

影响小麦 K199 不同外植体愈伤组织诱导的因素

张弛^{1,2}, 李霞¹, 王玉珍¹

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 河北石家庄 050021; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以小麦科农 199(K199)的完整种子、离体成熟胚和幼叶作为外植体,探讨了取材时间、取材部位、激素浓度和培养方式对小麦离体培养的影响。结果表明,创碎的离体成熟胚和叶片基段为小麦组织培养的良好起始材料,种子萌发 4 h 为最佳取材时间,2 mg/L 2,4-D 更有利于获得 II 型愈伤,光培养比暗培养更适用于叶片愈伤培养。

关键词:小麦;组织培养;成熟胚;幼叶

中图分类号:S512.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)增刊-0104-05

Factors Affect Callus Induction from Various Explants of K199

ZHANG Chi^{1,2}, LI Xia¹, WANG Yu-zhen¹

(1. Research Center of Agricultural Resources, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The explants used in the study are whole seed, detached mature embryo and leaf segment of wheat cultivar K199. The factors affecting the induction and differentiation of calli were studied. The results showed that mature embryo pieces and basal segments of young leaves were the best explant sources for K199. Good callus with high regeneration frequency could be obtained from medium containing Kinetin(KT) 3 mg/L and 2,4-D ichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) 0.01 mg/L.

Key words: Wheat (*Triticum aestivum* L.); Tissue culture; Mature embryo; Young leaf

小麦作为世界上重要的粮食作物之一,对其进行分子改良工作一直倍受关注,但因基因型依赖、再生困难等因素的影响,制约了小麦遗传转化改良作物的发展,因此探索和完善小麦组织培养体系成为小麦分子育种的重要课题。近年来,已有不少学者以小麦的叶^[1]、幼穗^[2]、花药^[3]、幼胚^[4]及成熟胚^[5]为材料,研究了其愈伤组织诱导及分化的情况,发现幼穗、幼胚具有较高的再分化能力^[6,7]。但幼穗、幼胚培养受季节的限制且生理的一致性很难得到保障;而相对于幼穗、幼胚而言,成熟胚(种子、离体成熟胚)和叶片作为外植体,来源丰富且不受季节、植物发育时期等因素限制,具有取材方便、操作简单等优点,是进行小麦基因转化的良好外植体来源^[8,9]。但当前报道的小麦成熟胚和叶片诱导愈伤培养中,其愈伤组织的诱导及分化频率低的问题仍未解决,进一步选择不同取材方法,优化多种培养条件,提高

胚性愈伤组织的形成能力,仍是目前小麦成熟胚和叶片培养面临的主要问题^[10,11]。

科农 199(K199)越冬抗寒性强,抗倒性好,节水耐寒,氮肥利用效率高,中抗秆锈病,中感纹枯病,高感条锈病、叶锈病、白粉病,是经系统选育而成的高产、稳产小麦新品种。本试验以 K199 小麦品种为材料,对不同外植体愈伤培养进行了研究,旨在获取分化率高的胚性愈伤组织,优化再生体系,为进一步的分子改良 K199 的农艺性状研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为小麦品种 K199,由中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源中心提供。

1.2 培养基

培养基种类及成分见表 1,所有培养基均附加

收稿日期:2008-01-22

基金项目:中国科学院知识创新重大项目

作者简介:张弛(1980-),女,河北石家庄人,在读硕士,主要从事植物基因工程研究。

通讯作者:王玉珍(1955-),女,河北保定人,副研究员,主要从事植物基因工程研究。

0.8%琼脂,3%蔗糖,pH调至5.8,121℃高压灭菌18 min。

表1 培养基种类及成分

Tab.1 Sorts and components of medium

种类 Sorts	成分 Component
诱导培养基 Induction medium	MS + 1.0 mg/L 2,4-D MS + 2.0 mg/L 2,4-D MS + 4.0 mg/L 2,4-D MS + 8.0 mg/L 2,4-D
分化培养基 Regeneration medium	MS + 3.0 mg/L KT + 0.01 mg/L 2,4-D MS + 3.0 mg/L KT MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA MS + 2.0 mg/L 6-BA

1.3 试验方法

1.3.1 取材与接种 取收获后保存3个月的小麦种子,75%酒精处理1 min,0.1% HgCl₂处理10 min,无菌水洗5次,浸泡萌发,取不同外植体接种于上述诱导培养基上。

1.3.2 成熟胚诱导愈伤

1.3.2.1 全种子诱导愈伤 取消毒后浸泡萌发4 h的小麦种子,将种子腹沟朝下置于培养基上;或将成熟胚做半剥离,即自胚芽两侧切开,并用刀将胚芽翘起使之不接触胚乳,但胚根和下胚轴仍与种子相连,种子腹沟朝下置于培养基上。

1.3.2.2 离体成熟胚诱导愈伤 取消毒后浸泡萌发2,4,6,8,10,12,14 h的小麦种子,在无菌条件下,将成熟胚剥下,按盾片向下、胚芽不直接接触培养基(正放)和盾片向上、胚芽直接接触培养基(反放)2种方式进行接种;或将消毒后萌发16 h已露白成熟胚的胚根和胚芽切去仅将胚轴接入诱导培养基;或将消毒后浸泡萌发4 h的种子,将胚以刀尖切碎后,置于诱导培养基上。

培养温度25℃,暗培养28 d后,进行出愈率和愈伤品质统计。

1.3.3 叶片诱导愈伤 将按上述方法消毒后的种子接种于MS培养基上,进行光培养,光照强度为2 000 lx,每日照光16 h,3~4 d后,取芽长2 cm左右的叶片,切取叶片做外植体置于愈伤诱导培养基上,进行愈伤诱导。

出愈率 = 产生的愈伤组织块数/接入的外植体数 × 100%;有效出愈率 = 产生的II型愈伤组织块数/接入的外植体数 × 100%;2x出愈率 = 两端都有愈伤产生的外植体数/接入的外植体数 × 100%;芽萌发率 = 有芽萌发出的外植体数/接入的外植体数 × 100%;根萌发率 = 有根萌发出的外植体数/接入的外植体数 × 100%。愈伤品质分为表面水化程度、愈

伤松软程度、愈伤颜色、愈伤透明度、愈伤生长量5个方面,较优则记作1分,较差则记作0分,最高为5分。

1.3.4 愈伤再生 愈伤培养28 d后(每14 d继代1次),转入再生培养基,光培养28 d后统计再生率。

再生率 = 产生芽结构的愈伤块数/接入的总愈伤块数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 取材部位和放置方式对愈伤诱导和品质的影响

从图1可以看出,不同的取材方式在相同2,4-D浓度诱导下的出愈率存在着较大的差异,这可能与小麦内源激素与2,4-D的浓度比相关,完整的胚结构在2,4-D浓度较低(2 mg/L)时,内源激素的作用显著,导致芽和根自然生长,而不是产生愈伤组织,特别是有胚乳供应时(全种子和半剥离)出愈率更低,从后续试验中也可得知出愈率和芽萌发率呈反比趋势;而当胚原有结构被破坏,即进行碎胚时,内源激素浓度减低,对2,4-D诱导更为敏感,出愈率大幅提高。

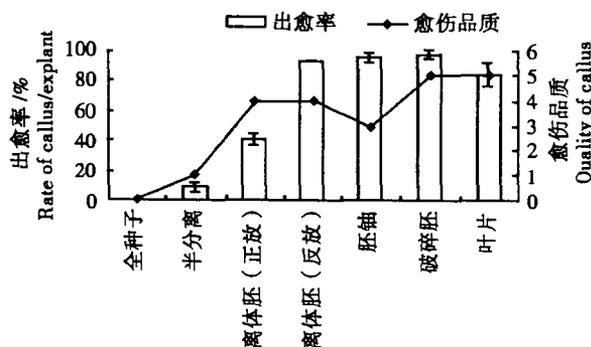


图1 取材部位对愈伤的影响

Fig.1 Effect of different explants

全种子和半分离途径的愈伤(图2-a)品质类似,松软透明,明显水化;离体胚途径愈伤(图2-b)颜色乳白,结构紧实,生长量较为适宜,但表面略显水化;胚轴(图2-c)途径的愈伤与离体胚途径状态类似,但是生长量很低,碎胚途径的愈伤(图2-d)乳白紧实,有颗粒状结构,愈伤品质最优;叶片途径的愈伤(图2-e)颜色浅黄,结构紧实,生长量最优,品质得分与碎胚相同。

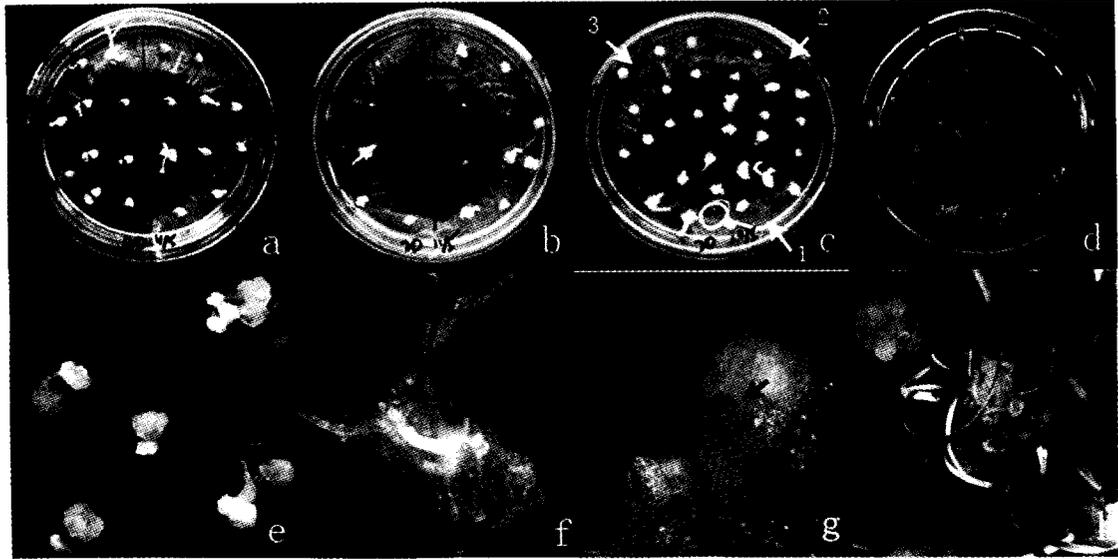
2.2 不同2,4-D浓度对诱导愈伤组织的影响

取离体成熟胚(反放)和萌发3~4 d叶片取基部以上0.5 cm区段置于含1,2,4,8 mg/L 2,4-D的MS培养基,培养30 d后统计出愈率和愈伤品质。

从图3.4可以看出,2,4-D浓度为1或2 mg/L的培养基对成熟胚愈伤诱导最为适宜,虽然出愈率不是最高的,但愈伤状态最好,这与其他文献中的记

载一致^[12];叶片基段在 2,4 mg/L 2,4-D 的培养基上获得的愈伤状态类似,但当 2,4-D 浓度为 4 mg/L,可

获得更多的愈伤组织,这与其他文献记载略有区别^[13,14],可能是因为品种差异造成的影响。



a. 全种子途径诱导产生的愈伤(右)和半分离途径诱导产生的愈伤(左);b. 成熟胚正放(左)和反放(右);c. 反放成熟胚(1)、划伤的成熟胚(2)和胚轴(3);d. 破碎胚途径产生的愈伤;e. 叶片途径产生的愈伤;f. 破碎胚愈伤的再生植株;g. 破碎胚愈伤再生方式为体细胞胚途径(箭头);h. 叶片途径的再生植株。

a. Callus induced from explants of whole seed (right) and half-cleaved (left); b. Callus induced from mature embryo with scutellum downwards (left) and upwards (right); c. Callus induced from mature embryo with scutellum upwards (1), lacerated mature embryo (2) and hypocotyl (3); d. Callus induced from fragments of mature embryo; e. Callus induced from basal leaves; f. Regeneration of callus induced from fragments of mature embryo; g. Regeneration of callus via somatic embryogenesis (arrow); h. Regeneration of callus induced from basal leaves.

图 2 小麦 K199 愈伤诱导及再生

Tab.2 Callus induction and regeneration of wheat K199

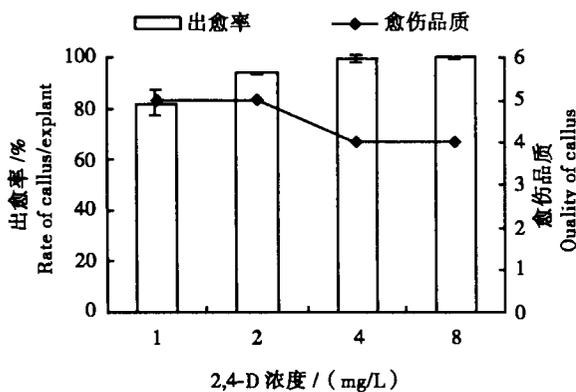


图 3 2,4-D 浓度对成熟胚愈伤的影响

Fig.3 Effect of 2,4-D on callus induction of mature embryo

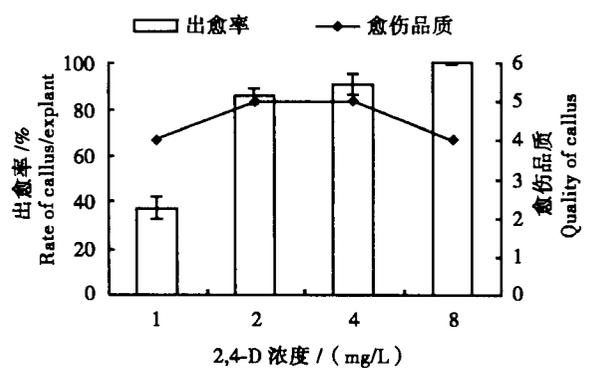


图 4 2,4-D 浓度对叶片愈伤的影响

Fig.4 Effect of 2,4-D on callus induction of leaves

2.3 种子萌发时间对离体成熟胚愈伤诱导和品质的影响

在试验中,我们发现小麦萌发时间有以下规律,自 4 h 开始胚发生软化萌动,8 h 开始露白,16 h 全部露白。根据表 2 可以看出,随着萌发时间的增加,出愈率先是增长,而后降低,芽萌发率和根萌发率也呈现相同的趋势。芽萌发率在 10 h 时达到最高,可能是因为露白种子增多,在摇动萌发的过程中因为

碰撞损伤反而导致芽萌发率降低,同样根萌发率则在 8 h 达到最高。出愈率受到胚萌动程度的影响,2 h 时种子萌动程度较低,因此愈伤诱导率也较低,而 6 h 后,由于芽萌发率和根萌发率的提高,反而制约了愈伤的诱导,可能内源激素自 6 h 开始逐步增强,对 2,4-D 的起到拮抗作用。

2.4 不同取材位置和取材长度对叶片愈伤的影响

将长度为 2 cm 带有胚芽鞘的芽自根以上全部

切取(包括胚轴),均等分为3分,基段标记为1,中段标记为2,顶段标记为3;或取0.25,0.5,1 cm的叶片基段,分别记作a,b,c。将外植体置于MS+4

mg/L 2,4-D 诱导培养基上,光培养30 d后统计出愈率和2x出愈率。

表2 萌发时间的影响

Tab.2 Effects of time for germination

萌发时间/h	接种外植体数/块	愈伤数/块	出愈率/%	芽萌发数/个	芽萌发率/%	根萌发数/个	根萌发率/%
2	300	268	89.33	41	13.67	31	10.33
4	300	281	93.67	48	16.00	64	21.33
6	300	259	86.33	96	32.00	84	28.00
8	300	244	81.33	110	36.67	117	39.00
10	300	242	80.67	118	39.33	82	27.33
12	300	236	78.67	107	35.67	73	24.33
14	300	233	77.67	102	34.00	72	24.00

根据表3可以看出叶片只有基段能产生愈伤组织,且区段长达1 cm时,只有靠基部的一端能产生愈伤,区段长0.5 cm时,会有部分外植体两端均产生愈伤,这些现象与小麦的结构有很大关系,在解剖过程中,我们发现小麦的分生组织在营养生长过程中始终处于根叶连接处,因此越靠近基部的叶片细胞越接近分生细胞,越容易诱导产生愈伤。

表3 不同取材部位和长度对叶片愈伤的影响

Tab.3 Effects of sorts and length of explants on callus induction from leaf

	1	2	3	a	b	c
出愈率/%	89.27	0.00	0.00	81.33	90.67	84.00
2x出愈率/%	35.00	0.00	0.00	10.00	35.00	2.00

2.5 不同光照条件对叶片愈伤的影响

按上述方法得到的0.5 cm幼叶基段接入MS+4 mg/L 2,4-D的诱导培养基中,光培养,或光暗交替培养(暗培养15 d后转至上述光条件下培养15 d),或暗培养30 d。进行有效出愈率和愈伤品质统计。

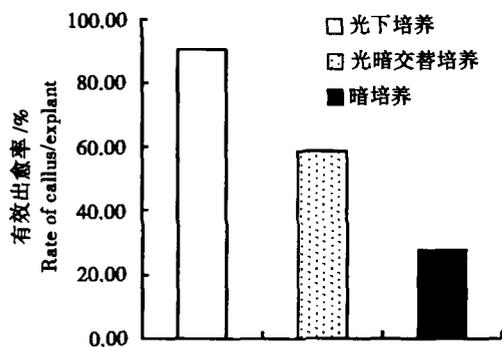


图5 不同光照条件对叶片愈伤的影响

Fig.5 Effects of light condition on caucus induction from leaf

光培养得到的愈伤颜色浅黄,质地紧实,多为II型愈伤;暗培养获得的愈伤则颜色灰白,质地松软,多为I型愈伤;光暗交替培养的愈伤品质介于上述两种方式之间。因此尽管出愈率差异不明显,但光

照条件下培养的外植体有效愈伤率最高(图5)。

2.6 成熟种子不同取材部位对分化的影响

离体成熟胚途径愈伤在再生过程中毛状根生长旺盛,大面积出现绿点,但无法形成真正的芽结构,在本试验中仅获得2株再生植株;碎胚途径的愈伤稍为松软,颜色略浅,在再生培养基上均有再生植株产生,最高可达10%(图2-f,g);叶片途径的愈伤在再生过程中,表现并不比碎胚途径的愈伤更好,再生率很低,共获得5棵再生植株(图2-h)。

KT和6-BA对小麦愈伤分化的影响差异不明显,但在KT培养基中加入少量2,4-D,更有利于芽分化,NAA会导致毛状根的大量生成,一旦愈伤生成大量毛状根便不会再分化出芽结构。

3 讨论

迄今为止,基因型的局限性是限制小麦遗传转化和应用的关键因素之一。筛选培养力高而且农艺性状好的基因型作为受体,对于促进转基因小麦的研究和发展具有重要意义。因此使用推广品种作为材料,以成熟种子为基础进行不同取材方式和不同培养条件的探索,对不同培养途径得到的愈伤进行统计和评估,选择、建立和完善更为有效的愈伤诱导和分生体系对于提高小麦生物技术育种效率具有重要意义。

3.1 最优的培养途径

取消毒后萌发4 h的种子,以刀尖将胚刨碎,接种于2 mg/L 2,4-D的MS培养基上,培养30 d后,转入MS+3.0 mg/L KT+0.01 mg/L 2,4-D的分生培养基上进行再生,分化率最高可达10%,碎胚法得到的愈伤颜色乳白,质地紧实,再生率高,这可能是因为碎胚法完全破坏了胚的原有结构,从而大大降低了自身激素的影响,有利于产生II型愈伤。

3.2 2,4-D 在分生培养基中的应用

在分生培养基中加入低浓度的 2,4-D,比单纯使用 KT 更有利于愈伤分化,这与彭朝华等^[15]的研究结果相异,推测可能是品种差异引起的区别,因为在谷立坤等^[16]的试验中可以看出不同的基因型对分生培养基中加入 2,4-D 呈现不同反应。对于 K199 这个品种,加入适量 2,4-D 有利于抑制毛状根的生长,提高分化率,可能是因为 2,4-D 有利于保持细胞胚性,从而更容易进入正常的芽分化。

本试验对 K199 愈伤组织的诱导和分生培养基仅仅进行了初步的探索,为建立 K199 高效组织培养系统提供了重要依据。但要建立分化率更高的小麦组培途径并能用于下一步的遗传转化提供材料,应该进一步弄清小麦分化过程中各种因素的影响,对此我们正进行进一步的试验。

参考文献:

- [1] Maddock S E. Cereal Tissue and Cell Culture[M]. 1985: 131 - 134.
- [2] 覃建兵,何光源.不同小麦基因型及其不同处植体离体培养研究初探[J].华中农业大学学报,2001,20(6):522 - 527.
- [3] 胡含,王恒立.植物细胞工程与育种[M].北京:北京工业大学出版社,1990:23 - 32.
- [4] He D G. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Plant Science, 1986(45):119 - 124.
- [5] John P. Factors affecting the establishment and maintenance of embryogenic callus and suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Plant Cell Report, 1995(15): 232 - 237.
- [6] Maheshwarin, Rajyalakshmik, Chwdhary C N. In vitro culture of wheat and genetic transformation retrospect and prospect[J]. Critical Review on Plant Science, 1995, 14: 149 - 178.
- [7] 余泽高,卫良翠.不同小麦品种或熟胚离体培养的研究[J].湖北农业科学,2004(6):10 - 12.
- [8] Ozgen M, Turet M, Ozean S, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 331 - 335.
- [9] Archana Chugh, Paramjit Khurana. Regeneration via somatic embryogenesis from leaf basal segments and genetic transformation of bread and emmer wheat by particle bombardment[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 74: 151 - 161.
- [10] 杨淑慎,郭振,徐虹,等.小麦胚愈伤组织的诱导和植株再生[J].西北农业学报,2002,11(4):46 - 48.
- [11] 于晓红,朱祯,付志明.提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J].植物生理学报,1999,25(4):388 - 394.
- [12] 曹新有,李春莲,余玲,任慧莉,陈耀锋.小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化研究[J].西北植物学报,2006,26(11):2276 - 2280.
- [13] 宣云,黄群策,秦广雍,等.小麦叶片愈伤组织的形成及植株再生因素研究[J].河南农业,2004(7):9 - 12.
- [14] 王万军,王文芳,曹建军,等.小麦叶片愈伤组织及其再生植株的诱导[J].西北植物学报,1998,18(3):401 - 405.
- [15] 彭朝华,毛炎麟.小麦成熟胚愈伤组织的诱导和植株再生[J].北京农业大学学报,1989,15(4):397 - 402.
- [16] 谷立坤,张建云,张世敏,等.不同质量浓度 2,4-D 对硬粒小麦成熟胚愈伤组织诱导及植株再生的影响[J].河南农业大学学报,2004,38(4):452 - 455.