

小麦叶基切段愈伤组织的诱导和植株再生

郝建国, 贾敬芬

(西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:从3~5 d龄小麦籽苗幼叶基部切段诱导出大量愈伤组织。诱导可再生的愈伤组织的培养基为MS+1.5 mg/L 2, 4-D+0.2 mg/L, 激动素(KT)+500 mg/L, 水解酪蛋白(CH)+120 mg/L, 天冬酰胺+100 mg/L, 肌醇+3%蔗糖+0.7%琼脂粉。当愈伤组织转移到生长调节物质改变为2 mg/L KT, 1 mg/L NAA和0.1 mg/L 2, 4-D的MS培养基上培养后, 出现了苗的分化。当分化苗在无机盐分减半的MS培养基上培养后, 产生了根。愈伤组织的形成和植株再生的频率与外植体的位置和籽苗的发育阶段密切相关, 3~4 d龄苗叶基1 cm处的切段效果最好。叶基愈伤组织的分化能力可保持3~4个月。

关键词:小麦; 叶片; 组织培养; 植株再生

中图分类号:Q23 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2003)04-0489-03

禾谷类作物的遗传改良是农作物育种的主要目标之一。植物组织培养和生物技术的发展已经有可能对离体操作难度较大的小麦进行遗传修饰, 如抗性变异体的离体筛选^[1,2]、体细胞杂交^[3,4]和转基因植物的产生^[5,6]等。这些操作多利用未成熟胚或培养的胚性细胞作为起始材料或靶材料。然而, 建立可再生的小麦胚性细胞系是很不容易的, 它常受基因型的限制。取未成熟胚作材料也不很方便, 因为取材受生长季节限制, 或要求有特定设备的生长环境条件。因此, 建立一种简便易行的随时可取的小麦材料体系, 对于作外源基因的导入或其他遗传操作是十分必要的。小麦的愈伤组织尽管也可从成熟种胚诱导产生, 但其再生能力较差, 很少被用。

从叶片组织产生可再生的愈伤组织已在好几种麦类作物中获得成功, 如燕麦^[7,8]、黑麦^[9,10]、大麦^[11]等。小麦叶片作外植体, 若能诱导获得有分化能力的愈伤组织, 将为离体遗传操作提供方便而简单的材料来源。本研究以小麦幼苗叶基切段作起始材料, 进行了不同苗龄对叶基切段愈伤组织形成和再生苗分化条件的研究, 成功地建立了愈伤组织形成和植株再生的实验体系。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试小麦(*Triticum aestivum* L)品种为阎麦8911。种子用70%酒精灭菌2 min。灭菌水洗2次, 再用0.1%HgCl₂水溶液灭菌12 min, 灭菌蒸馏水换洗5次。灭菌后的种子接种在不加任何生长调节物的MS培养基上, 在25℃条件下萌发。每日光照12 h, 光照度1 200 lx。

1.2 愈伤组织的诱导和继代培养

将生长3~8 d籽苗(长度5~8 cm)的叶片取出, 从叶基部向上依次横切成2 mm左右的小段, 按顺序接种在表1所示MS₁培养基上, 在25℃±2℃下进行暗培养。将诱导出的小愈伤组织在MS₂培养基上进行增殖和继代培养, 每3周转代一次。

1.3 苗的分化和移栽

将继代培养二次的愈伤组织转移到表1所示MS₃培养基上, 在白天25℃±2℃, 1 200 lx光照12 h, 夜间15℃±2℃条件下诱导苗的分化。待苗长到5 cm以上时, 转移到无机盐成分减半并且不加其他附加成分的MS培养基上诱导根的形成。

收稿日期: 2002-07-16

基金项目: 陕西省自然科学研究计划资助项目(2000SM15)

作者简介: 郝建国(1953-), 男, 河北邯郸人, 西北大学讲师, 从事植物细胞工程研究。

表 1 用于小麦叶基愈伤组织诱导和分化的培养基及其附加成分

Tab. 1 Media and complements used for callus induction and plant regeneration of leaf base of wheat^{*}

培养基代号	附加成分/mg·L ⁻¹					
	水解酪蛋白	肌醇	天冬酰胺	2,4-D	KT	NAA
MS ₁	500			3.0		
MS ₂		200	120	1.5	0.2	
MS ₃	500	100	120	0.1	2.0	1.0

* 基本培养基均为 MS 培养基附加 3% 蔗糖和 0.65% 琼脂粉

待发达的根系形成之后,去掉培养瓶的盖,炼苗 3 d 取出,洗去附着在根上的培养基,移栽到花盆土中,在温室条件下生长。

2 结 果

2.1 愈伤组织的诱导及其影响因素

苗龄 3~4 d 的第一片叶 1 cm 处来的切段在 MS₁ 培养基上培养 3 天后,即可看到外植体明显伸

长。1 周左右即在切口两端形成 2~3 mm 大小的小愈伤组织(图版 I, 1~2)。形成愈伤组织的能力主要取决于叶外植体的来源部位。愈伤组织几乎只出现在叶基部分大约 1 cm 处的切段上,同时还与籽苗的苗龄密切相关。曾比较了不同苗龄第一片叶基 1 cm 处切段诱导愈伤组织的能力。结果如表 2 所示,苗龄 3 天的叶基愈伤组织诱导率为 72%,明显高于苗龄 5 d(50%)和 10 d(25.3%)的外植体。

表 2 不同苗龄对叶基切段愈伤组织形成和苗分化频率的影响

Tab. 2 The effects of different age of seedling on callus formation and shoot differentiation efficiencies

苗龄/d	接种的外植体数/个	愈伤组织的外植体数/个	愈伤组织诱导率/%	用于分化的愈伤组织数/个	有芽分化的愈伤组织数/个	芽分化率/%
3	125	90	72	80	16	20
5	90	45	50	45	5	
10	63	16	25.4	40	0	0

在 MS₁ 培养基上形成的愈伤组织生长迅速,透明而松软。后来的分化实验表明,这类愈伤组织很少出现芽的分化。如果将 MS₁ 上诱导的愈伤组织转到 MS₂ 培养基上并在 800 lx 弱光下继代培养之后,表面出现一些紧密型淡黄色细颗粒状结构(图版 I, 3)。将其用于芽分化的起始材料比较合适。

2.2 植株再生

上述紧密型愈伤组织转入 MS₃ 培养基上生长 2 周之后,出现了分化芽(图版 I, 4)。经 2~3 周培养即可形成绿苗。如表 2 所示,不同苗龄的叶基部外植体不仅形成愈伤组织的频率不同,而且愈伤组织的分化能力也有很大差异。来自 10 d 龄的切段愈伤组织未见芽的分化。只有 3 d 龄的叶基切段愈伤组织有大约 20% 的芽分化率,明显高于 5 d 龄的材料。这种愈伤组织上有的可分化出 2~3 株丛生苗。

当苗长到 5 cm 高度以上时,将其转入大量元素减半的无生长调节物的 MS 培养基上培养 10 d 左右,可出现根的分化。当植株形成发达的根系(图版 I, 5)后,打开瓶盖,炼苗 3 d,移入土中能正常生长,成活率在 80% 以上。

3 讨 论

本研究从小麦 3 d 龄幼苗第一叶叶基切段诱导大量愈伤组织,将生长调节物质调整后,所扩增的愈伤组织出现了苗的分化和植株再生。高频率诱导愈伤组织的关键因素是外植体的取材部位和苗的生长年龄。麦类作物叶片细胞在离体培养条件下再生能力是很有限的,被认为是全能性很低的细胞。然而,一些报道发现,幼叶基部细胞具有相对较强的脱分化形成愈伤组织的能力^[7~11]。研究结果表明,小麦 3 天龄苗第一叶叶基 1 cm 处的切段在高浓度 2,4-D(3 mg/L)诱导下,具有较高的愈伤组织形成率(72%)。然而,在高浓度 2,4-D 诱导下形成的愈伤组织虽然生长很快,但很少分化出芽。只有 2,4-D 降低到 1.5 mg/L,并且与 0.2 mg/L KT 配合使用后,在附加 200 mg/L 肌醇,120 mg/L 天冬酰胺的 MS 培养基上继代培养时才诱导出一些半透明、淡黄色、结构较紧密的愈伤组织。这类愈伤组织细胞才是再生能力较强的易表达全能性的细胞。

鉴于小麦幼苗极易用成熟种子发芽获得,又不受生长季节的限制。因此,用3~4 d龄幼苗叶基作外植体诱导具有再生能力的愈伤组织,进而进行外源基因导入或其他离体遗传操作,显然是一种取材方便而且容易操作的材料体系。未成熟胚或培养的胚性细胞作转基因虽被广泛应用为靶组织,但在不易获得未成熟胚的季节或实验条件下,用幼苗叶起始愈伤组织,不失为一种可选用的受体材料。

参考文献:

- [1] JIA Jing-fen, ZHAO Xiang-shan. In vitro selection of wheat cell line tolerant to NaCl and study on their biochemical characteristics. Proc 8th Internl. Wheat Genet. Sump[M]. 北京:中国农业科技出版社,1993. 16-17.
- [2] 贾敬芬,郝建国,赵宇玮,等.小麦耐盐变异系的离体筛选及其生理生化特性[J].西北大学学报(自然科学版),2000,30(4):103-106.
- [3] 夏光敏,王槐,陈惠民.小麦与新麦草及高冰草属间不对称体细胞杂交的植株再生[J].科学通报,1996,41(15):1423-1426.
- [4] 夏光敏,向风宁,周爱芬,等.小麦与高冰草属间体细胞杂交获可育杂种植株[J].植物学报,1999,41(4):349-352.
- [5] VASIL V, CASTILLO A M, FROMM M E, *et al.* Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Bio/Technology, 1992, 10: 667-674.
- [6] 肖兴国,张爱民,聂秀玲.转基因小麦的研究进展与展望[J].农业生物技术学报,2000,8(2):111-116.
- [7] CHEN H, XU G, LOSCHKE D C, *et al.* Efficient callus formation and plant regeneration from leaves of oats (*Avena sativa* L)[J]. Plant Cell Reports, 1995, 14:393-397.
- [8] GLESS C, LORZ H, JAHNE G. Establishment of a highly efficient regeneration system from leaf base segments of oat (*Avena sativa* L)[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17:441-445.
- [9] LINACERO R, VAZQUEZ A M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of rye (*Secale cereale* L)[J]. Plant Sci, 1986, 44:219-222.
- [10] ZHANG Niao-sheng, JIA Jing-fen. somatic embryogenesis and plant regeneration in vitro from leaf blade of Rye (*Secale cereal* L)[J]. Chinese J Bot, 1993, 5(1):47-51.
- [11] BECHER T, HABERLAND G, KOOP H U. Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum Vulgare* L)[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11:39-43.

(编辑 徐象平)

Callus induction and plant regeneration from leaf base segments of wheat (*Triticum aestivum* L.)

HAO Jian-guo, JIA Jing-fen

(Life Science School, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: An efficient protocol for in vitro plant regeneration from leaf base segments of young seedlings of wheat was developed. Regenerable calli were induced on the MS medium supplemented with 1.5 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L Kinetin, (KT), 500 mg/L casein hydrolysate, (CH), 120 mg/L asparaginate and 100 mg/L inositol. When the calli were transferred to the medium containing 2 mg/L KT, 1.0 mg/L NAA and 0.1 mg/L 2,4-D, the shoots differentiated. After being cultured on half-strength MS medium, the roots were produced. Callus induction and shoot regeneration efficiencies were correlated with the position of explants and developmental stage of seedlings. The best responses were obtained from the segments of 1cm leaf base of 3~4d old seedlings. The regeneration ability of leaf base-derived calli could maintain 3~4 months.

Key words: wheat; leaves; tissue culture; plant regeneration

图版说明

1 小麦叶基切段小愈伤组织起始(7 d) 2 叶基切段小愈伤组织(10 d) 3 可再生的愈伤组织 4 愈伤组织分化芽 5 再生苗