

基因枪转化光温敏雄性不育小麦受体的选择 与培养条件优化

王灵云¹, 张立平^{1,2}, 赵昌平^{1,2}, 张风廷^{1,2}, 樊建青¹, 苑少华², 郭玉平²

(1. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100048; 2. 北京杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 为了选择适宜的基因枪转化光温敏雄性不育小麦的受体, 并对幼胚组织培养条件进行优化, 以小麦光温敏雄性不育系 BS210、BS366 以及常规品种京 411 的幼胚为材料, 分别对碳源、除草剂浓度和基因型进行筛选。结果表明, 在以蔗糖和麦芽糖为碳源的诱导培养基上, 幼胚的愈伤率差异不显著; 在以蔗糖和麦芽糖为碳源的分化培养基上, 愈伤组织的分化率差异显著, 其中添加麦芽糖的培养基上分化率较高; 在对轰击过 *bar* 基因的幼胚愈伤组织进行筛选时, 除草剂 Biolaphos 的最适浓度为 2 mg/L。3 个受体材料离体培养过程中出苗率差异显著, 其中 BS210 出苗率高, 是较优良的转化受体, 为今后利用转基因技术改良光温敏雄性不育小麦奠定了基础。

关键词: 小麦幼胚; 光温敏雄性不育; 碳源; 除草剂浓度; 基因型

中图分类号: S512.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0126-04

The Choice of Photo-thermo-sensitive Male Sterile Wheat Receptor Through Partical Bombardment and the Optimization of Culture Conditions

WANG Ling-yun¹, ZHANG Li-ping^{1,2}, ZHAO Chang-ping^{1,2}, ZHANG Feng-ting^{1,2},
FAN Jian-qing¹, YUAN Shao-hua², GUO Yu-ping²

(1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China;
2. Beijing Research Center for Hybrid Wheat, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to choose the appropriate receptor of photo-thermo-sensitive male sterile wheat for bombardment and optimize the Culture condition of immature embryos, We used immature embryos of 3 wheat lines including photo-thermo-sensitive male sterile line BS210, BS366 and normal cultivar Jing 411. Carbon source, screening concentration and genotype were screened respectively. The study showed that the frequency of embryos callus formation is not significantly different between sucrose and maltose as the carbon source. While adding maltose in different mediums, the frequency of callus differentiation was higher than the medium adding sucrose. During screening callus that the *bar* gene had bombarded in, the optimal concentration of herbicides biolaphos was 2 mg/L. The seeding rate of three material was significantly different. The seeding rate of BS210 was higher than other plants, which is the best recipient for transformation. The research sets the foundation for the improvement of photo-thermo-sensitive male sterile wheat.

Key words: Wheat immature embryos; Photo-thermo-sensitive male sterility; Carbon source; Concentration of herbicide; Genotype

二系法杂交小麦是小麦杂种优势利用的重要途径, 其中小麦光温敏雄性不育系是二系杂交小麦育

收稿日期: 2011-05-07

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5091001); 国家高技术研究与发展计划“863”项目(2009AA101102; 2011AA10A106); 农业部“948”项目(2009-Z4); 北京市农业育种基础研究创新平台项目(D08070500690801; D111100001311002)

作者简介: 王灵云(1984-), 女, 河北衡水人, 在读硕士, 主要从事小麦分子育种研究。

通讯作者: 张立平(1969-), 女, 山西大同人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦分子育种研究。

张风廷(1971-), 男, 河北沧州人, 研究员, 硕士, 主要从事小麦遗传育种研究。

种的核心与基础。前期对于小麦光温敏不育系的改良主要应用常规方法, 周期较长, 选育效率较低。我国转基因作物的研究始于 20 世纪 80 年代, 是国际上农业生物工程应用最早的国家之一。转基因技术目前已经成为作物分子育种的常用技术, 在棉花、大豆、玉米、水稻等作物育种和种质创新中普遍应用, 而小麦转基因育种进展相对滞后, 尤其在二系杂交小麦研究中的应用几乎空白, 因此, 利用转基因技术改良光温敏不育系, 为小麦杂种优势利用研究注入新的活力, 缩短育种周期、人为定向改造, 对于促进二系杂交小麦的发展具有重要意义。

小麦遗传转化方法主要包括: PEG 法、电击法、脂质体转化法、基因枪法、农杆菌侵染法、花粉管通道法等^[1]。其中基因枪法避开了原生质培养和再生的困难, 成为小麦基因转导的重要手段。作为转基因的受体材料, 小麦幼胚具有再生能力强, 操作简单、污染率低^[2]、出苗率较高等优点, 是目前小麦遗传转化中最常用的转化受体系统。组织培养作为生物技术和遗传转化操作的基础, 研究其最佳培养条件是必需的基础工作, 培养基成分、筛选剂、基因型等因素在一定程度上影响组织培养的效果。研究表明培养基中使用不同的碳源, 结果植物外植体形成愈伤组织的诱导率以及愈伤组织的生长状况不同, 一般麦芽糖优于蔗糖^[3-4]。*bar* 基因是比较常用的选择标记, 它赋予植物细胞对除草剂 Basta 或其活性成分 L. PPT 的抗性^[5], 基因型及外植体类型不同, 其适宜的筛选试剂和浓度也不尽相同^[6-7]。

基因型在小麦愈伤组织离体培养中具有决定作用, 即愈伤组织诱导率以及再生植株的频率在一定程度上依赖于基因型^[8], 不同的小麦基因型在胚性愈伤组织诱导、分化及分化能力的保持等方面均有显著差异^[9-11]。由于前人所用的研究材料不同, 其研究结果不能完全覆盖所有基因型, 目前尚未见有关光温敏雄性不育小麦的基因型筛选的报道, 因此有必要对光温敏不育小麦遗传转化过程中的诸多因素进行优化, 从而提高其转化效率。本研究以骨干小麦光温敏雄性不育系 BS210、BS366 以及常规品种京 411 的幼胚为材料, 在基本培养基的基础上, 分别对碳源、除草剂浓度和基因型进行筛选, 为进一步改良小麦光温敏不育系, 促进二系杂交小麦转基因育种提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料小麦光温敏雄性不育系 BS366、

BS210 和常规品种京 411 种植于北京市农林科学院海淀试验田, 于 2010 年 5 月采集其开花后 12 ~ 16 d 的未成熟种子。其中小麦光温敏雄性不育系 BS210 和 BS366 由北京杂交小麦工程技术研究中心自主选育, 分别为杂交小麦品种京麦 6 号和京麦 7 号的母本。

1.2 方法

1.2.1 幼胚愈伤组织的培养 剥取 3 个小麦品种(系)的未成熟种子, 在超净工作台上用 70% 的乙醇表面消毒 1 min, 加入 15% 的次氯酸钠溶液在摇床上(200 r/min)震荡 20 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次, 用手术刀剥离幼胚, 盾片朝上, 分别接种于以蔗糖和麦芽糖为碳源的愈伤组织诱导培养基 SD₂ (MS 基本培养基 + 2 mg/L 2-*i*-D + 0.15 g/L 天冬素 + 1 mg/L VB₁ + 3% 蔗糖/麦芽糖 + 2.4 g/L 植物凝胶) 上, 25℃ 暗培养 7 d。

7 d 后统计 3 个品种(系)的幼胚分别在蔗糖和麦芽糖两种诱导培养基上形成愈伤组织的数量, 并计算出愈率。愈率 = 形成愈伤数/接种幼胚总数 × 100%。

1.2.2 渗透处理与基因枪轰击 幼胚在诱导培养基上黑暗培养 7 d 后, 挑选质地优良的愈伤组织集中到高渗培养基(SD₂ 培养基 + 0.4 mol/L 甘露醇 + 0.4 mol/L 山梨醇 + 3% 蔗糖/麦芽糖 + 2.4 g/L 植物凝胶) 的中央, 培养 4 ~ 6 h。使用 Bio-Rad 公司生产的 PDS1000PHe 型基因枪, 轰击压力为 1 100 psi, 轰击距离为 6 cm。轰击后的愈伤组织在渗透压培养基上后处理 16 ~ 18 h。将愈伤组织转移到 SD₂ 培养基上恢复培养 14 d, 统计经过基因枪处理的愈伤组织总数。

1.2.3 愈伤组织分化培养 恢复培养的愈伤组织转移到分化培养基上(1/2 MS + 5 mg/L 玉米素 + 3% 蔗糖/麦芽糖 + 2.4 g/L 植物凝胶), 24 ~ 26℃ 光照培养。30 d 后统计培养基上产生绿芽的愈伤组织数量, 计算愈伤组织分化率。分化率 = 产生绿色芽点愈伤数/接种幼胚愈伤组织的总数 × 100%。

1.2.4 除草剂 Bialaphos 的最适筛选浓度 挑选分化状况良好产生绿芽的愈伤组织分别转接到筛选培养基上(1/2MS 培养基 + 2% 蔗糖 + Bialaphos + 2.4 g/L 植物凝胶), 筛选剂 Bialaphos 浓度分别选择 0, 2, 4 mg/L 3 个浓度梯度, 24 ~ 26℃ 光照培养。14 d 后统计不同筛选浓度下愈伤组织的出苗情况, 并计算出苗率, 同时确定最适的除草剂筛选浓度。出苗率 = 产生绿苗愈伤数/接种幼胚愈伤组织的总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 培养基碳源的筛选

以 BS366、BS210 和京 411 的幼胚为材料,在愈伤组织诱导、基因枪轰击后恢复培养以及分化培养过程中分别使用了 3% 蔗糖和 3% 麦芽糖作为碳源。不同品种(系)在两种碳源培养基上的出愈率和分化率见表 1,方差分析见表 2,品种间多重比较分析(表 3)。结果表明,不同碳源间出愈率差异不显著;品种间差异显著($P < 0.05$)。说明蔗糖和麦芽糖对幼胚出愈率影响不显著,基因型对幼胚出愈率影响显著($P < 0.05$),其中光温敏不育系 BS210 的幼胚出愈率显著高于 BS366 和常规品种京 411。分化率在碳源间差异显著($P < 0.05$),以麦芽糖为碳源的愈伤组织分化率明显高于以蔗糖为碳源的愈伤组织分化率;在品种间差异显著,其中 BS210 与 BS366 的愈伤组织分化率差异显著($P < 0.05$),二者与京 411 的愈伤组织分化率差异不显著。同时外观上,在添加麦芽糖培养基中的愈伤组织生长良好,颜色淡黄,褐化现象较蔗糖培养基轻微。

表 1 三个品种(系)不同碳源培养基上幼胚出愈率和分化率
Tab.1 The rate of embryos callus formation and differentiation tables in different carbon sources medium

品种(系) Species	碳源 Source	出愈率/% Formation rate	分化率/% Differentiation rate
BS210	蔗糖	95.9	53.1
	麦芽糖	96.3	62.9
BS366	蔗糖	92.9	45.8
	麦芽糖	92.5	58.0
京 411	蔗糖	93.4	48.6
	麦芽糖	94.3	63.2

表 2 不同碳源、品系对幼胚出愈率和分化率的方差分析
Tab.2 Analysis of wheat callus formation and differentiation rate between variance of carbon sources and speices

性状 Trait	变异来源 Source	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F valul
出愈率 Formation rate	碳源	1	1.350E-5	0.628
	品种	2	0.001	27.822*
	误差	2	2.150E-5	-
分化率 Differentiation rate	碳源	1	0.014	38.111*
	品种	2	0.008	20.012*
	误差	2	0.000	-

注:*. $P < 0.05$ 。

表 3 品种间愈伤组织出愈率和分化率的多重比较
Tab.3 Multiple comparison of different speices of callus formation and differntion rate

品系 Species	出愈率 Formation rate		分化率 Differentiation rate	
	均值/% Average	5% 显著水平 Significantly at 5%	均值/% Average	5% 显著水平 Significantly at 5%
BS210	96.1	a	58.0	a
BS366	92.7	b	51.9	b
京 411	93.8	b	55.9	ab

2.2 除草剂 Bialaphos 的最适筛选浓度

将愈伤组织接种在添加了不同浓度除草剂 Bialaphos 的筛选培养基上,培养两周后,统计每个筛选浓度下愈伤组织的出苗率见表 4。随着除草剂浓度的升高出苗率逐渐降低,但是二者并不存在指数相关关系,不添加筛选剂时愈伤组织的出苗率最高,但是此时出现假阳性苗的概率也会上升,且后期检测工作量较大。筛选剂为 4 mg/L 时,愈伤组织生长状况极差,褐化非常严重,出苗率很低,分别为 8.0% 0.0% 3.0%。而浓度为 2 mg/L 时,既能起到一定的筛选作用,也可能在一定程度上降低假阳性苗的概率,又能得到相当数量的小麦幼苗,建议选择筛选剂的最适浓度为 2 mg/L。

表 4 不同浓度 Bialaphos 对愈伤组织出苗率的影响
Tab.4 The effect of different concentrations of Bialaphos to the seedling rate of callus

Bialaphos 浓度/(mg/L) Concentration of Bialaphos	出苗率/% Seedling rate		
	BS210	BS366	京 411
0	63.1	18.0	36.5
2	47.8	4.4	18.5
4	8.0	0.0	3.0

2.3 光温敏雄性不育小麦优良转化受体的选择

3 个品种(系)的出苗率统计见表 4,结合表 2 和表 3 的结果分析表明,幼胚出愈率以及愈伤组织分化率均受基因型的影响,不同品种(系)间出愈率和分化率差异显著。小麦光温敏雄性不育系 BS210 的愈伤组织出愈率和分化率较高,显著高于 BS366 和京 411,可见 BS210 在愈伤组织诱导、分化以及分化后出苗过程中均表现出作为优良转化受体材料的特性,京 411 次之,BS366 最差,相同培养条件下,BS366 出愈率不低,但是愈伤组织褐化严重,而且分化率和出苗率相对较低。

3 结论与讨论

糖类不仅给植物细胞的生长提供碳源,而且对维持植物细胞内的渗透压起着重要作用。范学科等^[3]将小麦西农 1376 的幼胚接种在不同碳源组合的培养基上进行培养发现,不同碳源间的出愈率差异不大,而将培养基中的蔗糖改变为麦芽糖,或将蔗糖浓度从 30 g/L 降为 15 g/L,同时加入 15 g/L 的甘露醇或山梨醇后,对小麦幼胚愈伤组织的诱导效果比单独使用蔗糖有所提高。Zhang G F 等^[12]研究表明,培养基中使用麦芽糖代替蔗糖做碳源能明显改善愈伤组织的褐化状态。本研究在培养基中分别添加了蔗糖和麦芽糖为碳源,其中在诱导培养基中,不

同碳源对幼胚出愈率影响并无显著差异,但是愈伤组织的生长状况较好;而在分化培养基中二者存在显著差异,其中用麦芽糖作碳源,愈伤组织生长良好,分化率较高,褐化现象也比较轻微,上述结果与 Zhang G F 等^[12]的研究结果类似。

使用合适的筛选标记与筛选浓度,是许多科学工作者一直探寻摸索的重点。筛选浓度对于获得足够数量的转基因植株十分重要,由于筛选剂类型和浓度对幼苗生长存在基因型差异,不同基因型的受体细胞所适宜的筛选浓度不尽相同。Vasil V 等^[13]研究表明,基因枪转化小麦幼胚以 3~10 mg/L PPT 为适宜浓度。叶兴国等^[14]以扬麦 158 和扬麦 10 号等材料为研究对象,针对载体上的 *bar* 基因筛选标记作了研究,认为使用较高浓度的 PPT 或 Bialaphos (如 Bialaphos 5 mg/L) 进行初筛,使用较低浓度筛选剂(如 Bialaphos 3 mg/L) 进行二次筛选的方案比较可行。张志清等^[15]以川农 16 和川麦 32 为材料研究发现,幼胚在含不同 L-PPT 剂量的 MS₂ 培养基中生长受到明显的抑制,L-PPT 浓度为 3 mg/L 时就能完全抑制幼胚的生长,因此认为 L-PPT 合适的筛选浓度是 2~3 mg/L。针对光温敏雄性不育系小麦,本研究认为,使用 2 mg/L Bialaphos 进行筛选得到的效果较好。

利用基因枪法转化小麦幼胚的影响因素很多,其中基因型在幼胚离体培养中的决定作用已经得到普遍认同。在本试验材料中,BS210 出苗率高,植株再生效果好,可作为光温敏雄性不育小麦的优良转化受体。由于目前生产应用的骨干不育系较少,本研究仅针对光温敏雄性不育系 BS210、BS366 和常规品种京 411 进行了遗传转化相关因素的研究,随着不同遗传背景的 BS 系列不育系的选育,今后将进一步优化试验条件,针对新选不育系筛选更多适宜基因枪转化的受体基因型,为二系杂交小麦转基因育种提供基础材料,从而促进小麦杂种优势利用的快速发展。

参考文献:

[1] 赵化冰,马峙英,赵宏. 小麦转基因方法的回顾、比较

与展望[J]. 河北农业大学学报 2002 25(S1):5-7.

- [2] 伍碧华,郑有良,周永红,等. 四川小麦幼胚脱分化特性研究[J]. 麦类作物学报 2001 21(2):25-30.
- [3] 范学科,王亚红,奚亚军,等. 小麦幼胚愈伤组织诱导影响因素的研究[J]. 中国农学通报 2007 23(11):68-71.
- [4] 王晓玲,彭定祥. 光温条件及碳源对苕麻愈伤生长和分化的影响[J]. 中国农学通报 2004 20(2):1-4.
- [5] 武丽敏. 小麦遗传转化参数优化及其应用研究[D]. 成都:四川农业大学 2005.
- [6] 傅荣昭,孙勇如,贾十荣. 植物遗传技术手册[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994.
- [7] 郝建平,陈占宽,裴雁曦,等. 非选择性除草剂 Basta 对荞麦和莜麦种子萌发的影响[J]. 华北农学报 2001, 16(2):136-140.
- [8] Shigeo TaKumi, TaKiKo shimada. Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues [J]. Genes Genet Syst 1997 72(2):63-69.
- [9] Takumi S, Shimada T. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration [J]. Journal of Plant Physiology 1996 149(3-4):418-423.
- [10] 叶健,王小霞,符书兰,等. 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[J]. 安徽农业科学 2007 35(12):3561-3562, 3569.
- [11] 祁永斌,李和平,高春生,等. 不同小麦品种愈伤组织诱导和再生体系建立[J]. 武汉植物学研究 2005 23(3):227-232.
- [12] Zhang G F, Zhao M, Ding Z S. Cloning and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from *Echinochloa crusgalli* [J]. Acta Agronomica Sinica 2005 31(10):1365-1369.
- [13] Vasil V. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos [J]. Bio Technology 1993 11(13):1553-1558.
- [14] 叶兴国,徐惠君,杜丽璞,等. 小麦遗传转化几个因素的研究[J]. 中国农业科学 2001 34(2):128-132.
- [15] 张志清,郑有良,王丕武,等. 农杆菌介导转化小麦几个影响因素的再研究[J]. 四川农业大学学报 2006, 24(1):1-6, 24.