚乳轻轻分开但不剥离,在籽粒上进行成熟胚培养,11 d 左右形成乳白色的愈伤组织,然后小愈伤组织与胚乳分离后单独培养,逐步出现淡黄色颗粒状愈伤组织。胚乳支撑培养研究结果表明,成熟胚愈伤诱导和再生与基因型密切相关。该方法需要对种子进行严格灭菌,否则污染现象比较严重。Mohammad 等^[14]直接培养浸泡后的种子,发现 MS 培养基添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP 能产生质地疏松、颗粒状的愈伤组织,在含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA (Indoleacetic acid) 或 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 的 MS 培养基上可分化植株。王海波等^[6]将干种子切去胚根、茸毛后直接培养或种子浸泡 10 h 后培养,发现萌动种子比干

种子出愈快,愈伤组织质量好,切去胚根和茸毛后的干种子也能产生一定量的愈伤组织,表明胚乳有利于提高愈伤组织活力。

纵横切法是在胚乳支撑法和切割法基础上改进的一种新方法,即在灭菌的种子将胚纵切一刀、横切两刀,将种子接种在培养基上进行培养。此方法可有效抑制芽的直接萌发,形成愈伤组织的速度较胚乳支撑法快,愈伤组织质量明显提高,分化能力比较强。Mikhail 等^[15]应用该方法研究了生长素类型及生长素处理时间对愈伤组织形成和植株再生的影响,发现 Dicamba(3,6-dichloro-o-anisic acid)效果最佳,Dicamba 处理时间由 7d 延长到 21 d,胚性愈伤组织诱导率和植株再生率都明显提高。Birsin 等^[16]对胚乳支撑法和整粒切胚愈法进行了对比研究,发现胚乳支撑法的植株再生效率较高。

1.1.4 成熟胚刮碎培养效果研究 将成熟种子灭菌消毒后浸泡一定时间,在种子上将成熟胚刮成碎屑接种在培养基上诱导愈伤组织。刮碎的成熟胚组织能很好地抑制胚的直接萌发,出愈率高,产生的愈伤组织比较致密,表面有球状突起,呈淡黄色颗粒状,再生能力强。Delporte 等^[4]把小麦成熟胚从种子上刮碎后进行组织培养,胚性愈伤组织诱导率高达 47%,并且获得了比较理想的再生效果。林德书等^[17]将晋麦 2148 的成熟胚刮碎后接种在 MS 附加 11.2 g · L⁻¹ 葡萄糖、2 mg · L⁻¹ 2,4-D 的培养基上诱导愈伤组织,3 周后将愈伤组织转移到 MS 附加 11.2 g · L⁻¹ 葡萄糖、0.2 mg · L⁻¹ IAA 的培养基上继续培养 4~8 周,然后转移到 1/2MS 附加 30 g · L⁻¹ 蔗糖的培养基上分化植株,再生率为 21.5%,初步建立了晋麦 2148 成熟胚的再生体系。

1.2 培养基中激素种类和浓度配比的优化

在小麦成熟胚培养过程中,培养基和基因型是最关键的影响因素。植物激素作为培养基中必不可少的组分,对于调节组织和细胞培养中胚状体的发生具有举足轻重的作用。生长素和细胞分裂素浓度及比例控制着细胞的分裂和器官的分化。国内外学者对小麦成熟胚组织培养中诱导培养基和分化培养基中添加的激素种类及其浓度配比进行了较多研究^[2,3,11,18]。

2,4-D 是小麦成熟胚培养中应用最广泛的生长调节剂,培养基中添加 2~8 mg · L⁻¹ 2,4-D 都能诱导愈伤组织,但具体浓度与成熟胚的培养方式密切相关。刮碎法和整粒切胚愈法 2,4-D 浓度一般为 2 mg · L⁻¹^[7],胚乳支撑法则以 8 mg · L⁻¹ 为宜^[2,3]。高浓度 2,4-D 能有效抑制胚发芽,但对愈伤组织的分化不利^[7,11,19,20]。细胞分裂素 KT 在某种程度上能够拮抗高浓度 2,4-D 对愈伤组织分化的抑制作用,但附加 KT 对愈伤组织有一定的毒害作用。研究还发现,在成熟胚愈伤组织诱导的起始阶段 2,4-D 起着非常重要的作用,之后需降低 2,4-D 浓度或不添加 2,4-D 才会更有利于胚性愈伤组织的产生^[2,4]。在生根培养基中,添加低浓度 2,4-D 或不添加任何生长素的效果比

添加 IAA 和 BAP 的效果要好^[11,18]。王海波等探讨了不同水平的 2,4-D 对愈伤组织质量的影响,发现单纯增加或降低 2,4-D 浓度并不能很好地改善愈伤组织的生长状态,应根据愈伤组织的状态确定继代培养基中 2,4-D 的用量,原来质量很差的愈伤组织经过继代培养可以得到改良,高水平 2,4-D 配合 0.2 mg · L⁻¹ KT 或 6-BA 有利于维持愈伤组织的致密结构和促进芽分化^[6]。

除 2,4-D 外, Dicamba、Picloram 和 2-MCPP (2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid)、2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) 等也在小麦成熟胚培养得到了实践。通过比较不同生长素在小麦成熟胚愈伤组织诱导和植株再生过程中的效果,发现使用 Dicamba 得到的胚性愈伤率最高,在含有 Dicamba 的诱导培养基中加入 IAA、IBA(Indolebutyric acid)和 NAA 对胚性愈伤的形成有促进作用,其中 0.5 mg · L⁻¹ IAA 与 Dicamba 结合能明显促进体细胞胚发生,并能显著提高植株再生率^[12,15,21]。与 2,4-D 相比,Dicamba(18 μmol · L⁻¹)诱导产生的愈伤组织分化能力好,同时还能大大缩减植株再生所需的时间,这与幼胚培养中用 Dicamba 取代 2,4-D 的结果相同^[1]。一般而言,Picloram 能显著加快小麦成熟胚形成愈伤组织,但胚性愈伤组织诱导率和植株再生率较低,而 Ding 等^[10]利用低浓度(1.0 mg · L⁻¹)培养小麦成熟胚获得了较好的培养效果。Bi 等^[7]对不同小麦品种成熟胚进行了离体培养研究,发现 ABA 的浓度虽然对愈伤组织诱导率没有影响,但随着其浓度的增加,愈伤组织质量和分化率有所降低。李宏潮等^[22]认为 ABA 仅对根的分化有促进作用。于晓红等^[23]发现加入 ABA 可以有效抑制成熟胚发芽,并有助于胚性愈伤组织的形成以及愈伤组织再生能力的保持,添加 TDZ 可明显提高芽分化频率,1/2MS 附加低浓度 NAA 的培养基可有效促进生根。Ganeshan 等^[24]的研究表明,小麦成熟胚在添加 TDZ 或 TDZ+BAP 组合的培养基上再生效果较好。

2 小麦成熟胚遗传转化研究进展

近三十年来,随着转基因技术的不断完善,小麦遗传转化研究也取得了长足进步。1992 年 Vasil 等^[25]以小麦幼胚为外植体,采用基因枪介导法将 bar 基因导入了长期培养的胚性愈伤组织,首次获得了小麦转基因植株。1997 年 Cheng 等^[26]利用农杆菌介导法转化小麦获得成功。随后,花粉管通道法、电激法、PEG 法等转化方法相继用于小麦,将各种有益基因转入了小麦,获得了具有抗病、抗逆以及改善品质的转基因小麦,为改良小麦抗性和品质等性状奠定了基础^[27]。但目前小麦转基因研究仍存在很多问题,如组织培养再生率低、基因型依赖性强、转化频率低和受体单一等,限制了转基因小麦的快速发展和应用。

迄今为止,转基因小麦研究还主要以幼胚为转化受体,受体的单一性成了制约小麦转基因研究的瓶颈。成熟胚由于不受生长季节的限制,取材方便等优点,有望取代

幼胚成为小麦遗传转化的方便受体。因而,将小麦成熟胚组织培养技术与遗传转化技术结合对小麦进行遗传改良,一直是大家关注的研究热点。但由于小麦成熟胚培养再生效率低,这方面的成功报道还比较少。目前,尝试小麦成熟胚的转化方法主要有基因枪介导法和农杆菌介导法。

2.1 基因枪介导的小麦成熟胚转化

自基因枪法成功转化小麦以来,一直是小麦遗传转化的主要方法。基因枪法的广泛应用主要是由于受体取材广泛,可以是胚性悬浮细胞、幼胚、成熟胚、幼穗等产生的愈伤组织,也可以是花药、盾片等。另外,基因枪转化技术可以减弱基因型特异性限制,避免农杆菌导致的小麦细胞死亡现象,并可在细胞、组织水平进行操作^[27,28]。

随着小麦成熟胚培养技术的发展,应用基因枪法转化小麦成熟胚的研究吸引了科研工作者的兴趣。Wan 等^[15]将 Bobwhite 成熟胚纵切后接种在 MS 附加 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 和 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Picloram 培养基上预培养,基因枪轰击包含 GFP 和 NPTII 基因的质粒 DNA,在 MS 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D、 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Picloram 和 $25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ G418 的培养基上筛选 2 周,转移到 MS 含同样浓度 G418 的培养基上分化植株,轰击后 2 周在 15% 的组织中或芽中观察到了 GFP 基因表达,抗性再生植株经 Southern blot 检测证实转化效率为 3%。Patnaik 等^[27]用整粒切胚法诱导成熟胚愈伤组织,然后用基因枪轰击胚性愈伤组织,成功地将抗除草剂 BAR 基因转入六倍体和四倍体小麦,获得了转基因植株,PCR、Southern blot 杂交分析表明转基因后代能够正常分离并稳定遗传。Tang 等^[17]将成熟胚横切为两部分,利用含胚芽的部分诱导愈伤组织,然后用基因枪介导法进行转化,转化效率达 2.3%。Delporte 等^[28]利用基因枪轰击刮碎法诱导产生的愈伤组织,组织化学染色结果显示 GUS 基因在轰击组织中可以稳定表达,发现预培养 6 d 的愈伤组织最有利于外源基因的转化。林德书等^[14]将成熟胚刮碎后诱导愈伤组织,利用基因枪介导法将 GUS 基因转入了晋麦 2148 成熟胚愈伤组织,X-Gluc 染色表明 GUS 基因已经在小麦成熟胚愈伤组织中表达,瞬间表达率达 29% 左右。

2.2 农杆菌介导的小麦成熟胚转化

1997 年 Cheng 等^[26]利用农杆菌介导法首次获得了小麦转基因植株,建立了农杆菌转化小麦幼胚的技术体系。随后,夏光敏^[29]、叶兴国^[30]等也分别利用农杆菌介导法转化小麦幼胚获得了转基因植株。与基因枪介导法相比,农杆菌介导法具有操作简便、成本低、可以转移较大片段 DNA、转基因多为单拷贝整合、基因沉默现象较少、后代遗传较为稳定等特点,在小麦转基因研究中一直受到普遍重视^[10]。但在农杆菌介导的小麦转化方面,目前多以幼胚及其来源的胚性愈伤组织作为转化受体,极大限制了工作效率。近几年也出现了少数利用农杆菌介导法转化小麦成熟胚的报道,Khurana 等^[19]以四倍体小麦成熟胚愈伤组织为外植体,利用农杆菌 LBA4404 (pBI101::

Act1) 转化获得了转基因植株,组织化学染色结果证实外源基因成功整合到受体基因组中。Patnaik 等^[31]以成熟胚和成熟胚愈伤组织为受体,分别利用携带 pBI101::Act1、p35SGUSINT 二元表达载体的 LBA4404 农杆菌进行侵染,PCR 以及 Southern blot 结果均显示外源基因已成功整合并遗传。王艳丽等^[32]选用西农 222、豫麦 66、扬麦 6 号和 Bobwhite 等小麦基因型,完整成熟胚和纵切后的成熟胚直接用于农杆菌(菌系为 C58C1)侵染,刮碎成熟胚在改良 MS、N6 等培养基上培养 7~10 d 后用于农杆菌侵染,室温下感染 15 min 后在无菌滤纸上共培养 2 d,组织化学染色检测部分受体组织中 GUS 基因(含内含子)瞬时表达,其余受体组织进一步恢复、筛选和再生,证明豫麦 66 成熟胚对农杆菌感染最为敏感,在三种处理方式的愈伤组织中都观察到了 GUS 基因表达,表达率分别为 3.3%、64.9% 和 94.4%,均分别高于其它基因型;成熟胚纵切更利于农杆菌感染,但豫麦 66 以成熟胚切碎后在含 AS 的 N6 培养基上预培养 7 d 为最高;T₀ 代经 PCR 和 nptII ELISA 检测,获得了 20 株阳性植株,其中有 3 株 ELISA 检测呈现阳性,表明外源基因已经整合到了小麦基因组中并已正常表达完整成熟胚或其愈伤组织,组织化学染色、PCR 扩增以及 Southern blot 杂交结果表明,外源基因已成功整合并遗传,共培养培养基中加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮可有效提高转化效率,共培养时间 2 d 效果最佳。Ding 等^[10]利用含 pBI121 载体的 LBA4404 农杆菌侵染小麦完整成熟胚,以 GUS 基因表达和分子检测结果为依据,对转化过程的影响因素进行了研究,认为干燥条件下共培养更有利于农杆菌的侵染。陈立国等^[33]以含有 pATC 载体的 LBA4404 农杆菌对小麦成熟胚愈伤组织进行转化,发现菌液浓度 OD_{600} 为 0.8、侵染时间为 60 min 时转化效率最高。

3 存在的问题

相对于其他单子叶植物,小麦基因工程育种研究远远滞后。限制小麦转基因研究发展的首要因素是缺乏有效的受体及其再生体系。小麦幼胚虽然再生性能比较强,但取材在时间和空间上受到很大限制,适宜转化的生理状态对培养条件的要求比较严格,转化周期比较长^[15]。相比幼胚,成熟胚取材方便,生理状态一致,不受生长季节限制,是组织培养和遗传转化理想的外植体,如水稻成熟胚再生频率很高,显著促进了水稻转基因研究和功能基因组研究的发展。另外,以小麦成熟胚作为遗传转化的受体,不但节省时间、空间和能源,提高工作效率,而且更经济、方便、实用。然而,小麦成熟胚的离体再生还比较困难,再生频率还比较低。如何诱导成熟胚产生高质量的愈伤组织及高频率再生植株是小麦成熟胚转化的关键。综合多方面的结果,完整成熟胚直接培养容易长芽,但难以产生高质量的胚性愈伤组织,需要对成熟胚进行必要的切割处理。另外,小麦成熟胚培养需要较高的生长素浓度,低浓

度生长素不足以抑制实生苗的生长和诱导胚性愈伤组织。其次,利用 GUS 基因作为报告基因建立或优化农杆菌转化小麦成熟胚体系时,GUS 基因中间需要插入内含子,以确保 GUS 基因只在小麦细胞中表达,而在细菌中表达,避免组织化学染色结果的假阳性。

限制转基因小麦研究的另一个主要因素是缺乏再生能力强、农艺性状优良的受体基因型。目前开展小麦转基因研究利用的材料大多是模式品种 Bobwhite,根据笔者课题组开展小麦幼胚培养和成熟胚培养的资料,Bobwhite 并不是最好的基因型,况且 Bobwhite 农艺性状较差,以 Bobwhite 为受体获得转基因材料后也很难直接商业化应用。因而选择具有良好组培特性的主栽品种,筛选对转化敏感的基因型,仍是小麦基因工程育种的重要环节^[17]。利用小麦幼胚为受体进行农杆菌转化中存在的主要问题是小麦幼胚经农杆菌侵染后停止生长,褐化死亡现象严重,不能进一步产生胚性愈伤组织和获得抗性再生植株,从而严重制约了小麦幼胚在农杆菌介导的小麦遗传转化中的应用^[34]。

4 研究前景

小麦成熟胚经农杆菌侵染后褐化坏死现象不严重,作为农杆菌转化的受体具有非常广阔的应用前景。因此,需要继续探讨影响小麦成熟胚愈伤组织诱导和再生频率的因素、进一步优化成熟胚培养体系和转化体系。

笔者课题组利用相同基因型对小麦成熟胚 4 种培养方式(完整胚直接接种、胚乳支撑接种、成熟胚刮碎接种、成熟胚切割接种)进行了比较,表明成熟胚刮碎接种再生效果最好,其次为成熟胚切割接种,完整胚直接接种和胚乳支撑接种再生频率很低。在利用小麦成熟胚刮碎培养技术的基础上,对培养基进行了改进,同时开展了农杆菌转化研究,发现培养基中加入山梨醇、甘露醇、Dicamba、AgNO₃ 等成分可明显提高成熟胚碎末组织再生率、保持农杆菌侵染后愈伤组织的活力和抑制农杆菌引起的细胞死亡现象。利用改进后的培养基,济麦 20、郑 9023、石 4185、Bobwhite、邯 6172 和轮选 987 成熟胚刮碎组织的再生率 32%~84%。利用农杆菌转化法将 nptII 等基因转入了小麦成熟胚愈伤组织,获得了转基因植株,并对转基因植株进行了 PCR、ELISA 和 Southern blot 等检测,转化效率 0.6%左右,需要进一步提高转化效率。

小麦成熟胚再生体系和转化体系的不断完善,对于促进小麦基因工程育种和小麦功能基因组研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] Satyavathi V V, Jauhar P P, Elias E M, *et al.* Effects of growth regulators on in vitro plant regeneration in durum wheat[J]. *Crop Science*, 2004, 44: 1839-1846.
- [2] Özgen M, Turet 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: 455-458.
- [3] Ozgen M, Turet 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: 331-335.
- [4] 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.
- [5] Chin J C, Scott K J. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures[J]. *Annual Review of Botany*, 1977, 41: 473-481.
- [6] 王海波, 范云六. 用“对话”试验探索植物组织培养机制并建立适用性广的小麦组织培养方法[J]. *作物学报*, 2006, 32(7): 964-971.
- [7] Bi R M, Kou M, Chen L G, *et al.* Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*[J]. *Plant Breeding*, 2007, 126: 9-12.
- [8] 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*, 2007, 125: 1-7.
- [9] Hars C, Srinivas A D, Paramjit K. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2007, 91: 191-199.
- [10] 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 Report*, 2007, 37: 104-109.
- [11] Wan Y, Liu C N. Regeneration and genetic transformation of wheat using mature embryos[J]. *Congress on In Vitro Biology*, 2001, 7: 3012.
- [12] Janice M Z, Harmony W K, Kidwell 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: 277-281.
- [13] Tang Z X, Ren L, Wu F, *et al.* The selection of transgenic recipients from new elite wheat cultivars and study on its plant regeneration system[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(6): 417-424.
- [14] Mohammad I S, Mussarat J, Ihsan I. In vitro callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Botany*, 2003, 35(2): 209-217.
- [15] Mikhail F, Dmitry M, Darya V, *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: 213-222.
- [16] Birsin M A, Özge M. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale × *Triticosecale Wittmack* [J]. *Cellular & Molecular Biology*

- Letters, 2004, 9: 353-361.
- [17] 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, 2005, 34(2): 141-144.
- [18] Chawla H S, Wenzel G. Regeneration potential of callus from wheat and barley. Archiv fur Zuchtungsforchung[J]. Bockhorn, Grunbach, German Federal Republic, 1987, 17(6): 337-343.
- [19] Khurana J, Archana C, Paramjit K. Regeneration from mature and immature embryos and transient gene expression via Agrobacterium-mediated transformation in emmer wheat (*Triticum dicoccum Schuble*) [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2002, 40: 1295-1303.
- [20] 李根英, 黄承彦, 隋新霞, 等. 小麦不同外植体的组织培养效果研究[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 21-25.
- [21] Maria G M, Heidi F. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. In Vitro Cell Development of Biology of Plant, 2002, 38: 39-45.
- [22] 李宏潮, 胡道芬, 王虹. 影响小麦成熟胚培养因素的研究[J]. 华北农学报, 1990, 5(1): 22-27.
- [23] 于晓红, 朱 楨, 付志明, 等. 提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J]. 植物生理学报, 1999, 25(1): 388-394.
- [24] Seedhabadee G, Sanjay V C, Monica B, et al. In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 85: 63-73.
- [25] Vasil V, Castillo A M, Frommm M E, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. Bio/Technology, 1992, 10(6): 667-674.
- [26] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by Agrobacterium tumefaciens [J]. Plant Physiology, 1997, 115: 971-980.
- [27] Patnaik D, Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli[J]. BMC Plant Biology, 2003, 3: 5-15.
- [28] Delporte F, Shirun L, Jean M J. 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: 139-149.
- [29] Xia G M, Li Z Y, He C X, et al. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. Acta Phytophysiological Sinica, 1999, 25(1): 22-28.
- [30] 叶兴国, Shirley S, 徐惠君, 等. 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): 465-468.
- [31] Patnaik D, Vishnudasana D, Khurana P. Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum* [J]. Current Science, 2006, 91(3): 307-317.
- [32] 王艳丽, 叶兴国, 王道文. 基于小麦成熟胚培养的农杆菌转化研究[J]. 西南农业学报, 2005, 18(增刊): 100.
- [33] 陈立国, 后 猛, 王玉海, 等. 农杆菌介导小麦成熟胚愈伤组织的遗传转化研究[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(2): 188-192.
- [34] David L P, Anne J A, John G C. Agrobacterium induces plant cell death in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2002, 60: 59-69.

