

燕麦愈伤组织诱导和分化再生影响因素的研究

贾利敏¹, 傅晓峰², 孙国琴¹, 孙瑞芬¹, 斯钦巴特尔¹, 刘力平¹, 刘俊清²

(1. 内蒙古农牧业科学院生物中心, 内蒙古 呼和浩特 010031; 2. 内蒙古农牧业科学院甜菜研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要:以燕麦3个品种(系)幼胚、幼穗为材料, 通过组织培养方法, 研究了基因型、培养基、外植体对愈伤组织诱导、继代和分化再生的影响。结果表明, 对愈伤组织的诱导, 基因型和培养基起重要作用, 对幼胚作用极显著, 对幼穗作用显著; 外植体不同也影响愈伤组织形成, 随培养基成分改变而变化, 且幼穗较幼胚更易培养; 2, 4-D浓度影响愈伤组织生长和胚性愈伤组织形成, 3 mg/L 2, 4-D有利于愈伤生长, 促进胚性愈伤形成; 草莠一号幼穗愈伤组织有很强的继代能力, 继代培养330 d仍具有46.58%的分化率, 该材料在组织培养和基因工程研究中具有很大潜力。

关键词:燕麦; 幼胚; 幼穗; 组织培养

中图分类号: S512.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)04-0031-04

The Studies on the Factors Affecting the Callus Induction and Plant Regeneration of Oat (*Avena nuda* L)

JIA Li min¹, FU Xiao feng², SUN Guo qin¹, SUN Rui fen¹,
SI Qin Bateer¹, LIU Li ping¹, LIU Jun qing²

(1. Biotechnology Centre, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot 010031, China; 2. Sugarbeet Institute, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot 010031, China)

Abstract: The influence of genotypes, medium and explant on induction, subculture and regeneration of oat callus have been studied by tissue culture of immature embryo and inflorescence of three oat varieties (line). The results showed that genotype and medium had an important role in callus induction. They were very significant and significant respectively on immature embryo and inflorescence. The formation of callus was also affected by explant and it was difference with the medium composition, inflorescence were easier to culture than immature embryo. 2, 4-D concentration influenced callus growth and embryogenic callus generation and it can accelerate callus development and embryogenic callus generation in 3 mg/L. Callus from inflorescence of "Cao you no. 1" had strong subculture capacity, it had 46.58% differentiation rate after 330 days subculture. This material had great potential in tissue culture and in genetic engineering.

Key words: *Avena nuda* L.; Immature embryo; Inflorescence; Tissue culture

燕麦属禾本科燕麦属一年生草本植物, 是粮饲兼用型作物, 有极高的营养、饲用价值和保健功效, 它抗旱、耐寒、耐瘠, 主要在我国华北、西北、西南高寒地区种植^[1]。内蒙古是我国燕麦主产区, 燕麦作为我区特色作物, 目前资源缺乏、品种混杂, 生产发展受到限制。因此, 品种改良、资源创新势在必行^[2-5]。实践证明应用基因工程方法行之有效, 而转化效率高低关键取决于转化体系的再生频率, 为

此选用性状优良的燕麦材料, 对其组织培养特性、植株再生能力进行研究, 为燕麦转基因研究和新品种选育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

燕麦粮饲兼用型品系 861、高蛋白型品系 8202、

收稿日期: 2006-01-05

基金项目: 内蒙古自治区科技厅攻关项目 (200201)

作者简介: 贾利敏(1963-), 女, 山西大同人, 副研究员, 硕士, 主要从事作物基因工程研究工作。

草用型新品种草苻一号, 幼胚、幼穗取自内蒙古农牧业科学院的大田试验地。

1.2 取材方法

取授粉后 1~ 2 mm 长的幼胚(幼穗 1~ 2 cm), 剥出子粒(外层叶片), 用 75% 酒精表面灭菌 30 s(10 min), 无菌水冲洗, 再用 10% 次氯酸钠溶液灭菌 10 min(20 min), 无菌水冲洗 4~ 5 次, 在无菌条件下挑取幼胚(剥出幼穗, 切成 2~ 3 mm 小段), 接种在诱导培养基上。

1.3 培养条件

基本培养基为 MS, 添加不同种类、浓度激素组合和有机附加物作为愈伤组织诱导培养基(编号 1~ 7)、继代培养基(编号 8~ 12)、分化培养基(编号

13)(表 1)。1/2 MS 培养基添加 Pro 500 mg/L、多效唑 3 mg/L 作为生根壮苗培养基, 所有培养基琼脂 7 g/L, pH 5.8, 121 °C 高温灭菌 20 min。愈伤组织诱导、继代为暗培养, 分化、生根为光照培养, 光照时间为 12 h, 培养温度(25 ± 1) °C。

1.4 数据统计

各培养期以 30 d 为一个周期, 进行调查统计。愈伤组织诱导率 = 愈伤组织数 / 接种数 × 100%; 愈伤组织相对生长量 = 愈伤重量 / 初期愈伤重量; 绿苗分化率 = 分化绿苗的愈伤数 / 分化愈伤数 × 100%; 再生率 = 再生苗数 / 分化愈伤数 × 100%; 完整再生株先移入营养钵成活后再转到温室土壤中, 移栽成活率 = 温室成活苗数 / 再生苗移栽数 × 100%。

表 1 培养基成分

Tab 1 Medium composition

培养基 Medium	2,4_D (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)	IAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	水解酪蛋白 (mg/L) CH	蔗糖 (g/L) Sucrose	谷氨酰胺 (mg/L) Gln	天冬氨酸 (mg/L) Asp	酵母提取物 (mg/L) Yeast extract
1	3	1	-	-	-	-	60	-	-	-
2	3	1	0.5	-	-	-	60	-	-	-
3	2	1	-	1	-	-	60	-	-	-
4	3	1	-	-	1	-	30	150	150	50
5	5	1	-	-	1	-	30	150	150	50
6	3	-	-	-	-	200	30	-	-	-
7	5	-	-	-	-	200	30	-	-	-
8	-	-	-	-	-	200	30	-	-	-
9	1	-	-	-	-	200	30	-	-	-
10	2	-	-	-	-	200	30	-	-	-
11	3	-	-	-	-	200	30	-	-	-
12	4	-	-	-	-	200	30	-	-	-
13	-	0.2	0.2	-	0.5	200	30	-	-	-

注: 培养基 6 和 11 组成成分相同 Note: Both medium 6 and 11 had the same composition

2 结果与分析

2.1 基因型对愈伤组织诱导的影响

参试 3 种基因型材料, 在设置的 7 种培养基上都能长出愈伤组织, 基因型不同, 愈伤组织诱导率不同(表 2)。草苻一号出愈能力最强, 愈伤组织诱导率表现最高, 如幼胚诱导频率在 53.96%~ 94.30%, 平均为 72.19%, 明显高于 861 和 8202; 幼穗诱导率在 52.40%~ 84.40%, 平均为 64.63%, 明显高于 8202, 略高于 861。方差分析(表 3)结果表明, 以幼胚为外植体, 基因型间愈伤组织诱导频率差异达到极显著水平, 以幼穗为外植体, 愈伤组织诱导频率差异显著, 由此可见基因型对愈伤组织的诱导起着重要作用。

2.2 培养基对愈伤组织诱导的影响

7 种诱导培养基都能不同程度地诱导出愈伤组织(表 2)。在 3 号培养基中幼胚诱导率相对最高, 最高达 94.30%, 平均为 84.53%; 在 1 号培养基幼穗诱导率相对最高, 最高为 84.40%, 平均为 66.99%。方差分析表明(表 3), 培养基在幼胚、幼穗愈伤组织诱导中起着极显著和显著作用, 说明培养基组分配比也是重要的影响因素。

2.3 外植体对愈伤组织诱导的影响

幼胚、幼穗诱导能力在不同培养基上表现不同(表 2)。在 3 号培养基上幼胚培养能力较幼穗培养能力强, 诱导率分别为 84.53%, 46.63%; 在 2 号培养基表现正相反, 幼穗诱导能力比幼胚强, 诱导率分别是 51.55%, 32.66%; 在 1 号培养基上二者相近。表明除基因型和培养基外, 外植体也会影响愈伤组织形成。

表2 不同基因型燕麦幼胚、幼穗在不同培养基上的愈伤组织诱导率

Tab 2 Induction rate of immature embryo and inflorescence callus of 3 genotypes on several medium %

基因型 Genotypes	培养基 Medium							平均 Average	
	1	2	3	4	5	6	7		
幼胚 Immature embryo	861	79.61	27.96	85.70	30.00	39.51	51.14	27.50	48.77
	8202	45.60	16.07	73.60	33.80	42.50	52.81	40.70	43.58
	草苻一号	63.92	53.96	94.30	86.25	62.90	74.80	69.20	72.19
	平均	63.04	32.66	84.53	50.02	48.30	59.58	45.80	
幼穗 Inflorescence	861	70.78	63.55	52.00					62.11
	8202	45.80	34.00	35.49					38.43
	草苻一号	84.40	57.10	52.40					64.63
	平均	66.99	51.55	46.63					

表3 愈伤组织诱导率的方差分析

Tab 3 Analysis of variance of callus induction rate

变异来源 Sources	幼胚 Immature embryo				幼穗 Inflorescence				
	自由度 Df	均方 MS	F值 F value	F _{0.01}	自由度 Df	均方 MS	F值 F value	F _{0.05}	F _{0.01}
品种间	2	1 625.884 5	10.53**	6.93	2	626.862 2	13.79*	6.94	18.00
培养基间	6	805.503 0	5.21**	4.82	2	338.684 2	7.45*		
误差	12	154.396 6			4	45.449 6			

注: *, ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著

Note: *, ** Indicated Significant difference at 0.05 and 0.01 levels respectively

2.4 2, 4-D 浓度对愈伤组织继代保持的影响

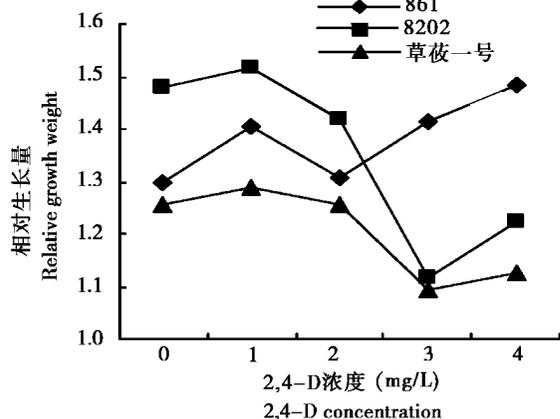


图1 不同处理对幼胚愈伤组织相对生长量的影响

Fig. 1 Difference of five treatments on relative growth weight of callus from immature embryo

经过 6 次继代的愈伤组织, 在含有不同浓度 2, 4-D 培养基中测定其相对生长量, 结果见图 1, 2。愈伤组织在不同 2, 4-D 浓度中以不同速度生长, 图 1 显示幼胚愈伤组织相对生长量, 随着 2, 4-D 浓度的增加, 3 种基因型变化趋势表现一致, 先略有升高, 随后明显下降, 之后又上升。图 2 显示幼穗愈伤组织相对生长量的变化, 随着 2, 4-D 浓度的增加, 不同基因型变化趋势表现不同, 861 表现为降、升、降, 8202 表现为逐渐下降, 草苻一号表现为升、降、平缓。同时 8202 和草苻一号愈伤组织状态也随浓度变化出现差异, 在含有 2, 4-D 2 或 3 mg/L 的培养基

上, 出现颗粒状疏松的胚性愈伤组织, 幼穗愈伤出现比例分别为 30.77%, 44.74%, 幼胚分别为 14.81%, 18.52%, 3 mg/L 2, 4-D 比 2 mg/L 更有利于愈伤组织继代保持。

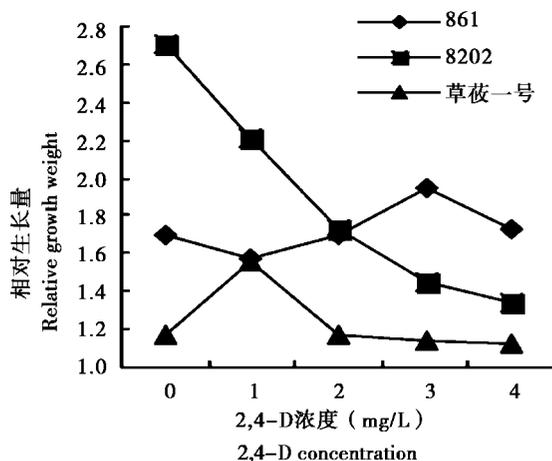


图2 不同处理对幼穗愈伤组织相对生长量的影响

Fig. 2 Difference of five treatments on relative growth weight of callus from inflorescence

草苻一号幼穗诱导的愈伤组织在培养过程中表现特殊, 一般禾本科植物继代培养时间最多 30 d, 而它在第 3 次继代生长 120 d 后, 愈伤仍然保持分化能力, 随后又以 30 d 为一个周期继续培养 5 次, 330 d 后, 46.58% 的愈伤组织仍然能分化绿苗, 它不仅长期继代, 而且还可延长继代培养时间, 这样的材料有利于进行细胞学、形态学、生理生化和遗传转化

等研究,在组织培养和基因工程研究中有很大潜力。

2.5 愈伤组织分化再生

经2次继代挑选胚性愈伤转入分化培养,结果列于表4。从3份材料平均值来看,幼穗愈伤组织分化再生力强,分化率为62.21%,绿苗再生率53.84%,幼胚愈伤分化力相对较弱,只有不足1/3的愈伤发生分化再生。3种基因型愈伤组织分化再

生、再生苗移栽成活表现不同,总的来看861幼穗产生的愈伤组织再生力、移栽成活率高,8202和草苻一号幼穗愈伤分化率高,再生率8202高于草苻一号,移栽成活率正好相反。在分化中不是所有的愈伤都能分化,只有胚性愈伤组织分化力强,形成绿苗,软黏的愈伤不能长出绿苗,没有再生能力。

表4 愈伤组织分化率、再生率和成活率

Tab 4 Differentiation rate, regeneration rate and survival rate of callus

%

基因型 Genotypes	幼胚 Immature embryo			幼穗 Inflorescence		
	愈伤分化率 Callus differentiation rate	绿苗再生率 Green shoot regeneration rate	移栽成活率 Transplant survival rate	愈伤分化率 Callus differentiation rate	绿苗再生率 Green shoot regeneration rate	移栽成活率 Transplant survival rate
861	23.21	19.64	76.19	68.80	50.40	84.13
8202	38.89	41.11	86.49	53.13	64.06	39.02
草苻一号	24.49	25.51	40.00	64.71	47.06	62.50
平均 Average	28.86	28.75	67.56	62.21	53.84	61.88

3 讨论

影响愈伤组织形成和植株再生能力的因素有基因型、培养基激素配比、外植体来源、糖源、pH值、光周期、继代时间等,从诸多因素中找到几个起主导作用的因素也很重要,研究认为籼稻基因型和培养基激素配比这两项最重要,这与内源激素的含量和比例有关^[6]。对于燕麦,基因型和培养基对愈伤组织诱导同样有显著作用,但它的内源激素代谢和激素间相互关系目前未见报道,机理尚不清楚。

在燕麦组织培养过程中,关键是提高愈伤组织分化能力,分化率的高低决定再生植株的多少。根据经验本试验只采用一种分化培养基,如果通过改变激素种类和浓度有可能进一步提高分化再生率。

鸣谢:此试验郭九峰研究员给予支持和帮助,表示感谢!

参考文献:

- [1] 杨海鹏,孙泽民. 中国燕麦[M]. 北京:农业出版社, 1989.
- [2] 王茅雁,傅晓峰,齐秀丽. 利用RAPD标记研究燕麦属不同种的遗传差异[J]. 华北农学报,2004,19(4):24-28
- [3] 付晓峰,李登明,王. 草用裸燕麦新品种“草苻一号”选育及应用前景[J]. 内蒙古农业科技,2002(专辑):40-41.
- [4] 冯俊. 开发燕麦产品的思路和建议[J]. 内蒙古农业科技,2000,(4):31-32
- [5] 付晓峰,刘俊青,刘建国,等. 国外引入燕麦种质资源在裸燕麦新品种选育中的应用[J]. 内蒙古农业科技,1999,(2):14-15.
- [6] 高振宇,黄大年. 影响籼稻愈伤组织形成和植株再生能力的因素[J]. 植物生理学通讯,1999,35(3):227-230.