

“热研11号”黑籽雀稗植株再生体系的建立

侯海军^{1,2} 郭建春^{1*} 胡新文³

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101

2 中国科学院亚热带农业生态研究所 长沙 410125

3 海南大学农学院 海南 儋州 571737

摘要 以热带牧草“热研11号”黑籽雀稗(*Paspalum atratum* cv. Reyan No.11)种子为材料,对其外植体植株的再生过程进行系统研究。结果表明,以MS无机盐+9.0 mg/L 维生素 B₁+9.5 mg/L 维生素 B₆+4.5 mg/L 尼克酸+1.0 mg/L 水解酪蛋白+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂为基本成分(MSM),附加植物激素类物质 2.0 mg/L 2,4-D时,适合种子的愈伤组织形成,愈伤诱导率可达65%;继代培养基附加 1.0 mg/L 2,4-D和 0.1 mg/L KT;分化的培养基附加 6.0 mg/L 6-BA,分化率可达50%;生根培养基附加 0.5 mg/L 激素类物质 NAA,生根率100%。完成植株再生约需13周。

关键词 黑籽雀稗 组织培养 植株再生

中图分类号 S544.903.53

黑籽雀稗品种“热研11号”(*Paspalum atratum* cv. Reyan No.11)属禾本科雀稗属,是中国热带农业科学院于1994年从印度印度尼西亚引进的热带牧草,适宜在湿热地区中等肥力或贫瘠土壤种植,并有一定的耐寒和耐旱性。该品种在华南热带地区推广种植,并已取得了巨大的经济和社会效益^[*]。黑籽雀稗的组织培养和植株再生相关研究报道极少。Can曾以雀稗(*Paspalum dilatatum* Poir.)幼穗诱导愈伤组织和植株再生^[1],笔者曾以简报形成报道“热研11号”黑籽雀稗的组织培养和植株再生^[2],本文详细报道该研究的结果,以便利用基因工程方法对黑籽雀稗进行品质改良,进一步提高它对环境的适应性,有利于黑籽雀稗在我国推广种植。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料:热研11号黑籽雀稗种子,中国热带农业科学院品质资源研究所提供。

1.2 方 法

1.2.1 种子发芽实验 选取150粒饱满的黑籽雀稗种子,55℃温水浸种1h,放置在有湿润滤纸的培养皿中,每皿50粒种子,在培养温度为25℃下,避光使其发芽,2周后统计出芽率。

1.2.2 黑籽雀稗种子消毒 首先,将黑籽雀稗种子以55℃温水浸种1h,去除浮在上层的不饱满种子,选取成熟饱满的种子,然后用体积分数70%的酒精先消毒2min,再用0.1%~0.2%(w:v)的氯化汞消毒35min,无菌水冲洗5次,每次4~5min。

1.2.3 培养基及培养条件 用于愈伤诱导和保持以及分化的基本培养基为改良的MS培养(MSM)^[3],其基本成分是MS无机盐+维生素 B₁ 9.0 mg/L+维生素 B₆ 9.5 mg/L+尼克酸 4.5 mg/L+水解酪蛋白 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 8.0 g/L。实验中所有的培养基都在灭菌前将pH调到5.8,灭菌条件为121℃保持20min。经过消毒的黑籽雀稗种子接种到诱导愈伤组织培养基中,置于黑暗处,在25℃环境下培养。每处理接种30粒,设置3个重复。待愈伤组织长到米粒大小时,将其剥离,转到继代培养基上

教育部重点资助项目(编号:204158)。人事部留学人员科技行动项目。中国热带农业科学院基金 Rky0526。

侯海军 男,1980年生,助理研究员。研究方向:植物基因工程。

*郭建春,通讯作者,E-mail: jianchunguoh@163.com

收稿日期:2007-06-11 修回日期:2007-10-10

“中国热带农业科学院热带牧草研究中心编.热带牧草及草坪草优良品种简介[G].儋州:中国热带农业科学院热带牧草研究中心,2002.19

培养。30 d 后,统计愈伤组织诱导率并记录愈伤生长状态。愈伤组织长到半粒黄豆大小时,进行分化培养,每处理接种 20 块愈伤组织,设置 3 个重复。30 d 后统计有芽分化的愈伤组织比例。丛生芽长到 1 cm 长时,进行生根培养,每处理接种 10 棵绿芽,14 d 后统计正常成苗植株的生根率。愈伤继代时开始光照,培养物表面光照强度约 3 000 lux,光照周期为 16 h/d。

1.3 公式计算及数据处理

种子发芽率 = 发芽的种子数 / 播种的种子数 × 100 %

愈伤诱导率 = 愈伤形成的种子数 / 接种种子总数 × 100 %

愈伤分化率 = 有芽形成的愈伤组织数 / 接种的总愈伤组织数 × 100 %

根诱导率 = 有根形成的芽丛数 / 接种的芽丛数 × 100 %

数据采用 SAS 统计分析软件处理,邓肯测验。

2 结果与分析

2.1 黑籽雀稗种子发芽和愈伤组织诱导

黑籽雀稗种子经过浸种后,置于湿润的滤纸上 1 周后即可陆续发芽,2 周后芽长可达 3~4 cm。黑籽雀稗发芽率不高,大概在 60 % 左右。在愈伤组织诱导的各处理激素配比下,黑籽雀稗种子发芽率都有所提高,这可能与激素能导致种子生活力提高有关。

当 2,4-D 浓度小于 2.0 mg/L 时,黑籽雀稗愈伤组织的诱导率随着 2,4-D 浓度升高而升高,愈伤状态也越来越好,伴随生长的芽随着 2,4-D 浓度升高而变短,这是因为 2,4-D 改变了成熟胚的生长状态,使成熟胚脱分化。当 2,4-D 浓度大于 2.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率降低(见表 1)。2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 时,愈伤诱导率极显著高于其他浓度诱导率,所以本实验中确定 MSM + 2.0 mg/L 2,4-D + 3 % 蔗糖 + 8.0 g/L 琼脂为黑籽雀稗愈伤组织诱导培养基。

2.2 愈伤组织分化

当 6-BA 浓度小于 6.0 mg/L 时,黑籽雀稗愈伤组织的分化率随着 6-BA 浓度升高而升高,愈伤褐化数量减少,每颗愈伤组织上丛生芽的数量增多。当 6-BA 浓度大于 6.0 mg/L 时,分化率下降。6-BA 浓度为 6.0 mg/L 时的分化率与其他浓度分化率之间存在极显著差异,6-BA 浓度为 6.0 mg/L 时的分化率高于其他浓度(见表 2)。本实验中确定 MSM+6.0 mg/L 6-BA+3 % 蔗糖 + 8.0 g/L 琼脂为黑籽雀稗愈伤组织分化培养基。

2.3 植株的生根

将分化出的丛生芽从分化培养基上移入含不同浓度 NAA 的 MSM 培养基上。在生根培养基上培养 5 d 后发现有的小苗开始发根,同时有部分芽没有完成生根而逐渐枯萎死亡。当 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,丛生芽生根率为 100 % (见表 3)。本实验中确定 MSM+0.5 mg/L NAA+3 % 蔗糖 + 8.0 g/L 琼脂为黑籽雀稗生根培养基。

表 1 2,4-D 对黑籽雀稗愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度 /mg·L ⁻¹	愈伤诱导率 /%	差异显著性		愈伤状态
		a=0.05	a=0.01	
0	0	g	F	无愈伤组织产生
0.5	39	e	D	乳白色,团粒状
1.0	46	c	C	乳白色,团粒状
1.5	49	b	B	乳白色,团粒状
2.0	65	a	A	乳白色,团粒状
3.0	41	d	D	乳白色,团粒状
4.0	36	f	E	乳白色,团粒状
5.0	36	f	E	乳白色,团粒状
6.0	35	f	E	乳白色,团粒状

说明:小写字母不同表示在 a=0.05 水平上差异显著,相同表示差异不显著,大写字母不同表示在 a=0.01 水平上差异显著,相同表示差异不显著,下同。

表 2 6-BA 对黑籽雀稗愈伤组织分化的影响

6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	愈伤诱导率 /%	差异显著性		愈伤状态
		a=0.05	a=0.01	
0	0	e	E	无芽分化
2.0	30	d	D	苗丛生,正常
4.0	40	c	C	苗丛生,正常
6.0	50	a	A	苗丛生,正常
8.0	45	b	B	苗丛生,正常

3 讨论

植物组织培养过程中,外植体的消毒是关键的一环。目前,比较常用的消毒方式有3种,一是体积分数70%的酒精,二是次氯酸钠溶液,三是质量分数0.1%~0.2%的升汞溶液。黑籽雀稗种子颖壳内有大量的真菌,且黑籽雀稗种子坚硬,消毒液不易渗入,笔者采用0.2%的升汞溶液消毒35 min。尽管升汞溶液浓度到0.2%,处理时间达到35 min,仍然有少数种子在培养一段时间后长菌。

利用成熟胚为外植体诱导愈伤,成熟胚的质量非常关键,选用当年收获的新鲜种子,能提高愈伤诱导率。诱导植物愈伤组织常用的生长素是2,4-D和NAA。在禾本科植物中2,4-D被广泛应用,实践证明2,4-D能高效诱导禾本科牧草愈伤形成。但是2,4-D浓度过大,将不利于愈伤生长,愈伤质量变差,出现很多毛状根的现象,本实验结果也很好的重复了前人的经验^[4-6]。愈伤继代培养时,采取降低2,4-D的浓度到1.0 mg/L同时加入0.1 mg/L细胞分裂素KT使黑籽雀稗愈伤组织快速增殖和形成体细胞胚,这为分化奠定了良好的基础。细胞分裂素类物质6-BA被广泛应用于禾本科植物愈伤组织分化,但是不同的植物所需6-BA浓度不一^[5-7]。本实验中确定的黑籽雀稗愈伤组织分化最适宜6-BA浓度为6.0 mg/L。

笔者摸索出了一套再生频率较高的黑籽雀稗组织培养方法,所诱导的愈伤组织可作为转基因研究的受体材料。这为下一步基因工程操作(基因枪法和根瘤农杆菌法),将外源优质基因导入黑籽雀稗,从而获得转化植株,以及开展黑籽雀稗体细胞无性系变异利用、突变体筛选以及基因转移等方面的研究工作奠定了良好基础。

表3 NAA对黑籽雀稗分化绿苗生根的影响

NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	根诱导率 /%	根生长状态
0	0	无根
0.1	85	每从芽上长出1~2根,根长2.5cm
0.2	90	每从芽上长出1~2条根,根长2.5 cm
0.4	95	每从芽上长出1~2根,根长2.5 cm
0.5	100	每从芽上长出3~4根,根长2.5 cm
0.6	100	每从芽上长出3~4条根,根长1.2 cm



图1 黑籽雀稗植株再生过程
A: 在诱导培养基上愈伤组织的生长状态; B, C, D: 在分化培养基上芽的生长状态; E: 绿芽在生根培养基上生根状态; F: 移栽苗在苗圃中的生长状态

图1 黑籽雀稗植株再生过程

参 考 文 献

- 1 Can E. Adi Yalancy dary (*Paspalum ditalatum* Poir.) bitrisinin genc salkymlaryndau kallus olusumu vebitk rejenerasyonuna genotipve 2,4-D konsantrasyonunum etkileri uzerinde bir arastyrma[J].Turk J Agr. For, 1998, 24(1): 113~119
- 2 侯海军, 胡新文, 段瑞军, 等. 黑籽雀稗品种“热研 11 号”的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 483
- 3 张万军, 王 涛. 多年生黑麦草组织培养与植株再生研究[J]. 草地学报, 2003, 11(3): 219~222
- 4 张万军, 李天红, 王 涛, 等. 高羊茅高频植株再生体系的建立及其影响因子的分析[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(2): 157~161
- 5 曲同宝, 王丕武, 关淑艳, 等. 羊草组织培养及再生系统的建立[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 91~94
- 6 徐子勤, 陈利红. 芥麦组织培养及高频植株再生体系的建立[J]. 分子细胞生物学报, 2006, 3(5): 445~451
- 7 王淑芬, 李 雪, 简丽观. 蓝羊茅的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2006, 2(1): 67

Tissue culture and Plant Regeneration of Tropical Pasture *Paspalum atratum*

Hou Haijun¹ Guo Jianchun² Hu Xinwen³

1 Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences Changsha 410125 China

2 College of Agronomy, SCUTA Danzhou Hainan 571737 China

3 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Haikou Hainan 571101 China

Abstract A systematic study of plant regeneration of tropical pasture *Paspalum atratum* has been conducted. The result showed modified MS medium (MSM) composed of MS salt+9.0 mg/L vitamin B₁+9.5 mg/L vitamin B₆+4.5 mg/L nicotinic acid+1.0 mg/L casein hydrolisate +30 g/L sucrose+8 g/L agar as basic medium was suitable for inducing callus formation from *Paspalum atratum* seeds when 2.0 mg/L 2,4-D was added, and gave a frequency of callus induction of 65%. The subculture medium was added with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L KT. The MSM for differentiation at the presence of 6.0 mg/L 6-BA produced a frequency of green plantlets differentiation of 50%. The rooting frequency was upto 100% on the MSM medium with the supplement of 0.5 mg/L NAA. It takes about 13 weeks for *Paspalum atratum* to regenerate a plant.

Key words *Paspalum atratum* tissue culture plant regeneration