

基因枪轰击后大麦幼胚的组织培养及植株再生研究

刘 雷¹, 尹 钧¹, 任江萍¹, 李会勇², 李 磊¹

(1. 河南农业大学国家小麦工程技术研究中心, 河南 郑州 450002; 2. 山西农业大学, 山西 太谷 030801)

摘要:以基因枪轰击后的6个大麦品种的幼胚为材料,研究了不同质量浓度的ABA, 2, 4-D, ZT和IAA对胚幼的出愈率、愈伤组织分化特性和植株再生能力的影响。结果表明:用1.0 mg/L的ABA在诱导培养基上处理幼胚能大大降低胚芽鞘发生率,并对出愈率和胚性愈伤组织的形成无不良影响;经1.0 mg/L的2, 4-D诱导产生的胚性愈伤组织转到分化培养基上以后,芽分化率可达8%~17%,而4.0 mg/L 2, 4-D处理芽分化率极低。1.0 mg/L ZT与0.1 mg/L IAA配比能降低分化过程中不定根的发生率,有利于芽的分化。通过植株再生系统的优化,6个大麦品种的转化幼胚植株再生率达到2%~8%。

关键词:基因枪; 大麦幼胚; 植物激素; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: S512.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)04-0001-04

Tissue Culture and Plant Regeneration of Barley Immature Embryos Bombed by Microprojectile

LIU Lei, YIN Jun¹, REN Jiang-ping¹, LI Hui-yong², LI Lei

(1. National Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Effects of different ABA, 2, 4-D concentrations and ZT and IAA ratio on callus induction and plant regeneration of barley immature embryos, bombed by microprojectile, were studied. The results demonstrated that 1.0 mg/L ABA could effectively inhibit coleoptile growth of immature embryo without negative effects. Frequency of bud differentiation was up to 8%~17% from embryonic callus induced by the treatment of 1.0 mg/L 2, 4-D, while few buds induced by 4.0 mg/L 2, 4-D. Desirable combination of ZT and IAA for bud differentiation was 1.0 mg/L ZT and 0.1 mg/L IAA. According to optimum hormone concentrations, plant regeneration frequency of bombed immature embryos from six barley varieties were at a range of 2%~8%.

Key words: Microprojectile; Barley immature embryos; Hormone; Callus; Plant regeneration.

基因枪轰击转化法在大麦转基因研究中广为应用,组织培养是通过基因枪转化技术获得转基因植株的重要支持手段。衡量组织培养工作的一个重要标准就是植株再生率的高低。据报道:许多未经基因枪轰击的大麦品种的幼胚,经组织培养后植株再生率在20%~90%之间^[1~3]。基因枪轰击时剧烈的气流震荡和金粒的冲击对外植体造成损伤,这必然

影响组织培养效果。Thomas Koprek等对轰击后大麦幼胚的再生能力做过研究,认为同未经轰击的幼胚相比,其胚性愈伤组织发生率下降80%,经过轰击和筛选后的大麦幼胚的植株再生率仅约为2%^[4]。轰击过的外植体在组织培养过程中植株再生率不高,这已成为获得转基因品种的主要限制因素^[1]。本试验以轰击过的幼胚为材料,研究了脱落

收稿日期:2002-10-18

基金项目:国家948项目(991028)

作者简介:刘雷(1972-),男,在读博士,主要从事转基因大麦研究工作,尹钧为通信作者。

酸(ABA)、2, 4- 二氯苯氧乙酸(2, 4- D)、玉米素(ZT)和吲哚乙酸(IAA)对出愈率、分化特性和植株再生能力的影响, 旨在探索轰击后大麦幼胚的组织培养优化方案, 以期提高转化受体的植株再生能力。

1 材料与方法

1.1 植物材料与基因枪轰击

试验选用了 Franklin, Stirling, Gairder, Harrington, 豫啤1号(YP1)和豫啤2号(YP2)共6个品种。取开花后12~14 d的大麦子粒用70%的酒精浸泡2 min, 用无菌水漂洗后再用0.1%的HgCl₂浸泡10 min, 用无菌水漂洗后剥取1.0~1.5 mm的幼胚, 盾片向上接种到培养基上。接种5 d后用PDS-1000/He型基因枪进行转化轰击, 轰击参数为: 可裂膜与载弹片间距2.5 cm, 载弹片与阻挡网间距1.1 cm, 阻挡网与外植体间距5.5 cm, 轰击气体压力373 KPa, 真空度89 MPa, 每枪金粉量50 μg。

1.2 愈伤组织的培养

接种的幼胚在26℃下进行愈伤组织诱导的暗培养, 每15 d继代1次。诱导培养基为: MS培养基加ABA和2, 4- D。ABA质量浓度处理为: 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L, 处理时间为接种后14 d内; 2, 4- D质量浓度处理为: 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L, 在进入分化培养前一直使用; 培养基中麦芽糖质量浓度为30 g/L。经2~3次继代培养后, 选择直径约5 mm、色泽淡黄、结构紧凑的胚性愈伤组织转入分化培养。在16 h/d的光照(3 000 lx)和26℃下进行愈伤组织分化培养, 每15 d继代1次, 分化培养基为: MS培养基加ZT和IAA, ZT和IAA质量浓度(mg/L)配比为: 0.1/1.0, 0.5/1.0, 1.0/0.5, 1.0/0.1, 麦芽糖质量浓度为40 g/L。当小芽长到2~3 cm时转入生根培养, 生根培养基为: 1/2 MS培养基加0.2 mg/L的IAA, 麦芽糖质量浓度为15 g/L。生根培养完成后进行炼苗移栽。

2 结果与分析

2.1 ABA对大麦幼胚愈伤组织诱导的影响

本试验以 Stirling 和 Gairder 轰击后的幼胚为材料, 研究不同质量浓度ABA对大麦幼胚愈伤组织诱导的影响(表1)。

从表1可以看出, 在未加ABA的培养基上胚芽鞘生长十分严重, 胚芽鞘发生率高达70%~80%, 观察发现接种后5~7 d内就可长到2~3 cm。ABA

对胚芽鞘生长的抑制作用随着质量浓度的增加而增大, 当ABA质量浓度达到1.0 mg/L时, 胚芽鞘的生长被控制在10%以内, 且生长较慢; 2.0 mg/L ABA在抑制胚芽鞘生长的同时, 也降低了出愈率和胚性愈伤组织百分率, 表现为愈伤组织色泽较为暗淡、体积增长较慢, 个别愈伤组织出现水渍状、结构松散的非胚性特征。幼胚在培养基上有两种发展趋势, 其一是幼胚的生长, 其二是诱导条件下原有组织的脱分化过程。观察发现两者可同时进行, 但长了胚芽鞘的愈伤组织长势明显偏弱。试验结果表明在诱导愈伤组织的过程中, 胚芽鞘的生长与愈伤组织、特别是胚性愈伤组织的形成之间存在着相互竞争、抑制的关系。本研究表明: 1.0 mg/L的ABA处理既能控制胚芽鞘生长又不妨碍胚性愈伤组织形成。

表1 ABA对啤酒大麦幼胚愈伤组织诱导的影响

品种	ABA 质量 浓度 (mg/L)	接种胚数 (个)	胚芽鞘 发生率 (%)	出愈率 (%)	胚性愈伤 组织百分 率(%)
Stirling	0	98	71.4	57.1	22.4
	0.5	263	22.0	61.9	50.9
	1.0	240	9.0	72.1	60.0
	2.0	221	4.1	61.1	42.9
Gairder	0	104	81.7	53.8	25.0
	0.5	247	25.9	59.9	48.9
	1.0	253	9.9	64.0	47.0
	2.0	238	6.0	57.9	37.8

2.2 2, 4- D对大麦幼胚愈伤组织的诱导和分化的影响

试验研究了不同2, 4- D质量浓度处理下 Franklin 和 Harrington 品种轰击后的幼胚在愈伤组织生长与分化方面的反应, 结果见表2。2, 4- D质量浓度在0.5~1.0 mg/L时, 两个品种の出愈率和胚性愈伤组织百分比都随质量浓度增大而上升, 而当质量浓度由2.0 mg/L上升到4.0 mg/L时, 这两项指标表现出明显的下降趋势, 说明高质量浓度的2, 4- D有抑制愈伤组织生长的作用。各处理诱导出的胚性愈伤组织在分化能力和分化方向上有明显差别。经0.5 mg/L的2, 4- D处理培养出的胚性愈伤组织的分化率达到80%, 但绝大多数是不定根, 芽分化率极低; 1.0~2.0 mg/L的2, 4- D质量浓度范围内, 出愈率和胚性愈伤组织百分比相对较高, 而且芽分化率明显高于其他处理, 4.0 mg/L的2, 4- D处理在芽和不定根的分化率上都最低。上述分析表明1.0~2.0 mg/L的2, 4- D适宜于轰击后大麦幼胚的

组织培养。

表 2 2,4- D 对胚性愈伤组织的诱导与分化的影响

品种	2,4- D 质量浓度 (mg/L)	接种胚数 (个)	出愈率 (%)	胚性愈伤组织 百分率(%)	不定根发生率 (%)	芽分化率 (%)
Franklin	0.5	111	56.7	35.1	79.4	0
	1	153	70.5	50.3	61.8	17.1
	2	148	75.6	45.2	70.1	10.4
	4	108	68.5	38.8	52.3	2.4
Harrington	0.5	98	59.1	30.6	83.3	3.3
	1	142	69.0	45.1	62.5	7.8
	2	145	64.1	48.9	60.5	8.5
	4	103	48.5	34.9	47.2	0

注: 出愈率和胚性愈伤组织发生率是以各处理中接种的胚数为比较的基础; 不定根和芽的分化率则是以各处理上得到的胚性愈伤组织个数为基础

2.3 ZT 与 IAA 对比对愈伤组织分化的影响

本试验以 YP1 和 YP2 为材料, 研究了 ZT 与 IAA 的不同组合对轰击后幼胚诱导的愈伤组织分化的影响。对胚性愈伤组织上绿色分化原基发生率以及芽和不定根分化情况进行统计, 结果见表 3。表 3 表明: ZT 和 IAA 的不同组合对绿色原基的分化影响不大, 不同处理下绿色分化原基发生率都在 70% 以上, 同一品种不同处理间相差在 6% 以内。ZT 和 IAA 的不同组合对不定根和芽的分化却有较大的影响。随着 ZT 质量浓度的升高和 IAA 质量浓度的降低, 不定根的分化率降低, 芽的分化率增加。当 ZT/IAA 的质量浓度配比由 0.1/1.0 逐渐变化为 1.0/0.1 时, 不定根的分化率由 90% 以上降到 50% 左右, 而芽的分化率由 0 上升到 8%~10%, 这表明较高质量浓度的 ZT 与低质量浓度的 IAA 配合对不定根的生长有一定的抑制, 对芽的分化有促进作用。

表 3 ZT 与 IAA 对比对愈伤组织分化的影响

品种	ZT/IAA (mg/L)	接种愈伤 组织数	绿原基发 生率(%)	不定根发 生率(%)	芽分化 率(%)
YP1	0.1/1.0	50	76	96	0
	0.5/1.0	50	80	88	2
	1.0/0.5	50	78	68	6
	1.0/0.1	50	74	44	10
YP2	0.1/1.0	50	74	92	0
	0.5/1.0	50	70	84	4
	1.0/0.5	50	72	76	0
	1.0/0.1	50	76	54	8

2.4 不同基因型对组织培养的反应

根据上述试验结果得出激素的优化方案为: 在愈伤组织诱导培养基上 ABA 为 1.0 mg/L, 2,4- D 为 1.5 mg/L; 分化培养基上的激素 ZT 与 IAA 配比为 1.0/0.1。采用优化方案对 6 个大麦品种的轰击后

幼胚进行试验, 结果见表 4。

表 4 不同基因型对组织培养的反应

品种	接种 胚数	出愈率 (%)	胚性愈伤 组织百分率 (%)	不定根 发生率 (%)	芽分化率 (%)	再生 植株数
Franklin	100	90	67	35	17	8
Stirling	100	82	74	48	5	3
Gairder	100	81	68	39	7	4
Harrington	100	85	57	41	9	5
YP1	100	85	65	40	8	5
YP2	100	83	66	51	6	2

6 个品种的幼胚出愈率都在 80% 以上, 差异不大。在愈伤组织的总分化能力上各品种不定根与芽分化率之和都达到 50% 左右。在分化方向上各品种的幼胚存在较大差异, 表现为芽分化率高的品种不定根的分化率较低, 而芽分化率低的不定根分化率却较高。如豫啤 2 号的不定根分化率达 51%, 芽分化率只有 6%; Franklin 的芽分化率最高达到 17%, 不定根的分化率却最低只有 35%; 与此相应的是 Franklin 的植株再生率明显地高于豫啤 2 号。根据 6 个大麦品种在出愈率、胚性特点、分化能力、植株再生能力等几方面的表现, 可以看出: Franklin 的幼胚对组织培养的反应最好, 植株再生能力可达到 8%。

3 结论与讨论

在大麦幼胚组织培养过程中极易发生胚芽鞘生长的现象, 这能导致幼胚愈伤组织出愈率的下降、生长缓慢、胚性降低, 轰击过的大麦幼胚同样有此现象。ABA 可以抑制胚芽鞘的生长, 常用于大麦幼胚愈伤组织的诱导, 而且对愈伤组织的发生和分化有影响^[5]。值得注意的是: 高质量浓度的 ABA 对愈伤组织的形成也可以产生负效应, 这是因为 ABA 能诱

导乙烯生成对愈伤组织造成伤害^[6,7]。本试验表明: 接种后 14 d 内使用 1.0 mg/L 的 ABA 有助于提高出愈率和胚性愈伤组织的数量。

有报道显示, 2, 4- D 对愈伤组织的诱导、分化、植株的再生都有影响, 且人们对 2, 4- D 的最佳使用浓度有不同的认识^[1,8~10]。Phil Bregitzer 曾研究了未经轰击的幼胚对 2, 4- D 的反应, 当质量浓度大于 3.0 mg/L 时仍未见不良反应^[9]。本试验结果则显示: 经轰击的幼胚在 2, 4- D 质量浓度为 1.0~2.0 mg/L 内时, 出愈率和胚性愈伤组织百分比相对较高, 而且芽分化率表现突出; 质量浓度大于 2.0 mg/L 时开始表现出不良影响。这可能是因为轰击处理影响了外植体对 2, 4- D 的反应能力。

不定根和芽的分化先后顺序对于植株的再生有重大影响, 如果愈伤组织先分化出不定根, 则几乎不可能再分化出芽; 反之, 形成芽后, 愈伤组织却能在生根培养基上长出根来, 形成完整的再生植株。有效地诱导芽分化是提高植株再生率的重要环节。植物激素对于组织培养中器官或胚状体的分化有重要的调节作用, 适宜的激素配比有利于胚性愈伤组织分化出苗和根, 成长为再生植株。本试验表明: 在 ZT / IAA 由 0.1/1.0 变化为 1.0/0.1 的过程中, ZT 含量的增加对不定根的生长有一定的抑制, 并促进芽的分化。有研究发现: 当 ZT 质量浓度为 5.0 mg/L 时仍可取得较好的效果, 但 ZT 质量浓度升高到 10.0 mg/L 时愈伤组织的发育会受到阻碍^[3]。与之相比, 本试验中选用处理属于低质量浓度水平, 相应的形态观察也未发现 1.0 mg/L ZT 对愈伤组织的发育有阻碍。因此, ZT 的质量浓度在 1.0 mg/L 以上还可能有一定的合理增长范围。

相同培养条件下, 6 个大麦品种的植株再生率的差异较明显, 最大相差可达 4 倍。这说明选择合适的受体材料进行遗传转化能明显增加再生植株的数量。综合出愈率、胚性特点、分化能力、植株再生能力等几方面的表现, 可以看出: Franklin 的幼胚对组织培养的反应最好, 可作为基因转化的理想受体材料。

本试验建立的植株再生系统为: 接种幼胚长 1.0~1.5 mm, 愈伤组织诱导培养基为 MS+ 1.0 mg/

L ABA+ 1.5 mg/L 2, 4- D+ 30 g/L 麦芽糖; 分化培养基为 MS+ 1.0 mg/L ZT+ 0.1 mg/L IAA+ 40 g/L 麦芽糖; 生根培养基为: 1/2 MS 培养基+ 0.2 mg/L IAA+ 15 g/L 的麦芽糖。经愈伤组织诱导、分化培养、和生根培养后, 6 个大麦品种都有再生植株产生, 说明此植株再生系统有较广泛的适用范围。

参考文献:

- [1] Akula C, Akula A, Henry R. Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars[J]. *Biologia Plantarum*, 1999, 42 (4): 505- 513.
- [2] Dunwtan D I, Bekkaoui F, Pilon M, *et al.* Effects of abscisic acid and analogous on the maturation of white spruce (*Picea gluca*) somatic embryos[J]. *Plant Science*, 1998, 55: 77- 84.
- [3] Francisco B, Antomio M, Paul A, *et al.* Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum [J]. *Euphytica*, 1999, 108: 161- 167.
- [4] Thomas K, Robert H, Andrea N, *et al.* Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response[J]. *Plant Science*, 1996, 119: 79- 91.
- [5] Phil B. Plant regeneration and callus type in barley: effects of genotype and culture medium[J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 1108- 1112.
- [6] LIANG Hui, ZHOU Hai-ying, LI Liang-cai, *et al.* Effects of abscisic acid in immature embryo culture of wheat [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1996, 4: 51- 55.
- [7] Goldstein C S, Kronstad W E. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1986, 71: 631- 636.
- [8] Reddy V D, Reddy G M. Effects of abscisic acid and gibberellic acid 3 on morphogenesis in callus culture of hexaploid triticales [J]. *J Plant Physiol*, 1987, 128: 303- 306.
- [9] Phil B, Robert D, Campbell, *et al.* Plant regeneration from barley callus: Effects of 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid and phenylacetic acid [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 43: 229- 235.
- [10] Ziauddin A, Kasha K J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants [J]. *Euphytica*, 1990, 48: 279- 286.