

黎 萍, 黄秋伟, 彭靖茹, 等. 木薯胚性愈伤组织诱导及其离体保存的研究 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 48–52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.014

木薯胚性愈伤组织诱导及其离体保存的研究

黎 萍, 黄秋伟, 彭靖茹, 石兰蓉, 李慧敏

(广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西南宁 530001)

摘要:以 4 个不同木薯品种(SC205、GR3、GR891、GR911)的无菌苗幼叶或带有腋芽的茎段为试验材料, 研究不同植物生长调节剂浓度及组合对其胚性愈伤组织诱导的影响, 并对其离体保存条件进行了研究。结果表明:2,4-D 和毒莠定对 4 个不同木薯品种的幼叶及腋芽均能诱导出胚性愈伤, 诱导能力为 GR3 最高, 其次为 SC205。4 个品种以幼叶或腋芽为试料, 在毒莠定或 2,4-D 为 12 mg/L 时(除 GR911 幼叶、GR891 腋芽), 诱导效果最佳; 相同木薯品种在不同激素组合的诱导条件下, IBA+6-BA 浓度为(1.5+0.8)mg/L 组合诱导胚性愈伤分化数量多于单独使用 IBA、6-BA, 表现出一定的显著差异性。在 20 ℃ 条件下, 将 GR3 木薯胚性愈伤组织保存在添加比久(B₉)或烯效唑浓度为 6 mg/L 的保存培养基(含 12 mg/L 毒莠定+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 脂琼的 GD 培养基, pH 值 5.8)中, 保存效果最佳, 继代时间延长至 80 d。

关键词:木薯; 胚性愈伤; 离体保存; 蔗糖; B₉; 烯效唑; 细胞活力

中图分类号: Q943.1; S533.043

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)02-0048-04

木薯(Cassava)是大戟科(Euphorbiaceae)木薯属(*Manihot*)的灌木状植物, 是世界 3 大薯类作物之一^[1], 在我国广为栽培, 主要栽培于热带和亚热带地区。木薯的栽培及加工利用在农业生产中占有重要的地位, 目前世界各木薯生产国收集保存的木薯种质已有 8 500 多份^[2], 国内主要采用种质资源圃的形式对木薯种质资源进行保存, 这种保存方式需要大量的土地和人力资源, 成本高, 保存数量有限, 且易遭受各种自然灾害的侵袭^[3]。离体保存技术的迅速发展^[4], 为长期有效地保存木薯种质资源提供了新的有价值的手段, 由于其具有省时、省地、省空间和无病虫害侵害等优点, 目前正广泛用于生产实践的各个领域。有关木薯胚性愈伤组织离体保存的研究较少, 因此, 笔者以广西壮族自治区亚热带作物研究所提供的木薯品种为试验材料, 进行了木薯胚性愈伤组织诱导及其离体保存的研究, 以期对木薯种质资源的长期离体保存提供参考依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试品种 供试木薯品种 SC205、GR891、GR911、GR3 均由广西木薯研究所、广西亚热带作物研究所提供。

1.1.2 试验仪器 主要仪器有电子分析天平、超净工作台、高压灭菌锅、紫外可见分光光度计、电热恒温培养箱、循环水真空泵。

1.1.3 试剂 甲醇、保险粉(Na₂S₂O₄)、氧化三苯基四氮唑(TTC)粉、石英砂、蔗糖、琼脂、2,4-D、6-BA、IBA、毒莠定、

B₉、烯效唑等。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导改良分化培养基配制 M₁ 培养基: MS+2 mol/L CuSO₄+2% 蔗糖+0.3% 琼脂, pH 值 6.0; M₂ 培养基: M₁+12.0 mg/L 6-BA; M₃ 培养基: M₁+毒莠定或 2,4-D; M₄ 培养基: M₁+6-BA/IBA, 或 M₁+6-BA+IBA。

1.2.2 无菌外植体获取 取上述 4 个不同木薯品种无菌苗茎切段在 M₁ 培养基上继代培养扩繁, 获得大量无菌苗备用。

1.2.3 腋芽及幼叶的膨大诱导 取在 M₁ 培养基上培养 4 周的无菌苗, 切取 1.0~1.5 cm 带腋芽的茎段或者幼叶, 将其水平放置在 M₂ 培养基上, 30 个/皿, 培养温度 26 ℃, 每天光照 16 h(800~1 000 lx), 膨大培养 3~7 d, 观察记录。

1.2.4 胚性愈伤组织的诱导 2,4-D 及毒莠定是 2 种最常用的诱导胚性愈伤的激素, 优化激素浓度组合研究中设定 2,4-D 及毒莠定的浓度梯度均为 6、12、14、18 mg/L。在 M₁ 中分别添加不同浓度的 2,4-D 或毒莠定, 即为诱导培养基 M₃。挑取已膨大的芽点(约 1 mm)或者从茎尖挑取 1~2 mm 幼叶, 转移到 M₃ 培养基, 30 个/皿, 5 皿/处理, 26 ℃ 暗培养。每 2 d 在体视显微镜下观察胚性愈伤的发生情况, 第 4 天开始记录, 统计外植体形成初生胚的数目, 计算出胚率。当球形或鱼雷形胚出现, 则将其转移、继代到新鲜 M₃ 培养基上备用。

1.2.5 体细胞胚的继代、成熟 将 M₃ 培养基上诱导获得的初生胚状体从培养块分离, 转移到新鲜的 M₄ 上继代培养, 诱导次生胚状体发生和增殖, 2 周继代 1 次, 建立循环培养; 观察、统计增殖速率。

1.2.6 胚性愈伤组织保存条件的筛选方法 选择由品种 GR3 腋芽诱导出的颗粒状胚性愈伤组织, 在显微镜下用针头挑出较纯化的胚性愈伤, 以含有 12 mg/L 毒莠定、30 g/L 蔗糖、6.5 g/L 琼脂的 GD 培养基(pH 值 5.8)为常规保存培养基, 每 20 d 继代 1 次, 培养条件为温度 25 ℃, 光照度 800~1 000 lx, 光照时间 12 h/d。

收稿日期: 2014-05-29

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金(编号: 2012GXNSFAA053072)。

作者简介: 黎 萍(1966—), 女, 广西博白人, 农艺师, 主要从事植物组织培养与快速繁殖研究。Tel: (0771) 2539097; E-mail: lipingx1026@163.com。

1.2.7 离体保存试验方法

1.2.7.1 不同浓度蔗糖处理对木薯胚性愈伤保存的影响
将愈伤组织接种在分别附加 10、20、30、40、50 g/L 蔗糖的 GD + 12 mg/L 毒莠定 + 6.5 g/L 琼脂固体培养基中,以添加 25 g/L 蔗糖的培养基为对照。

1.2.7.2 生长抑制剂处理对木薯胚性愈伤保存的影响
将待保存的愈伤组织接种在分别附加 2、4、6、8、10 mg/L 的 B₉、烯效唑(S3307)的 GD + 12 mg/L 毒莠定 + 6.5 g/L 脂琼 + 25 g/L 蔗糖固体培养基中,以不附加抑制剂为对照。

不同浓度蔗糖浓度和生长抑制剂处理的愈伤组织均放置在培养温度 20 ℃、光照度 1 500 ~ 2 000 lx、光照时间 12 h/d 的条件下,第 1 次于培养 20 d 观察,以后每 15 d 观察 1 次,测定其生长量和细胞活力。

1.2.7.3 不同温度处理对木薯胚性愈伤保存的影响
将正常保存接种后的材料分别于 0、10、15、20、26 ℃ 下保存,以 26 ℃ 下正常培养的材料为对照,光照时间和测定内容与上述方法相同。

1.2.7.4 细胞活力测定方法
木薯胚性愈伤细胞活力的 TTC 法测定参照白宝璋的方法^[5]并略有改动。主要步骤如下:(1)取 0.25 mL 0.4% TTC 溶液,加 9.75 mL 乙酸乙酯和少量保险粉于 10 mL 容量瓶中,充分摇动,以所生成的红色 TTF 溶液作为已知母液,取 5 支 10 mL 容量瓶,按照表 1 所给数据配制系列浓度溶液,并用甲醇定容。用紫外分光光度计比色,以甲醇作空白对照,检测波长 485 nm,记录 D_{485 nm} 值。并以 D_{485 nm} 值为纵坐标、以 TTF 的含量为横坐标,绘制出以甲醇为溶剂的标准曲线,详见图 1。

表 1 TTF 系列浓度溶液的配制

每管 TTF 含量 (μg)	试剂用量(mL)	
	母液	甲醇
25	0.25	9.75
50	0.50	9.50
100	1.00	9.00
150	1.50	8.50
200	2.00	8.00

(2)称取以上各处理保存时间分别在 20、35、50、65、80 d 的愈伤保存材料各 0.5 g,放入小烧杯中,加入 0.4% TTC 溶液和磷酸缓冲液(pH 值 7.0)各 5 mL,使愈伤组织充分浸没在溶液内,在 37 ℃ 下暗保温 1 h,此后立即加入 2 mL 1 mol/L H₂SO₄溶液以停止反应(与此同时做空白试验,先加硫酸,再

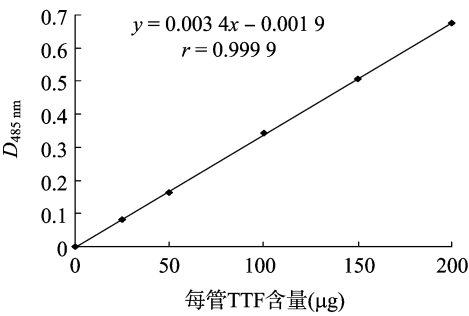


图1 TTF 标准曲线

加样品,37 ℃ 下暗保温 1 h)。

(3)将胚性愈伤取出,用循环水真空泵滤干水分,再用滤纸压干愈伤水分,放入试管中,加入 5 mL 甲醇溶液,然后将试管置于 35 ℃ 保温箱 3 h,使愈伤组织完全变白。将红色提取液移入容量瓶,最后加甲醇,使总量为 10 mL,用分光光度计在波长 485 nm 下比色,以空白对照试验作参比测出吸光度 D_{485 nm},查标准曲线,求出 TTC 还原量。

(4)结果计算:愈伤组织活力值[mg/(g · h)] = TTC 还原量(μg)/[愈伤组织质量(g) × 时间(h)];生长量(g) = 愈伤组织的终质量(g) - 愈伤组织接种质量(g)。

2 结果与分析

2.1 2 种植物生长调节剂对诱导幼叶愈伤组织的影响

表 2 试验结果表明,2,4 - D 和毒莠定对 4 个木薯品种的幼叶均能诱导胚性愈伤。运用 DPS v7.05 软件 LSD 法分析可知,不同木薯品种在相同的诱导条件下,GR3 的幼叶诱导胚性愈伤的平均数量多于 SC205、GR891、GR911,说明 GR3 的幼叶诱导能力最高,其次为 SC205、GR891、GR911 的诱导能力较差;相同木薯品种在不同激素水平诱导条件下,2,4 - D 浓度为 12、14 mg/L 时,除 GR911、GR891 外,幼叶诱导胚性愈伤的数量均高于浓度为 6、18 mg/L;毒莠定浓度为 12、14 mg/L 时,幼叶诱导胚性愈伤的数量高于浓度为 6、18 mg/L,而且差异显著。4 个品种中,除 GR911 在 2,4 - D 为 14 mg/L 时诱导效果好于 12 mg/L 外,其余 3 个品种均在 2,4 - D 为 12 mg/L 时诱导效果最好。综合 2 种生长调节剂在不同浓度下的诱导愈伤效果来看,以幼叶为材料,4 个品种均在毒莠定为 12 mg/L 时的诱导效果表现较好,木薯品种间的基因型对诱导胚性愈伤的能力表现出明显差异。

表 2 2,4 - D 及毒莠定对 4 个木薯品种幼叶诱导胚性愈伤的影响

激素种类	浓度 (mg/L)	诱导形成的愈伤数量(个)			
		SC205	GR891	GR911	GR3
2,4 - D	6	10.0 ± 2.55b	10.0 ± 1.87b	8.0 ± 2.35b	14.0 ± 2.74b
	12	14.0 ± 3.08a	13.0 ± 2.34a	8.0 ± 1.87b	20.0 ± 1.87a
	14	13.2 ± 1.92a	10.0 ± 1.87b	14.0 ± 5.09a	20.0 ± 3.32a
	18	9.0 ± 2.35b	9.0 ± 1.22b	9.0 ± 1.87b	13.0 ± 3.08b
毒莠定浓度	6	10.0 ± 4.85b	10.2 ± 2.05b	11.0 ± 1.41b	14.0 ± 2.35b
	12	15.0 ± 3.08a	15.2 ± 2.28a	14.0 ± 3.67a	20.0 ± 2.65a
	14	13.0 ± 5.24a	12.0 ± 4.36a	13.0 ± 2.0a	20.0 ± 2.00a
	18	9.0 ± 1.22b	9.0 ± 1.58b	9.0 ± 1.22b	13.0 ± 1.00b

注:数据为平均值 ± 标准误(n = 5);同一行/列的不同小写字母表示处理间的指标表现差异显著(P < 0.05)。表 3、表 4 同。

2.2 2 种植物生长调节剂对腋芽诱导愈伤组织的影响

表 3 试验结果表明,2,4-D 和毒莠定对 4 种木薯栽培品种的腋芽均能诱导出胚性愈伤。运用 DPS v7.05 软件 LSD 法分析可知,不同木薯品种在相同的诱导条件下,GR3、SC205 的腋芽诱导胚性愈伤的数量多于 GR891、GR911,与幼叶诱导效果一致。2,4-D 和毒莠定在 12、14 mg/L 浓度下对 4 个品

种的诱导效果均明显好于 6、18 mg/L,且 4 个品种均在毒莠定、2,4-D 为 12 mg/L 时诱导效果最好(除 GR891)。综合 2 种生长调节剂不同浓度的表现来看,以腋芽为材料,品种间诱导胚性愈伤的能力有较大差异,大致可以分为 2 组,即 GR3、SC205 为 1 组,GR891、GR911 为 1 组,且前 1 组的诱导效果要明显好于后 1 组。

表 3 2,4-D 及毒莠定对 4 个木薯品种腋芽诱导胚性愈伤的影响

激素种类	浓度 (mg/L)	诱导形成的愈伤数量(个)			
		SC205	GR891	GR911	GR3
2,4-D	6	14.0±3.16b	13.0±3.74b	13.0±2.74b	19.0±2.00b
	12	27.0±2.45a	17.0±1.41a	17.0±1.73a	28.0±2.00a
	14	25.0±4.30a	18.0±1.58a	15.0±2.55a	26.0±3.87a
	18	14.2±2.95b	10.0±1.73b	10.0±0.71b	18.0±1.87b
毒莠定	6	18.0±3.39b	14.2±2.68b	13.0±4.06b	18.0±1.73b
	12	30.0±0.00a	19.0±1.73a	14.0±4.74a	28.0±0.71a
	14	23.0±2.74a	16.0±2.55a	13.0±2.65b	26.0±2.45a
	18	17.2±3.11b	11.0±2.00b	10.0±1.87b	19.0±1.87b

2.3 植物生长调节剂组合对诱导愈伤组织分化的影响

运用 DPS 7.05 软件 LSD 法对表 4 试验结果进行分析可知,除 GR891,相同木薯品种在不同激素组合的诱导条件下,IBA+6-BA 诱导胚性愈伤分化数量多于 IBA、6-BA,且存在显著差异;而 IBA、6-BA 间的差异性不明显,诱导效果优越性排序为 IBA+6-BA>IBA>6-BA。除 GR911,相同木薯品种在不同激素水平诱导条件下,IBA 浓度为 1.5、2.0 mg/L 时,诱导胚性愈伤分化数量的数量多于 1.0 mg/L,表现显著差异;相同木薯品种在不同激素水平诱导条件下,6-BA 浓度为 0.8 mg/L 时,诱导胚性愈伤分化数量多于 0.4、1.2 mg/L,表

现显著差异;相同木薯品种在不同激素水平诱导条件下,IBA+6-BA 浓度为(1.5+0.8) mg/L 诱导胚性愈伤分化数量多于(1.5+0.4)、(1.0+0.4) mg/L,差异明显或显著。

IBA、6-BA 单独使用均能使木薯 4 个品种的胚性愈伤发生不同程度的分化,但二者的组合均比单独使用时效果明显提高,说明二者之间具有一定程度的协同作用。1.5 mg/L IBA+0.8 mg/L 6-BA 的组合诱导 4 种木薯品种胚性愈伤的分化效果最好。从品种间整体愈伤诱导差异来看,GR3 略优于 SC205,但均明显优于 GR911,整体愈伤诱导最差的是 GR891,说明不同品种间的差异还是比较明显的。

表 4 不同激素组合水平对 4 个木薯品种胚性愈伤分化的影响

激素种类	浓度 (mg/L)	诱导形成的愈伤数量(个)			
		SC205	GR891	GR911	GR3
IBA	1.0	10.4±1.82b	10.0±3.08b	11.0±2.24a	12.4±2.79c
	1.5	18.8±2.17a	13.2±1.10a	10.0±2.45a	22.0±3.74a
	2.0	16.0±3.74a	12.6±2.88a	11.0±2.55a	16.8±3.03b
6-BA	0.4	14.0±1.41a	13.0±4.00a	8.0±1.87b	12.8±3.90a
	0.8	15.0±2.45a	13.6±1.95a	11.4±2.51a	13.4±3.91a
	1.2	11.0±2.00b	12.0±3.24b	8.8±2.28b	11.4±1.34b
IBA+6-BA	1.0±0.4	18.4±1.52b	10.4±0.89b	16.2±2.95b	18.8±3.70b
	1.5±0.4	20.6±3.13a	11.8±3.96b	17.4±3.44b	21.0±2.35a
	1.5±0.8	21.2±2.59a	15.2±1.48a	18.0±2.12a	22.0±4.85a

2.4 不同处理对木薯胚性愈伤保存的生长量及细胞活力的影响

从表 5 可见,随着保存时间的延长,各处理组及对照组均表现出生长量增加、细胞活力下降的趋势,但生长量和细胞活力下降幅度各异,其中生长抑制剂 B₉、烯效唑浓度均在 6 mg/L 时表现效果最佳。

在蔗糖浓度低于 30 g/L 时,随着蔗糖浓度升高,木薯愈伤组织的周期增殖量总体看来也在增大,添加 30 g/L 蔗糖的处理,20 d 增殖量达到 2.04 g,细胞活力值达 0.545 mg/(g·h),细胞活力高于对照;而后随着蔗糖浓度继续升高,愈伤组织增殖量反而有所下降,因为愈伤组织不能进行光合作用,完全处于一种异养状态,当培养基中的碳源供应不足时,组织长期处

于碳饥饿状态,生长受阻;当蔗糖浓度继续提高时,培养基渗透压增加,超出一定浓度,愈伤组织吸收水和养分受阻,抑制了生长^[6]。

B₉ 能够提高培养基的渗透压,从而抑制材料的生长,因此常作为生长调节物用于缓慢生长保存,本试验用 B₉ 保存也得到了较好的结果,添加 6、8 mg/LB₉,经过 50 d 保存后,愈伤组织生长量分别达到 2.87、2.45 g,细胞活力分别达到 0.426、0.311 mg/(g·h),细胞活力明显高于对照;随着 B₉ 浓度继续升高,添加 10 mg/L B₉,对愈伤组织的生长及细胞活力影响明显,严重抑制材料的增殖,并影响到其活力,因此,添加 6 mg/L B₉ 有利于提高木薯胚性愈伤组织生长量和细胞活力。

在常规保存培养基中添加不同浓度的生长抑制剂烯效唑

表 5 不同保存条件下木薯胚性愈伤组织生长量和细胞活力的比较

保存处理	不同保存时间愈伤组织的生长量(g)					不同保存时间愈伤组织的细胞活力[mg/(g·h)]				
	20 d	35 d	50 d	65 d	80 d	20 d	35 d	50 d	65 d	80 d
蔗糖 10 g/L	1.50	1.84	2.05	2.12	2.14	0.279	0.234	0.184	0.063	0.057
蔗糖 20 g/L	1.46	1.89	1.95	2.12	2.45	0.367	0.317	0.254	0.196	0.145
蔗糖 30 g/L	2.04	2.78	3.00	3.05	3.12	0.545	0.526	0.375	0.286	0.213
蔗糖 40 g/L	1.42	1.79	2.01	2.37	2.58	0.425	0.371	0.337	0.206	0.127
蔗糖 50 g/L	1.20	1.25	1.56	1.89	2.01	0.271	0.177	0.157	0.129	0.118
B ₉ 2 mg/L	1.12	1.82	2.07	2.48	2.86	0.306	0.256	0.198	0.155	0.131
B ₉ 4 mg/L	1.43	2.21	2.87	3.23	3.45	0.436	0.302	0.235	0.191	0.174
B ₉ 6 mg/L	1.98	2.36	2.87	2.94	3.56	0.580	0.485	0.426	0.369	0.220
B ₉ 8 mg/L	1.89	2.23	2.45	2.87	3.10	0.508	0.481	0.311	0.249	0.167
B ₉ 10 mg/L	1.75	1.89	2.23	2.45	2.75	0.410	0.323	0.295	0.205	0.154
烯效唑 2 mg/L	1.23	1.56	2.05	2.35	2.87	0.398	0.337	0.268	0.221	0.153
烯效唑 4 mg/L	1.56	1.79	2.26	2.75	2.90	0.485	0.352	0.231	0.189	0.128
烯效唑 6 mg/L	2.02	2.36	2.72	2.98	3.78	0.542	0.471	0.351	0.229	0.197
烯效唑 8 mg/L	1.85	2.14	2.36	2.85	3.18	0.415	0.308	0.219	0.178	0.112
烯效唑 10 mg/L	1.42	1.68	1.96	2.10	2.23	0.318	0.279	0.171	0.119	0.101
温度 0 ℃	0.21	0.25	0.28	0.30	0.34	0.119	0.062	0.052	0.000	0.000
温度 10 ℃	0.54	0.65	0.87	0.89	0.97	0.156	0.083	0.052	0.034	0.013
温度 15 ℃	1.06	1.34	1.39	1.42	2.03	0.215	0.182	0.164	0.102	0.094
温度 20 ℃	1.42	1.89	2.32	2.58	2.67	0.354	0.325	0.298	0.221	0.175
CK	2.18	2.69	3.12	3.54	3.82	0.342	0.242	0.101	0.047	0.012

(S₃₃₀₇),对木薯胚性愈伤组织的保存作用也有影响,效果与 B₉ 差异不明显,说明这 2 种生长抑制剂均能延缓木薯胚性愈伤保存时间。在培养基中添加 6 mg/L 烯效唑,保存 35 d,愈伤组织生长量为 2.36 g,稍低于对照(2.69 g),但细胞活力保持在 0.471 mg/(g·h),高于同期对照组的细胞活力。烯效唑浓度提高至 10 mg/L 时,仅保存 20 d,愈伤组织的细胞活力就下降至 0.318 mg/(g·h),稍低于对照,由于愈伤组织的存活受到抑制,因此,添加高浓度的烯效唑不利于愈伤组织的保存。

在木薯愈伤组织保存过程中,温度具有重要作用。当温度处于 0~10 ℃ 时,愈伤组织几乎无法存活,即使转入常温也无法生长。继代 20 d 后,TTC 法测其活力,其活力值很低,仅为 0.156 mg/(g·h)(温度 10 ℃),生长量仅为 0.54 g,几乎没有增殖;在 15、20 ℃ 条件下,虽然愈伤组织生长量增殖不大,但保存 50d 时,20、26 ℃ (对照)处理愈伤组织活力差异很明显,分别为 0.298、0.101 mg/(g·h),保存 65 d 时,26 ℃ 处理几乎没有细胞能力,20 ℃ 处理活力仍高,说明 20 ℃ 有利于木薯愈伤组织保存,常温保存时,在短时间内愈伤组织增殖量大,衰老很快,而低温可以延缓衰老,并降低短时间内的增殖量。

3 结论与讨论

在植物组培中,植物生长调节剂是影响愈伤组织诱导的重要因素,植物生长调节剂的种类、浓度以及它们之间的组合影响着愈伤组织的诱导和分化^[7],合适的细胞分裂素和生长素的组合,能促进愈伤组织的形成及分化。何亚文等将木薯 NZ188 无菌苗茎段接种在 MS 附加 IBA、BA 固体培养基上,能诱导出愈伤组织^[8];覃艳等用不同浓度 2,4-D 和 6-BA 组合能从木薯腋芽诱导出愈伤组织^[9]。席世丽等用不同浓度 6-BA 和 NAA 组合能从木薯花药诱导出愈伤组织^[10]。本试

验比较了单独使用 2,4-D、毒莠定、IBA、6-BA 及 IBA+6-BA 组合生长调节剂对 4 个不同木薯品种愈伤组织诱导的效果,结果显示,使用 2,4-D、毒莠定浓度为 12 mg/L 时能从幼叶或腋芽诱导出木薯胚性愈伤组织且效果最好,1.5 mg/L IBA+0.8 mg/L 6-BA 的组合诱导 4 种木薯品种胚性愈伤的分化效果最好,能够将水浸状愈伤组织继续分化成浅绿色颗粒状愈伤组织,且品种间差异较明显。

由表 2、表 3、表 4 的结果可以看出,取不同品种的无菌苗幼叶及腋芽为接种材料,在相同的培养基上诱导愈伤组织的差异较大,这种差异反映了不同基因型对相同生长调节剂或组合的反应不同,而且在本试验中也反映了同一基因型对不同的生长调节剂或组合的反应也不同,这可能由材料本身的内源激素造成的。而组合 1.5 mg/L IBA+0.8 mg/L 6-BA 中的激素配比可能与多数品种的内源激素之间产生协调关系,因此这个处理对多数品种愈伤组织的分化最适合。

离体保存成功的关键因素之一是使用合适的植物生长抑制剂^[11]。在种质资源离体保存过程中,缓慢生长法是通过调节培养温度和改变培养基成分来抑制保存材料的生长和延缓材料衰老从而延长继代时间的 1 种保存方法^[12]。本研究中,经单因素试验比较,得出在 20 ℃ 条件下在常规培养基(含 2 mg/L 毒莠定+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 脂琼的 GD 培养基,pH 值 5.8)中添加 6 mg/L B₉ 或烯效唑的方法,可将木薯品种 GR3 胚性愈伤组织的继代时间延长至 80 d,且继代细胞活力率较高,可作为木薯胚性愈伤离体保存方法之一。

从试验结果可以发现,适当低温培养有利于提高木薯胚性愈伤组织的细胞活力。常规保存(26 ℃)下,培养 65 d 的木薯胚性愈伤组织完全失活,愈伤老化,呈褐色颗粒状,而生长量增多;随着培养温度的降低,愈伤组织细胞活力增强,适合离体保存方法。该结论与洪森荣等报道降低培养温度是植物组织培养缓慢生长保存最常用的方法^[13]一致,本试验得出,

李朝炜,刘颖,朱昀,等. 旱稻成熟胚愈伤组织诱导的影响因素[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):52-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.015

旱稻成熟胚愈伤组织诱导的影响因素

李朝炜,刘颖,朱昀,刘青,贾慧敏

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

摘要:以旱稻品种鲲早 1 号的种子为材料,研究了不同培养基成分及不同浓度的激素对愈伤组织诱导效率的影响。结果表明,NB 培养基较 MS 培养基更加有利于旱稻愈伤组织的诱导和继代培养;当 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时的愈伤组织出愈率最高;添加脯氨酸不利于鲲早 1 号愈伤组织的形成和生长;选用麦芽糖作为碳源可明显提高愈伤组织的诱导率。

关键词:旱稻;愈伤组织;成熟胚;诱导

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0052-03

旱稻是适于在旱地种植的栽培稻,属于水稻的变异型,栽培历史悠久,可追溯至数千年前,目前在世界范围内种植面积大约占到稻米总种植面积的 12%。旱稻具有耐瘠、耐旱、适应性广的特点,在我国水资源短缺及耕地面积不断减少的严峻形势下具有明显的发展优势。干旱缺水已成为制约我国粮食生产的关键性因素^[1],我国人均占有水资源量只有世界人均占有量的四分之一。水稻作为我国重要的粮食作物,其用水量巨大,加之现有选育和推广的栽培稻品种普遍存在在不抗旱的不足,因而水资源短缺已经成为严重影响水稻产量的原因之一。在此形势之下,加快选育旱稻新品种,能够节约

大量农业用水,扩大稻谷种植面积,增加粮食产出渠道,提高农业生产的经济效益^[2]。大力发展旱稻品种选育,获得抗逆、优质、高产的旱稻品种,既可以克服干旱对农业生产的危害,又为培育优质的稻类新品种提供重要的基础。通过基因工程的方法对其进行改良是目前的研究热点^[3-8]。胚性愈伤组织作为遗传转化体系的最常用受体材料,其诱导条件成为稻类组织培养研究的重要方面。本研究以粳水稻、粳旱稻、爪哇稻进行三杂交育种得到的耐旱高产的粳旱稻品种——鲲早 1 号的成熟种子作为材料,研究在不同培养基成分及不同外源激素浓度配比情况下,旱稻愈伤组织的生长状态及诱导效率的差异,以期获得大量适于遗传转化的优质愈伤组织,并为进一步建立稳定高效的旱稻转化体系奠定基础。

收稿日期:2014-03-17

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号:2011ZX08001-003)。

作者简介:李朝炜(1979—),女,河北衡水人,博士,讲师,从事植物基因工程与分子生物学研究。Tel:(0311)81668495;E-mail:lizhaowei79@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

旱稻品种鲲早 1 号(由河北鲲鹏种业提供)的成熟种子作为愈伤组织诱导的材料。

温度在 20℃ 时最适合木薯胚性愈伤组织保存的结论。蔗糖是影响木薯胚性愈伤组织生长的关键因素,提高蔗糖浓度可增加培养基的渗透压,使愈伤组织对水分和养分的吸收受阻,从而延缓离体保存材料的生长速度,但在保存后期却能加剧愈伤组织的褐变,不利于愈伤组织稳定保存,因此在保存过程中不宜采用增加蔗糖浓度的方法。本试验结果表明,蔗糖浓度在 30 g/L 时有利于木薯胚性愈伤组织的保存。

参考文献:

- [1]沈光. 广西木薯产业的发展前景与对策[J]. 热带农业科学, 2001(2):24-27,39.
- [2]方佳,濮文辉,张慧坚. 国内外木薯产业发展近况[J]. 中国农学通报,2010,26(16):353-361.
- [3]杨青. 果树种质离体保存[J]. 福建果树,2005(4):26-29.
- [4]梁忠锋,李茂富,李绍鹏. 果树种质资源离体保存研究进展[J]. 广西农业科学,2007,38(4):375-378.
- [5]白宝璋. 玉米根系活力 TTC 测定法的改良[J]. 玉米科学,1994

- (4):44-47.
- [6]王梓清. 荔枝种质资源离体保存的研究[D]. 福州:福建农林大学,2006:30.
- [7]冯大领,孟祥书,王艳辉,等. 植物生长调节剂在植物体细胞胚发生中的适用[J]. 核农学报,2007,21(3):256-260.
- [8]何亚文,韩美丽,贺红,等. 中国木薯栽培种通过器官发生再生植株研究[J]. 实验生物学报,1998,31(1):79-85.
- [9]覃艳,夏秀忠. 木薯愈伤组织诱导培养初步研究[J]. 广西农业科学,2005,36(3):196-198.
- [10]席世丽,冯斗,潘潞华. 木薯花药愈伤组织诱导初步研究[J]. 广西农业科学,2009,40(2):124-127.
- [11]付传明,黄宁珍,赵志国,等. 广西地不容种质离体保存技术研究[J]. 广西科学,2007,14(2):155-159.
- [12]Negash A, Krens F, Schaart J, et al. *In vitro* conservation of onset under slow-growth conditions[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2001,66(2):107-111.
- [13]洪森荣,郭连金. 离体保存技术在植物种质资源保存中的应用[J]. 上饶师范学院学报:自然科学版,2006,26(3):92-97.