

燕麦新品种燕科一号组织培养 特性及再生体系研究

贾利敏¹, 贾利欣², 付晓峰³

(1. 内蒙古农牧业科学院生物中心, 内蒙古呼和浩特 010031; 2. 内蒙古农业技术推广站,
内蒙古呼和浩特 010010; 3. 内蒙古农牧业科学院甜菜研究所, 内蒙古呼和浩特 010031)

摘要: 为建立燕麦遗传转化的高效植株再生体系, 选用裸燕麦新品种燕科一号的幼穗进行组织培养特性和再生体系研究。结果表明, 在 6 种诱导培养基上愈伤组织状态和诱导率差异不大; 在进一步继代培养过程中愈伤组织出现明显差异, 其中培养基 Y2 和 J 结合培养效果好; 愈伤组织分化产生绿色芽点和绿苗, 二者分化率呈显著正相关; 绿苗分化适宜的激素配比是 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.4 mg/L + NAA 0.4 mg/L, 有 84.90% 的愈伤组织分化成苗, 其中 KT 的作用较 6-BA、NAA 强; 在 1/2MS 培养基上再生苗容易生根, 生根率达到 89.64%, 移栽成活率 91.05%; 幼穗取样以 0.5~1.0 cm 最为理想。

关键词: 燕麦; 燕科一号; 幼穗; 愈伤组织; 植株再生体系

中图分类号: S512.1; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2006)06-0042-04

Tissue Culture Response and Regeneration System of the New Oat Variety Yanke 1

JIA Li-min¹, JIA LI-xin², FU Xiao-feng³

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

2. Agricultural Technique Extension Station of Inner Mongolia, Huhhot, Inner Mongolia 010010, China;

3. Sugarbeet Institute, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot, Inner Mongolia 010031, China)

Abstract: In order to establish a high efficient plant regeneration system for gene gun transformation, the tissue culture response and regeneration system of oat were studied by using inflorescences of the new variety Yanke 1. The results showed that the callus states and inducing frequency of oat were similar in six induction medium, but there were significant difference among the callus under different medium in subculture. The culture effect was very good when medium Y2 used in combination with medium J. The differentiating frequency of green buds and green shoots exited significant and positive correlation. Based on the orthogonal test, 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.4 mg/L + NAA 0.4 mg/L were the optimal composition of medium for green shoots differentiation from callus and their frequency was 84.90%, KT had a better effect on differentiation than 6-BA and NAA. Roots inducing of regenerated shoots were easier on 1/2 MS medium and the frequency of root inducing and transplant survival were 89.64% and 91.05%, respectively. Meanwhile the optimal length of inflorescence was 0.5~1.0 cm.

Key words: Oat; Yanke 1; Inflorescence; Callus; Plant regeneration system

燕科一号是内蒙古农牧业科学院最新育成的旱地裸燕麦饲用型新品种。燕科一号综合性状和群体结构好, 结实小穗数、粒重、穗粒数连续 3 年在内蒙古区试中均居第 1 位。在生产示范中, 籽粒产量比当地主栽品种增产 45.7%, 秸秆产量增

产 3.6%, 蛋白质含量 13.6%, 脂肪含量 7.6%, 品质好, 抗旱、抗倒力强, 稳产性好, 适宜在内蒙古、山西、河北、辽宁、甘肃等北方燕麦主产区旱地种植^[1]。国外研究认为, 在燕麦转化受体方面存在的主要问题是基因型依赖性, 一些农艺性状较好

收稿日期: 2006-03-20

修回日期: 2006-06-05

基金项目: 内蒙古自治区科技厅“十五”攻关项目(200201)。

作者简介: 贾利敏(1963-), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事细胞工程和基因工程研究。

的栽培品种因不能建立良好的再生系统而无法使用^[2,3],目前国内尚未见相关报道。鉴于此,本研究以燕科一号幼穗为材料,对其愈伤组织的形成、分化和再生进行研究,旨在建立高效植株再生系统,为遗传转化技术在燕麦品种改良中的应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

燕科一号幼穗采自温室,在孕穗初期剪取生长整齐一致的植株最上部节,取出幼穗,先 75% 酒精浸泡 2 min,无菌水冲洗,再用 10% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min,无菌水冲洗 4~5 次,切段备

用。

1.2 培养基及培养条件

基本培养基为 MS,分别添加不同种类和浓度的激素、水解酪蛋白(CH)、L-脯氨酸(L-Pro)及蔗糖,分别组成诱导培养(Y1~Y6)、继代培养基(J)、分化培养基(D1~D9)(具体成分详见表 1),生根培养基为去掉激素的 1/2 MS。分化培养基的优化筛选采用 $L_9(3^4)$ 设计进行 3 因素 3 水平的正交试验^[4](表 2),所有培养基用 0.7%(W/V)琼脂固化,pH 5.8,121℃ 高温灭菌 20 min。诱导、继代、分化、生根每日光照 12 h,培养温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 。

表 1 培养基成分

Table 1 Medium composition(1L)													
培养基 Medium	2,4-D (mg)	NAA (mg)	KT (mg)	CH (mg)	Pro (mg)	蔗糖(g) Sucrose	培养基 Medium	6-BA (mg)	NAA (mg)	KT (mg)	CH (mg)	Pro (mg)	蔗糖(g) Sucrose
Y1	1	1	0	200	500	20	D1	0.5	0	0	200	0	30
Y2	2	1	0.5	400	0	20	D2	0.5	0.2	0.2	200	0	30
Y3	2	2	0	200	300	40	D3	0.5	0.4	0.4	200	0	30
Y4	3	0	0	400	0	40	D4	1	0.2	0	200	0	30
Y5	4	1	0	0	0	30	D5	1	0.4	0.2	200	0	30
Y6	5	2	0	400	500	30	D6	1	0	0.4	200	0	30
J	3	0	0	200	0	30	D7	0	0.4	0	200	0	30
							D8	0	0	0.2	200	0	30
							D9	0	0.2	0.4	200	0	30

表 2 $L_9(3^4)$ 因子水平表

Table 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ design			
水平 Levels	因素 Factors		
	A 6-BA(mg/L)	B KT(mg/L)	C NAA(mg/L)
1	0.5	0	0
2	1.0	0.2	0.2
3	0	0.4	0.4

表 3 不同长度幼穗对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of length of inflorescences on callus induction			
幼穗长度(cm) Length of inflorescence	接种数 No. of inoculated	愈伤数 No. of callus formed	诱导率(%) Frequency of callus induced
0.5~1.0	112	90	80.36
1.1~2.0	122	83	68.03
2.1~4.0	125	68	54.40

2 结果与分析

2.1 幼穗发育时期对愈伤组织诱导的影响

将幼穗按 0.5~1.1、1.1~2.0、2.1~4.0 cm 分为 3 组在 Y2 培养基中进行诱导培养,培养 4 周统计出愈结果。由表 3 可知,不同长度的幼穗愈伤诱导率和生长状态表现不一,表现最好的是 0.5

~1.0 cm 的幼穗,不仅诱导率高(80.36%),而且主要形成黄色疏松颗粒状胚性愈伤,是诱导愈伤的适宜长度;2.1~4.0 cm 的幼穗,形成胚性愈伤数量很少,多数是质地软而呈透明状的愈伤,被长出的颖片包裹;1.1~2.0 cm 的幼穗形成的胚性愈伤介于二者之间,也有颖片长出。

2.2 幼穗愈伤组织的诱导效果

将 0.5~2.0 cm 长的幼穗切段接种,3 d 后开始膨大变形,第 8 天切段周围出现愈伤组织,呈透明软粘状。随着培养时间的延长,愈伤逐渐变大,20 d 后出现质地黄色的胚性愈伤组织,4 周后统计愈伤数。由表 4 可知,6 种诱导培养基都能产生愈伤组织,除 Y3 诱导率最低(49.15%)外,其余集中在 68.63%~78.69%之间,出愈率相近,而且都形成胚性愈伤,差异不明显。进一步将生长状态良好的愈伤转入继代培养基 J 培养,4 周后愈伤状态出现明显差别,表现最好的是从 Y2 培养基转入的愈伤,其色泽鲜黄块大,胚性愈伤生长旺盛,而且没有出现褐化愈伤(图 2A);其次是由 Y5、Y6 培养基转入的愈伤,大部分保持胚性,少部分变得软粘,颜色暗,出现轻度褐化;Y1、Y3、

Y4 培养基愈伤质量最差,一少部分为黄白色,保持疏松愈伤,一少部分变为透明软粘状,大部分愈伤颜色变褐,生长停止。综合比较愈伤诱导率和愈伤状态可知,Y2 培养基诱导的愈伤出愈率不是最高,但在 J 培养基中愈伤生长状态表现良好,不仅能保持愈伤组织的胚性,而且能促进愈伤生长,适合愈伤组织诱导和继代。

表 4 不同培养基对幼穗愈伤组织诱导的影响
Table 4 Effects of different medium on callus induction of in florescences

培养基 Medium	接种数 No. of inoculated	愈伤数 No. of callus formed	诱导率(%) Fre. of callus induced
Y1	122	96	78.69
Y2	126	90	71.43
Y3	118	58	49.15
Y4	124	90	72.58
Y5	102	70	68.63
Y6	126	98	77.78
平均 Average			69.71

2.3 幼穗愈伤组织分化再生培养

将经过诱导培养基 Y2 和继代培养基 J 培养后得到的愈伤组织转入分化培养基,2 d 后可在愈伤表面看到绿色芽点,随后在芽点处分化形成绿苗(图 2B、2C),但并不是全部绿色芽点发育成绿苗,有的不能继续分化,也有的能分化 2~3 个绿苗。由表 5 可看出,在同一种分化培养基上,基本上表现为绿色芽点分化率高,绿苗分化率也高,反之绿点分化率低,绿苗分化率也低,经相关性测验,两者之间呈极显著正相关($r=0.8543, t=5.921, t_{0.01}=3.499$)。

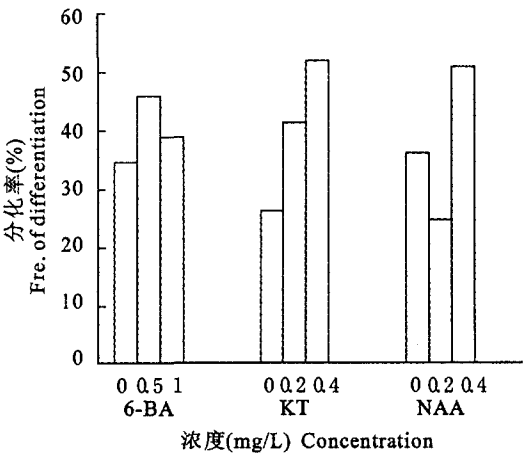


图 1 不同激素对绿苗分化率的影响
Fig. 1 Effect of hormones on frequency of green shoots differentiation

以绿苗分化率为指标,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验,对愈伤组织的分化培养基进行优化筛选(表 5),表 5 结果显示,9 种分化培养基都能产生绿色芽点和绿苗,但不同培养基之间差异较大,D3 培养基对应的愈伤组织分化率最高,有 84.9% 的愈伤形成绿苗,培养基组合是 $A_1B_3C_3$,即激素配比为 6-BA 0.5 mg/L、KT 0.4 mg/L、NAA 0.4 mg/L。通过各个因素水平值的计算得出最佳培养基组合也是 $A_1B_3C_3$,二者结果一致,因此 D3 培养基为最优组合,为燕科一号幼穗愈伤分化的最适培养基。

表 5 不同激素影响下愈伤组织分化的试验结果

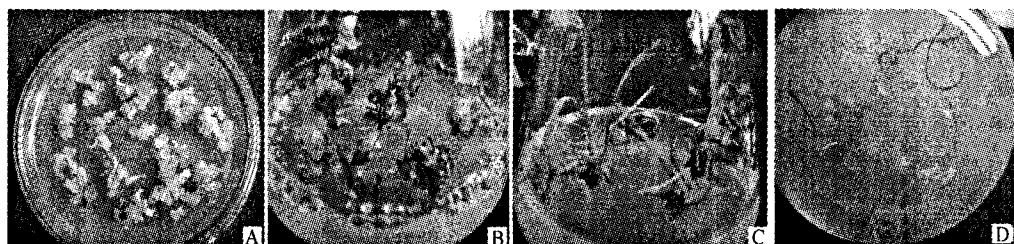
Table 5 Result of callus differentiation under different hormones

培养基 Medium	因素 A Factor A (6-BA)	因素 B Factor B (KT)	因素 C Factor C (NAA)	绿点分化率(%) Fre. of green buds differentiaed	绿苗分化率(%) Fre. of green shoots differentiaed
D1($A_1B_1C_1$)	1(0.5)	1(0)	1(0)	22.7	15.9
D2($A_1B_1C_1$)	1(0.5)	2(0.2)	2(0.2)	57.9	36.8
D3($A_1B_1C_1$)	1(0.5)	3(0.4)	3(0.4)	88.4	84.9
D4($A_1B_1C_1$)	2(1.0)	1(0)	2(0.2)	42.9	34.3
D5($A_1B_1C_1$)	2(1.0)	2(0.2)	3(0.4)	55.6	38.9
D6($A_1B_1C_1$)	2(1.0)	3(0.4)	1(0)	73.5	44.1
D7($A_1B_1C_1$)	3(0)	1(0)	3(0.4)	62.1	27.6
D8($A_3B_2C_1$)	3(0)	2(0.2)	1(0)	60.6	48.5
D9($A_3B_3C_2$)	3(0)	3(0.4)	2(0.2)	45.0	27.5
总和 Total	水平 1 Level 1	1 137.6	77.8	108.5	
	水平 2 Level 2	117.3	124.2	98.6	
	水平 3 Level 3	103.6	156.5	151.4	
平均 Average	水平 1 Level 1	45.9	25.9	36.2	
	水平 2 Level 2	39.1	41.4	24.7	
	水平 3 Level 3	34.0	52.2	50.5	
	极差 R	34.5	78.7	52.8	

2.4 激素在绿苗分化中的作用

从表 5 极差值(R)可以看出,B 因素极差值最大,C 因素极差值次之,A 因素极差值最小,说明 KT 对绿苗分化影响最大,其次是 NAA,影响最小的是 6-BA,表明不同激素对绿苗分化的影响程度不同。由图 1 可以看出,随着 KT 含量的增

加,绿苗分化率呈上升趋势,而且差异明显,随着 NAA 含量增加,绿苗分化率呈先下降后上升趋势,差异明显;随着 6-BA 含量的增加,绿苗分化率有先上升后下降的趋势,差异较明显,这说明激素浓度不同对绿苗分化的影响趋势不同。



A. 由 Y2 到 J 培养基诱导的愈伤组织;B. D3 上分化的绿芽;C. D3 上再生的绿苗;D. 绿苗的再生根

A. Callus induced from Y2 to J medium; B. Green buds differentiated on D3; C. Green shoots regenerated on D3; D. Regenerated roots of green shoots

图 2 燕科一号幼穗的组织培养

Fig. 2 Tissue culture of inflorescences from Yanke 1

2.5 再生苗根系生长和移栽

再生苗长到 2~3 cm 时,及时转入生根培养,(图 2D)。最早观察到生根是在培养 1 周,大部分苗集中在 2 周左右长根,个别也有 4 周左右才看到根。4 周后有 89.64% 的苗长出根,成为完整的再生植株。待根长到 3 cm 以上,敞开瓶口炼苗 1~2 d 后,移入蛭石和珍珠岩各半的营养钵里生长,再生植株成活率高达 91.05%。

3 讨论

培养基中的激素种类及其浓度配比对组织培养的效果有重要影响。根据经验,6-BA 是禾本科作物绿苗分化的主要细胞分裂素,而且在以燕麦幼胚、成熟胚为外植体的培养过程中,6-BA 是分化必不可少的激素。本试验在绿苗分化过程中,6-BA 极差却是最小,其原因可能是所选水平变动没有反映出该因素的重要性,也可能是与 KT、NAA 所设浓度范围有些窄有关,这还有待于进一步确定。

幼穗长度影响愈伤组织的形成,但在长度的

确定上因研究材料不同得到的结果也有区别。范银燕等^[5]的研究认为,裸燕麦以 1.0~2.0 cm 的幼穗为适宜,笔者认为 0.5~1.0 cm 的裸燕麦幼穗是理想的接种材料,这种差异可能与所选用材料的基因型不同有关,这在水稻幼穗^[6]研究上也有过报道。

参考文献:

- [1]刘俊青,付晓峰. 旱地裸燕麦新品种“燕科一号”的选育[J]. 内蒙古农业科技,2004(5): 31.
- [2]王茅雁,齐秀丽,张凤英. 国外燕麦分子生物学研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报,2001, 22(4):139-144.
- [3]K. A. Torbert, H. W. Rines, D. A. Somers. Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures[J]. Crop Sci., 1998, 38: 226-231.
- [4]盖钧益主编. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
- [5]范银燕,崔林. 裸燕麦幼穗离体培养的研究[J]. 内蒙古农业科技,1995,(1):21-23.
- [6]王亚琴,段中岗,黄江康,等. 水稻幼穗培养高效再生系统的建立[J]. 植物学通报,2004,21(1):52-60.