

小麦转基因再生植株培养体系的优化

任江萍¹, 尹 钧¹, 师学珍², 姜小冬², 王智琴²

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

摘要:以 5 个基因型不同的小麦幼胚、幼穗作为供试材料, 探讨了品种基因型、ABA 处理及生根条件等对小麦离体培养的影响。结果表明, 小麦品种豫麦 18-64 为遗传转化的良好受体材料; 0.2 mg/L NAA 和 0.8 mg/L IAA 可促进幼苗生根; 在幼胚愈伤组织诱导前 14 d, 用 0.5 mg/L ABA 处理可有效抑制出芽率, 并有利于促进胚愈伤组织形成和再生能力的保持。

关键词: 小麦; 基因型; 组织培养体系

中图分类号: S512.103.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0022-04

Optimisation of the Cultural System of Wheat Transgenic Regenerated Plants

REN Jiang ping¹, YIN Jun¹, SHI Xue zhen², JIANG Xiao dong², WANG Zhi qin²

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

Abstract: The acceptors were obtained from 5 wheat cultivars including Yumai 18-64, Yumai 34, Wenmai No. 6, Yumai 70 and 895004. The factors affecting the plants regeneration, such as genotype, ABA treatment and rooting conditions were studied. The result showed that Yumai 18-64 was the best acceptor genotype among 5 cultivars. The hormone proportions of NAA 0.2 mg/L and IAA 0.8 mg/L could efficiently improve root differentiation. Meanwhile it was found in the experiments that immature embryo germination was not only inhibited, but embryonic callus development could also be significantly improved by culturing callus on the medium containing ABA (0.5 mg/L) for two weeks.

Key words: Wheat (*Triticum aestivum* L.); Genotype; Tissue culture system

小麦作为世界上重要的粮食作物, 对其进行基因工程改良一直倍受关注。自 1992 年第 1 株转基因小麦问世至今^[1], 许多国家开展了小麦遗传转化研究, 已将一些标记基因和目标基因导入小麦基因组中, 其中基因枪介导法是目前广泛采用的方法。所用受体基本上集中于 2~3 个模式品种, 而当前主要推广品种的基因转化报道较少。其原因是小麦外植体基因型依赖性强, 外植体离体再生频率低^[2~4]。因此选择适宜的基因型, 研究小麦组织培养条件和影响植株再生频率的因素是小麦分子育种研究的重要课题。本研究旨在从 5 个优良小麦品种中筛选出

适宜基因转化的优良基因型, 并对愈伤组织诱导及再生频率的影响因素进行研究, 以期当前小麦主要推广品种的基因转化提供最佳的再生系统。

1 材料和方法

1.1 材料

用于试验的植物材料包括: 895004、豫麦 34 号、豫麦 18-64、温麦 6 号和豫麦 70 号。

1.2 培养基

基本培养基为 MS 培养基^[5]。幼胚愈伤组织诱导及继代培养基为 MS 基本培养基+ 2, 4-D 2 mg/L。

收稿日期: 2002-07-16

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化项目(J200-B-019)

作者简介: 任江萍(1966-), 女, 山西定乡人, 讲师, 博士, 主要从事生物技术教学和研究工作。

同时附加经过滤灭菌的 ABA, 其处理为: 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/L。幼穗愈伤组织诱导培养基为: MS 基本培养基+ 500 mg/L 水解乳蛋白+ 500 mg/L L-脯氨酸+ 0.5 mg/L NAA+ 2 mg/L 2,4-D+ 30 g/L 麦芽糖。

幼胚愈伤组织分化培养基为 MS 基本培养基+ 2 mg/L ZT+ 1 mg/L IAA。幼穗愈伤组织分化培养基为 MS 基本培养基+ 500 mg/L 水解乳蛋白+ 500 mg/L L-脯氨酸+ 0.2 mg/L NAA+ 0.1 mg/L 玉米素+ 30 g/L 麦芽糖。生根培养基为 1/2MS 基本培养基+ 不同浓度的 NAA 或 IAA。NAA 浓度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/L, IAA 浓度分别为 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/L。

以上培养基(除幼穗培养基外)均含 30 g/L 蔗糖+ 7 g/L 琼脂, pH 值 5.6~ 5.8, 常规方法灭菌。

1.3 外植体

幼胚材料来源于开花后 14~ 16 d 的幼穗(幼胚直径为 1.0~ 1.5 mm)和剥下幼嫩种子。幼穗用小麦生长锥处于小穗分化期(肉眼观察幼穗长度为 1.0 cm 左右)前后, 取生长一致的植株, 剥去主茎外层、叶鞘, 保留含嫩叶部分在内的幼穗。幼嫩种子与幼穗用 70% 的酒精表面消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 次后用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 6 min, 无菌水冲洗 3~ 4

次。然后在超净工作台上用解剖镊剥出幼胚、幼穗。幼胚盾片朝上接种于培养基上, 每皿放 40 粒幼胚; 幼穗切成长约 2~ 3 mm 的小段, 每皿放 3 枚幼穗。Parafilm 封口, 暗培养待用。

1.4 培养条件

剥取的幼胚盾片朝上接种于愈伤组织诱导培养基上, 24~ 26 ℃暗培养 14 d, 然后转入继代培养基中再培养 14 d。同时统计不同品种的出愈率(出愈率= 产生的愈伤组织块数/接入的幼胚数× 100%)。14 d 后挑选生长良好的胚性愈伤组织转入分化培养基进行光照培养, 光强为 2 000~ 3 000 lx, 每天光照 16 h, 35~ 40 d 后统计分化率(分化率= 愈伤组织出现的绿点数/接入的愈伤组织块数× 100%)。每隔 15~ 20 d 继代 1 次。待分化出的绿芽长至 2~ 3 cm 时, 转至生根培养基中生根。

2 结果与分析

2.1 不同基因型小麦的幼穗、幼胚愈伤组织的生长及分化

将 4 个小麦品种的幼穗接种到 MS 诱导培养基上, 置于暗培养箱中培养 30 d 后统计愈伤组织的诱导率(表 1)。

表1 小麦品种基因型对幼穗愈伤组织生长的影响

品 种	接种数(穗)	出愈起始天数(d)	愈伤组织形成天数(d)	愈伤组织数(块)	出愈率(%)	分化率(%)
豫麦 18 64	201	5	8	154	76.6	60
温麦 6 号	200	7	10	87	43.5	32
豫麦 70 号	195	6	9	131	67.1	40
豫麦 34 号	196	8	12	87	50.0	20

由表 1 可以看出, 在相同的培养基上, 虽然愈伤形成天数相差不大, 但出愈率不同品种之间存在着较大差异, 表现为豫麦 18-64 和豫麦 70 号在出愈速度和出愈率上均明显高于其他两个品种, 7 d 左右就可形成愈伤组织, 而温麦 6 号和豫麦 34 号则需 10~ 12 d 才可形成愈伤组织; 其中豫麦 18-64 形成的愈伤组织数最多, 出愈率达到 76.6%, 其次为豫麦 70 号; 出愈率最低的是温麦 6 号, 仅为 43.5%。可见, 在培养条件相同的情况下, 不同基因型对幼穗愈伤组织的诱导率有很大影响。不同品种之间分化率也存在着较大差异, 豫麦 18-64 表现出较高的植株再生频率, 达到 60%, 且丛生芽较多; 其次为豫麦 70 号, 分化率为 40%, 分化率最低的是豫麦 34 号, 为 20%。

将 4 个小麦品种幼胚接种于 MS 诱导培养基上(表 2), 可以看出, 4 个小麦品种共接种幼胚 1 604

个, 得到 1 578 块愈伤组织。4 个不同基因型的所有幼胚在诱导培养基上几乎都能产生愈伤组织, 诱导率在 96.9%~ 100.0% 之间, 诱导频率相差不大, 平均出愈率为 98.3%, 其中豫麦 18-64 的出愈率达到 100%。因此, 不同基因型接种材料之间的出愈率没有明显差异。但不同基因型愈伤组织诱导形成愈伤组织的天数、再生苗分化率存在显著差异。其中以豫麦 18-64 品种愈伤组织生长最佳, 4 d 即可形成愈伤组织, 且表现为生长速度快, 色泽鲜嫩, 体积明显大于其他品种。另外 3 个品种愈伤组织形成比较缓慢且松散, 大多呈水泡状。把得到的 1099 块净愈伤组织转接于分化培养基上, 其中仅 387 块愈伤组织分化形成再生芽, 分化率为 35.2%; 有 370 块愈伤组织只能分化成根或形成绿点, 不能形成再生芽, 占 33.7%; 有 342 块愈伤组织完全不分化, 占 31.1%。

其分化频率在 4 个基因型之间也出现较大的差异, 豫麦 18-64 的幼胚愈伤组织分化效果非常好, 分化率达到 59.6%, 温麦 6 号、豫麦 70 号、豫麦 34 号等基因型的幼胚产生的愈伤组织分化效果较差。由此可见, 虽然参试基因型幼胚的出愈率很高, 基因型之

间几乎没有差异, 但愈伤组织在分化率上存在着明显差异。筛选结果表明, 供试品种中豫麦 18-64 在致密愈伤组织的诱导、分化等方面均表现出良好的特性, 是可以用于小麦遗传转化的良好基因型。

表 2 小麦品种基因型对幼胚愈伤组织生长的影响

品 种	幼胚数(个)	愈伤数(块)	出愈率(%)	愈伤组织形成天数(d)	净愈数(块)	分化芽数(个)	分化率(%)
豫麦 18-64	412	412	100.0	4	305	208	59.6
豫麦 34 号	402	399	99.2	5	270	89	32.9
豫麦 70 号	398	387	97.2	5	268	56	20.9
温麦 6 号	392	380	96.9	6	256	34	13.3

表 3 ABA 对小麦愈伤组织诱导的影响

品 种	ABA 浓度 (mg/L)	接种幼 胚数(个)	形成愈伤 组织数(块)	出愈率 (%)	形成胚 芽数(个)	成愈率 (%)	分 化 芽数(个)	分化率 (%)
豫麦 34 号	M0	300	300	100.0	105	35.0	93	30.9
	M0.5	250	240	96.0	62	24.8	100	40.0
	M1.0	377	352	93.3	31	8.2	60	15.9
	M1.5	265	239	90.0	0	0	10	3.7
豫麦 18-64	M0	742	742	100.0	228	30.7	289	39.0
	M0.5	365	360	98.6	52	14.2	183	60.1
	M1.0	620	591	95.3	10	1.6	104	16.8
	M1.5	451	405	89.8	0	0	24	5.4
豫麦 70 号	M0	324	300	92.5	134	41.3	65	20.0
	M0.5	256	231	90.2	52	20.3	90	40.1
	M1.0	264	233	88.2	13	4.9	58	19.6
	M1.5	243	198	81.4	0	0	12	4.9
温麦 6 号	M0	312	310	99.3	100	32.1	61	19.5
	M0.5	354	321	90.6	49	13.8	133	37.5
	M1.0	347	301	86.7	16	4.6	73	21.0
	M1.5	265	220	83.0	0	0	8	3.0
平 均	M0	419	413	97.95	141	34.78	89.3	27.35b
	M0.5	306	288	93.85	54	18.28	120.0	44.40a
	M1.0	402	369	90.88	18	4.83	48.1	18.30b
	M1.5	306	265	86.05	0	0	8.5	4.25c

注: a, b, c 代表处理间有显著差异(α= 0.05), 新复极差测验

2.2 ABA 对小麦幼胚培养及愈伤组织再生能力的影响

本试验用豫麦 34 号、温麦 6 号、豫麦 18-64 和豫麦 70 号这 4 个小麦品种, 在愈伤组织诱导前 14 d 进行了 MS 诱导培养基附加不同浓度的 ABA 对幼胚愈伤组织诱导影响的研究, 14 d 后记录了形成愈伤组织的幼胚数, 并统计了发芽的幼胚数目。由表 3 可以看出, MS 诱导培养基中未附加 ABA, 4 个小麦品种均表现出胚芽易萌发且愈伤组织比较松散, 附加不同浓度的 ABA 后对小麦幼胚脱分化过程中的发芽率均有一定的抑制作用, 但抑制程度有差异。表现为, 随着 ABA 浓度的增加, 抑制率逐渐增强, ABA

浓度达到 1.5 mg/L 时, 抑制率达到 100%。4 个品种均表现出相同的趋势, 但对愈伤组织的诱导频率基本无明显影响。进一步观察发现, 添加 0.5 mg/L 的 ABA 对胚性愈伤组织的形成有促进作用, 表现为愈伤组织多呈淡黄色, 结构较致密, 出现结节状结构, 更容易分化。附加 1.0~ 1.5 mg/L 的 ABA 后明显抑制了愈伤组织的生长, 最后导致胚性的丧失, 分化能力明显降低。通过方差分析表明, 经不同浓度 ABA 诱导的愈伤组织其分化率主要受 ABA 浓度的影响 (F= 28.1, F_{0.05}= 3.86), 与基因型关系不大。进一步通过 SSR 测验, 处理间差异达到极显著水平。

2.3 不同生长素对生根的影响

本试验选用春性小麦品种 895004 作为供试材料, 把幼胚诱导分化 2~3 cm 高的幼苗, 接种于 8 种不同的生根培养基上, 比较了在 1/2MS 生根培养基中附加不同生长素对诱导生根的影响。结果表明(图 1), 在含 NAA 0.2 mg/L 生根培养基中的生根率最高, 达 88% 以上。据观察, 在此培养基上的幼苗根系丛生, 主根粗长健壮, 须根多且盘曲, 极为发达, 而且诱导生根时间短, 能诱导芽快速生根。NAA 0.1 mg/L 时, 只有少数须根, 且细短。NAA 0.3 mg/L 和 NAA 0.4 mg/L 时, 诱导的根极少, 只有少数主根, 且粗而短, 生长缓慢。

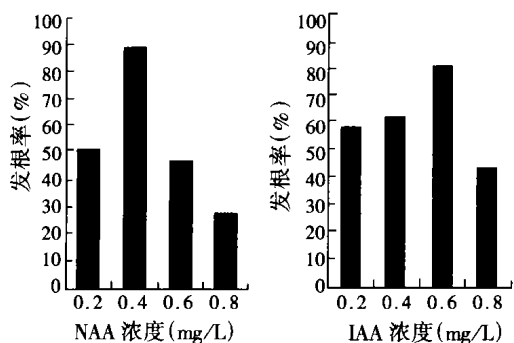


图 1 不同生根培养基对 895004 幼胚来源幼苗生根的影响

含 IAA 0.8 mg/L 时, 可以快速诱导芽生根, 生根率达 81% 以上, 据观察, 所诱导的主根多且长, 须根少, 但粗长盘曲, 极为健壮; 当 IAA 为 0.2 mg/L 和 0.4 mg/L 时, 主根少且细长, 须根多但细而短, 所诱导的根比较纤弱; 当 IAA 为 1.6 mg/L 时, 发根率虽达 42.86%, 但只有少数几条须根长出, 细而短。

以上可以看出, 添加 NAA 0.2 mg/L 和 IAA 0.8 mg/L 时, 可以诱导芽快速生根, 且所生根系发达健壮。NAA 和 IAA 都有促进芽生根的作用, 但 NAA 作用时间长, 不易分解, 易使再生根系过度生长而导致培养基消耗过快, 不利于其移栽炼苗。而 IAA 易于分解, 其降解周期 10 d 左右, 在诱导生根的后期, 使根在几乎不含外源激素的条件下生长, 再生植株表型正常。所以根据本试验的结果, 可以认为宜在生根培养基中加入低浓度的 NAA 或用适量浓度的 IAA 取代 NAA 诱导生根。

3 结论与讨论

本研究所用的 5 个基因型中, 在愈伤组织的诱导、胚性活力的维持及分化能力等方面表现出较大差异, 其中豫麦 1864 表现出非常高的离体培养力,

且多为丛生芽, 是可作为小麦遗传转化的理想受体基因型。

脱落酸(ABA)在多种作物组织培养上对胚性愈伤组织的发生有良好的作用^[6,7]。许多试验研究结果表明, 在诱导愈伤组织的前期, 培养基中附加适当浓度的 ABA, 不仅对愈伤组织的形成无影响, 而且能有效抑制胚芽过早生长, 增加盾片愈伤组织的致密度, 从而有利于诱导出更多的胚状体。本试验研究表明, 添加 0.5 mg/L ABA 对抑制胚芽的过早萌发, 促进和保持小麦胚性愈伤组织的形成有明显的作用。附加 ABA 后能使幼胚愈伤组织表面几层质地疏松的细胞变得质地致密, 这有利于基因枪的转化, 因为微弹能击入的细胞主要是这些表层细胞。因此, 在诱导培养基中添加适量的外源 ABA, 可增加外源基因进入分化细胞的几率, 为外源基因的转化提供良好的受体材料。

参考文献:

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, *et al.* Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Bio Technology, 1992, 10: 667-674.
- [2] Maddock S E, Lancaster V A, Risitoo R, *et al.* Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. J Exp Bot, 1983, 34: 915-926.
- [3] Mathias R J, Simpson E S. The interaction of genotype and culture medium on the tissue responses of wheat callus [J]. Plant Cell Tiss Org Cul, 1986, 7: 31-37.
- [4] Fennel S, Bohorova N, Van Ginkel M, *et al.* Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 163-169.
- [5] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Plant Physiol, 1962, 15: 473-497.
- [6] Van Ark H F, Zaai M A C M, Creemers Molenaar J, *et al.* Improvement of the tissue culture response of seed derived callus culture of *Poa pratensis* L: effect of gelling agent and abscisic acid [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1991, 27: 275-280.
- [7] Etienne H, Sotta B, Montoro P, *et al.* Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole 3 acetic acid and abscisic acid in the expressions of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Science, 1993, 88: 91-96.