

小麦幼穗的离体培养及其影响因素研究

刘香利, 刘 缙, 郭蔼光, 赵惠贤

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了确立适于小麦幼穗遗传转化的组织培养体系, 对8个小麦品种的幼穗通过组织培养方法, 研究了不同基因型、培养基对愈伤组织诱导及分化的影响。结果表明, 不同小麦品种幼穗愈伤组织诱导出愈率差异不大, 而分化率却差异明显, 其中绵阳19分化率最高, 平均可达72.9%, 洛阳8716次之, 平均为61.2%; 分化培养基对分化率也有很大影响, 在选用的2种分化培养基中, 郑麦9023幼穗愈伤组织的分化率差异最大, 而洛阳8716的差异最小; 小偃22、西农88、郑麦9023和陕150的幼穗愈伤组织, 在分化培养基B中分化率较高, 而陕354、绵阳19和小偃107则在分化培养基A中较高; 幼穗愈伤组织分化最佳温度为20~22℃, 光照强度3 000 lx。因此, 在所选用的8个小麦栽培品种中, 绵阳19和洛阳8716的幼穗愈伤组织可作为遗传转化的受体材料。

[关键词] 小麦; 幼穗; 愈伤组织; 分化

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0079-04

Influencing factors on wheat immature inflorescences culture

L U Xiang-li, L U Jin, GUO Ai-guang, ZHAO Hui-xian

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to establish a high frequency of plant regeneration system, the immature inflorescences of eight wheat varieties were cultured to study the effects on the frequency of callus induction and plant regeneration. The result showed that there was little difference between the frequencies of callus induced among all varieties, but the frequencies of plantlet differentiation were quite different. Mianyang No. 19 was the best genotype for explant regeneration, and Luoyang No. 8716 took the second place. The differentiation medium also had great influence on differentiation of different wheat varieties; The optimum differentiation medium of Xiaoyan No. 22, Xinong No. 88, Zhengmai No. 9023 and Shan No. 150 was medium B, while Shan No. 354, Mianyang No. 19 and Xiaoyan No. 107 was medium A. The optimum culture condition was temperature 20-22℃ and light intensity 3 000 lx. Therefore the immature inflorescences of Mianyang No. 19 and Luoyang No. 8716 were the optimal explant for wheat transformation.

Key words: wheat; immature inflorescence; callus; differentiation

应用生物技术改良禾谷类作物, 是国内外学者研究的热点之一。禾谷类作物的组织培养技术是生物技术应用的基础^[1-2]。幼穗和幼胚是小麦遗传转化中使用最多的外植体。舒理慧^[3]研究表明, 在小麦颖分化期, 其幼穗离体培养诱导率和分化率最高; 郑企成等^[4]也指出, 用合适时期的幼穗作外植体诱导

出的愈伤组织, 其再生能力比常用的幼胚外植体更理想, 不仅再生频率高, 而且在长期继代培养过程中能保持较高的再生能力; 陈梁鸿等^[5]在比较幼穗和幼胚为受体的转化试验中观察到, 幼穗的转化效果优于幼胚, 幼穗较幼胚更耐继代, 更易形成再生植株; 林刚等^[6]研究激素对小麦愈伤组织, 诱导和植株

· [收稿日期] 2005-12-30

[基金项目] 科技部国家转基因研究与产业化开发专项(Y03-A-13-01); 西北农林科技大学青年专项基金

[作者简介] 刘香利(1972-), 女, 陕西杨凌人, 讲师, 在读博士, 主要从事生化与分子生物学研究。

[通讯作者] 郭蔼光(1942-), 女, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事生化与分子生物学研究。E-mail: guoaignang@yahoo.com.cn

再生的影响时发现, 幼穗的愈伤组织诱导率和植株再生频率高于幼胚和成熟胚; 然而尹钧等^[7]研究认为, 小麦幼胚作为基因枪转化的受体材料, 其愈伤组织形成与芽分化能力优于幼穗。幼穗作为离体培养的外植体, 更有取材方便、操作简单等优点。虽然目前关于幼穗遗传受体再生体系的报道较多, 但不同基因型小麦幼穗分化能力差异很大^[8-10]。因此, 建立适于目的基因转化的幼穗组织培养体系, 是利用幼穗为外植体进行小麦遗传转化的关键。本试验以生产上栽培的、不含高分子量麦谷蛋白14亚基基因的8个小麦品种为材料, 对其幼穗组织培养特性进行了研究, 分析了不同小麦品种幼穗的出愈率及其愈伤组织的分化潜力, 旨在建立小麦幼穗的体外培养体系, 为利用优质高分子量麦谷蛋白14亚基基因改良小麦品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 小麦品种

小麦品种为洛阳8716、绵阳19、西农88、陕150、小偃22、郑麦9023、小偃107和陕354, 均播种于西北农林科技大学实验田。

1.2 培养基

诱导培养基:MS培养基+ 2 mg/L 2,4-D+ 500 mg/L 水解酪蛋白。

分化培养基A:MS培养基+ 1 mg/L KT+ 0.5 mg/L 2,4-D+ 500 mg/L 水解酪蛋白。

分化培养基B:MS培养基+ 2 mg/L KT+ 0.2 mg/L NAA+ 500 mg/L 水解酪蛋白。

生根培养基:1/2 MS培养基+ 0.5 mg/L NAA。

以上培养基pH 均为5.8, 并在121℃下高压灭菌20 min。

1.3 方法

1.3.1 幼穗接种继代 在小麦生长锥处于小穗分化期(肉眼观察幼穗长度为0.5~1.0 cm)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。在超净工作台上用体积分数70%酒精浸泡10 min, 无菌水冲洗后再用1 g/L 升汞溶液消毒15 min, 无菌水冲洗3~4次。小心剥去外围的叶鞘和幼叶, 取出幼穗切成2~3 mm 的小段, 接种到诱导培养基上, 暗培养15 d后, 将幼穗转入新的诱导培养基上继续诱导愈伤, 培养条件为24℃, 光照时间14 h/d, 光照强度3 000 lx, 每2周继代1次。

1.3.2 愈伤组织分化及植株再生 将继代2次的幼穗愈伤转入分化培养基A和B中, 培养条件为: 分化条件I. 20~22℃, 光照时间14~16 h/d, 光照强度3 000 lx; 分化条件II. 26~29℃, 光照时间12~14 h/d, 光照强度2 000 lx。培养15 d后, 观察其分化情况。将分化小苗转至生根培养基上, 于22℃、光照强度3 000 lx、光照时间14 h/d条件下诱导生根。

1.3.3 出愈率和分化率的计算 幼穗愈伤组织的出愈率和分化率按以下公式计算:

出愈率/% = (出愈外植体数/接种外植体数) × 100%;

分化率/% = (分化出芽愈伤数/接种愈伤数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同小麦品种幼穗愈伤组织的诱导结果

观察发现, 幼穗接种后3 d左右开始膨大变形, 7~14 d后陆续产生乳白色愈伤组织。继代后转入光照培养。初期愈伤组织外形呈不规则状突起, 并迅速增大转绿。不同小麦品种幼穗愈伤组织的出愈率见表1。

表1 不同小麦品种幼穗愈伤组织的诱导和分化结果

Table 1 Frequency of callus fomation and plantlet differentiation of different wheat varieties

品 种 Variety	接种数 Number of transplanted immature inflorescences	出愈率/% Frequency of callus formation	接种愈伤数 Number of transplanted callus	分化愈伤数 Number of callus differentiation	分化率/% Frequency of differentiation
郑麦 9023 Zhengmai No. 9023	297	98.7	125	26	21.0
陕354 Shaan No. 354	264	98.1	134	63	47.0
洛阳8716 Luoyang No. 8716	484	99.0	121	74	61.2
小偃22 Xiaoyan No. 22	649	98.8	275	128	46.5
西农88 Xinong No. 88	275	98.2	253	41	16.2
陕150 Shaan No. 150	264	96.6	173	66	38.2
绵阳19 Mianyang No. 19	389	95.9	118	86	72.9
小偃107 Xiaoyan No. 107	400	95.8	102	55	53.9

由表1可以看出,不同小麦品种幼穗的诱导出愈率都较高,在95.8%~99.0%,且差异不明显。其中绵阳19的出愈率较低且生长缓慢,愈伤组织较小,颜色淡绿(图1)。出愈率最高的为洛阳8716,且其



图1 绵阳19幼穗的愈伤组织

Fig. 1 Immature inflorescence callus of Mianyang No. 19

愈伤颜色较深(图2)。西农88的幼穗愈伤组织不仅出愈早,生长速度快,且明显大于其他品种,颜色黄绿色,结构紧密,而其他基因型幼穗的愈伤组织生长速度则较慢。

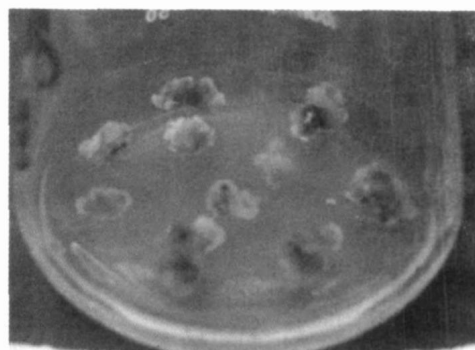


图2 洛阳8716幼穗的愈伤组织

Fig. 2 Immature inflorescence callus of Luoyang No. 8716

2.2 不同小麦品种幼穗愈伤组织的分化结果

幼穗愈伤组织进入分化阶段后,各个品种愈伤组织的分化特性表现出很大差异。观察发现,转入分化培养基后,可明显看出小麦幼穗愈伤组织中有一

些组织细胞再分化,产生出绿色芽点(图3),而部分愈伤组织生长停止,逐渐褐化。分化后小苗转入生根培养基后,有些品种能很快诱导生根,迅速成苗(图4),而有些品种则生根较困难。

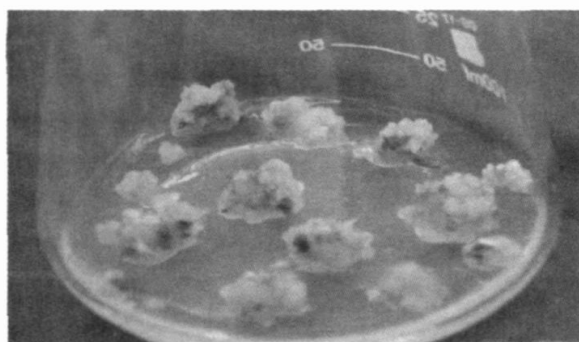


图3 绵阳19的愈伤组织分化(分化培养基A)

Fig. 3 Callus differentiation of Mianyang No. 19 immature inflorescence



图4 绵阳19的愈伤组织再生植株

Fig. 4 Regenerated plants of Mianyang No. 19 immature inflorescence

不同小麦品种幼穗愈伤组织的分化率统计结果见表1。由表1可以看出,不同小麦品种幼穗愈伤组织分化率的高低依次为绵阳19、洛阳8716、小偃107、陕354、小偃22、陕150、郑麦9023、西农88。其中绵阳19的愈伤生长最好,分化率最高,且多为丛生苗;洛阳8716的愈伤分化率也较高;西农88的愈伤虽然开始生长较快,但在转入分化培养基后分化率低,褐变较严重;陕354和小偃22的愈伤组织虽生长较快,分化出芽率较高,但生根困难,不能形成全苗。

2.3 不同分化培养基对小麦幼穗愈伤组织分化的影响

在小麦幼穗愈伤组织分化中,本试验采用文献中使用较多的2种分化培养基,研究不同小麦品种的分化情况。

从表2可以看出,分化培养基的激素配比对分化率有很大影响。绵阳19的幼穗愈伤组织在分化培养基A中的分化最好,而西农88和郑麦9023却在分化培养基A中褐变严重;郑麦9023幼穗愈伤组织的分化率在2种分化培养基中差异最大,而洛阳8716

的差异最小;小偃 22、西农 88、郑麦 9023 和陕 150 的幼穗愈伤组织在分化培养基 B 中的分化比 A 好,而陕 354、绵阳 19 和小偃 107 的幼穗愈伤组织在分化培养基 A 中分化比 B 好。可见,应根据不同的小麦品种选择合适的分化培养基。

表 2 不同分化培养基对小麦幼穗愈伤组织分化的影响

Table 2 Influence of callus differentiation on different medium s

基因型 Genotype	培养基 Medium	愈伤数 Number of callus	分化愈伤数 Number of buds	分化率/% Frequency of plantlet differentiation
洛阳 8716 Luoyang No. 8716	A	62	38	61.3
	B	59	36	61.0
小偃 22 Xiaoyan No. 22	A	92	19	20.7
	B	183	109	59.6
西农 88 Xinong No. 88	A	100	11	11.0
	B	153	30	19.6
郑麦 9023 Zhengmai No. 9023	A	64	5	7.8
	B	61	21	34.4
陕 354 Shaan No. 354	A	64	36	56.3
	B	70	27	38.6
陕 150 Shaan No. 150	A	109	34	31.2
	B	64	32	50.0
绵阳 19 Mianyang No. 19	A	62	54	87.1
	B	56	42	75.0
小偃 107 Xiaoyan No. 107	A	52	29	55.8
	B	50	26	52.0

2.4 对不同分化条件下小麦幼穗愈伤组织生长分化的影响

表 3 结果表明,不同培养温度和光照对小麦愈伤组织分化有很大影响,分化条件 I 比分化条件 II 更适合幼穗的生长分化。在分化条件 I 下,幼穗的愈

伤组织生长状态良好,芽分化率较高,外植体呈绿色,且不易褐变,有利于幼穗分化及其后期的成苗。而在分化条件 II 下,幼穗组织块发白,呈水浸状,幼穗分化出芽率低,且易褐变。因此,较低的温度和较强的光照对小麦幼穗愈伤组织分化更有利。

表 3 不同分化条件对小麦幼穗愈伤组织生长分化的影响

Table 4 Result of callus differentiation at different temperatures

分化条件 Differentiation condition	总数 Total number of callus	褐变数 Total number of death callus	褐变率/% Death rate of callus	分化芽数 Number of buds	芽分化率/% Frequency of plantlet differentiation
I	492	24	4.9	308	62.5
II	562	110	19.6	166	29.5

3 讨 论

小麦遗传转化的受体材料,要通过愈伤组织诱导、分化和再生成苗的过程才能获得转基因植株。因此,选择合适的品种及外植体,优化其组织培养条件,对遗传转化有非常重要的作用。本研究对 8 个品种小麦幼穗愈伤组织的诱导和分化进行了研究,结果表明,小麦基因型对幼穗组织培养有很大的影响。虽然不同基因型愈伤组织诱导率差异不大,但不同基因型分化能力差异显著,说明基因型是影响小麦幼穗组织培养的主要因素。吉前华等^[11]对影响小麦幼穗组织培养特性的基因进行了染色体定位。本研究选用的 8 个栽培品种中,绵阳 19 和洛阳 8716 幼穗愈伤组织分化率较高,可作为遗传转化受体材料。

在小麦幼穗的组织培养中发现,愈伤组织的诱导、分化和植株的再生是相互独立的。诱导率高并不表明其分化率也高,分化率高的品种再生率不一定高,这与 Ozgen 等^[12]在小麦成熟胚培养中的研究结果一致。

不同基因型小麦幼穗愈伤在不同培养条件、不同分化培养基中的分化率各有差异,其中绵阳 19 在分化培养基 A 中的分化率最高;较低的温度(20~22℃)和较强的光照(3 000 lx)有利于幼穗愈伤分化。这可能是由于低温培养可以减慢愈伤生长速度,从而改变了分化前细胞团的状态,使高温下结构疏松、生长快、难以分化的愈伤组织,转变成了结构致密、生长缓慢、易于分化的愈伤组织。

(下转第 87 页)

通过 SDS-PAGE 电泳分析表明, 该外源蛋白是 *bar* 基因的表达产物, 表达量高, 而且主要以包涵体的形式存在。将包涵体溶解后经过试剂盒纯化, 获得了高纯度的目的蛋白。

本研究选用的大肠杆菌原核表达系统在基因表达技术中发展最早、应用最广泛, 与其他系统相比具有遗传背景清楚、繁殖快、表达效率高及抗污染能力强等优点^[5]。本试验选用的 pET28a(+) 原核表达载体含有能被 T7 RNA 聚合酶特异性识别的 T7 强启动子^[6]。将外源基因置于 T7 启动子控制下, 经 IPTG 诱导后能够高效表达外源蛋白。此外, 该表达载体具有 His6 的编码序列, 使目的蛋白 N 端融合有 6 个 His 残基, 便于纯化, 尤其适合抗原蛋白的制作。

大肠杆菌表达系统产生的重组蛋白通常以包涵体与可溶性蛋白两种形式出现。一般 80% 的蛋白质在细菌中都是以包涵体形式表达的。以包涵体形式表达的重组蛋白容易通过简单的洗涤达到很高的纯度, 有利于进一步纯化。重组蛋白是以包涵体形式存在还是以可溶性蛋白形式存在, 主要取决于重组蛋白本身及载体的性质, 与外在的表达条件关系不大^[7]。包涵体形式一般表达量高, 相对成本较低, 往往具有比较完全的抗原性。

本实验表达的蛋白可以替代植物外源蛋白, 用

作转 *bar* 基因产品的食用安全性检测, 以及对生物多样性影响的评价, 也可用于转 *bar* 基因产品 ELISA 检测的抗体制备。

[参考文献]

- [1] Thompson C J, Movva N R, Tizard R. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. EMBO J, 1987, 6: 2519-2523
- [2] Vaisl V, Castillo A M, Fromm M E. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Biotechnology, 1992, 10: 667-674
- [3] Mariani C, De Beukeleer J M, Truettner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene [J]. Nature, 1990, 347: 731-741.
- [4] Toki S, Susumu T, Chyuhei M. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*bar* chimeric gene in transgenic rice plants [J]. Plant Physiol, 1992, 100(3): 1503-1507.
- [5] 李育阳. 基因表达技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-13
- [6] 陈长征, 段治军, 杨新颖, 等. T7 启动子控制下的多功能大肠杆菌表达系统 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28(5): 531-539
- [7] 陈孝平, 王 锋. 抗鞘翅目 Bt 杀虫基因 GFM cry3Bb 的人工合成、原核表达及植物转基因的研究 [D]. 湖北武汉: 华中农业大学, 2004

(上接第 82 页)

[参考文献]

- [1] 贾士荣. 农业高新技术论 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1992: 121-128
- [2] 吉前华, 任正隆. 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种的组培特性和转基因受体选择 [J]. 作物学报, 2004, 30(9): 855-860
- [3] 舒理慧. 小麦不同发育时期的幼穗对离体培养的反应 [J]. 科学通报, 1982(14): 15-19
- [4] 郑企成, 朱门兰, 陈文华. 八倍体小黑麦单倍性胚性细胞无性系的建立 [J]. 植物学报, 1987, 9(4): 367-372
- [5] 陈梁鸿, 王新望, 张晓东, 等. 基因枪转化小麦不同受体的研究 [J]. 华北农学报, 1998, 13(1): 1-5
- [6] 林 刚, 何勇刚, 刘 勇, 等. 激素对小麦愈伤组织诱导和植株再生的影响 [J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(9): 111-113
- [7] 尹 钧, 任江萍, 宋 丽, 等. 小麦不同转基因受体材料的植株再生培养研究 [J]. 麦类作物学报, 2004, 24(2): 1-4
- [8] 肖梅林, 赵世绪. 影响小麦幼穗离体培养的几个重要因素的研究 [J]. 北京农业大学学报, 1989, 15(2): 147-152
- [9] 刘 淖, 张琼玉, 徐龙珠, 等. 不同品种小麦幼穗离体培养的研究 [J]. 河南师范大学学报, 1993(4): 65-68
- [10] 曾寒冰. 小麦幼穗离体培养的研究——不同基因型的反应 [J]. 东北农学院学报, 1989, 20(3): 205-209
- [11] 吉前华, 任正隆. 影响小麦幼穗组织培养特性基因的染色体定位 [J]. 麦类作物学报, 2004, 24(3): 14
- [12] Ozgen M, Turet M, Altinok S, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18(3/4): 331-335