

甘蔗幼叶组织培养中培养基的优化

杨 庆

(昆明学院 农学中专部, 云南 昆明 650213)

摘 要: 对不同激素浓度质量组合对甘蔗愈伤组织的诱导、不定芽的分化和生根的效果进行研究。结果表明: MS+2, 4-D 2.0 mg/L 培养基对诱导愈伤组织和继代增殖较适宜; MS+NAA 0 mg/L+BA 1.0 mg/L 培养基对愈伤组织分化不定芽的效果为佳; 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L 培养基对生根较好。通过这 3 个培养基培养出的甘蔗组培苗长势良好, 表现为叶面积适宜、干物质积累多等方面。

关键词: 甘蔗; 组织培养; 培养基; 优化

中图分类号: S 566.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0146-04

甘蔗是我国最主要的糖料作物, 其产糖量占全国总产糖量的 90% 以上^[1]。甘蔗通常以种茎来进行繁殖, 但繁殖速度慢, 种茎用量大, 很难满足生产上的需要^[2]。组织培养技术的广泛推广和应用为甘蔗品种的快速繁殖和良种推广提供了有效的手段, 不仅大大增加了繁殖系数, 节省种苗, 而且在脱毒苗生产、抗性选育方面都有不可替代的应用价值^[3]。

在植物组织培养中, 生长调节物质对组织培养的成功与否和器官的发生途径起着决定性的作用, 生长调节物质调节芽的增殖、器官的分化和胚状体的形成, 这种

调节作用不但取决于生长调节物质的种类和浓度, 还取决于不同生长调节物质之间浓度的配比, 为使生长调节物质在植物组织培养中发挥最佳效果, 该试验对甘蔗组培的各个阶段进行了培养基的优化, 以便筛选出适宜甘蔗组培的激素配比种类^[4]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为甘蔗品种闽糖 69/421, 由云南农业大学甘蔗研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 愈伤组织诱导培养基: 设 4 个处理, 1 个对照。每个处理设 3 个重复, 每个重复 10 瓶, 每瓶接种 3 块甘蔗幼嫩叶鞘。处理 A: MS-(CK); 处理 B: MS+2, 4-D 1.0 mg/L; 处理 C: MS+2, 4-D 2.0 mg/L; 处理 D:

作者简介: 杨庆(1970-), 男, 本科, 讲师, 研究方向为园林园艺植物生育和环境。

收稿日期: 2010-04-21

Study of Infection *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* Dipping Flower Method

XU Hong-mei^{1,2}, ZHANG Li-jun¹, LIU Chun¹

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang Liaoning 110161; 2. Heilongjiang Agricultural Vocational and Technical College, Jiamusi Heilongjiang 154007)

Abstract: To improve the transformation method of *Arabidopsis thaliana* very widely and to gain insight that may facilitate transformation of other plant species, we sought to test a number of parameters in the transformation method. The results showed that the three main requirements for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* were correct plant developmental stage (floral buds stage) and 5% sucrose plus 0.05% Silwet L-77. The method was very successful for transformation of multiple *Arabidopsis* ecotypes, which facilitate the high-throughput transformation of T-DNA gene tagging plant, also provide a certain reference value for transgenic technology of plant.

Key words: *Agrobacterium*; floral dip; inoculation; *Arabidopsis thaliana*

MS+2,4-D 3.0 mg/L;处理 E: MS+2,4-D 4.0 mg/L。愈伤组织继代培养基: 设 4 个处理, 1 个对照。每个处理设 3 个重复, 每个重复 10 瓶, 每瓶接种 3 块愈伤组织。处理 F: MS-(CK); 处理 G: MS+2,4-D 0.5 mg/L; 处理 H: MS+2,4-D 2.0 mg/L; 处理 I: MS+2,4-D 3.0 mg/L; 处理 J: MS+2,4-D 5.0 mg/L。愈伤组织分化培养基: 设 4 个处理, 1 个对照。每个处理设 3 个重复, 每个重复 10 瓶, 每瓶接种 3 块愈伤组织。处理 K: MS-(CK); 处理 L: MS+NAA 0 mg/L+BA 1.0 mg/L; 处理 M: MS+NAA 0.1 mg/L+BA 1.0 mg/L; 处理 N: MS+NAA 0.3 mg/L+BA 1.0 mg/L; 处理 P: MS+NAA 0.5 mg/L+BA 1.0 mg/L。生根培养基: 设 4 个处理, 1 个对照。每个处理设 3 个重复, 每个重复 10 瓶, 每瓶接种 3 棵小苗。处理 R: 1/2MS-(CK); 处理 S: 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0 mg/L; 处理 T: 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L; 处理 U: 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L; 处理 V: 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 1 mg/L。

1.2.2 培养过程 取生长健壮的无病虫害的甘蔗茎梢, 用 75% 的酒精表面消毒, 剥去外层老叶鞘, 留下 3~4 层嫩叶鞘。将生长点以上 0~4 cm 的嫩叶鞘切成 5 mm 长的小块, 接种到诱导培养基上, 每瓶接种 3 块, 每个处理共接种 90 块, 于 27~28℃ 的暗室内培养 20 d, 统计各处理的愈伤组织诱导率; 然后, 将愈伤组织转移到分化培养基上, 每瓶转接 3 块, 每个处理共接种 90 块, 在温度 27~28℃, 光强 1 500~2 000 lx, 每日光照 12 h 的条件下培养, 待分化成苗后, 将未长根的分化苗移入催根培养基, 同等条件下培养至生根。

1.3 结果观测及数据处理

观察测量愈伤组织的生长量, 分化苗数、苗高、苗鲜重、苗干重、生根数及根鲜重、根干重等。并对各个处理的数据进行方差分析, 具体方法参照相关文献^[9-10]。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

外植体接于 MS+2,4-D 1~4 mg/L, 从第 3 天开始, 陆续在切口处出现愈伤组织, 培养 13 d 后, 灰黄色的愈伤组织在原愈伤组织的基础上分化出来。第 21 天后, 出现不同类型的愈伤组织。致密型的愈伤组织: 愈伤组织结构紧密, 表面光滑, 主要由小而圆、细胞核大、细胞质浓厚的细胞组成, 此类愈伤组织称为胚性愈伤组织; 松软型愈伤组织: 愈伤组织结构松散, 半透明, 主要由排列疏松、大而伸长的细胞组成, 很少分化; 粘糊型愈伤组织: 愈伤组织松软、粘糊状, 主要由伸长而高度分散

的细胞组成, 不具有胚性能力。通过多次试验, 从表 1 说明 2,4-D 3~4 mg/L 的培养基与 2,4-D 1~2 mg/L 的培养基相比, 诱导率低且愈伤组织类型中致密型的数量较少。从整体水平来看处理 C 的配方最优, 此配方诱导率达 100% 且致密型愈伤组织占了总数的 97%。

表 1 不同处理诱导愈伤组织的情况

处理	诱导率/ %	愈伤组织类型/ 块			总材料 块数/ 块
		致密型	松软型	粘糊型	
A(CK)	51	20	10	16	90
B	96	46	21	19	90
C	100	87	3	0	90
D	64	26	12	20	90
E	51	12	22	12	90

注: 接种时供试材料每单位为 5 mm 长的嫩叶。

2.2 不同 2,4-D 浓度处理对愈伤组织继代效果的影响 诱导出的愈伤组织在几个不同的处理中均能生长, 但生长情况有所区别, 经过 1 个月的培养, 愈伤组织生长情况可以通过表 2 看出, 处理 H 的成活块数平均数最高, 达到最优水平。

表 2 不同处理愈伤组织的继代效果及差异性

处理	成活块数平均数	差异显著性	
		5%	1%
H	87. 999	a	A
I	78. 999	ab	AB
J	71. 001	bc	B
G	66. 999	c	B
F(CK)	65. 001	c	B

多重比较结果表明, 以处理 H 水平为最优, 极显著优于处理 J、G、F; 处理 I 显著优于 G、F; 处理 H、I 之间差异不显著; 处理 I、J 之间差异不显著; 处理 G、F 之间差异不显著。

表 3 不同处理愈伤组织的继代效果

处理	愈伤组织类型	愈伤组织块大小		接种块数
		> 5 cm	< 5 cm	
F(CK)	多数为黑色(褐变), 松软型占多数	30	41	90
G	黄色, 致密型占多数	64	10	90
H	金黄色 全为致密型	90	0	90
I	淡黄色, 松软型占多数	30	35	90
J	白色, 粘糊型占多数	23	49	90

注: 接种时, 每单位(块)愈伤组织的直径为 0.3~0.4 cm。

愈伤组织生长的大小情况及愈伤组织的类型也受 2,4-D 质量浓度的影响较大, 从表 2 可以看出, 处理 H 全为胚性愈伤组织(致密型), 生长较快, 长势较好。

从上述结果来看, 无论是在成活率, 外部形态, 愈伤组织的大小都是处理 H: MS+2,4-D 2.0 mg/L 的表现较好, 作为愈伤组织的继代培养基。

2.3 不同处理愈伤组织分化苗的情况

愈伤组织转移到分化培养基后,第3天可见紫色突起,出现紫色突起是分化绿苗的前期特征,第4天可见紫色转为绿色,绿色小点慢慢成小苗,小苗又慢慢长成分裂旺盛的丛生苗。图1就是每隔3 d的观察情况。可以看出,愈伤组织在5种不同的处理中均能生长,但它们之间存在差异,它们的分化速率受到了生长素浓度的影响。从图1可以看出,处理K(CK)和处理N随着继代时间的延长,愈伤组织在22 d后停止分化,以后的时间有部分分化后的小苗甚至死亡。说明这2个处理培养的时间不宜过长。处理M和处理P则是,开始迅速分化以后就不在分化。而处理L在整个生长过程中稳步增长。

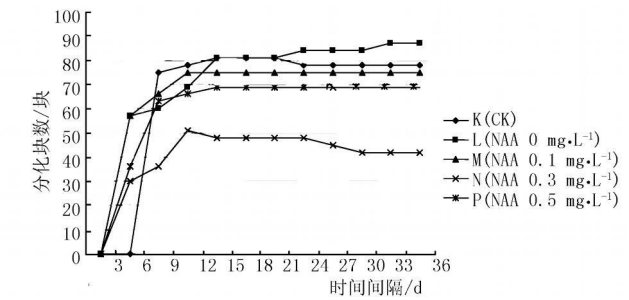


图1 愈伤组织分化苗情况

表4从苗的长势中也做了比较,可以看出不同处理间的区别。多重比较结果表明,以处理L水平为最优,极显著优于处理P、M、N、K;处理L、P、M、N、K之间差异显著。

表4 不同处理分化苗的叶面积及差异显著性				
处理	叶面积平均数	差异显著性		
		5%	1%	
L	21.7967	a	A	
P	20.0667	b	B	
M	18.9033	c	B	
N	17.6667	d	C	
K	9.5533	e	D	

表 5 不同处理分化苗地上部分的鲜质量与干质量及差异显著性						
处理	苗鲜重 平均数 _g	显著性差异		苗干重 平均数 _g	显著性差异	
		5%	1%		5%	1%
L	6. 4000	a	A	0. 6667	a	A
M	5. 1667	b	B	0. 6067	a	AB
P	5. 1000	b	B	0. 4550	ab	ABC
N	2. 1333	c	C	0. 2717	bc	BC
K	1. 3733	d	C	0. 1667	c	C

多重比较结果表明,鲜质量中,以处理L水平为最优,极显著优于处理M、P、N、K,显著高于处理M、P;处

表6 不同处理分化苗的生长情况

处理	苗高/cm	丛苗(芽)总重/g	外观表现
K	19.7	1.3733	长势好,叶片嫩绿、平展,基部无丛芽
L	11.7	6.4000	长势较好,叶片嫩绿、平展,基部丛芽多,部分成团生长
M	15.0	5.1667	长势差,叶片黄、卷曲,基部丛芽少
N	17.0	2.1333	长势一般,叶片嫩绿、卷曲,基部无丛芽
P	16.7	5.1000	长势一般,叶片嫩绿、大部分卷曲,基部丛芽多,部分成团生长

理P显著高于处理N、K,处理M、N间差异不显著。干质量中,以处理L水平为最优,极显著优于处理N、K,处理M极显著优于处理K;处理P显著高于处理K;处理L与M之间差异不显著,处理P与N之间差异不显著,处理N与K之间差异不显著。

通过对分化试验的各项指标(图1,表4~6)观测及分析可以总结出处理L(NAA:BA=0:1.0)优于其它处理。

2.4 不同处理对生根的影响

将诱导出的长势相同的小苗,移于5种不同处理的培养基中。接种后2个星期后有白色的小根陆续长出。每隔3 d观察1次,具体观察结果如图2所示。5个处理均能有效的促进苗生根,但不同质量浓度的生长素会产生一定的不同效果。其中处理T(NAA:IBA=5:2)和处理U(NAA:IBA=5:5)的生根效果较好。其次为处理S(NAA:IBA=5:0)和处理V(NAA:INA=5:10),总体上看处理T最优。

表7 不同处理分化苗根的鲜质量与干质量及差异显著性

处理	根鲜重平 均数/g	显著性差异		根干重 平均数/g	显著性差异	
		5%	1%		5%	1%
T	0.59000	a	A	0.045000	a	A
S	0.42300	b	B	0.036333	b	B
V	0.42000	b	B	0.028667	c	B
R	0.17333	c	C	0.009667	d	C
U	0.11800	d	C	0.009000	d	B

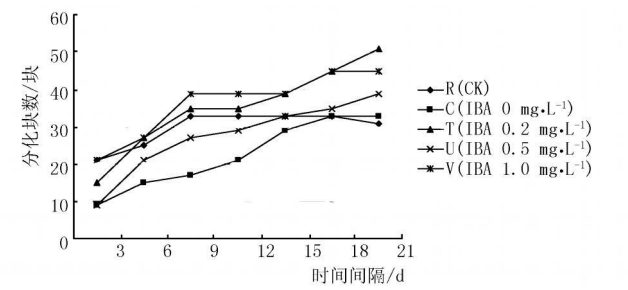


图2 分化苗生根情况

多重比较结果显示: 根鲜重中, 处理 T 极显著高于处理 S、V、R、U; 处理 S 极显著高于处理 R、U; 处理 R 显著高于处理 U; 处理 S、U 之间差异不显著。

根干重中, 处理 T 极显著高于处理 S、V、R、U; 处理 S 极显著高于处理 R、U; 处理 S 显著高于处理 V、R、U; 处理 R、U 之间差异不显著。

通过对根的各项指标(图 2, 表 7)的观测及分析, 得出的结论是处理 T 是最适的生根配方。

3 讨论

该试验在前人的基础上, 对甘蔗组织培养过程中的培养基进行优化, 为针对不同品种筛选适宜的培养基配方组合、建立甘蔗组培高效再生体系提供依据。在诱导和继代结果中也出现了如同 Ho 和 Vasil 所分类的愈伤组织的 3 种类型: 致密型的愈伤组织, 愈伤组织结构紧密, 表面光滑, 主要由小而圆、细胞核大、细胞质浓厚的细胞组成, 此类愈伤组织亦称胚性愈伤组织; 松软型, 愈伤组织结构松散, 半透明, 主要由排列疏松、大而伸长的细胞组成, 这类愈伤组织只能偶尔进行分化; 粘糊型, 愈伤组织松软、粘糊状, 不具有胚性能力, 亦不能继代, 主要由伸长而高度分散的细胞组成。2, 4-D 是诱导甘蔗幼叶产生愈伤组织的有效激素。随着 2, 4-D 浓度的改变, 甘蔗愈伤组织诱导率也相应改变。试验中以 2, 4-D (2.0 mg/L) 的诱导率最高, 与浓度为 1.0、3.0、4.0 mg/L 的处理相比, 差异达到了极显著, 并且这一浓度的愈伤组织

类型多为致密型, 说明 2, 4-D (2.0 mg/L) 较适合诱导甘蔗愈伤组织。在继代愈伤组织的配方中, 以 2, 4-D (2.0 mg/L) 的成活率以及各个方面效果(愈伤组织类型、大小)最佳, 与其它处理相比达到了极显著水平, 说明 2, 4-D 较适宜继代愈伤组织。甘蔗愈伤组织在除去 2, 4-D 的培养基上即能分化成苗, 以 NAA (0 mg/L) 加 BA (1.0 mg/L) 的培养基上分化率最高(90%以上), 说明甘蔗愈伤组织有较好的分化能力, 且叶面积, 株高等各项指标均较适宜。试验结果表明, 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L 培养基适宜甘蔗组培苗的生根。

参考文献

[1] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程参考[M]. 兰州: 甘肃科技出版社, 1996(3): 264-269.
[2] 黄慧芳. 甘蔗组织培养研究综述[J]. 广西热作科技, 1998(2): 33-37.
[3] 杨柳, 李杨瑞, 李小辉. 甘蔗组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学发展, 2007(2): 44-46.
[4] 罗素兰, 孙东亭, 陈如凯. 甘蔗遗传转化研究进展[J]. 生物技术通报 2002(2): 9-13.
[5] 许莉萍. 甘蔗组织培养一种植发展的生物技术[J]. 国外农学—甘蔗, 1992(2): 1-5.
[6] 李军生, 李春瑶. 甘蔗的植物组织培养[J]. 广西植物 1990 10(1): 18-20.
[7] Paul W J Hlaw L K. 甘蔗胚性愈伤组织及高原原生质悬浮细胞系的建立[J]. 张子建, 译, 国外农学—甘蔗 1992(4): 22-29.
[8] 明道绪. 生物实验与统计分析[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
[9] 朱永平. 生物统计学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 9.

Medium Optimization on Tissue Culture with Young Leaf of Sugarcane

YANG Qing

(Agriculture Department of Kunming College Kunmin, Yunnan 650213)

Abstract: The Comparison were made among different media with various hormone concentration combinations on callus inducing, shoot differentiation and rooting. The results showed that MS+2, 4-D 2.0 mg/L of the callus induction medium and subculture proliferation of the most effective MS+NAA 0 mg/L+BA 1.0 mg/L of the callus tissue differentiation medium adventitious buy ds was the best 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L on rooting medium better. And the three formulas can be the best biochemical indicators(such as differentiation seedling leaf size, fresh material and the accumulation of dry matter).

Key words: sugarcane; tissue culture; medium; optimization