

甘露糖对小麦不同外植体愈伤诱导及生长的影响

姚明镜¹, 李和平¹, 廖玉才^{1,2}

(1. 华中农业大学分子生物技术实验室, 湖北武汉 430070; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 为了给以磷酸甘露糖异构酶基因作为筛选标记的小麦遗传转化提供资料, 以小麦栽培品种扬麦 158 和华麦 13 的茎尖、叶基、成熟胚为外植体, 研究了不同甘露糖浓度对这些外植体愈伤组织诱导和生长培养的影响。结果表明, 10 g/L 的甘露糖使茎尖的出苗和生根受到明显抑制, 而茎尖幼苗对甘露糖的耐受力较强, 15 g/L 甘露糖才能有效抑制幼苗生长。叶基在 5 g/L 甘露糖时, 其愈伤组织诱导率降低 55%, 而成熟胚在 10 或 15 g/L 甘露糖时的愈伤组织诱导率与叶基在 5 g/L 甘露糖时相当。这些结果说明, 在以小麦叶基、茎尖和成熟胚为外植体的 PMI/甘露糖筛选中, 可分别以 5、10、15 g/L 甘露糖作为筛选压。另外, 培养时间不同的外植体或培养物对甘露糖敏感性不同, 在培养早期阶段筛选时, 可选较低的甘露糖筛选压, 而在后期培养阶段进行筛选时, 可适当提高筛选压。

关键词: 小麦; 外植体; 组织培养; 愈伤诱导; 甘露糖

中图分类号: S512.1; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2007)01-0007-05

Effect of Mannose on Callus Induction and Growth of Different Explants Derived from Wheat

YAO Ming-jing¹, LI He-ping¹, LIAO Yu-cai^{1,2}

(1. Molecular Biotechnology Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Explants derived from shoot apices, leaf bases and mature embryos of elite wheat varieties were assayed for their callus induction and growth on culture media containing various concentrations of mannose as carbon sources. Results showed that a clear inhibitory effect on the growth and rooting of shoot apices was observed in the presence of 10 g/L mannose, whereas 15 g/L was required to inhibit the growth of young seedlings derived from shoot apices. Callus induction from leaf bases was inhibited with 5 g/L mannose, resulting in a reduction of callus formation up to 55%. For mature embryos, callus induction and growth rate were inhibited in the presence of 10 g/L or 15 g/L mannose. These results indicated that 5 g/L, 10 g/L and 15 g/L mannose were required for the explants derived from shoot apices, leaf bases and mature embryos, respectively, when mannose was used for positive selections in transgenic wheat plants. In addition a lower concentration of mannose can be used for the initial induction and culture of wheat explants while an increasing mannose can be deployed at the later stages.

Key words: Wheat; Explants; Tissue culture; Callus induction; Mannose

目前转基因植物中使用较多的筛选标记基因主要包括抗生素抗性基因和除草剂抗性基因。这

些抗性标记基因在生态环境和食品安全方面的潜在危害已经受到广泛关注。因此, 在转基因植物

收稿日期: 2006-08-01 修回日期: 2006-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(304709291, 30530510); 国家转基因植物研究专项(JY04-A-01); 教育部博士点基金项目。

作者简介: 姚明镜(1963—), 女, 副教授, 主要从事小麦细胞与基因工程研究。

通讯作者: 廖玉才(1954—), 男, 教授, 主要从事小麦分子生物学研究。

中使用安全筛选标记基因,对于转基因植物商品化具有重要意义。以糖代谢酶基因磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, PMI)基因为筛选标记的方法,对人体健康和环境安全无危害^[1]。自从 1998 年 Joersbo 等^[2]将 PMI/甘露糖阳性筛选系统用于筛选甜菜转基因植物以来,现已用于不同植物遗传转化筛选中^[3~7]。在小麦愈伤组织诱导及遗传转化中,以未成熟胚作为外植体的研究已有报道^[8],但小麦叶基^[9]和成熟胚^[10,11]的愈伤组织亦能分化再生成苗,茎尖^[12]也被证明是可以高频率再生的外植体。这些外植体取材方便,不受季节限制,也可作为遗传转化的受体。为了在小麦不同受体的遗传转化中有效地利用 PMI/甘露糖筛选系统,笔者以小麦茎尖、叶基和成熟胚为外植体材料,研究了以甘露糖为碳源对小麦不同外植体培养的影响,旨在为利用磷酸甘露糖异构酶基因作为筛选标记基因的小麦遗传转化提供资料。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试小麦品种为扬麦 158 和华麦 13,扬麦 158 由江苏农科院陆维忠研究员提供,华麦 13 来自本实验室。

1.2 外植体培养与处理

1.2.1 茎尖 选择饱满种子用 70%乙醇处理 3 min,0.1% HgCl₂ 15 min,无菌水洗涤 4~5 次,4℃浸泡 24 h,置于含 6 g/L 琼脂的三角瓶中,在 16 h 光照/8 h 黑暗、25℃条件下培养 3~4 d。取幼苗切取长约 2~2.5 mm 的茎尖,将基部垂直插入含不同甘露糖+蔗糖浓度的培养基(MS 无机元素,B5 有机元素,8 g/L 琼脂,pH5.8)中培养,观察比较茎尖出苗和生长情况。对照为含 2%蔗

糖的相同培养基。每个处理 20 个茎尖。

1.2.2 叶基 种子表面除菌和发芽方法同上。取 3~4 d 幼苗,从基部向上的方向按 1.5~2 mm 长切取三段(含胚芽鞘),置于含 2 mg/L 2,4-D 及不同浓度甘露糖+蔗糖的培养基(MS 无机元素,B5 有机元素,0.75 mg/L 生物素,400 mg/L 水解酪蛋白,146 mg/L 谷氨酰胺,8 g/L 琼脂,pH5.8)上,25℃黑暗培养 21 d,观察、统计出愈率及生长情况。对照为含 30 g/L 蔗糖的相同培养基。愈伤组织 21 d 继代一次。将继代培养的愈伤组织置于含不同甘露糖浓度的培养基上培养一个月,以分析比较甘露糖对愈伤组织生长的影响。

1.2.3 成熟胚 将种子按上述方法表面除菌,4℃下分别将华麦 13 和扬麦 158 种子浸泡 30 h 和 48 h 后,取成熟胚用于愈伤组织诱导和继代培养,培养基成分及甘露糖浓度与叶基相同。

1.3 统计分析

采用 SAS release 6.12 统计分析软件(Statistics Analysis System, SAS institute, USA)中的 GLM 程序进行 DUNCAN 测验。

2 结果与分析

2.1 甘露糖对茎尖生长的影响

离体茎尖在含甘露糖的培养基上,生长明显受到抑制(表 1)。在 5 g/L 甘露糖条件下,茎尖外植体虽为绿色,但芽苗伸长缓慢,仅个别能长出极短的新根;在 10 g/L 甘露糖中培养的外植体表现褐化,新生芽呈白色,无新根;15 和 20 g/L 甘露糖中培养的外植体迅速褐化,无新生芽和根,茎尖生长被完全抑制。而对照的外植体保持绿色,新芽生长快,新根多。由此表明,在不同甘露糖浓度的培养基上培养 7 d 后 10 g/L 或 10 g/L 以上甘露糖可以有效抑制小麦茎尖外植体生长。

表 1 不同甘露糖浓度下小麦茎尖的生长情况(幼苗高度,cm)

Table 1 Growth of shoot apices of wheat under different mannose concentrations (seedling height, cm)

品种 Variety	甘露糖/蔗糖(g/L) Mannose/sucrose (g/L)				
	0/20	5/15	10/10	15/5	20/0
华麦 13 Huamai 13	3.86±1.00A	1.57±0.79B	0.67±0.29C	0.24±0.04C	0.24±0.05C
扬麦 158 Yangmai 158	4.13±1.80A	1.47±0.91B	0.33±1.00C	0.27±0.07C	0.26±0.04C

注:同行数值后不同字母表示差异极显著, $\alpha=0.01$,下同。

Note: Different capital letters after the numbers in the same line stand for significant difference at $\alpha=0.01$. The same is as in the following tables.

2.2 甘露糖对幼苗生长的影响

为了分析甘露糖对小麦幼苗生长的影响,在不含甘露糖培养基上离体培养 10 d 的扬麦 158

茎尖幼苗(苗高 2~4 cm),被转接到含不同甘露糖浓度的培养基上,在分别培养 5、7、14 d 后比较幼苗生长状态。结果表明,在 5、10 g/L 甘露糖条

件下,小麦幼苗可长出新根,并可逐渐伸长,但随着时间的推移,新根伸长的速度差异明显(表 2)。在 15、20 g/L 甘露糖条件下小麦幼苗始终无新根生长,幼苗不仅没有长高,而且叶片从叶尖开始发

黄,并逐渐扩展至整个叶片。这说明幼苗耐受甘露糖的能力高于茎尖外植体,在 15 g/L 或 15 g/L 以上甘露糖条件下培养 5 d,才能有效抑制幼苗生长。

表 2 甘露糖对扬麦 158 幼苗生长的影响

Table 2 Effects of mannose on seedling growth of Yangmai 158

培养时间 Incubation time	甘露糖/蔗糖 (g/L) Mannose/sucrose (g/L)			
	5/15	10/10	15/5	20/0
5 d	苗绿色 Green 长出新根 New root	苗绿色 Green 长出新根 New root	苗绿色 Green 无新根 No new root	苗绿色 Green 无新根 No new root
7 d	苗绿色 Green 新根长 2~3 cm 2~3 cm new root	苗绿色 Green 新根长 0.2~1cm 0.2~1 cm new root	叶尖发黄 Yellow leaf tip 无新根 No root	1/2 叶片发黄 Yellow half leaf, 无新根 No root
14 d	苗绿色 Green 新根长 3~6 cm 3~6 cm new root 苗伸长明显 Clear seedling growth	叶尖发黄 Yellow leaf 新根长 1~2 cm 1~2 cm new root 苗伸长 Seedling growth	叶发黄、心叶绿色 Yellow leaf, green young leaf 无新根 No root 苗不伸长 No seedling growth	叶严重发黄,仅心叶绿色 Severe yellow leaf, green young leaf 无新根 No root 苗不伸长 No seedling growth

2.3 甘露糖对愈伤组织诱导的影响

甘露糖对小麦叶基切段和成熟胚的愈伤组织诱导具有明显的影响(表 3)。无论是叶基还是成熟胚,不含甘露糖的对照出愈率均达 90% 以上,甘露糖的存在可显著降低出愈率(仅对扬麦 158 成熟胚出愈率无影响),而且随着甘露糖浓度的升高,这种作用愈加明显。比较成熟胚和叶基的出愈率表明,成熟胚对甘露糖的耐受力明显高于叶基。叶基在 5 g/L 甘露糖条件下出愈率降低 55% 以上;而成熟胚在 10 g/L 或 15 g/L 甘露糖

下时,其出愈率才降低 50% 以上,且不同品种的成熟胚耐受力亦有差异,扬麦 158 高于华麦 13。尽管这两个小麦品种的两种外植体对甘露糖的敏感程度不同,但 25 g/L 甘露糖则可完全抑制这两个品种的愈伤诱导,其出愈率均为 0。虽然在 25 g/L 甘露糖浓度以下的处理仍具有一定的出愈率,但诱导形成愈伤的速率大大降低,因而愈伤组织的体积随甘露糖浓度升高也依次降低(图 1),表明甘露糖确实对愈伤组织诱导形成具有强烈抑制作用。

表 3 甘露糖对小麦叶基和成熟胚愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of mannose on callus induction of leaf bases and mature embryos of wheat

品种 Variety	类别 Class	甘露糖/蔗糖 (g/L) Mannose/sucrose (g/L)					
		0/30	5/25	10/20	15/15	20/10	25/5
扬麦 158 Yangmai 158	叶基段数 Leaf base number	164	212	209	177	174	112
	出愈数 Callus number	149	86	26	16	3	0
	出愈率 Callus frequency (%)	90.9A	40.6B	12.4C	9.09CD	1.7DE	0E
	成熟胚数 Mature embryo number	63	30	105	69	81	75
	出愈数 Callus number	63	30	84	30	10	0
	出愈率 Callus frequency (%)	100A	100A	80B	43C	12D	0E
华麦 13 Huamai 13	叶基段数 Leaf base number	80	57	50	56	46	28
	出愈数 Callus number	78	21	4	0	0	0
	出愈率 Callus frequency (%)	97.5A	36.8B	16.0C	0CD	0D	0D
	成熟胚数 Mature embryo number	117	71	101	105	135	138
	出愈数 Callus number	115	61	31	22	11	0
	出愈率 Callus frequency (%)	98A	86B	31C	21D	8E	0F

2.4 甘露糖对愈伤组织生长的影响

为了研究甘露糖对小麦愈伤组织生长的影响,将在只含蔗糖的培养基上诱导及继代培养 1 代的叶基愈伤组织(直径约 3~4 mm)和继代培养 2 代的成熟胚愈伤组织,转接到含不同甘露糖浓度的培养基上培养 30 d,观察比较甘露糖对愈伤组织生长的影响。结果(表 4)表明,不同浓度的甘露糖对愈伤组织生长具有不同程度的抑制作用。不同来源的愈伤组织,对甘露糖的反应亦有

差异。叶基愈伤对甘露糖更加敏感,两个品种的愈伤组织在 20 g/L 甘露糖条件下,生长完全受到抑制。15 g/L 甘露糖条件下扬麦 158 成熟胚愈伤组织生长受抑制程度略低于华麦 13。在不含甘露糖的对照处理中,愈伤组织正常生长,体积增大,且没有金黄色愈伤组织块。但在含甘露糖的处理中,均出现了金黄色愈伤组织块。而且甘露糖浓度愈高,金黄色愈伤组织块数愈多。



1、2、3、4、5 分别表示甘露糖/蔗糖为 0/30、5/25、10/20、15/15、和 20/10(g/L) 的处理。上部为叶基切段,下部为成熟胚。

1, 2, 3, 4 and 5 represent 0/30, 5/25, 10/20, 15/15 and 20/10(g/L) mannose/sucrose, respectively. Upper samples: leaf bases; bottom samples: mature embryos

图 1 甘露糖对扬麦 158 愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effect of mannose on callus growth of Yangmai 158

表 4 甘露糖对小麦叶基和成熟胚愈伤组织生长的影响

Table 4 Effects of mannose on callus growth of leaf bases and mature embryos of wheat

品种 Variety	类别 Class	甘露糖/蔗糖(g/L) Mannose/sucrose(g/L)				
		0/30	10/20	15/15	20/10	25/5
扬麦 158 Yangmai 158	叶基愈伤块数 Leaf base callus number	33	74	37	33	34
	生长情况 Growth status	++++	+++	++	0	0
	金黄色愈伤块数 Golden callus number	0	1	14	10	10
	金黄色愈伤块频率 Golden callus frequency(%)	0A	1A	38B	30B	29B
	成熟胚愈伤块数 Mature embryo callus number	72	58	53	61	29
	生长情况 Growth status	++++	+++	++	+	0
华麦 13 Huamai 13	金黄色愈伤块数 Golden callus number	0	9	14	35	27
	金黄色愈伤块频率 Golden callus frequency(%)	0A	16B	26B	57C	93D
	叶基愈伤块数 Leaf base callus number	35	35	37	36	37
	生长情况 Growth status	++++	++	+	0	0
	金黄色愈伤块数 Golden callus number	0	17	10	15	37
	金黄色愈伤块频率 Golden callus frequency(%)	0A	49B	27B	42B	100C
	成熟胚愈伤块数 Mature embryo callus number	47	—	31	28	31
	生长情况 Growth status	++++	—	++	0	0
	金黄色愈伤块数 Golden callus number	0	—	7	8	29
	金黄色愈伤块频率 Golden callus frequency(%)	0A	—	23B	29B	94C

注:++++表示生长完全正常;+++表示生长受到抑制;++表示生长受到显著抑制;+表示生长受到非常显著抑制;0表示生长完全受到抑制;—表示无结果记录。

Note:++++ represent normal growth;+++ represent growth inhibition;++ represent severe growth inhibition;+ represent very severe growth inhibition;0 represent complete growth inhibition;— represent not recorded.

为了进一步分析不同甘露糖浓度对愈伤组织活力及再生的影响程度,将各处理的扬麦 158 愈伤组织转接至相同处理的培养基上继续培养 30 d。结果表明,来自叶基的愈伤组织,在 10 g/L 甘露糖条件下金黄色愈伤块由原来的 1% 增加到 8%,在 15 g/L 甘露糖条件下金黄色愈伤组织块数由 38% 增加到 70%,而在 20 g/L 和 25 g/L 甘露糖时愈伤组织体积和颜色基本没有变化,处于静止状态。来自成熟胚的愈伤组织,在 15 g/L 甘露糖条件下金黄色愈伤组织块无明显增加,而在 20 g/L 甘露糖时金黄色愈伤组织块数高达 90%。因此成熟胚愈伤组织耐受甘露糖的能力显著高于叶基愈伤组织。进一步将这些金黄色愈伤块和在高浓度甘露糖下无明显体积增长的叶基愈伤组织,转接到不含甘露糖的正常培养基上继代培养,

结果均无明显的体积增长现象,表明这些受甘露糖毒害的小麦愈伤组织细胞,已经完全丧失活力,不能恢复正常生长。

3 讨论

利用甘露糖/PMI 正向筛选体系选择转基因植物时,根据待转化植物对甘露糖的耐受能力,选用合适的甘露糖筛选压,是成功利用这一筛选体系获得转基因植物的关键之一。这类筛选体系通常是在一定的总糖量下,将甘露糖与其它可代谢碳源糖如蔗糖组配成不同比例,用于比较筛选效率^[4,8,13]。小麦等植物愈伤组织诱导培养基的含糖量多为 30 g/L,而分化、再生成苗的培养基含糖量为 20 g/L^[10,11]。因此本研究的愈伤诱导和幼苗生长的总含糖量分别为 30 和 20 g/L。研究

表明,不同植物对甘露糖耐受力差异明显。玉米、小麦未成熟胚愈伤组织分别在 10 g/L 和 15 g/L 甘露糖时生长受到明显抑制^[8];而水稻未成熟胚外植体的筛选压为 25 g/L 甘露糖^[4]。本研究表明,小麦叶基外植体耐受甘露糖的能力较弱,5 g/L 甘露糖使出愈率下降 50%,10~15 g/L 甘露糖严重抑制愈伤组织生长或导致死亡;小麦幼苗在 10 g/L 甘露糖条件下,生长发育受到明显抑制,15 g/L 甘露糖以上则不能生根;而成熟胚外植体的耐受力较强,10~15 g/L 甘露糖时出愈率下降 50%,20 g/L 甘露糖严重抑制愈伤组织生长或导致死亡。因此,在以甘露糖为筛选压的小麦遗传转化中,有必要根据不同外植体来确定甘露糖筛选浓度。

甘露糖与蔗糖搭配使用有利于鉴定筛选。本研究中观察到,在 30 g/L 甘露糖和不含蔗糖的条件下,叶基虽不长出愈伤组织,但仍呈绿色;而在含 25 g/L 甘露糖和 5 g/L 蔗糖时,叶基明显褐化,说明在培养基中添加一定的蔗糖,可能有利于植物细胞吸收利用甘露糖,从而促进植物细胞 ATP 及磷酸根离子的消耗,加速植物细胞中毒而表现为褐色,这与以前报道的研究结果一致^[1,8]。同时,扬麦 158 的耐受力高于华麦 13,表明小麦不同品种对甘露糖的反应亦不相同。此外,甘露糖对愈伤组织的影响也会因继代次数、生长状态不同而异,在筛选过程中需要根据在不甘露糖培养条件下的对照生长状态,适当调整甘露糖浓度。

参考文献:

[1] Reed J, Privallel M, Powell L, *et al.* Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation[J]. *In Vitro Cell Dev. Bio. Plant*, 2001, 37:127-132.

- [2] Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, *et al.* Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4:111-117.
- [3] Gao Z, Xie X, Ling Y, *et al.* Agrobacterium tumefaciens-mediated sorghum transformation using a mannose selection system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, (3):591-599.
- [4] He Z, Fu Y, Si H, *et al.* Phosphomannose-isomerase (pmi) gene as a selectable marker for rice transformation via agrobacterium[J]. *Plant Science*, 2004, 166:17-22.
- [5] Paola L, Ye X, Ingo P. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent[J]. *Molecular Breeding*, 2001, 7:43-49.
- [6] Todd R, Tague B W. Phosphomannose isomerase: A versatile selectable marker for Arabidopsis thaliana germ-line transformation[J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2001, 19:307-319.
- [7] 彭世清, 陈守才. 甘露糖阳性选择系统的建立及在番茄转化中的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(2):141-144.
- [8] Wright M, Dawson J, Dunder E, *et al.* Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivium* L.) using the Phosphomannose isomerase gene, pmi, as the selectable marker[J]. *Plant Cell Rep.*, 2001, 20:429-436.
- [9] Wang C T and Wei Z M. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivium* L.) leaf base [J]. *Plant Cell Tiss Org Cul.*, 2004, 77:149-156.
- [10] 祁永斌, 李和平, 廖玉才. 不同小麦品种成熟胚愈伤组织诱导及分化研究[J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24(2):117-120.
- [11] 唐宗祥, 张怀琼, 张怀渝, 等. 不同小麦成熟胚对愈伤组织形成及萌发的影响[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(1):33-36.
- [12] Sharma V K, Hansch R, Mendel R R, *et al.* Influence of picloram and thidia zuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments[J]. *Plant Breeding*, 2005, 124:242-246.
- [13] He Z, Duan Z, Liang W, *et al.* Mannose selection system used for cucumber transformation [J]. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25:953-958.