

田娟,孙墨可,董玉迪,等. 燕麦成熟胚愈伤组织诱导的优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):57-61.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.011

燕麦成熟胚愈伤组织诱导的优化

田娟,孙墨可,董玉迪,郭来春,王春龙,张曼

(白城市农业科学院,吉林白城 137000)

摘要:研究了冷处理、基因型、消毒方法和不同培养基等对燕麦成熟胚愈伤组织诱导的影响。试验结果表明,在种子消毒前,4℃冰箱冷处理3d最为合适;在进行种子消毒时先用75%乙醇处理10min,无菌水冲洗5min,再用10%次氯酸钠(NaClO,有效氯浓度≥10%)处理15min,无菌水冲洗5min的方法;在配制诱导培养基时,应选择W14为基本培养基,添加2mg/L 2,4-D、1mg/L NAA、500mg/L 水解酪蛋白(CH)、30g/L 蔗糖、6g/L 植物凝胶,这样才会得到更高的出愈率。在愈伤组织分化时,6-BA的质量浓度为0.5mg/L最佳。

关键词:燕麦;成熟胚;愈伤组织;诱导;2,4-D;6-BA;水解酪蛋白

中图分类号:S512.604.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)05-0057-04

燕麦(*Avena sativa* L.),又名莠麦、雀麦、野麦子等,属禾本科(Gramineae)燕麦属(*Avena* L.),一年生草本植物^[1],是一种集饲用、营养、药用于一身的特色杂粮作物,对畜牧业发展和生态建设都具有重要意义^[2-3]。国内在燕麦方面的研究主要集中在品种选育^[4-5]、栽培技术^[6-8]等。随着生物技术的发展,对改良植物品质、增强植物抗性等方面,利用植物基因工程是一项行之有效的方法,进行转基因育种的前提是建立高效稳定的组织培养再生体系^[9]。在燕麦方面,已有不少学者以花药^[10]、颖片^[11]、幼穗^[12]、幼胚^[13]、成熟胚^[14-15]为材料建立了燕麦再生体系,成熟胚与其他材料相比,材料丰富,保存期长,易于获取,且不受植株发育时期和季节等因素的限制,具备取材方便、操作简单等优点,是进行燕麦基因转化的良好受体。为此,本试验以燕麦成熟胚为试验材料,通过对不同消毒方法、不同基因型、不同基本培养基、不同2,4-D浓度及冷处理等方面的研究,探索影响燕麦成熟胚愈伤组织诱导的因素,筛选适宜于燕麦成熟胚培养的培养基,旨在提高愈伤组织分化和再生能力。

1 材料与方法

收稿日期:2019-01-24

基金项目:国家燕麦荞麦产业技术体系建设专项(编号:CARS-08)。

作者简介:田娟(1985—),女,吉林松原人,硕士,研究实习员,主要从事生物技术育种。E-mail:tianjuanyes@126.com。

通信作者:张曼,助理研究员,主要从事生物技术育种。E-mail:ashuan19870324@126.com

1.1 试验材料

供试品种为吉林省白城市农业科学院选育的白燕11号(B11)和从加拿大引进的燕麦品种JA3。

1.2 试验方法

1.2.1 不同燕麦种子消毒方法消毒效果的比较

选取成熟籽粒饱满的燕麦JA3种子,用自来水冲洗0.5h,在超净工作台内,先用75%乙醇处理3~15min,无菌水冲洗5min,再用10%次氯酸钠(NaClO,有效氯浓度≥10%)处理10~30min,无菌水冲洗5min。放入25℃恒温培养箱中黑暗培养,接种后的第15天调查记录污染数和出愈情况。培养基为MS+4mg/L 2,4-D+1mg/L NAA+30g/L 蔗糖+6g/L 植物凝胶,pH值为5.8。

1.2.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响 选用不同基因型JA3和B11的成熟胚,将燕麦种子置于4℃冰箱中3d后用处理5(表1)消毒,分别接种到不同的培养基上:不同组合(表2)+30g/L 蔗糖+6g/L 植物凝胶+500mg/L 水解酪蛋白(CH),pH值为5.8。放入25℃恒温培养箱中黑暗培养15d后,记录出现的愈伤组织数。计算其出愈率,选择最适的诱导培养基,分析不同基因型、不同基本培养基、不同2,4-D浓度对燕麦成熟胚愈伤组织诱导的影响。

1.2.3 水解酪蛋白 以JA3为试验对象,在诱导处理1培养基中添加500mg/L 水解酪蛋白(CH),以诱导处理1培养基作对照,15d后观察记录愈伤组织的出愈率。

1.2.4 低温处理 以JA3为试验对象,将燕麦种子

置于 4 ℃ 冰箱中处理 1、2、3、4 d,室温下未处理的种子作为对照,处理 5 消毒后接种在组合 7 培养基,培养条件均放入 25 ℃ 恒温培养箱中黑暗培养。15 d 后观察记录愈伤组织的出愈率。

1.2.5 愈伤组织分化培养基的选择 有文献记载 6-BA 对愈伤组织分化影响最大^[16],为系统地探讨 6-BA 对愈伤组织分化的影响,以 W14 为基本培养基附加不同质量浓度的 6-BA(分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)和 30 g/L 蔗糖+6 g/L 植物凝胶+500 mg/L 水解酪蛋白(CH)+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT,pH 值为 5.8。置于(25±1)℃下光照培养,光照度为 1 500~2 000 lx,光周期 16 h/d,接种后 12 d 统计分化率。

1.2.6 数据统计分析 试验数据用 Excel 和 SPSS 统计软件进行分析。

污染率 = 污染种子数/接种种子总数 × 100%;
出愈率 = 出现愈伤组织外植体数/接种外植体总数 × 100%;
分化率 = 出现苗的愈伤组织数/转移的愈伤组织总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理比较

由表 1 可知,所有的处理组合都没有污染,都可

以有效消毒,但是不同处理 JA3 的出愈率有所不同,可能是乙醇或者次氯酸钠的消毒时间过长对外植体造成损伤影响出愈情况。处理 5 的出愈率最高,达到 62.50%,处理 4 的出愈率最低,仅 16.67%。在乙醇处理时间相同的情况下,次氯酸钠消毒时间越长,出愈率越低,对外植体的损伤越严重。

表 1 不同灭菌组合处理时间及结果

处理	处理时间(min)		JA3				
	75%乙醇	次氯酸钠	接种数(个)	污染数(个)	污染率(%)	出愈数(个)	出愈率(%)
1	3	25	48	0	0	15	31.25
2	3	30	48	0	0	12	25.00
3	7	25	48	0	0	10	20.83
4	7	30	48	0	0	8	16.67
5	10	15	48	0	0	30	62.50
6	10	20	48	0	0	20	41.67
7	15	10	48	0	0	18	37.50
8	15	15	48	0	0	17	35.42

2.2 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

在植物组织培养中,愈伤组织的产生是整个组织培养的基础,培养基是最为关键的影响因素。统计 2 种培养基的出愈率情况(表 2)可以看出,在其他条件都相同的情况下,基本培养基 W14 要比基本培养基 MS 出愈率更高。由表 3 可以看出,培养基对愈伤组织出愈率的影响极显著($P=0.002<0.01$)。

表 2 不同培养基成分及出愈情况

组合	处理			JA3			B11			平均出愈率(%)
	基本培养基	2,4-D(mg/L)	NAA(mg/L)	接种数(个)	出愈数(个)	出愈率(%)	接种数(个)	出愈数(个)	出愈率(%)	
1	MS	4	1	76	67	88.16	80	38	47.50	67.83
2	MS	3	1	80	73	91.25	79	38	48.10	69.68
3	MS	2	1	78	70	89.74	78	44	56.41	73.08
4	MS	1	1	76	65	85.53	72	38	52.78	69.16
5	MS	0.5	0.1	80	60	75.00	80	30	37.50	56.25
6	W14	4	1	79	72	91.14	72	50	69.44	80.29
7	W14	3	1	77	74	96.10	79	55	69.62	82.86
8	W14	2	1	78	73	93.59	70	58	82.86	88.23
9	W14	1	1	73	66	90.41	72	43	59.72	75.07
10	W14	0.5	0.1	79	61	77.22	56	26	46.43	61.83

2.3 不同基因型对愈伤诱导的影响

由表 2 可以看出,不同燕麦基因型成熟胚的最佳诱导培养基不同。JA3 的最适愈伤组织诱导培养基组合为 W14+3 mg/L 2,4-D+1 mg/L NAA,B11 的最适愈伤组织诱导培养基组合为 W14+2 mg/L 2,4-D+1 mg/L NAA。由表 3 可以看出,基因型对出愈率的影响达到了极显著水平($P<0.01$)。

2.4 不同质量浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

由表 2、表 3 可以看出,2,4-D 质量浓度对出愈率的影响极显著。2 种基本培养基中都是随着 2,4-D 质量浓度增加出愈率先升高后降低,在 2 mg/L 时出愈率最高,在 MS 中平均出愈率达到 73.08%,在 W14 中平均出愈率达到 88.23%。不同基因型

表 3 各影响因素的出愈率方差分析

变异来源	Ⅲ型平方和	df	均方	F 值	P 值
校正模型	6 340.718a	6	1 056.786	28.470	0.000
截距	104 907.612	1	104 907.612	2 826.248	0.000
基因型	4 736.426	1	4 736.426	127.601	0.000
基本培养基	546.640	1	546.640	14.727	0.002
2,4-D 质量浓度	1 057.652	4	264.413	7.123	0.003
误差	482.547	13	37.119		
总计	111 730.878	20			
校正的总计	6 823.266	19			

2,4-D 的最适质量浓度不同,JA3 的最适质量浓度为 3 mg/L,B11 的最适质量浓度为 2 mg/L。

2.5 水解酪蛋白

由图 1 可以看出,添加 500 mg/L 水解酪蛋白处理下 JA3 的出愈率为 81.16%,不添加水解酪蛋白处理下 JA3 的出愈率为 62.50%,这表明水解酪蛋白在燕麦成熟胚愈伤组织诱导中可以提高其出愈率。

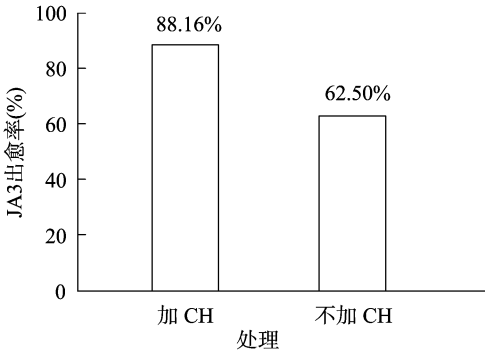


图1 水解酪蛋白促进 JA3 出愈

2.6 低温处理

由图 2 可以看出,对照组中 JA3 出愈率为 81.16%,随着处理天数的增加出愈率明显增加,当冷处理 3 d 时出愈率达到最高水平(96.70%),这表明适当的低温处理(4 ℃ 处理 3 d)在燕麦成熟胚愈伤组织诱导中可以提高其出愈率。

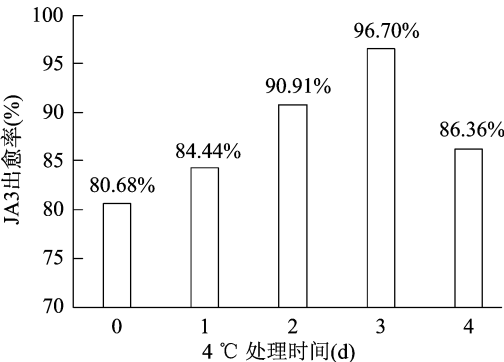


图2 不同冷处理 JA3 出愈情况

2.7 不同质量浓度 6-BA 对愈伤组织分化的影响

在不同质量浓度 6-BA 的培养基中愈伤组织分化结果如表 4 所示,随着质量浓度增加,分化率降低。分化率最高的质量浓度为 0.5 mg/L,平均分化率为 41.38%;1 mg/L 中的平均分化率为 34.41%;1.5 mg/L 中的平均分化率为 33.72%;2 mg/L 中的平均分化率为 30.56%。其中,在相同质量浓度 6-BA 的培养基中,B11 的分化率要比 JA3 的分化率高,说明 B11 的分化能力比较强。本研究中的分化率不高,没有达到 50%,除了与基因型和培养基有关外,可能与愈伤组织的质量有关,在诱导出愈伤组织后可以转移到继代培养基中进行继代培养,改善愈伤组织后再进行分化。

表 4 不同浓度 6-BA 对愈伤组织分化的影响

组合	处理	JA3			B11			平均分化率 (%)
	6-BA(mg/L)	接愈数(个)	出苗数(个)	分化率(%)	接愈数(个)	出苗数(个)	分化率(%)	
1	0.5	91	35	38.46	70	31	44.29	41.38
2	1.0	99	32	32.32	74	27	36.49	34.41
3	1.5	91	29	31.87	90	32	35.56	33.72
4	2.0	100	30	30.00	90	28	31.11	30.56

3 讨论与结论

低温具有增加核酸含量、诱导其蛋白质合成的效应^[16],还能改善幼穗及花药的出愈状态^[17]。本

试验表明,适当的低温处理(4 ℃ 处理 3 d)在燕麦成熟胚愈伤组织诱导中可以提高其出愈率。

种子表面灭菌处理可以创造一个无菌环境,有利于愈伤组织的形成。在燕麦愈伤组织诱导中常

用的消毒剂有氯化汞、乙醇和次氯酸钠。消毒剂的选择和处理时间长短对试验能否成功非常关键。李建民等采用的是乙醇和氯化汞相结合的消毒方法^[18-20],可以有效消毒,但是氯化汞有剧毒,容易对身体造成伤害,也容易对环境造成污染。罗志娜等选用不同浓度乙醇和次氯酸钠相结合的消毒方法也可以有效消毒^[21-22]。本研究选用对人和环境友好的乙醇和次氯酸钠,选出了最佳的消毒组合:先用 75% 乙醇处理 10 min,无菌水冲洗 5 min,再用 10% 次氯酸钠 (NaClO,有效氯浓度 $\geq 10\%$) 处理 15 min,无菌水冲洗 5 min,不仅能够有效地消毒,而且不会对外植体造成损伤影响出愈情况。

常用的基本培养基有多种,胡晓旭比较了基本培养基 MS 和 N6,结果表明,在 2 种不同的基础培养基上进行愈伤组织的诱导差异显著,MS 上愈伤组织的出愈率和成活率明显高于 N6 培养基^[23];李建民等在 MS、B5、N6、改良 N6 (N6 培养基中的盐酸硫胺改为 0.4 mg/L,肌醇与 MS 同量)4 种培养基上诱导愈伤组织,结果发现在 4 种培养基上种子胚均被诱导形成了愈伤组织,诱导率最高的为改良 N6 培养基^[18]。本研究对比了 W14 和 MS 这 2 种基本培养基,结果显示,在其他条件都相同的情况下,基本培养基 W14 要比 MS 出愈率高,并且基本培养基对愈伤组织出愈率的影响极显著。

在禾本科植物愈伤组织诱导中,2,4-D 通常是起决定作用的植物生长调节物质^[24-25]。Hassan 等通过研究认为,2,4-D 与愈伤的形成相关,能促进愈伤的生长^[26]。Kim 等研究得出只有适量浓度的 2,4-D 才会增加外植体的出愈率,使用过量或低浓度少量使用都不利于愈伤组织的形成^[27]。本试验用 JA3 和 B11 成熟胚为材料,2 种基本培养基中添加 2 mg/L 2,4-D 时出愈率最高,在 MS 中平均出愈率达 73.08%,在 W14 中平均出愈率达到 88.23%,明显高于其他质量浓度,所以添加 2 mg/L 2,4-D 为最佳质量浓度;但是不同基因型的最适 2,4-D 质量浓度不同,JA3 的最适质量浓度为 3 mg/L,B11 的最适质量浓度为 2 mg/L,这与罗志娜等的结论^[21]一致。所以在诱导燕麦成熟胚愈伤组织时,2,4-D 的质量浓度要根据基因型不同适量选择,建议质量浓度为 2~3 mg/L。

有研究表明,水解酪蛋白 (CH) 可以提高燕麦愈伤组织诱导率、改善愈伤组织的质量和再生率^[22,28]。本试验中发现,500 mg/L CH 有助于提高

燕麦愈伤组织的出愈率。

在植物组织培养中,6-BA 的主要功能是促进细胞的分裂和芽的形成,其活性较强,对于产生花粉胚状体有明显的提高作用,而对于分化成苗 6-BA 可以起到主导作用。本研究设置了 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 这 4 个不同质量浓度的 6-BA,试验结果表明,随着质量浓度增加,分化率降低,在愈伤分化时,0.5 mg/L 6-BA 为最佳质量浓度。

综上所述,在进行燕麦愈伤组织诱导时,种子消毒前于 4℃ 冰箱冷处理 3 d 最为合适;在进行种子消毒时先用 75% 乙醇处理 10 min,无菌水冲洗 5 min,再用 10% 次氯酸钠 (NaClO,有效氯浓度 $\geq 10\%$) 处理 15 min,无菌水冲洗 5 min 的方法;在配制诱导培养基时,应选择 W14 为基本培养基,添加 2 mg/L 2,4-D、1 mg/L NAA、500 mg/L 水解酪蛋白 (CH),这样才会得到更高的出愈率;在愈伤分化时,6-BA 的质量浓度为 0.5 mg/L 最佳。

参考文献:

- [1] 杨文钰,屠乃美. 作物栽培学各论 (南方本) [M]. 北京:中国农业出版社,2011:25-37.
- [2] 师尚礼,赵桂琴,姚拓. 农牧交错带特征分析与苜蓿燕麦种植区域的形成 [J]. 草原与草坪,2005(6):17-20.
- [3] 蔡丽艳,宋志萍,徐静,等. 18 份燕麦属牧草种质材料的鉴定与评价 [J]. 中国草地学报,2007,29(4):21-27.
- [4] 刘俊青,付晓峰,杨海顺,等. 国审燕麦新品种蒙燕 2 号品种选育报告 [J]. 内蒙古农业科技,2014(4):74-74,79.
- [5] 魏黎明,郭来春,沙莉,等. 燕麦新品种白燕 2 号选育报告 [J]. 作物研究,2007(3):341-342.
- [6] 黄前晶,胡瑞梅,张春华,等. 燕麦双种双收栽培技术研究 [J]. 绿色科技,2017(23):152-153.
- [7] 郭来春,于维,王春龙,等. 白城地区燕麦产业发展建议 [J]. 农业科技通讯,2013(3):24-25.
- [8] 隋永建. 燕麦栽培正交试验初报 [J]. 西藏农业科技,2018(3):40-44.
- [9] 赵桂琴,慕平,魏黎明. 饲用燕麦研究进展 [J]. 草业学报,2007,16(4):116-125.
- [10] 田娟,张曼,董玉迪,等. 燕麦花药组织培养影响因子研究进展 [J]. 安徽农业科学,2018,46(35):11-13.
- [11] 王子霞,戚家华,海热古力·阿布力孜,等. 莜麦颖片培养及再生植株后代性状 [J]. 新疆农业科学,1994(1):26-27.
- [12] 范银燕,崔林. 裸燕麦幼穗愈伤组织诱导及植株再生技术 [J]. 山西农业科学,1996,24(1):14-17.
- [13] 郑伟. 燕麦幼胚组织培养及植株再生的研究 [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [14] 贾利敏. 燕麦成熟胚组织培养及植株再生体系建立 [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2006.
- [15] 罗志娜. 燕麦成熟胚组织培养及再生体系建立 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2012:12-13.

王丽丽,孙昌法,胡尚连. 梁山慈竹 SSR-PCR 体系的优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):61-64.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.012

梁山慈竹 SSR-PCR 体系的优化

王丽丽,孙昌法,胡尚连

(西南科技大学生命科学与工程学院,四川绵阳 621010)

摘要:以梁山慈竹为材料,提取叶片 DNA 并将其作为模板,采用正交设计试验优化影响梁山慈竹简单重复序列-聚合酶链式反应(SSR-PCR)体系的 3 个主要因素,并对 21 个梁山慈竹不同品系进行稳定性验证,结果表明,优化的 20 μL SSR-PCR 反应体系为 $2 \times \text{Taql PCR Mix}$ 8 μL 、模板 DNA (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2.5 μL 、SSR 引物 (1.0×10^{-4} mmol/L) 1 μL 、无菌蒸馏水补足至 20 μL ;使用 SSR 引物 BMK.38757 对 21 个梁山慈竹不同品系进行扩增,扩增产物大小在 140 bp 左右,共有 4 个多态性位点;使用 SSR 引物 L6、R83 对梁山慈竹进行扩增,均获得 3 个多态性位点,且条带清晰。

关键词:梁山慈竹;简单重复序列(SSR);聚合酶链式反应(PCR);正交试验;优化

中图分类号:S795.501 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)05-0061-04

简单重复序列(simple sequence repeats,SSR)别称微卫星 DNA(microsatellite DNA)^[1],由 1~6 个碱基重复串联组成,其不同等位基因间的重复数具有丰富的差异,而其两侧的序列高度保守,可以在重复串联序列的两端设计引物,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增片段的长度检测等位基因的多态性。SSR 是 Skinner 等于 1974 年在研究寄居蟹时首次发

现的^[2],此后人们相继发现,SSR 广泛存在于真核生物中,由于其具有多态性高、容易检测、共显性等特点,SSR 标记技术很快在动植物遗传检测分析中得到广泛应用^[3-4]。

SSR 标记根据开发方法可分为基因组 SSR(gSSR)、表达序列标签 SSR(EST-SSR)标记,随着高通量测序技术的发展,转录组测序相对价格越来越低,一些无参照基因组物种的 EST-SSR 开发也越来越容易。西南科技大学生命科学与工程学院实验室在梁山慈竹分子层面研究上取得一定进展^[5],并获得多个品系梁山慈竹的转录组数据^[6-7],这为梁山慈竹 EST-SSR 分子标记的开发提供了坚实的基础。在 EST-SSR 标记开发过程中,PCR 过

收稿日期:2019-02-12

基金项目:四川省“十三五”重点攻关项目(编号:2016NYZ0038)。

作者简介:王丽丽(1992—),女,山东临沂人,硕士,从事植物遗传与品种改良。E-mail:1298901076@qq.com。

通信作者:胡尚连,博士,教授,从事植物生理与生物技术研究。E-mail:hashanglian@126.com。

[16] 廖祥儒,朱新产. 种子引发提高小麦抗渗透胁迫能力的效应[J]. 植物学通报,1997,14(2):37-41.

[17] Henry Y, De Buyser J. Float culture of wheat anthers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1981,60(2):77-79.

[18] 李建民,李喜文. 皮燕麦胚性愈伤组织的形成及植株再生[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),1999(3):40-43,45.

[19] 张丽君,刘龙龙,马名川,等. 燕麦成熟胚组织培养体系的优化及其影响因素[J]. 山西农业科学,2015,43(3):269-272.

[20] 王迅娟,修 谨,倪秀珍. 燕麦组织培养体系的建立与优化[J]. 湖北农业科学,2014,53(16):3936-3938.

[21] 罗志娜,赵桂琴,刘 欢. 燕麦成熟胚的组织培养及植株再生[J]. 甘肃农业大学学报,2012,47(5):60-68.

[22] 贾利敏,傅晓峰,刘俊清. 不同燕麦种成熟胚诱导条件的优化[J]. 杂粮作物,2009,29(2):95-98.

[23] 胡晓旭. 燕麦成熟胚组织培养植株再生体系的建立与优化[D]. 福州:福建农林大学,2017:11-12.

[24] Bhaskaran S R. Regeneration in cereal tissue culture; a review[J]. Crop Science,1990,30:1328-1336.

[25] Saalbach G H. Attempts to initiate callus formation from barley leaves[J]. Plant Science Letters,1978,13(2):165-169.

[26] Hassan G, Zipf A, Sharma G C, et al. Plant regeneration from mature *Avena* tissue explants [J]. Cereal Research Communications,1999,27(1):25-32.

[27] Kim K H, Lee B M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos in oat[J]. Indian Journal of Ophthalmology,2002,60(2):87-93.

[28] Artunduaga I R, Taliaferro C M, Johnson B L. Effects of auxin concentration on induction and growth of embryogenic callus from young inflorescence explants of old world bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermud (*Cynodon* spp.) grasses[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture,1988,12(1):13-19.