

网络出版时间:2026-06-29

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20260629.1142.002

农杆菌介导的小麦幼胚遗传转化及非基因型依赖性评价

郑楠楠¹, 付玉洁¹, 鲁向前¹, 赵俊恒¹, 孙楠楠¹, 张国平^{1,2}, 叶玲珍^{1,2}

(1. 浙江大学中原研究院生物设计与育种中心, 河南郑州 450000; 2. 浙江大学作物科学研究所, 浙江杭州 310058)

摘要:农杆菌介导是小麦遗传转化的重要手段,但其存在转化效率低、基因型依赖性强及愈伤组织易于褐化、再生率较低等关键问题。本研究以小麦模式材料 Fielder 的幼胚为外植体,系统探究了胚龄、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)浓度、农杆菌侵染时间、草铵膦(phosphinothricin, PPT)筛选压力以及外源激素(abscisic acid, ABA; kinetin, KT)配比等对愈伤组织的诱导分化及转化效率的影响,并利用扬麦 20、郑麦 7698、科农 199 等品种对优化后的体系进行基因适用性评价。结果表明,花后 12 d 的幼胚是最适宜的转化受体,作为外植体诱导的愈伤组织褐化率最低(4.40%);农杆菌侵染液 $OD_{600}=0.5$ 、添加 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS、侵染愈伤组织 10 min 时,抗性愈伤组织绿点分化率最高(34.29%);诱导和分化培养基中分别添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 后,胚性愈伤组织的形成与植株再生能力显著提高;PPT 最佳筛选浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在该优化体系下,Fielder 的转化效率从 8.16% 显著提高至 14.83%,扬麦 20、郑麦 7698 和科农 199 的转化效率分别达到 9.03%、7.32% 和 8.70%,接近甚至超过 Fielder 在优化前的水平。本研究得到的优化体系提高了小麦遗传转化效率,且对不同遗传背景的小麦品种具有较好的适用性,为小麦基因功能的解析和分子育种提供了技术支持。

关键词:小麦;农杆菌介导遗传转化;体系优化;基因型差异;再生体系

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2026)08-1041-08

Agrobacterium-Mediated Transformation Parameters for Wheat (*Triticum aestivum* L.) Immature Embryos and Evaluation of Genotype Independence

Zheng Nannan¹, Fu Yujie¹, Lu Xiangqian¹, Zhao Junheng¹,
Sun Nannan¹, Zhang Guoping^{1,2}, Ye Lingzhen^{1,2}

(1. Center for Biological Design and Breeding, Zhongyuan Research Institute, Zhejiang University, Zhengzhou, Henan 450000, China; 2. Institute of Crop Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: *Agrobacterium*-mediated transformation is an important approach for genetic modification of wheat, but it still suffers from several unresolved critical technical bottlenecks, including low transformation efficiency, strong genotype dependence, severe browning of calli, and low regeneration efficiency. In this study, immature embryos of the model cultivar Fielder were used as explants to systematically investigate the effects of embryo age, acetosyringone (AS) concentration and *Agrobacterium* infection duration, phosphinothricin (PPT) selection pressure, and exogenous hormone (abscisic acid, ABA; kinetin, KT) ratios on callus induction, regeneration and transformation efficiency. Using the optimized protocol, applicability was evaluated in the cultivars Yangmai 20, Zhengmai 7698, and Kenong 199. The results showed that embryos harvested 12 days after anthesis exhibited the lowest browning rate (4.40%) and were most suitable as recipients for transformation. When the *Agrobacterium* suspension was adjusted to $OD_{600}=0.5$, supplementation with $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS and a 10 min

收稿日期:2026-02-06

修回日期:2026-04-20

基金项目:浙江省农业新品种选育重大科技专项(2021C02064-3)

第一作者 E-mail:18838917038@163.com(郑楠楠)

通讯作者 E-mail:yelingzhen@zju.edu.cn(叶玲珍)

infection produced the highest induction rate of resistant green callus spots (34.29%). Addition of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA to the induction medium and $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT to the regeneration medium significantly enhanced embryogenic callus formation and plant regeneration. The optimal PPT selection concentration was determined to be $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Under the optimized conditions, transformation efficiency of Fielder increased significantly from 8.16% before optimization to 14.83%; transformation efficiencies of Yangmai 20, Zhengmai 7698, and Kenong 199 reached 9.03%, 7.32% and 8.70%, respectively, approaching or exceeding the pre-optimization level of Fielder. In summary, the optimized system established in this study improves wheat genetic transformation efficiency and is broadly applicable across different genetic backgrounds, providing a technical platform for gene functional analysis and molecular breeding in wheat.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum* L.); *Agrobacterium*-mediated transformation; System optimization; Genotype difference; Regeneration system

植物遗传转化技术能够实现外源基因的稳定导入与表达,是解析基因功能、构建分子设计育种材料以及加速目标性状改良的关键手段。随着小麦基因组学、功能基因挖掘与基因编辑技术的快速发展,大量候选基因亟需在小麦的遗传背景中完成高通量、稳定且可重复的功能验证^[1-4];同时,高产、优质、抗性等重要育种目标性状也需要可靠的基因导入体系支撑^[5-7]。在多种植物遗传转化途径中,农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的遗传转化因基因插入拷贝数少、插入结构较稳定、成本较低且便于规模化操作等优势,已在多种作物中得到广泛应用^[8-11]。然而,由于小麦 (*Triticum aestivum* L.) 为异源六倍体作物,其基因组庞大且组织培养再生体系复杂,农杆菌介导转化效率较低,成为制约小麦功能基因研究与分子育种的重要瓶颈之一^[12]。尽管近年来在转化流程、培养基配方、载体系统等方面有一定改进,但农杆菌介导的小麦遗传转化仍普遍存在转化效率不高、稳定性不足、基因型限制等问题^[13-17]。因此,建立高效率、低基因型依赖的遗传转化体系,是实现小麦基因功能解析和生物育种的核心技术,具有重要的科学意义与应用价值。

小麦农杆菌介导转化效率受多个环节协同影响。外植体的来源与生理状态决定愈伤组织诱导与再生潜力,其中幼胚通常比成熟胚更易形成胚性愈伤组织并再生植株,但不同胚龄的响应亦存在明显差异,影响后续分化再生与转化成功率^[17-18]。农杆菌侵染与共培养条件直接影响 T-DNA 转移效率,而菌液浓度、侵染时间以及添加物乙酰丁香酮 (AS) 浓度等因素,都会改变侵染强度与外植体损伤之间的平衡,进而影响抗性愈伤组织形成和绿点诱导^[19-21]。筛选体系与选择压力

同样是决定阳性愈伤获得效率的关键因素,以 bar/PPT 为代表的筛选体系在实际应用中常面临筛选压力与再生能力之间的权衡:压力不足易导致逃逸与假阳性,压力过强则抑制愈伤组织增殖与分化再生,降低阳性植株获得率^[22-24]。此外,培养基组成与激素调控在愈伤诱导、抗性愈伤组织维持、分化再生等不同阶段均具有重要作用,2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid)、ABA 及细胞分裂素类 (如 KT、ZT) 在各阶段的种类与浓度配比,显著影响胚性保持、褐化发生与分化效率,且其最适组合常因基因型而异^[25]。尽管上述因素已分别有过研究,并在一定程度上提升了部分材料的转化效果,但小麦农杆菌介导转化体系在整体效率和基因型通用性方面仍面临突出挑战。

本研究以小麦幼胚为外植体,选用 Fielder 小麦为主要受体材料,围绕农杆菌介导转化的关键环节开展系统研究。重点比较不同胚龄对褐化与再生的影响,筛选 AS 浓度与农杆菌侵染时间的适宜组合,确定 bar/PPT 体系的最佳选择压力,评估添加 ABA 与 KT 等植物生长调节剂在愈伤组织诱导与不定芽分化再生中的调控作用。在此基础上,用扬麦 20、郑麦 7698、科农 199 等不同品种验证优化体系的适用性,旨在构建一套效率高、稳定性好、多基因型通用的小麦农杆菌介导遗传转化体系,为小麦基因功能解析与分子育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 Fielder、扬麦 20、郑麦 7698 和科农 199 等 4 个小麦品种。农杆菌菌株为 AGL1

(麦类作物遗传转化常用菌株),转化所用质粒载体为携带草铵膦抗性基因(bar)的双元载体 pCambia3301。

1.2 培养基配方

Fielder 基础培养基配方参考 Hayta 等的方法^[13]。

1) 液体培养基: 4.3 g · L⁻¹ MS、10 g · L⁻¹ MES、10 g · L⁻¹ 蔗糖。

2) 共培养培养基: 4.3 g · L⁻¹ MS、10 g · L⁻¹ MES、10 g · L⁻¹ 蔗糖、1.25 mg · L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O、0.85 g · L⁻¹ AgNO₃、7 g · L⁻¹ 琼脂糖。

3) 诱导培养基: 4.3 g · L⁻¹ MS、30 g · L⁻¹ 麦芽糖、1.0 g · L⁻¹ 干酪素水解物、0.1 g · L⁻¹ 盐酸硫胺素、35 g · L⁻¹ 肌醇、69 g · L⁻¹ 脯氨酸、2.2 mg · L⁻¹ 毒莠定、1.25 mg · L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O、0.25 g · L⁻¹ 谷氨酰胺、0.25 g · L⁻¹ L-天冬氨酸、0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D、200 mg · L⁻¹ 特美汀(Timentin)、5 mg · L⁻¹ PPT、3.5 g · L⁻¹ 植物凝胶。

4) 分化培养基: 4.3 g · L⁻¹ MS、0.5 g · L⁻¹ MES、20 g · L⁻¹ 蔗糖、2.78 g · L⁻¹ Na · Fe · EDTA、0.05 g · L⁻¹ 烟酸、10 g · L⁻¹ 肌醇、0.1 g · L⁻¹ 盐酸硫胺素、0.05 g · L⁻¹ 盐酸吡哆醇、1.25 mg · L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O、200 mg · L⁻¹ 特美汀、5 mg · L⁻¹ PPT、3.2 g · L⁻¹ 植物凝胶。

5) 生根培养基(PPT 5 mg · L⁻¹): 4.3 g · L⁻¹ MS、30 g · L⁻¹ 麦芽糖、1.0 g · L⁻¹ 干酪素水解物、0.1 g · L⁻¹ 盐酸硫胺素、35 g · L⁻¹ 肌醇、69 g · L⁻¹ 脯氨酸、1.25 mg · L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O、1.5 mg · L⁻¹ ZT、200 mg · L⁻¹ 特美汀、3.2 g · L⁻¹ 植物凝胶。

1.3 小麦幼胚选取与预处理

为有效缩短小麦生育期,以更高效同步获得适龄幼胚,在超长光周期条件(22 ℃、22 h 光照, 18 ℃、2 h 黑暗)下,于花后 10、12、14、16 d 采集 Fielder 籽粒(3 次生物学重复),去除颖壳,在超净工作台上用 75% 乙醇消毒 30 s,再用 2.5% 次氯酸钠溶液消毒 10 min,之后无菌蒸馏水冲洗 6~7 次。无菌条件下剥离幼胚,用解剖镊轻微破坏胚芽生长点,将幼胚转入基础转化液体培养基(见 1.2)中暂存。待所有材料选取完毕后,将装有 Fielder 幼胚的离心管置于 4 ℃ 离心机中,12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃去上清液,以备后续农杆菌侵染处理。

1.4 农杆菌的侵染与共培养

将农杆菌 AGL1 菌液接种于 10 mL LB 液体

培养基中,28 ℃、200 r · min⁻¹ 振荡培养至对数生长期(约 8 h),随后离心收集菌体,重悬于液体培养基中,调节 OD₆₀₀ 至 0.5。在侵染液中分别添加不同浓度(0、50、100、150、200 μmol · L⁻¹)的 AS。将预处理后的幼胚浸入侵染液,分别进行 10 和 20 min 侵染,结束后,用无菌滤纸吸干表面菌液,将幼胚盾片朝上置于共培养培养基,25 ℃ 黑暗培养 3 d。

1.5 愈伤组织诱导、筛选、再生与炼苗

共培养结束后,切除残留胚轴,将幼胚转移至诱导培养基中,25 ℃ 黑暗培养 14 d 后,继续在诱导培养基继代培养 1 次(14 d)。将诱导的抗性愈伤组织切分后转入分化培养基,25 ℃ 光照培养(16 h · d⁻¹)14 d。分化培养基的幼苗至 3~4 cm 时,转入生根培养基。生根健壮后,植株移至水培炼苗 10 d 再移栽至土壤。水培炼苗营养液的配方: 101 g · L⁻¹ 硝酸钾、236 g · L⁻¹ 四水硝酸钙、246 g · L⁻¹ 七水硫酸镁、115 g · L⁻¹ 磷酸二氢钾、1.85 g · L⁻¹ 硼酸、0.99 g · L⁻¹ 四水氯化锰、12.36 g · L⁻¹ 四水钼酸铵、1.15 g · L⁻¹ 七水硫酸锌、0.5 g · L⁻¹ 五水硫酸铜、84.2 g · L⁻¹ 乙二胺四乙酸铁钠盐。

1.6 转基因株系验证

再生植株的 PCR 检测。基因组 DNA 提取参考 Huang 等^[26]方法。所用引物为 Bar-F: 5'-ACCATCGTCAACCACTACATCG-3', Bar-R: 5'-CTGCCAGAAACCCACGTCAT-3'。PCR 体系中以未转化小麦基因组 DNA 为阴性对照,转化质粒为阳性对照,无菌水为空白对照。

1.7 数据统计与分析

分别计算愈伤组织诱导率、分化率、褐化率、绿点诱导率和遗传转化效率:

愈伤组织诱导率 = 诱导出的愈伤组织总数 / 接种外植体总数 × 100%;

愈伤组织分化率 = 愈伤组织分化成苗总数 / 诱导出的愈伤组织总数 × 100%;

愈伤组织褐化率 = 愈伤组织褐化总数 / 接种外植体总数 × 100%;

绿点诱导率 = 诱导出绿点的愈伤组织数 / 接种外植体总数 × 100%;

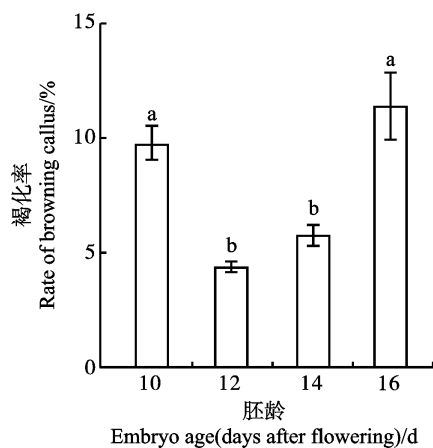
遗传转化效率 = PCR 验证阳性植株数 / 接种外植体总数 × 100%。

数据采用 IBM SPSS Statistics 26 进行统计分析,利用 Graphpad Prism 8 绘图。

2 结果与分析

2.1 不同胚龄对小麦愈伤组织褐化的影响

采集不同时期 Fielder 幼胚,分析胚龄对愈伤组织褐化的影响。结果表明,花后 0、12、14 和 16 d 胚龄的幼胚愈伤组织褐化率分别为 9.78%、4.40%、5.78%和 11.39%(图 1)。其中,花后 12 d 的幼胚褐化率最低,当取样时间早于或晚于花后 12 d 时,愈伤组织褐化程度均有所增加,不利于后续愈伤组织的诱导与不定芽的再生。因此,将花后 12 d 确定为幼胚取材的最适时期。



数据为平均值±标准误(n=3);不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Data are shown as the mean±SE(n=3); Different letters mean significant differences at 0.05 level. The same in belows.

图 1 不同胚龄 Fielder 愈伤组织褐化率

Fig. 1 Browning rate of Fielder calli with different embryo age

2.2 AS 浓度与侵染时间对愈伤组织诱导的影响

在菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.5 的条件下,于侵染液中分别加入 0、50、100、150、200 μmol·L⁻¹ AS,对 Fielder 花后 12 d 幼胚进行 10 或 20 min 的侵染处理,统计各处理组的绿点诱导率。结果(表 1)显示,随着 AS 浓度的提高,抗性愈伤组织的绿点诱导率呈现上升趋势,在 200 μmol·L⁻¹ 时达到最高(侵染 10 min 为 34.29%)。在 0~150 μmol·L⁻¹ AS 浓度范围内,侵染处理 20 min 的绿点诱导率均高于侵染 10 min 的处理;但在 200 μmol·L⁻¹ AS 时,侵染处理 10 与 20 min 之间差异不显著。考虑到延长侵染时间可能加重外植体损伤,综合转化效率与操作可行性,以 200 μmol·L⁻¹ AS、侵染 10 min 为抗性愈伤组织诱导的较优条件。

表 1 不同 AS 浓度与侵染时间下 Fielder 小麦愈伤组织绿点诱导率

Table 1 Green spot induction rate of wheat Fielder under different AS concentration and infection duration

AS 浓度 AS concentration/ (μmol·L ⁻¹)	侵染时间 Infection time/min	幼胚总数 Number of embryos	绿点诱导率 Green spot induction rate/%
0	10	210	15.71b
	20	210	20.95a
50	10	210	22.38b
	20	210	25.71a
100	10	210	26.67b
	20	210	29.52a
150	10	210	28.10b
	20	210	30.95a
200	10	210	34.29a
	20	210	33.33a

不同小写字母表示同一 AS 浓度下不同处理时间在 0.05 水平显著差异。

Different letters indicate significant differences among different treatments time under the same AS concentrations at 0.05 level.

2.3 PPT 筛选浓度对愈伤组织生长的影响

以 Fielder 花后 12 d 幼胚为外植体,在 200 μmol·L⁻¹ AS 条件下侵染 10 min,共培养 3 d 后转入不同浓度草铵膦(PPT)的筛选培养基。PPT 浓度设置为 5、10、15、20 mg·L⁻¹,每组接种幼胚 350 个,分别置于 5 个培养皿中,3 次生物学重复,统计转化效率,观察愈伤组织的生长情况。结果(表 2)表明,在 5 和 10 mg·L⁻¹ PPT 处理下,诱导愈伤组织数(305±14.80、317±15.59)及愈伤组织分化数(142±9.17、150±13.23)均保持较高水平,两组之间无显著差异。对应的愈伤组织转化率分别为(5.61±0.44)%和(8.28±1.02)%,其中 10 mg·L⁻¹ PPT 处理转化率显著高于 5 mg·L⁻¹ PPT 处理。15 和 20 mg·L⁻¹ PPT 处理,愈伤褐化严重,愈伤组织死亡数显著增加(61±9.54、153±12.53),分化能力显著下降(75±10.00、32±10.58),转化率降低。分析发现,5 mg·L⁻¹ PPT 虽利于愈伤生长,但筛选压力偏低,部分未转化愈伤组织逃逸,阳性率下降;15 mg·L⁻¹ 及以上浓度筛选压力过强,严重抑制愈伤增殖和再生。综合考虑愈伤生长状况、褐化程度及阳性率,确定 10 mg·L⁻¹ PPT 为本体系中最佳筛选浓度,可在有效抑制假阳性的同时保持较高的转化效率。

表 2 不同浓度草铵膦对 Fielder 小麦愈伤组织生长的影响

Table 2 Effect of PPT concentration to callus growing in wheat Fielder

草铵膦浓度 PPT concentration/ (mg · L ⁻¹)	愈伤数 Number of calli	愈伤死亡数 Number of dead calli	愈伤分化数 Number of regenerated calli	转化效率 Transformation efficiency/%
5	305±14.80a	23±6.24c	142±9.17a	5.61±0.44b
10	317±15.59a	25±5.00c	150±13.23a	8.28±1.02a
15	290±12.12ab	61±9.54b	75±10.00b	3.87±0.56c
20	262±17.44b	153±12.53a	32±10.58c	0

不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。表 3 同。

Different letters indicate significant differences at 0.05 level. The same in table 3.

2.4 外源生长调节剂对愈伤诱导与分化的影响

以胚龄 12 d 的 Fielder 幼胚为外植体进行遗传转化,在诱导培养基分别添加不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg · L⁻¹) ABA 后,愈伤组织的诱导率分别为(56.63±1.20)%、(64.29±1.64)%、(53.38±2.66)%、(26.77±2.93)%和(16.11±2.43)%。由此结果(图 2A)可见,诱导培养基中添加 0.5 mg L⁻¹ ABA 愈伤诱导率最高;当 ABA 浓度>1.0 mg · L⁻¹ 时,诱导率急剧下降。这表明在本实验设置的浓度范围内,0.5 mg · L⁻¹ ABA 有助于胚性愈伤形成,而较高浓度则产生明显抑制作用。

在分化培养基中添加不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg · L⁻¹) KT 后,愈伤组织绿点分化效率分别是(49.62±0.41)%、(51.96±0.94)%、(55.92±1.47)%、(58.45±1.48)%和(48.43±1.36)%。结果(图 2B)表明,KT 浓度达到 1.5 mg · L⁻¹ 时分化率最高;当浓度提升到 2.0 mg · L⁻¹ 时分化率下降。表明 1.5 mg · L⁻¹ 是本实验设定范围内最有利于分化的 KT 浓度。

综上,确定在诱导阶段添加 0.5 mg · L⁻¹ ABA,分化阶段添加 1.5 mg · L⁻¹ KT 为最优激素组合。

2.5 优化体系的转化效率验证

以胚龄 12 d 的 Fielder 幼胚为外植体,在前期优化的体系下进行农杆菌介导的外源基因 bar 的遗传转化。利用 PCR 技术对 T₀ 代再生植株进行检测(图 3A~图 3E)。结果(图 3F)显示,优化后的体系使 Fielder 阳性转化率从对照组的 8.16%提升至 14.83%,说明该体系具有较高的遗传转化效率。

2.6 不同小麦基因型对优化体系的适用性评价

以 Fielder 为对照,选用扬麦 20、郑麦 7698 和科农 199 验证优化的遗传转化体系在不同小麦品种中的适用性。结果(表 3)表明,在相同培养条件下,Fielder、扬麦 20、郑麦 7698 和科农 199 的愈伤组织诱导率分别为(77.4±9.48)%、(53.32±5.50)%、(43.81±5.16)%和(49.66±5.09)% ,愈伤组织分化率为(18.72±1.47)%、(17.06±1.84)%、(16.81±2.33)%、(17.67±2.14)% ,遗传转化效率分别为(14.83±0.12)%、(9.03±0.02)%、(7.32±0.19)%和(8.70±0.03)%。通过比较发现,Fielder 小麦的愈伤组织诱导率与转化效率均显著高于其他 3 个品种,扬麦 20 显著高于郑麦 7698 和科农 199。这说明不同遗传背景的小麦材料与本优化体系具有较好的适配性。

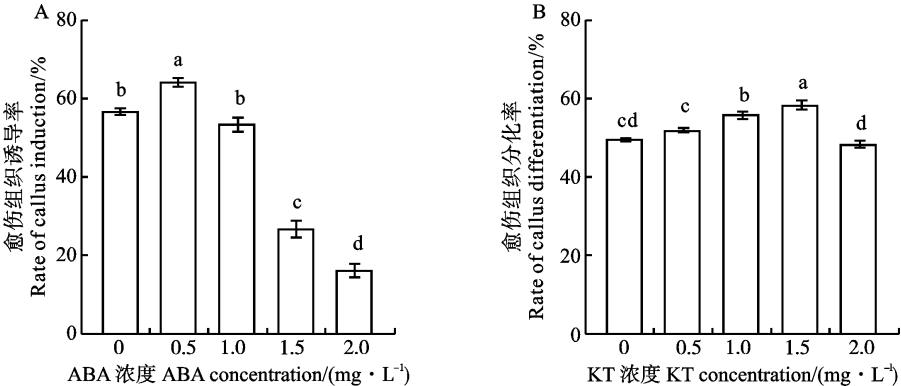
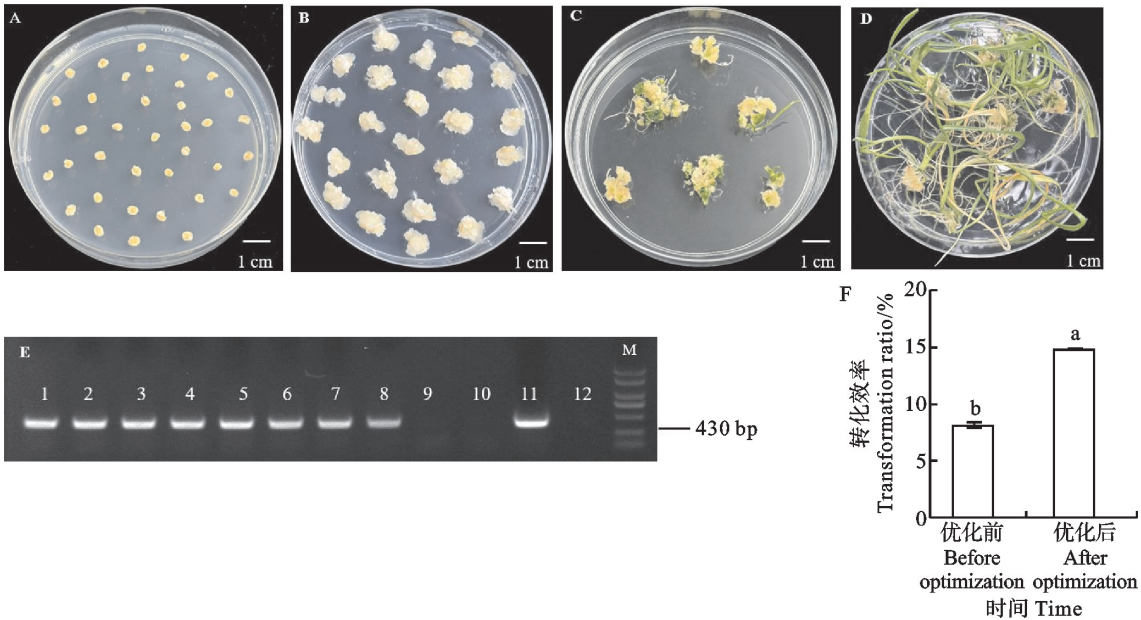


图 2 植物生长调节剂对 Fielder 小麦愈伤组织形成的影响

Fig. 2 Impact of plant growth regulators on callus formation in wheat variety Fielder



A: 幼胚接种; B: 愈伤组织诱导; C: 愈伤组织再分化; D: 再生植株; E: T₀ 代再生植株 bar 基因 PCR 检测(1~9: T₀ 代再生植株; 10: 未转化对照; 11: 质粒对照; 12: 空白对照; M: 2 000 bp DNA ladder); F: 转化效率。

A: Immature embryos inoculation; B: Callus induction; C: Callus differentiation; D: Regeneration plant; E: PCR analysis of T₀ generation regeneration wheat plants by bar gene primers(1–9: T₀ generation regeneration plants; 10: Non transgenic plant; 11: Plasmid; 12: Blank control; M: 2 000 bp DNA Ladder). F: The transformation ratio before and after optimization.

图 3 Fielder 小麦遗传转化
Fig. 3 Transformation of wheat Fielder

表 3 不同小麦品种的幼胚转化效率

Table 3 Transformation ratio of immature embryos of different wheat varieties

品种 Variety	接种幼胚 Number of embryo cultured	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	愈伤组织分化率 Callus differentiation rate/%	转化效率 Transformation ratio/%
Fielder	310	77.4±9.48a	18.72±1.47a	14.83±0.12a
扬麦 20 Yangmai 20	310	53.32±5.50b	17.06±1.84a	9.03±0.02b
郑麦 7698 Zhengmai 7698	310	43.81±5.16b	16.81±2.33a	7.32±0.19d
科农 199 Kenong 199	310	49.66±5.09b	17.67±2.14a	8.70±0.03c

3 讨论

小麦遗传转化效率受外植体生理状态、农杆菌侵染条件、激素配比、筛选压力等多种因素共同制约^[23-24, 27-29]。本研究通过系统优化上述关键环节,构建了一套操作简便、周期较短、试剂易得的农杆菌介导转化体系,使小麦遗传转化模式品种 Fielder 的转化效率从优化前的 8.16% 提高至 14.83%,3 个栽培品种扬麦 20、郑麦 7698 和科农 199 分别获得了(9.03±0.02)%、(7.32±0.19)% 和(8.70±0.03)% 的转化效率,接近或超过了 Fielder 在转化体系优化前的水平,其中扬麦 20 表现出比郑麦 7698 和科农 199 更高的转化适配性,这一结果为后续受体基因型的选择提供了参

考。同时,该体系有效解决了愈伤组织褐化和假阳性率高等常见问题。

外植体的选择与生理状态是决定转化成功与否的首要因素,其中愈伤组织褐化是限制小麦遗传转化再生的主要瓶颈。本研究发现,胚龄过小易受机械损伤难以诱导愈伤组织,胚龄过大倾向形成非胚性愈伤组织,只有适中的胚龄才能显著提高愈伤组织质量和后续转化效率。本研究确定花后 12 d 为最佳取材时间,与 Richardson 等^[30]提出的花后 12~16 d(14 d 最佳)、张月婷等^[31]指出的花后 12~15 d 以及 Wang 等^[32]报道的花后 10~15 d 结果基本一致,表明该胚龄处于胚性反应与抗褐化能力的最佳平衡点。

在农杆菌介导转化过程中,乙酰丁香酮(AS)

作为毒性区基因诱导剂,对提高 T-DNA 转移效率具有关键作用^[33-36]。本研究结果显示,当菌液 OD₆₀₀ 为 0.5 条件下,添加 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 并配合 10 min 侵染处理,可使抗性愈伤组织诱导率达到 34.29%。与更长的侵染时间相比,10 min 的处理既能保证充分的农杆菌附着与 T-DNA 转移,又可避免因过度浸泡导致的组织水渍化坏死,有助于缩短操作时间并提高转化效果。

植物生长调节剂在愈伤组织的诱导、增殖与再分化过程中发挥核心调控作用^[37-39]。本研究表明,在愈伤组织诱导阶段,在 2.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒莠定 + 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 基础上添加 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 可显著促进胚性愈伤组织的形成,诱导率达 (64.29 $\pm$ 1.64)%,这与 ABA 有助于体细胞胚发生的相关观点一致^[40]。当 ABA 浓度过高(>1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,细胞生长被抑制,诱导率下降。在不定芽再分化阶段,细胞分裂素(KT)对于绿点和绿芽的形成具有关键作用^[41-42]。本研究发现,随着 KT 浓度增加,愈伤组织分化率呈现先升后降趋势,在 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到峰值。本体系明确 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA(诱导)+1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT(分化)组合是促进小麦高效再生的最佳配方。

建立高效的筛选体系是获得转基因植株的关键,其核心在于平衡筛选压力与组织再生能力^[23-24]。本研究确定了 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PPT 为最佳筛选浓度,有效剔除非转化组织,最大限度地维持转化细胞的生长活性。

小麦遗传转化效率普遍存在基因型依赖^[43-44]。已有多项研究表明,在农杆菌介导的小麦遗传转化体系中,GRF4-GIF1、BBM、WUS、TaWOX5 等^[13,44-45]可以降低基因型依赖,提升再生效率。本研究通过系统优化侵染条件、激素配比等,改善了小麦转化中愈伤组织褐化、再生效率低、基因型依赖等问题,成功实现了再生植株的稳定获取。该体系操作简单、无多余外源元件、后代无需分离筛选,能同时兼顾转化效率与基因型广谱性,在育种上具有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Chen Z L, Debernardi J M, Dubcovsky J, et al. Recent advances in crop transformation technologies [J]. *Nature Plants*, 2022, 8(12): 1343.
- [2] 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展 [J]. *遗传*, 2015, 37(10): 953.
- [3] Shan Q W, Gao C X. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants [J]. *Hereditas*, 2015, 37(10): 953.
- [4] Awan M J A, Pervaiz K, Rasheed A, et al. Genome edited wheat-current advances for the second green revolution [J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 108006.
- [5] Zhou X M, Zhao Y D, Ni P, et al. CRISPR-mediated acceleration of wheat improvement: Advances and perspectives [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(11): 815.
- [6] Li S N, Lin D X, Zhang Y W, et al. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties [J]. *Nature*, 2022, 602(7897): 455.
- [7] Maharajan T, Ajeesh Krishna T P, Rakkammal K, et al. Application of CRISPR/Cas system in cereal improvement for biotic and abiotic stress tolerance [J]. *Planta*, 2022, 256(6): 106.
- [8] Zhang R, Liu J X, Chai Z Z, et al. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing [J]. *Nature Plants*, 2019, 5(5): 480.
- [9] 曾文丹, 严华兵, 吴正丹, 等. 发根农杆菌介导的野葛毛状根遗传转化体系 [J]. *植物学报*, 2025, 60(3): 425.
- [10] Zeng W D, Yan H B, Wu Z D, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system of *Pueraria lobata* hairy roots [J]. *Bulletin of Botany*, 2025, 60(3): 425.
- [11] Frame B R, Shou H X, Chikwamba R K, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(1): 13.
- [12] 汪炜耀, 魏云晓, 唐云霓, 等. 棉花发根农杆菌转化体系的建立及生根优化 [J]. *中国农业科学*, 2025, 58(8): 1479.
- [13] Wang W M, Wei Y X, Tang Y N, et al. Establishment and rooting optimization of *Agrobacterium rhizogenes* transformation system in cotton [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2025, 58(8): 1479.
- [14] 朱雨萱, 姚明军, 李 斌, 等. 发根农杆菌介导的草莓遗传转化体系构建 [J]. *果树学报*, 2026, 43(1): 196.
- [15] Zhu Y X, Yao M J, Li B, et al. Establishment of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in strawberry [J]. *Journal of Fruit Science*, 2026, 43(1): 196.
- [16] 彭亚博, 田保明, 崔明珠, 等. 农杆菌介导的小麦成熟胚遗传转化影响因素分析 [J]. *麦类作物学报*, 2017, 37(4): 458.
- [17] Peng Y B, Tian B M, Cui M Z, et al. Factors influencing *Agrobacterium* mediated transformation in mature embryo of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37(4): 458.
- [18] Hayta S, Smedley M A, Demir S U, et al. An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Methods*, 2019, 15(1): 121.
- [19] Li J R, Ye X G, An B Y, et al. Genetic transformation of wheat: Current status and future prospects [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2012, 6(3): 183.
- [20] Wang K, Riaz B, Ye X G. Wheat genome editing expedited by efficient transformation techniques: Progress and perspectives [J]. *The Crop Journal*, 2018, 6(1): 22.
- [21] 张伟, 尹米琦, 赵 佩, 等. 我国部分主推小麦品种组织培养再生能力评价 [J]. *作物学报*, 2018, 44(2): 208.
- [22] Zhang W, Yin M Q, Zhao P, et al. Regeneration capacity evaluation of some largely popularized wheat varieties in China [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(2): 208.
- [23] 石珍源, 殷桂香, 杜丽璞, 等. 小麦大龄幼胚再生性能改进与农杆菌转化 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(2): 225.

- Shi Z Y, Yin G X, Du L P, *et al.* Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation using large immature embryos of wheat [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(2): 225.
- [18] 王顺利, 王轲, 韩晓峰, 等. 小麦遗传转化方法研究进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2008, 29(6): 52.
Wang S L, Wang K, Han X F, *et al.* Progress in studies on the genetic transformation methods in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2008, 29(6): 52.
- [19] 张磊, 李国领, 张建国, 等. 农杆菌介导小麦遗传转化方法的优化与应用[J]. 河南农业大学学报, 2017, 51(6): 781.
Zhang L, Li G L, Zhang J Z, *et al.* Improvement and application of *Agrobacterium* mediated genetic transformation of wheat [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2017, 51(6): 781.
- [20] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(3): 971.
- [21] 毕瑞明. 农杆菌介导小麦成熟胚愈伤组织转化的主要因子优化[J]. 生物技术, 2008, 18(2): 58.
Bi R M. Optimization of major factors for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of callus of wheat mature embryo [J]. *Biotechnology*, 2008, 18(2): 58.
- [22] 李聪, 张启军, 刘少奎, 等. sbk 和 sck 双价抗虫转基因水稻的育成和鉴定[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(6): 599.
Li C, Zhang Q J, Liu S K, *et al.* Breeding and identification of insect-resistant rice with two insecticidal genes, sbk and sck [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(6): 599.
- [23] Wang K, Liu H Y, Du L P, *et al.* Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(5): 614.
- [24] Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, *et al.* *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, *Triticale*, and maize [J]. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 2009(1): 835608.
- [25] 罗志娜, 赵桂琴, 刘欢. 燕麦成熟胚的组织培养及植株再生[J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(5): 60.
Luo Z N, Zhao G Q, Liu H. Tissue culture and plant regeneration from mature embryos of oat [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2012, 47(5): 60.
- [26] Huang J C, Ge X J, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA [J]. *Bio-Techniques*, 2000, 28(3): 432.
- [27] Sparks C A, Doherty A, Jones H D. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery [M]//Cereal Genomics. Totowa, NJ: Humana Press, 2013: 235.
- [28] Kumar R, Mamrutha H M, Kaur A, *et al.* Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos [J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(2): 1845.
- [29] He Y, Jones H D, Chen S, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(6): 1567.
- [30] Richardson T, Thistleton J, Higgins T J, *et al.* Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 119(3): 647.
- [31] 张月婷, 廖玉才, 黄涛, 等. 农杆菌介导的小麦转化体系的优化[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 23.
Zhang Y T, Liao Y C, Huang T, *et al.* Optimization of genetic transformation of wheat cultivars mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(1): 23.
- [32] Wang G P, Yu X D, Sun Y W, *et al.* Generation of marker-and/or backbone-free transgenic wheat plants via *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1324.
- [33] Hiei Y, Ishida Y, Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 628.
- [34] Sun Y W, Zhang X, Wu C Y, *et al.* Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(4): 628.
- [35] Wu H, Sparks C, Amoah B, *et al.* Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(7): 659.
- [36] Hensel G, Marthe C, Kumlehn J. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using immature embryos [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1679: 129.
- [37] Sidik N J, Agha H M, Alkamil A A, *et al.* A mini review of plant tissue culture: The role of media optimization, growth regulators in modern agriculture, callus induction and the applications [J]. *AUIQ Complementary Biological System*, 2024, 1(2): 96.
- [38] Ahmad Dar S, Ahmad Nawchoo I, Tyub S, *et al.* Effect of plant growth regulators on *in vitro* induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl [J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00688.
- [39] Lowe K, Wu E, Wang N, *et al.* Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation [J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(9): 1998.
- [40] Vasil V, Brown S M, Re D E, *et al.* Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat [J]. *Bio/Technology*, 1991, 9(8): 743.
- [41] 杜文平, 余桂容, 宋军, 等. 基因型和外植体对小麦离体培养的影响[J]. 分子植物育种, 2012, 10(3): 290.
Du W P, Yu G R, Song J, *et al.* Effects of genotypes and explants on *in vitro* culture of wheat [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2012, 10(3): 290.
- [42] 刘香利, 刘缙, 郭嵩光, 等. 小麦不同外植体离体培养与再生研究[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(4): 568.
Liu X L, Liu J, Guo A G, *et al.* Study on the tissue culture and plant regeneration of different explant from wheat [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2008, 28(4): 568.
- [43] Liu X M, Bie X M, Lin X L, *et al.* Uncovering the transcriptional regulatory network involved in boosting wheat regeneration and transformation [J]. *Nature Plants*, 2023, 9(6): 908.
- [44] Wang K, Shi L, Liang X N, *et al.* The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation [J]. *Nature Plants*, 2022, 8(2): 110.
- [45] Debernardi J M, Tricoli D M, Ercoli M F, *et al.* A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(11): 1274.