

小麦茎尖丛生芽诱导及植株再生*

张杰¹ 李和平^{1,2} 廖玉才^{1,3} 瞿波^{1,3**}

1. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070;
3. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为了筛选不受季节限制的小麦遗传转化受体, 研究了3个小麦栽培品种在3种萌发培养基、4种诱导培养基、3种不同诱导时间和3种生根培养基下从茎尖直接诱导丛生芽的最佳条件和方法。结果表明, MB5基本培养基不添加任何激素最适于小麦成熟胚萌发; 而在MB5培养基中添加1.0 mg/L TDZ和0.5 mg/L IBA, 小麦茎尖丛生芽诱导率最高; 单个茎尖形成丛生芽的数目, 随诱导时间延长而增加, 诱导时间以不超过30 d为宜; 品种间的丛生芽诱导率及丛生芽形成数目没有差异; 最佳生根培养基为1/2 MS基本培养基添加1.0 mg/L IBA。由丛生芽诱导再生发育形成的植株开花结实正常。这些研究结果为建立基于小麦丛生芽的再生及遗传转化体系提供了方法。

关键词 诱导; 丛生芽; 成熟胚; 顶端分生组织; 小麦

中图分类号 S 512.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0403-05

建立快速、简便的植物培养再生体系, 是高效遗传转化技术的基础。尽管小麦遗传转化技术已经用于新品种培育, 但目前仍主要以 Vasil 等^[1]报道的小麦幼胚诱导的愈伤为转化受体, 而幼胚取材是在植株开花以后进行, 其周期长、季节性强、成本高, 因此开发不受季节影响的材料为转化受体, 对于促进小麦遗传工程的发展与应用具有重要意义。植物种子萌发形成的茎尖, 不仅培养简便、取材方便, 还可利用茎尖诱导丛生芽, 可提供更多的遗传转化受体。从茎尖诱导丛生芽已在大麦^[2-4]、小麦和燕麦^[5-6]、玉米^[7-8]、高粱^[9-10]、珍珠黍^[11]、早熟禾^[12]、鸭茅^[13]、黑麦草^[14]、水稻^[15]等作物中应用, 其中大多数是利用茎尖先诱导愈伤组织再分化形成丛生芽的途径, 而很少有以茎尖直接诱导丛生芽的报道。本研究以长江流域推广的小麦栽培品种为材料, 摸索了小麦茎尖直接诱导丛生芽以及发育形成植株的最佳条件和方法, 以期利用小麦茎尖作遗传转化受体提供资料。

1 材料与方法

1.1 小麦品种

供试小麦品种为华麦13、扬麦158和C101, 由

笔者所在的实验室提供。

1.2 培养基

基本培养基为MB5(MS大量元素, MS微量元素, B5有机成分, B5铁盐), 添加30 g/L蔗糖, 0.7%琼脂粉, 调pH至5.8, 湿热灭菌。根据文献^[4-5]设置了激素不同的3种成熟胚萌发培养基(A1、A2、A3), 以MB5为基本培养基, 其中A1不含任何激素, A2含2.0 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA, A3含1.0 mg/L TDZ和1.0 mg/L 6-BA; 4种丛生芽诱导培养基(B1、B2、B3、B4)也以MB5为基本培养基, 其中B1含1.0 mg/L TDZ和1.0 mg/L 6-BA, B2含1.0 mg/L TDZ和0.5 mg/L IBA, B3含2.0 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA, B4含1.0 mg/L TDZ; 3种丛生芽生根培养基(C1、C2、C3)以1/2 MS为基本培养基, 其中C1添加1.0 mg/L NAA, C2含0.5 mg/L NAA和0.5 mg/L IBA, C3含1.0 mg/L IBA。

1.3 种子萌发及幼苗生长

小麦种子经70%乙醇表面消毒、无菌水冲洗后, 转入0.1%升汞处理15 min, 无菌水冲洗后浸泡16 h, 无菌下剥取成熟胚, 置于成熟胚萌发培养基上, 25℃黑暗培养。每个处理取60个胚, 重复

收稿日期: 2009-12-05; 修回日期: 2010-04-19

* 国家新品种培育专项(2008ZX08002-001)、国家“863”高技术研究发展专项(2007AA100505)和教育部博士点基金(20070504010)资助

** 通讯作者。E-mail: qubo@mail.hzau.edu.cn

张杰, 女, 1983年生, 硕士。研究方向: 小麦细胞工程。E-mail: zhangjie07@webmail.hzau.edu.cn

3 次。

1.4 丛生芽诱导

取生长 5 d 的幼苗,由基部向上切取长约 5 mm 的切段,置于丛生芽诱导培养基上,25 ℃光照培养,每 2 周继代 1 次。

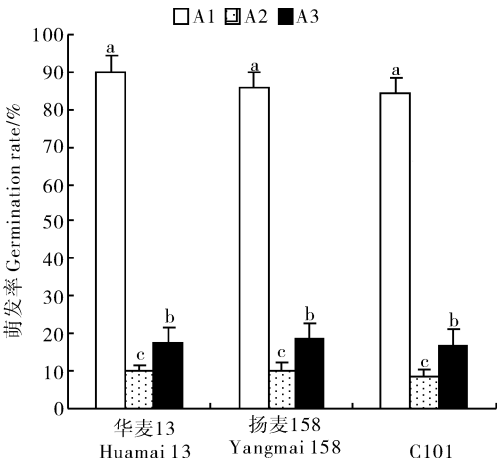
1.5 丛生芽生根

将诱导的丛生芽转入生根培养基中,25 ℃光照培养,取根系生长良好的幼苗于 4 ℃春化 2 周,再移栽到土钵中。

2 结果与分析

2.1 萌发培养基对小麦成熟胚萌发的影响

萌发培养基是影响成熟胚萌发形成丛生芽的基础。研究表明,添加适当浓度的 2,4-D、TDZ 或 6-BA,有助于大麦等禾本科作物成熟胚的萌发及后续丛生芽的形成^[4-5],据此,本研究设置了激素不同的 3 种萌发培养基,分析比较了 3 个小麦品种的成熟胚在这些培养基上培养 5 d 后的萌发率(图 1)。3 个品种均在 A1 培养基上的萌发率最高,其平均萌发率为 84.7%,极显著高于在 A2(9.5%)或 A3(17.2%)培养基上的萌发率。因此,小麦栽培品种成熟胚萌发,以不含任何激素的 MB5 基本培养基最佳,说明小麦成熟胚的内源激素含量能够满足种子萌发的需要。如果添加额外激素,影响了种胚萌发中其他物质的活性,从而抑制成熟胚萌发。



图中相同字母表示无显著性差异,下同 Bars with the same letters indicated no significant difference,the same as follows.

图 1 萌发培养基组成对小麦成熟胚萌发的影响
Fig.1 Effect of medium on germination of mature embryos from wheat cultivars

2.2 诱导培养基对丛生芽数目的影响

建立小麦成熟胚高效诱导丛生芽的培养条件是丛生芽诱导的关键之一。将 A1 萌发培养基上生长的材料置于 4 种不同诱导培养基上,比较它们的丛生芽数目。结果表明,不同诱导培养基之间的差异十分显著(图 2),其中 B2 培养基诱导形成的丛生芽数目最多,平均每个胚可形成 8.63 个丛生芽;B1 和 B3 培养基次之,可分别诱导 5.93 个和 7.04 个;而在 B4 培养基上则不形成丛生芽,平均 1 个胚仅产生 1 个芽;不同品种对 4 种培养条件的反应趋势基本相同,品种间的丛生芽数目差异不显著。因此,MB5 基本培养基添加 1.0 mg/L TDZ 和 0.5 mg/L IBA,是诱导小麦丛生芽的最佳条件。

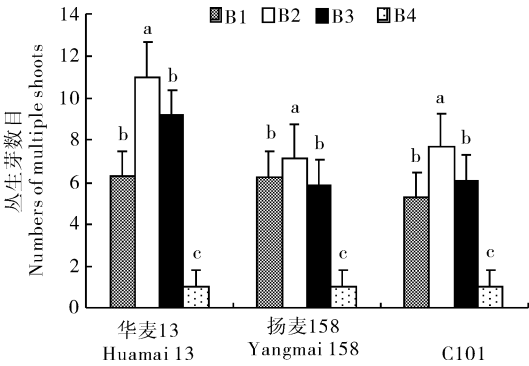


图 2 诱导培养基对小麦丛生芽形成的影响
Fig.2 Effect of induction medium on generation of multiple shoots of wheat cultivars

2.3 诱导时间对形成丛生芽数目的影响

选择适当的诱导时间是保证形成量多、质优丛生芽并发育形成植株的重要条件。选用在 A1 萌发培养基上生长的材料,在 B2 诱导培养基上培养 10、20、30 d 后,比较它们的丛生芽数目。结果表明,3 个品种的丛生芽数目均与诱导时间成正比,即诱导时间愈长,形成的丛生芽数目愈多(图 3)。诱导培养 10 d 的平均丛生芽数目仅 3.5 个,诱导 20 d 的为 6.5 个,诱导 30 d 的达到 11 个,不同时间之间的差异达到极显著水平。这个结果说明,延长诱导时间可以增加丛生芽的数目。但是,诱导时间不宜太长,否则丛生芽易形成小老苗,不利于植株后续生长发育。本研究中诱导 30 d 的丛生芽,仍处于较好的生长状态,所以一般丛生芽的诱导时间以不超过 30 d 为宜。

2.4 生根培养基对丛生芽发育成苗的影响

良好的根系发育,是丛生芽发育成苗乃至正常开花结实的基础。上述研究表明,品种间的丛生芽

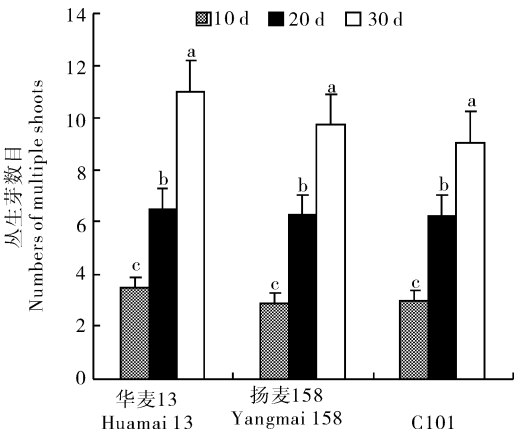


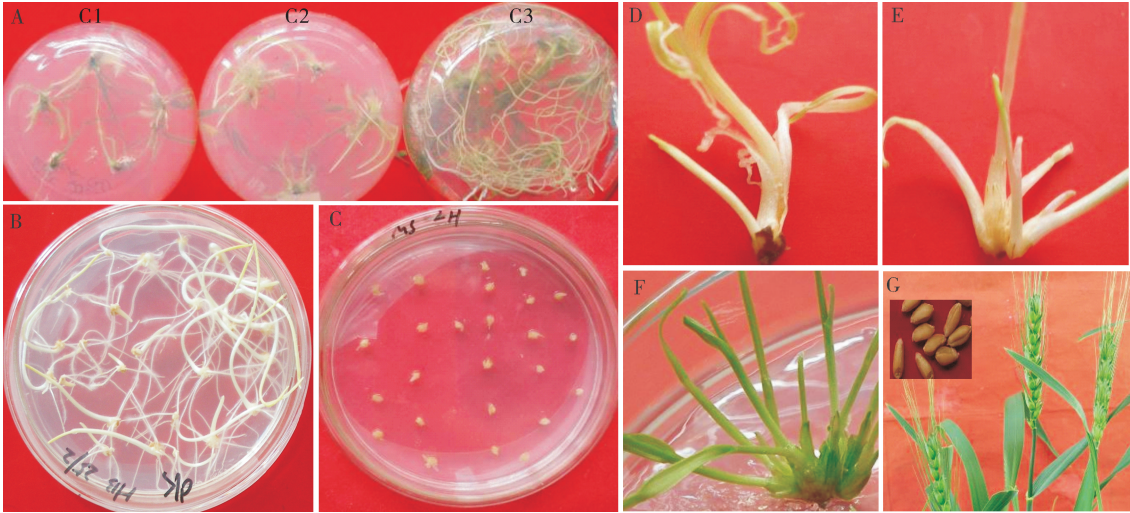
图 3 诱导时间对丛生芽形成数目的影响
Fig. 3 Effect of induction time on numbers of multiple shoots of wheat cultivars

诱导没有显著差异,因而在筛选最佳生根培养基时,仅选用小麦品种华麦 13 号置于 B2 培养基上诱导 15 d 后,选择生长状态一致的丛生芽,分别转至 3 种生根培养基上,观察比较其根系发育。结果表明:在不同生根培养基上培养 28 d 后,幼苗根系表现出明显差异(图4-A,C1,C2和C3),在C3培养

基上的幼苗根系长、数目多、生长旺盛,因而幼苗叶色深绿、叶片宽大、植株健壮;在 C2 培养基上的幼苗根系短、数目较少,幼苗也比较瘦弱、叶片较窄、卷曲;而在 C1 培养基上生长的幼苗根系很少,叶色浅绿,叶片严重卷曲,表现为严重发育不良。因此,含有 1/2 MS 及 1.0 mg/L IBA 的 C3 培养基,适宜小麦丛生芽生根发育,被选为后续研究的生根培养基。

2.5 经丛生芽发育形成正常开花结实的植株

将上述不同阶段筛选的最佳条件综合应用于湖北省目前推广小麦品种华麦 13^[16]的丛生芽诱导及再生植株和开花结实的整个过程。从小麦种子中取出成熟胚,在 A1 萌发培养基上培养 5 d(图 4-B),切取茎尖置于 B2 培养基上(图 4-C),7 d 后形成侧芽(图 4-D),继续培养 20 d 形成丛生芽(图 4-E),经在 C3 生根培养基上培养 20 d 后(图 4-F),移栽至土壤中,再生的植株发育正常,可正常开花灌浆结实,种子饱满(图 4-G)。这些结果表明,通过本研究建立的这些条件,可从成熟胚萌发的茎尖直接诱导丛生芽,并再生形成正常可育的小麦植株。



A: 3 种生根培养基上的幼苗根系生长状态 Seedlings roots on three different rooting media; B: 成熟胚萌发 5 d Germination of mature embryos for 5 days; C: 切取的茎尖 Cut segments; D: 形成侧芽 Induction of single shoot; E: 形成丛生芽 Induction of multiple shoots; F: 在生根培养基上培养 14 d Multiple shoots on rooting medium for 14 days; G: 发育形成的植株及种子 Plants and seeds from multiple shoots.

图 4 不同生根培养基的比较及由丛生芽发育形成的小麦植株

Fig. 4 Comparison of different rooting media and development of wheat plants derived from multiple shoots

3 讨 论

在植物丛生芽诱导培养中,最佳激素种类、浓度及其组合,是丛生芽高效诱导及再生的关键因素。

TDZ 是一种植物生长调节剂,它对植株芽的增殖和再生、体细胞胚胎发生等具有重要作用,还具有调节其他植物激素和生理活性物质的作用,从而影响植物生长发育过程^[17]。研究表明,低浓度的 TDZ 可

通过去除顶端优势诱导器官发生,从而促进不定芽或侧芽的形成^[18],TDZ 直接浸泡植株可大大促进形成不定芽^[19],Sharma 等^[6]将大麦成熟胚置于含 TDZ 的培养基上,促进形成了大量丛生芽,因而认为在成熟胚萌发时添加 TDZ 或 2,4-D 等激素有利于丛生芽的形成。然而,本研究的小麦成熟胚在含 TDZ 或 2,4-D 的培养基上,萌发率反而显著降低了,说明激素如 TDZ 对小麦成熟胚萌发具有抑制作用。

但是,在小麦成熟胚萌发后,取其茎尖切断置于丛生芽诱导培养基上,TDZ 的存在则可促进小麦丛生芽诱导形成。比较 4 种激素组合的丛生芽诱导培养基结果,可以看出(图 2),在 MB5 基本培养基中添加 1.0 mg/L TDZ 和 0.5 mg/L IBA 的 B2 培养基中,诱导的丛生芽数目最多,而且不同小麦基因型在该培养基上形成的丛生芽数目也没有差异。IBA 通常用于生根培养中,但在本研究的预备试验中发现,在丛生芽诱导时添加 0.5 mg/L IBA,既可增加丛生芽数目,也可促进后续培养中的丛生芽生根,而生根又是影响丛生芽再生成苗的关键之一。因此,将 IBA 与 TDZ 组合在一起的 B2 培养基,是小麦品种丛生芽诱导的最佳培养基。

本研究表明,TDZ 或 2,4-D 或 6-BA 抑制小麦成熟胚萌发,表明小麦成熟胚的内源激素可能与大麦不同,在种胚萌动过程中,这些激素可能影响小麦其他内源激素活性,进而使幼苗基部膨大并愈伤化,从而干扰萌发过程。而在随后的茎尖诱导丛生芽的培养中,由成熟胚萌发形成的茎尖被切下来后,置于丛生芽诱导培养基上,脱离了种胚的茎尖组织直接接触培养基而获得细胞增殖的营养和激素,培养基中的 TDZ 可进入茎尖组织,促进芽的增殖和再生,因而培养 20 d 就可形成 6 个以上的丛生芽。在这个过程中,TDZ 可能通过抑制顶端生长,促进分蘖节部位生长而快速形成丛生芽。

以茎尖诱导小麦丛生芽,没有基因型的差异,还具有取材方便、不受季节限制等优点。发展基于茎尖的遗传转化受体,已在其他作物中成功应用^[7-8,13],若能进一步用于小麦遗传转化,可望成为现有转化受体的重要补充。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] ZHANG S, WILLIAMS C R, JACKSON D, et al. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during *in-vitro* axillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (*Zea mays* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Planta, 1998, 204: 542-549.
- [3] GANESHAN S, BAGA M, HARVEY B L, et al. Production of multiple shoots from thidiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 73: 57-64.
- [4] SHARMA V K, ROBERT H, MENDEL R R, et al. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23: 9-16.
- [5] GANESHAN S, CHODAPARAMBIL S V, BAGA M, et al. *in vitro* regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2006, 85: 63-73.
- [6] SHARMA V K, HANSCH R, MENDEL R R, et al. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments [J]. Plant Breed, 2005, 124: 242-246.
- [7] 李国圣, 张卿伟, 张举仁. 玉米丛生芽体系的建立及抗除草剂转基因植株再生 [J]. 中国科学: C 辑, 2001, 5(31): 385-391.
- [8] 任振胜, 卿冬进, 陈巧云, 等. 杂交玉米的丛生芽的诱导、植株再生和转化 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 324-328.
- [9] KISHORE N S, VISARADA K, LAKSHMI Y A, et al. *in vitro* culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25: 174-182.
- [10] MAHESWARI M, JYOTHI L N, YADAV S K, et al. Efficient plant regeneration from shoot apices of sorghum [J]. Biol Plant, 2006, 50: 741-744.
- [11] DEVI P, ZHONG H, STICKLEN M B. *In vitro* morphogenesis of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]: efficient production of multiple shoots and inflorescences from shoot apices [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 546-550.
- [12] HU X R, YANG A F, ZHANG K W, et al. Optimization of *in vitro* multiple shoot clump induction and plantlet regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2006, 84: 89-98.
- [13] 晁相蓉, 宋玲玲, 胡孝瑞, 等. 鸭茅高效丛生芽体系的建立及耐盐植株的再生 [J]. 山东农业科学, 2005(1): 7-10.
- [14] 姜素云, 胡孝瑞, 晁相蓉, 等. 黑麦草高效丛生芽的发生及离体开花的初步研究 [J]. 草业学报, 2005, 14(6): 100-106.
- [15] MEDINA R, FALOCI M, MARASSI M A, et al. Genetic stability in rice micropropagation [J]. Biocell, 2004, 28: 13-20.

[16] 朱旭彤,廖玉才. 小麦新品种华麦 13 特征特性及栽培技术[J]. 湖北农业科学,2006,45(1):35-36.

[17] 陈云凤,张春荣,黄霞,等. TDZ 对植物体细胞胚胎发生的作用 [J]. 植物生理学通讯,2006,42(1):127-133.

[18] HUETTEMAN C A,PREECE J E. TDZ: a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1993,33:105-119.

[19] HENNY R J. TDZ increases basal bud and shoot development in Spathiphyllum ‘Petite ’[J]. Plant Growth Regul Soc Am Quart,1995,23:13-16.

Induction and Regeneration of Multiple Shoots from Elite Wheat Cultivars

ZHANG Jie¹ LI He-ping^{1,2} LIAO Yu-cai^{1,3} QU Bo^{1,3}

1. *Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
2. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
3. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract To develop a wheat genetic transformation system that is not restricted by seasons, this work investigated the optimized conditions and methods for induction and regeneration of multiple shoots directly derived from shoot apical meristem tissues in wheat. The study included the comparisons of three germination media, four induction media, three induction times and three rooting media with three elite wheat cultivars. The results indicated that MB5 basal medium without any hormones was suitable for germination of wheat mature embryos. MB5 basal medium plus 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L IBA produced the highest rate of multiple shoot induction. Numbers of multiple shoots increased with the increase of induction time. The suitable time for multiple shoot induction is not more than 30 days. There was no difference among the wheat cultivars in terms of induction rate and number of multiple shoots. The best medium for rooting was 1/2 MS basal medium plus 1.0 mg/L IBA. Regenerated plants derived from multiple shoots showed normal flowering and seeds. These results provide useful methods for regeneration and genetic transformation based on multiple shoots of wheat.

Key words induction; multiple shoots; mature embryos; apical meristem; wheat

(责任编辑:杨锦莲)