

剪股颖愈伤组织诱导与植株再生

吴桂胜^{1,2,3} 胡鸢雷¹ 宋福平² 郭晓燕³ 徐尔尼³

(¹北京大学生命科学学院,北京 100871;²中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100094;³南昌大学 食品科学教育部重点实验室,南昌 330047)

摘要: 以匍匐剪股颖的成熟种子为外植体,对其愈伤组织诱导及再生体系进行了研究。结果表明:愈伤组织诱导合适的培养基为 MS+6mg·L⁻¹ 2,4-D+0.2mg·L⁻¹ TDZ+500mg·L⁻¹ CH, 诱导率达到 68.1%;MS+5mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ TDZ+500mg·L⁻¹ CH 为愈伤组织继代较合适的培养基;愈伤组织分化的合适培养基为 MS+0.3mg·L⁻¹ TDZ+0.5mg·L⁻¹ 6-BA,分化率达到 52.7%。随着愈伤组织继代次数的增加,胚性愈伤组织的分化能力没有明显的降低,这可为后续的遗传转化长期提供受体材料。

关键词: 匍匐剪股颖 组织培养 愈伤诱导 植株再生

Study on Callus Induction and Plantlet Regeneration of Creeping Bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.)Wu Guisheng^{1,2,3} Hu Yuanlei¹ Song Fuping² Guo Xiaoyan³ Xu Erni³

(¹College of Life Science,Peking University, Beijing 100871; ²State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests,Institute of Plant Protection,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Beijing 100094;

³The Key Laboratory of Food Science of MOE,Nanchang University,Nanchang 330047)

Abstract: Taking mature seeds as explant,the callus induction and plant regeneration system of *Agrostis palustris* Huds.was optimized.The result showed that the suitable medium for callus induction was basic MS medium,supplemented with 6 mg·L⁻¹ 2,4-D,0.2mg·L⁻¹ TDZ and 500mg·L⁻¹ casein hydrolysate,and the ratio of callus induction was 68.1%.The better medium for callus subculture was basic MS medium,supplemented with 5 mg·L⁻¹ 2,4-D,0.1 mg·L⁻¹ TDZ and 500 mg·L⁻¹ casein hydrolysate.The basic MS medium contained 0.3 mg·L⁻¹ TDZ and 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA was suitable for differentiation medium, and the differentiation rate was 52.7%. With subculture times increased ,embryogenic callus still keep a high differentiation frequency,it could provide plant material for gene transfer for a long term.

Key words: *Agrostis palustris* Huds Tissue culture Callus induction Plant regeneration

匍匐剪股颖(*Agrostis palustris* Huds.)属冷季型草坪草,原产于欧亚大陆,我国东北、华北、西北等地均有分布。草质柔软、细嫩、生长迅速,草坪优美、观赏性强,具有较强的耐寒性、耐旱性、耐瘠性、耐荫性,并耐修剪。常用于高尔夫球道、发球区和果岭等高质量、高强度管理的草坪;可以广泛地运用于公园、庭院、厂区等地的绿化^[1,2]。

匍匐剪股颖在耐热性,耐践踏,抗虫、病等方面仍有不足之处。传统的育种手段费时、工作量大,且可利用的资源有限。植物基因工程为培育和改良作物品种提供了新的思路,打破了物种间基因交流的界限,而愈伤组织是基因枪法和农杆菌介导转化法很好的受体。目前,有关建立剪股颖愈伤再生体系方面的报道还

收稿日期:2006-04-07

基金项目:本研究得到北京市科技新星项目资助

作者简介:吴桂胜(1979-),男,在读硕士,研究方向:从事草坪抗虫基因工程研究

通讯作者:胡鸢雷,E-mail:huy1@pku.edu.cn

很少见,本研究以匍匐剪股颖种子为外植体,探索在不同激素组合下的愈伤诱导与分化效果,旨在建立剪股颖的植株再生体系,为剪股颖的遗传转化提供高效、稳定的受体材料。

1 材料与方法

1.1 材料

匍匐剪股颖成熟种子,品种:南岸(southshore),由中种公司提供。

1.2 方法

1.2.1 材料的处理与消毒 将种子去皮后用自来水浸泡 10h,用 70%的酒精浸泡 1h,用无菌水冲洗 3 次,再用 0.1%升汞浸泡 10h,用无菌水再冲洗 5~6 遍,最后用无菌吸水纸吸干。

1.2.2 培养基 诱导培养基为:MS 基本培养基中分别添加 2,4-D(3、4、5、6mg·L⁻¹)和 TDZ(0、0.1、0.2mg·L⁻¹)、30g·L⁻¹ 蔗糖、500mg·L⁻¹ 水解酪蛋白、5g·L⁻¹ 琼脂。愈伤继代与诱导使用相同的培养基。分化培养基为:MS 基本培养基添加 TDZ(0、0.1、0.3、0.5mg·L⁻¹)、6-BA(0、0.3、0.5mg·L⁻¹)、30g·L⁻¹ 蔗糖、500mg·L⁻¹ 水解酪蛋白、5g·L⁻¹ 琼脂。生根培养基为:MS 培养基另加 30g·L⁻¹ 蔗糖、5g·L⁻¹ 琼脂。所有培养基的 pH 值均调至 5.8,然后在 121℃下高压蒸汽灭菌 15min。

1.2.3 培养方法及培养条件 将灭过菌的种子置于愈伤组织诱导培养基上,每个培养皿接种 40 粒,4 个重复;7d 后将种子的芽剪掉,促进愈伤生长;30d 后统计愈伤诱导率和胚性愈伤诱导率,并将愈伤组织转接至继代培养基上,继代周期为 30d。继代 2 次后,将愈伤组织转入分化培养基上。愈伤组织诱导及继代为暗培养;分化及生根培养的光照强度为 2 000Lx,光照时间为 12h/d,培养温度为 25±1℃。

1.2.4 数据处理

种子发芽率=(发芽的种子总数/接种种子总数)×100%

愈伤组织诱导率=(形成愈伤的种子数/接种种子总数)×100%

胚性愈伤诱导率=(胚性愈伤数/接种种子总数)×100%

愈伤组织分化率=(有芽形成的愈伤组织数/接种的总愈伤组织数)×100%

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对愈伤组织诱导和继代的影响

将匍匐剪股颖灭菌种子接种到愈伤诱导培养基上,2d 后开始发出小芽,7d 后统计种子的发芽率,不同愈伤组织诱导培养基上种子的发芽率在 90.6%~92.5%之间,激素浓度对发芽率没有太大的影响。在 2,4-D 浓度低的培养基上,出芽速度快于 2,4-D 高的培养基。7~10d 后在种子的盾片处即可长出愈伤组织。30d 后统计愈伤组织数,计算愈伤诱导率,不同激素浓度下愈伤诱导的结果见表 1。

种子在诱导培养基上诱导的初始愈伤组织都是无色透明状的,且结构疏松。随着愈伤组织的继代培养后,逐渐形成 3 大类不同愈伤;Ⅰ类愈伤组织呈鲜亮的淡黄色或白色,结构致密,呈颗粒状,干燥易碎,生长迅速;Ⅱ类愈伤组织松软、湿润,部分长毛状根;Ⅲ类愈伤组织无结构,松软水渍。Ⅰ类愈伤组织符合胚性愈伤特征,具有很强的分化能力;Ⅱ类和Ⅲ类愈伤组织结构较差。

表 1 结果表明,在 12 种不同激素浓度的培养基中,含 6mg·L⁻¹ 2,4-D 和 0.2mg·L⁻¹ TDZ 培养基的诱导率最高,达到 68.1%。其次是含 5mg·L⁻¹ 2,4-D 和 0.2mg·L⁻¹ TDZ 达到 65.6%。在相同 TDZ 浓度时,2,4-D 浓度的增加,愈伤诱导率呈较大上升趋势,并且差异明显;在相同 2,4-D 浓度时,TDZ 浓度的增加对愈伤诱导率有一定的促进作用。当 2,4-D 浓度达到 5mg·L⁻¹ 与 6mg·L⁻¹ 时,愈伤诱导率变化不大。但 2,4-D 为 5mg·L⁻¹,TDZ 为 0.1mg·L⁻¹ 时,愈伤的质量最好,胚性愈伤的诱导率达到 45.6%。含 5mg·L⁻¹ 2,4-D 和 0.1mg·L⁻¹ TDZ 的培养基适合愈伤组织的继代培养。在只含 2,4-D 的培养基上,愈伤组织生长较慢,长毛的愈伤较多;而在添加 TDZ 的培养基上,愈伤组织生长较快,愈伤组织结构较好。

表 1 不同浓度的 2,4-D 和 TDZ 对种子愈伤诱导的影响

培养基编号	2,4-D (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)	出愈数*	愈伤诱导 率 (%)	胚性愈伤诱 导率 (%) **	愈伤组织状态
1	3	0	49	30.6	13.8	水渍、较软、生长较慢
2	4	0	72	45.0	21.9	水渍、较软、生长较慢
3	5	0	81	50.6	25.0	水渍、松软、部分长毛状
4	6	0	85	53.1	22.5	水渍、松软、部分长毛状
5	3	0.1	63	39.4	25.6	颗粒状、生长较慢
6	4	0.1	94	58.8	41.9	颗粒状、生长较慢
7	5	0.1	101	63.1	45.6	颜色鲜黄、结构致密、生长快
8	6	0.1	105	65.6	42.5	颜色鲜黄、结构致密、生长快
9	3	0.2	69	43.1	15.6	颗粒状、生长较慢、部分长芽
10	4	0.2	87	54.4	20.0	颗粒状、生长较慢、部分长芽
11	5	0.2	98	61.2	24.4	颜色鲜黄、结构致密、生长较快
12	6	0.2	109	68.1	41.3	颜色鲜黄、结构致密、生长较快

注: *,** 接种后 30d 的统计结果

2.2 不同培养基对愈伤组织分化的影响

将继代 2 次的胚性愈伤转移到分化培养基上培养,15d 后愈伤组织开始出现绿色的芽点,40d 后不定芽发育成小苗。此后不断有新的芽点发育成苗。分化过程可持续 3 个月。分化 2 个月 after 统计分化率,结果见表 2。

表 2 不同浓度 TDZ 和 6-BA 对愈伤分化的影响

培养基编号	TDZ (mg·L ⁻¹)	6-BA (mg·L ⁻¹)	分化愈伤数	出芽愈伤数***	愈伤分化率 (%)
a	0.1	0.3	75	22	29.3
b	0.3	0.3	76	28	36.8
c	0.5	0.3	79	31	39.2
d	0.1	0.5	75	27	36.0
e	0.3	0.5	74	39	52.7
f	0.5	0.5	77	36	46.8
g	0	0.5	75	15	20.0
h	0.5	0	78	26	33.3

注:*** 为分化 2 个月后的统计数据

表 2 结果表明,愈伤组织在 8 个分化培养基上均可分化出不定芽,但是分化率有一定差异。其中以含有 0.3mg·L⁻¹ TDZ 和 0.5mg·L⁻¹ 6-BA 培养基的分化率最高,可达到 52.7%,而且每块愈伤平均分化的株系在 6 个以上,较适合愈伤分化。在单独使用 0.5mg·L⁻¹ TDZ 或 0.5mg·L⁻¹ 6-BA 时,愈伤的分化率都不是很高,当 TDZ 和 6-BA 共同使用时,愈伤的分化率有不同程度的提高。但 TDZ 和 6-BA 的合适浓度对分化率影响较大。

2.3 不同继代时间对愈伤分化能力的影响

将继代 3~5 次的胚性愈伤,接种到含 0.3mg·L⁻¹ TDZ 和 0.5mg·L⁻¹ 6-BA 的再生培养基上,分化 2 个月 after 统计分化率,结果如下。

表 3 结果表明,随着继代时间的延长,愈伤分化率有下降趋势,但继代 5 次的愈伤组织仍然有 41.2%

的出芽率,这对长期提供遗传转化的受体材料是很必要的。

2.4 再生植株的生根

将分化的芽长到 2~3cm 高时转移到 MS 培养基上,一周后开始生根,在无激素的培养基上形成发达的根系,等植株长到 6~8cm 时,就可以进行炼苗并且移栽到土壤中。

表 3 不同继代时间对愈伤组织分化率的影响

愈伤继代时间(月)	分化愈伤数	出芽愈伤数	愈伤分化率(%)
3	50	24	48.0
4	53	23	43.4
5	51	21	41.2

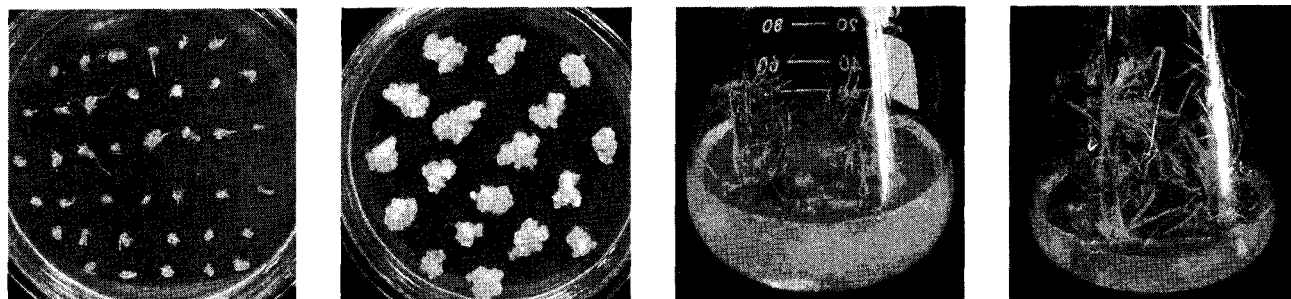


图 1 匍匐剪股颖植株再生过程

- 1 剪股颖种子的愈伤诱导 2 剪股颖愈伤的继代 3 剪股颖在分化培养基上的愈伤分化 4 剪股颖再生植株的生根

3 讨论与结论

3.1 讨论

剪股颖作为遗传转化的受体,主要是愈伤组织和悬浮培养细胞,目前有关建立剪股颖高效、稳定转化受体系统的报道还很少见。至今只有几个实验室获得了转基因剪股颖植株^[3-7],但得到的植株数量远不能满足育种工作的需要。本研究以匍匐剪股颖成熟种子为材料,胚性愈伤诱导和再生频率都比较高。胚性愈伤继代 4~5 次后仍能保持很高的再生频率,且再生植株中没有白化苗的出现,这为后续的遗传转化提供了很好的条件。

诱导愈伤时 2,4-D 浓度对愈伤的诱导率有很大影响,高浓度 2,4-D 的诱导率较高,这与刘文真^[8]的结论相同。但如果继代培养不即时降低 2,4-D 浓度,愈伤的状态会变差,从 I 类愈伤转化为 II 类愈伤,愈伤的再生频率下降。在 2,4-D 浓度为 $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, TDZ 浓度为 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时胚性愈伤诱导率最高,TDZ 的浓度对调节愈伤的状态有着很重要的作用,适当的 TDZ 与 2,4-D 浓度有利于胚性愈伤的形成;但 TDZ 的浓度过大时继代的愈伤有脱分化的趋势,开始长芽。因此,适合匍匐剪股颖愈伤诱导和继代的最佳培养基还需要进一步研究。

在分化培养基上,单独使用 TDZ 或 6-BA 都未能达到很好的分化效果,在 TDZ 与 6-BA 的共同作用下,由于激素的协同作用,使得分化频率大大提高,可见合理地调节不同激素水平是提高分化率的关键。此外将 3 类愈伤组织放在相同的分化培养基上, I 类愈伤组织分化能力强、且分化快; II 类愈伤可以分化,但分化效率不高,分化速度比较慢,所得植株数也较少; III 类愈伤基本不能分化,可见愈伤组织的状态对愈伤分化率有直接影响。对愈伤诱导和分化是否添加水解酪蛋白进行比较试验,发现添加 $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白对于改善愈伤质量和促进分化都有很好的效果,这如 Artunduaga^[9]的试验结果是一致的,但浓度超过 $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时没有明显的提高。

3.2 结论

(下转第 108 页)

因,封闭三孢布拉氏霉菌中 *CarR* 的表达,从而抑制分泌番茄红素环化酶,进而为抑制番茄红素向 β -胡萝卜素环化打好基础。

参考文献

- 1 Levy J, Bosin E. *Nutr Cancer*, 1995, 24:257~266.
- 2 王贵元, 徐娟, 夏仁学. 植物生理学通讯, 2004, 40(4):511~515.
- 3 Luisa ML, Manuel RC. *Plant journal*, 2000, 22(6): 503~513.
- 4 Susanne R. *Nature biotechnology*, 2000,18:666~669.
- 5 Rodríguez-Sáiz M, Paz B, Barredo JL, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(9): 5589~5594 .
- 6 Reynolds A, leake D, Boese Q, et al. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3):326~330.
- 7 Miyagishi M, Taira K. *NatBiotech*, 2002, 19 :497~500.
- 8 Shinagawa T, Ishii S. *GenesDev*, 2003, 17 (11):1340~1345.
- 9 Marina G,Gianluca A, Giuseppe M, et al. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41: 1016~1024.
- 10 Takeno S, Sakuradani E, Tomi A, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5124~5128.

(上接第 103 页)

本试验以匍匐剪股颖成熟种子为外植体,建立了一个较好的组培再生体系,愈伤组织诱导率达到 68.1%,胚性愈伤诱导率达到 45.6%,愈伤分化率达到 52.7%,能够满足下一步遗传转化条件的要求。本试验的再生体系还需要进一步提高分化率,缩短植株再生周期,这些有待于进一步深入研究。

参考文献

- 1 孙吉雄.草坪技术指南[M].北京:科学技术文献出版社,2000,43~45.
- 2 鲜小林,等.草坪建植手册[M].成都:四川科学技术出版社,2005,65~71.
- 3 Zhong H,Bolyard M G,Srinivasan C,et al. *Plant Cell Reports*,1993,13:1~6.
- 4 Hartman CL, Lee L, Day P R T, et al. *Biology Technology*, 1994, 12: 919~922.
- 5 Xiao L, Ha SB. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 874~878.
- 6 Chai B, Maqbool S B, Hajela R K, et al. *Plant Science*, 2002, 163: 183~193.
- 7 Asano Y, Ito Y, Fukami M, et al. *Plant cell Reports*, 1998, 17: 963~967.
- 8 刘文真, 玄松南, 陈惠哲, 等. 林业科学研究, 2004, 17(1): 95~101.
- 9 Artunduaga I R, Taliaferro C M, Johnson B B. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1988, 12: 13~19.