

甘露糖对大麦品种不同外植体生长的影响

王 韬¹, 王春霞¹, 廖玉才², 黄 涛¹, 李和平^{1*}

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘 要: 以大麦栽培品种的茎尖、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的影响。结果表明: 甘露糖浓度为 20 g/L 时, 茎尖的叶片伸长和生根受到明显抑制; 甘露糖浓度为 10 g/L 或 15 g/L 时, 成熟胚的愈伤组织诱导率降低 50%, 甘露糖浓度为 20 g/L 或 25 g/L 时, 成熟胚愈伤诱导和生长完全受到抑制, 因此在以大麦茎尖和成熟胚为外植体的磷酸甘露糖异构酶(PMI)/甘露糖筛选中, 可分别以 20 g/L、25 g/L 甘露糖作筛选压。另外, 在培养早期阶段筛选比较适宜。

关键词: 甘露糖; 大麦; 外植体; 愈伤诱导; 组织培养

中图分类号: Q945.32; S512.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0277-05

Effect of Mannose on Growth of Different Explants Derived from Elite Barley Varieties (*Hordeum vulgare* L.)

WANG Tao¹, WANG Chun-Xia¹, LIAO Yu-Cai², HUANG Tao¹, LI He-Ping^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Explants derived from shoot apices and mature embryos of elite barley cultivars were assayed for their callus induction and growth on culture media containing various concentrations of mannose as carbon sources. The results showed that a clear inhibiting effect on the leaf elongation and rooting of shoot apices in the concentration of 20 g/L mannose. For mature embryos, callus induction and growth rate were inhibited in the presence of 20 g/L or 25 g/L mannose, whereas 10 g/L or 15 g/L treatment could effectively result in a reduction of callus formation and growth up to 50%. These results indicated that 20 g/L and 25 g/L mannose were required for inhibition of the explants derived from shoot apices and mature embryos, respectively, when mannose was used for positive selections of transgenic barley plants. In addition, it is more suitable to select during the initial induction and culture of barley explants.

Key words: Mannose; *Hordeum vulgare* L.; Explants; Callus induction; Tissue culture

自 1983 年第一株转基因植物诞生以来, 以抗抗生素和抗除草剂基因为筛选标记基因的转化体系得到了广泛的应用^[1], 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使得许多转基因作物的推广受到限制。近年来, 以磷酸甘露糖异构酶(PMI)和木糖异构酶(xylA)为代表的糖类代谢酶在转基因安全上显示出巨大的应用潜力。以这类糖代谢酶基因为选择标记的转化系统用糖类作为筛选剂, 转化细胞由于获得了糖代谢能力在筛选培养基上生长扩增, 而非转化细胞因为不能正常代谢处于饥饿状态, 生长被抑制但不被杀死, 据此可以区分转化与非转化细胞^[2]。PMI/甘露糖筛选体系自 1998 年首次报道用于甜菜转基因以来, 已在不少单子叶

植物和双子叶植物上取得成功^[3-12]。由于不同植物对甘露糖敏感性有着很大的差异, 并且大麦转基因的甘露糖筛选体系尚未有明确的报道, 因此有必要对筛选培养基进一步优化, 建立稳定、有效的筛选体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种‘鄂大麦 7 号’、‘广丰 3 号’、‘花 30’、‘荆 02-248’、‘华大麦 3 号’, 均由湖北省农科院惠赠。D-甘露糖购于上海源聚生物试剂公司。

1.2 培养基的设置

成熟胚愈伤组织诱导和继代培养基: MS 基本培

收稿日期: 2006-12-08, 修回日期: 2006-12-28。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470929, 30530510); 转基因植物专项(JY04-A-01)资助; 教育部博士点基金资助项目[This work is supported by NNSFC (304709291, 30530510), MOST (JY04-A-01) and SRFPD]。

作者简介: 王韬(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程。

* 通讯作者(E-mail: hepingli@mail.hzua.edu.cn)。

培养基(Murashige and Skoog, 1962), 添加 500 mg/L 脯氨酸, 200 mg/L 肌醇, 1000 mg/L 水解酪蛋白, 1.25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L 盐酸硫胺素, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 麦芽糖, 6 g/L 琼脂。

茎尖培养和成熟胚愈伤组织分化培养基:不添加激素的 MS 基本培养基。

不同甘露糖浓度的梯度培养基:总糖量 30 g/L, 甘露糖浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30 g/L, 不足 30 g/L 由麦芽糖补齐。

1.3 茎尖的处理

将去皮的大麦种子浸入 70% 酒精 3 min, 然后转入 0.1% 升汞处理 15 min, 冲洗 3~5 次后, 室温 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 4~6 h; 无菌条件下剥取胚, 盾片朝下接种于 MS 培养基 (MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L, pH 5.8), 然后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 散射光下培养。5 d 后取健壮绿苗切去根, 再切下长约 2 mm 包含茎尖生长点的切段, 基部向下接种于各处理培养基。

1.4 成熟胚的处理

将饱满的大麦种子用 50% 的硫酸溶液浸泡, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 摇床振荡去壳 2 h, 蒸馏水冲洗去酸后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 16~20 h。剥胚前, 种子用 70% 乙醇灭菌 5 min, 然后 0.1% 升汞灭菌 15 min, 无菌水冲洗干净。将剥离的成熟胚盾片朝上接种到培养基上进行诱导培养。将直接从种子中剥离的成熟胚和诱导培养 2 周产生的愈伤组织分别接种到不同甘露糖浓度的培养基上进行耐受性试验。

2 结果和分析

2.1 甘露糖对大麦茎尖生长的影响

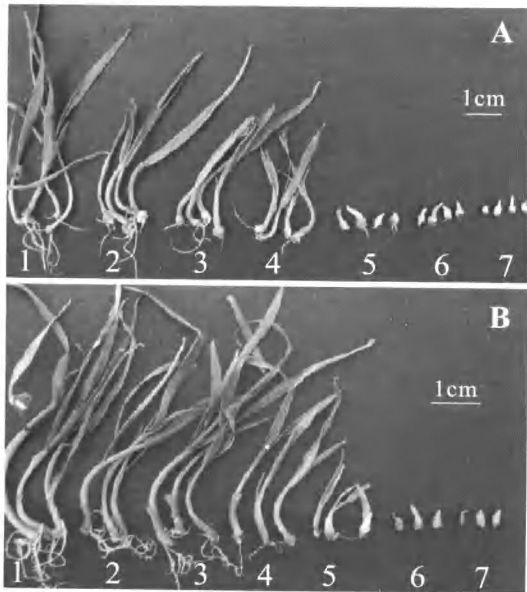
甘露糖对大麦茎尖生长的影响主要表现在抑制叶片伸长和生根。用 0~15 g/L 甘露糖处理的材料接种 1 d 后, 第一片真叶均不同程度伸出叶鞘, 但伸长长度随着甘露糖浓度的提高而递减, 接种 5~9 d 后, 真叶伸长明显, 大部分材料长出 1~3 条乳白色新根, 密布根毛, 长势粗壮; 20~30 g/L 甘露糖处理的材料真叶不伸长或伸长缓慢, 生根率低且长势弱, 表现为根细弱短小, 呈透明状, 根毛稀少; 接种 10 d 后, 0~15 g/L 甘露糖处理材料由于自身光合作用的增强, 长相差异越来越小, 而 20~30 g/L 甘露糖处理的茎尖停止伸长而失绿黄化, 最后枯白死亡。表 1 为接种后第 13 d 各处理材料的苗高、根长和生根率情况, 由表 1 可知, 20~30 g/L 甘露糖对大麦茎尖伸长和生根的抑制作用明显。

不同基因型大麦对甘露糖的天然耐受性不同, 具体表现在对甘露糖的最高耐受浓度和最长耐受时间上。20 g/L 的甘露糖对‘花 30’的生长产生较强的抑制作用(表 1, 图 1:A), 接种后第 8 d 即可观察到该处理的部分茎尖开始黄化死亡, 此时 30 g/L 甘露糖处理的大部分接种茎尖已死亡; 接种后第 13 d, 20 g/L 甘露糖处理除极个别材料呈失绿黄化状外, 其它已全部枯白死亡, 此时 25~30 g/L 甘露糖处理的茎尖已全部死亡。‘华大麦 3 号’和‘荆 02-248’

表 1 甘露糖对大麦茎尖根长的影响
Table 1 Effects of mannose on the growth of barley shoot apices

品种 Variety	性状 Character	甘露糖/麦芽糖(g/L)				Mannose / maltose		
		0/30	5/25	10/20	15/15	20/10	25/5	30/0
‘花 30’ ‘Hua 30’	苗高(cm) Seedling height	7.34 $\pm$ 1.10	5.68 $\pm$ 0.87	3.62 $\pm$ 0.38	2.48 $\pm$ 0.55	0.45 $\pm$ 0.09	0.40 $\pm$ 0.10	0.2 $\pm$ 0.21
	根长(cm) Root length	1.97 $\pm$ 0.20	1.48 $\pm$ 0.78	0.94 $\pm$ 0.62	0.56 $\pm$ 0.59	0.37 $\pm$ 0.43	0.10 $\pm$ 0.20	0
	生根率(%) Root frequency	100	100	97.67	73.53	20.47	9.29	0
‘荆 02-248’ ‘Jing 02-248’	苗高(cm) Seedling height	7.54 $\pm$ 1.32	6.57 $\pm$ 0.59	4.62 $\pm$ 0.50	3.13 $\pm$ 0.32	2.04 $\pm$ 0.47	0.51 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.10
	根长(cm) Root length	2.68 $\pm$ 0.12	2.29 $\pm$ 0.27	2.02 $\pm$ 0.22	1.53 $\pm$ 0.51	0.47 $\pm$ 0.42	0.22 $\pm$ 0.38	0.03 $\pm$ 0.06
	生根率(%) Root frequency	100	100	98.09	85.63	32.29	15.57	4.33
‘华大麦 3 号’ ‘Huadamai 3’	苗高(cm) Seedling height	7.33 $\pm$ 1.25	6.14 $\pm$ 0.69	4.63 $\pm$ 0.61	3.91 $\pm$ 0.46	2.11 $\pm$ 0.91	0.59 $\pm$ 0.21	0.21 $\pm$ 0.17
	根长(cm) Root length	2.07 $\pm$ 0.63	1.49 $\pm$ 0.14	1.19 $\pm$ 0.29	1.06 $\pm$ 0.24	0.42 $\pm$ 0.50	0.18 $\pm$ 0.21	0.04 $\pm$ 0.05
	生根率(%) Root frequency	100	100	98.59	83.47	31.47	16.13	3.67

对甘露糖的耐受性较‘花30’强,25 g/L的甘露糖才对其生长表现出较强的抑制作用(表1,图1:B),接种后第13 d和16 d,30 g/L和25 g/L甘露糖处理材料才开始出现死亡现象。



A. ‘花30’接种后第13 d的生长状态; B. ‘荆02-248’接种后第13 d的生长状态。1、2、3、4、5、6、7 分别表示甘露糖/麦芽糖为0/30、5/25、10/20、15/15、20/10、25/5、30/0(g/L)的处理
A. ‘Hua 30’ after 13 d of inoculation; B. ‘Jing 02-248’ after 13 d of inoculation. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represent 0/30, 5/25, 10/20, 15/15, 20/10, 25/5, 30/0(g/L) mannose/maltose, respectively

图1 甘露糖对茎尖生长的影响

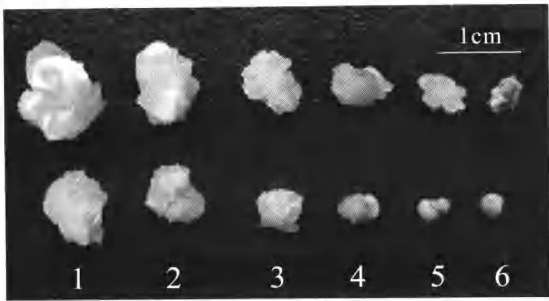
Fig. 1 Effect of mannose on growth of shoot apices

2.2 甘露糖对成熟胚诱导的影响

大麦成熟胚在诱导培养基上一方面主要是诱导产生初生愈伤组织,另一方面是直接由胚萌发出芽。甘露糖对大麦成熟胚的愈伤组织诱导和直接出芽都具有明显的影响。如表2所示,不含甘露糖的对照出愈率,除‘花30’外,均达50%左右,并且伴随着明显的出芽现象。随着甘露糖浓度的升高,愈伤组织的诱导受到显著的抑制,且不同品种的成熟胚反应亦有差异。‘荆02-248’和‘花30’在10 g/L甘露糖存在时,出愈数降低至原来的一半左右,‘花30’在25 g/L甘露糖培养基上则完全不出愈。‘鄂大麦7号’和‘广丰3号’则必须在15 g/L的甘露糖时出愈数才降低50%以上,在20 g/L的甘露糖浓度下愈伤的诱导被完全抑制。显然,‘鄂大麦7号’和‘广丰3号’对甘露糖更敏感,耐受性差。另外,甘露糖对同一品种成熟胚的愈伤诱导和出芽的影响也不相同。从表2可以看出,25 g/L甘露糖不能完全抑制‘荆02-248’的成熟胚出愈,但5 g/L甘露糖已经完全抑制了其出芽。在供试的4个品种中,甘露糖对‘鄂大麦7号’成熟胚出愈的影响大于对其出芽的影响;‘荆02-248’、‘广丰3号’和‘花30’3个品种的成熟胚出芽对甘露糖的反应更敏感。从实验中还观察到,所有供试品种的愈伤组织体积大小都随甘露糖浓度升高而依次降低(图2)。所有结果表明,甘露糖对成熟胚愈伤组织诱导有强烈的抑制作用。

表2 甘露糖对大麦成熟胚愈伤组织诱导和出芽的影响
Table 2 Effects of mannose on shoot and callus induction of mature embryos of barley

品种 Variety	类别 Class	甘露糖/麦芽糖(g/L) Mannose/maltose					
		0/30	5/25	10/20	15/15	20/10	25/5
‘荆02-248’ ‘Jing 02-248’	成熟胚数 Mature embryo number	50	50	46	50	49	50
	出愈数 Callus number	28	25	15	14	11	8
	出芽数 Shoot number	7	1	0	0	0	0
‘花30’ ‘Hua 30’	成熟胚数 Mature embryo number	48	49	48	50	50	50
	出愈数 Callus number	16	16	9	7	4	0
	出芽数 Shoot number	8	4	2	0	0	0
‘广丰3号’ ‘Guangfeng 3’	成熟胚数 Mature embryo number	48	50	50	50	50	50
	出愈数 Callus number	29	26	21	2	0	0
	出芽数 Shoot number	13	7	1	1	0	0
‘鄂大麦7号’ ‘Edamai 7’	成熟胚数 Mature embryo number	50	50	50	50	50	50
	出愈数 Callus number	37	38	28	13	0	0
	出芽数 Shoot number	18	13	18	8	3	0



上:‘花30’的愈伤组织;下:‘荆02-248’的愈伤组织。1、2、3、4、5、6 分别表示甘露糖/麦芽糖为 0/30、5/25、10/20、15/15、20/10、25/5(g/L) 的处理
Upper samples: callus of ‘Hua 30’; bottom samples: callus of ‘Jing 02-248’. 1, 2, 3, 4, 5, 6 represent 0/30, 5/25, 10/20, 15/15, 20/10, 25/5 (g/L) mannose/maltose, respectively

图2 甘露糖对愈伤组织诱导的影响
Fig. 2 Effect of mannose on callus induction

2.3 甘露糖对愈伤组织生长的影响

将大麦成熟胚接种到诱导培养基上诱导2周,产生的愈伤组织再转接到不同甘露糖浓度的继代培养基上,30 d后观察甘露糖对愈伤组织生长的影响。‘荆02-248’的愈伤组织在对照培养基上生长明显,愈伤组织的体积可增长到原来的1.5~2倍。在不同甘露糖浓度培养基上的愈伤组织也略有生长,处于生长状态的愈伤组织所占的比例随着甘露糖浓度的增加而降低(表3),完全抑制生长的甘露糖浓度不同品种之间也不相同。‘荆02-248’的愈伤在5 g/L甘露糖的条件下生长数量大幅降低,在20 g/L甘露糖的条件下不生长。对比愈伤诱导阶段,‘荆02-248’的愈伤在继代生长阶段对甘露糖更敏感。‘广丰3号’无论在诱导还是继代阶段均以20 g/L甘露糖为完全抑制浓度。同时,‘广丰3号’在甘露糖浓度达到20 g/L后,愈伤组织周围出现水圈。推测其愈伤组织生长受到抑制的原因有可能是渗透压过高。

2.4 甘露糖对愈伤组织分化的影响

将大麦成熟胚诱导2周产生的愈伤组织接种到含有不同浓度甘露糖的分化培养基上,40 d后观察甘露糖对愈伤组织分化的影响。由于成熟胚的初生愈伤组织在分化时大部分先分化出不定根,影响了芽的分化。绿原基是愈伤组织在分化阶段产生的绿色突起的生长点,可进一步发育成芽或根。愈伤组织只有在先形成绿原基的基础上,才有可能分化成苗。绿原基的生长直接影响分化过程后期的器官发生。在小麦的幼胚培养中曾经以绿原基的发生作为分化的指标^[3]。在大麦成熟胚的培养分化中,绿原基发生率具有基因型差异。所以实验从绿原基发生的角度观察甘露糖对愈伤组织分化的影响。

供试的2个品种绿原基发生率并没有因甘露糖浓度的升高而依次降低,而是在一定范围内浮动(表4)。这说明在分化阶段,愈伤组织对甘露糖的敏感性大大降低。

3 讨论

以上结果表明,不同基因型大麦对甘露糖的天然耐受性不同,5~15 g/L甘露糖仅暂时延缓植株的伸长生长和生根,随着培养时间的延长和植株光合作用能力的增强,植株可打破甘露糖的抑制作用而正常生长。愈伤组织在有光照的分化阶段,甘露糖对绿原基发生没有明显的抑制作用。Joersbo等的研究发现,提高光照强度可以减轻甘露糖对甜菜植株生长的抑制^[4,14],本实验结果与其相一致。同时,在大麦成熟胚的愈伤诱导和生长阶段甘露糖都表现出非常明显的抑制作用。同一品种的愈伤组织在不同培养阶段对甘露糖的耐受性也不一样。从‘荆02-248’的培养可以看出,该基因型在诱导阶段对甘露糖的耐受性最强,25g/L甘露糖仍然不能完

表3 甘露糖对愈伤组织生长的影响
Table 3 Effect of mannose on callus growth

类别 Class	品种 Variety	甘露糖/麦芽糖(g/L)			Mannose/maltose		
		0/30	5/25	10/20	15/15	20/10	25/5
生长愈伤率(%)	‘荆02-248’ ‘Jing 02-248’	31.37	9.26	5.66	5.88	3.92	0
Growing callus number frequency	‘广丰3号’ ‘Guangfeng 3’	34.48	29.31	16.00	12.50	0	0

表4 甘露糖对愈伤组织分化的影响
Table 4 Effect of mannose on callus differentiation

类别 Class	品种 Variety	甘露糖/麦芽糖(g/L)			Mannose/maltose		
		0/30	5/25	10/20	15/15	20/10	25/5
绿原基发生率(%)	‘荆02-248’ ‘Jing 02-248’	59.57	62.50	54.17	56.86	52.00	50.94
Green primordium frequency	‘花30’ ‘Hua 30’	29.17	26.19	26.67	28.26	23.53	29.63

全抑制其出愈;但其愈伤组织在继代生长阶段对甘露糖反应最敏感,20 g/L 甘露糖即可完全抑制生长。可能是因为愈伤组织在继代后处于生长最活跃时期,能量需求达到高峰,此时甘露糖-6-磷酸的积累以及 ATP 和磷酸根离子的无效消耗严重地抑制了愈伤的生长^[5]。

本研究表明:利用甘露糖为筛选标记的筛选体系对大麦进行抗性植株筛选时,30 g/L 甘露糖的筛选压过大,会造成供试植株生长不良进而导致不能正常结实。原因可能是甘露糖浓度太高而引起渗透压的改变,同时没有麦芽糖的补给,故宜用 20 g/L 甘露糖(部分品种需提高到 25 g/L)的筛选压,筛选时间至少 14 d,并应适当附加麦芽糖,促进植株健壮生长、结实。同时,根据不同品种愈伤对甘露糖的耐受性比较,筛选应选择在愈伤生长旺盛的时期进行。

参考文献:

- [1] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.
- [2] Joersbo M, Okkels F T. Calcium reduces toxicity of aminoglycosidic antibiotics in sugar beet explants *in vitro* [J]. *Physiol Plant*, 1996, 97: 245-250.
- [3] Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen S G, Brunstedt J, Okkels F T. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet [J]. *Mol Breeding*, 1998, 4(2): 111-117.
- [4] Joersbo M, Petersen S G, Okkels S G. Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet [J]. *Physiol Plant*, 1999, 105: 109-113.
- [5] Degenhardt J, Poppe A, Montag J, Szankowski I. The use of the phosphomannose isomerase/ mannose selection system to recover transgenic apple plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(11): 1149-1156.
- [6] Wright M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose-isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 429-436.
- [7] Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck A R, Hansen G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants via *Agrobacterium* transformation [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 798-803.
- [8] Boscarol R L, Almeida W A B, Derbyshire M T V C, Mourão Filho F A A, Mendes B M J. The use of PML/ mannose selection system to recover transgenic sweet orange plant (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(2): 122-128.
- [9] He Z, Fu Y, Si H, Hu G, Zhang S, Yu Y, Sun Z. Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium* [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 17-22.
- [10] Gao Z, Xie X, Yan L, Muthukrishnan S, Liang George H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using a mannose selection system [J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 591-599.
- [11] 彭世清, 陈守才. 甘露糖阳性选择系统的建立及其在番茄转化中的应用 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 141-144.
- [12] 岳健雄, 孟钊红, 张炼辉, 韩少杰, 林亲铁, 王巍. 以甘露糖作为筛选剂的棉花遗传转化 [J]. 棉花学报, 2005, 17(1): 37-43.
- [13] 余桂荣, 尹钧, 郭天财, 牛吉山. 小麦幼胚培养基因型的筛选 [J]. 麦类作物学报, 2003, 23(2): 14-18.
- [14] 杨莉, 徐昌杰, 陈昆松. PML/甘露糖筛选体系在植物转基因中的应用 [J]. 林业科学, 2005, 41: 137-141.
- [15] 张倩, 廖玉才, 陈方方, 董璇, 李和平. 大肠杆菌 6-磷酸甘露糖异构酶基因的克隆与表达 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(5): 461-464.