

加拿大披碱草 × 肥披碱草杂种 F₁ 幼穗组培再生体系的研究

李小雷, 于卓*, 马艳红, 谢芳利, 李造哲, 周亚星 (内蒙古农业大学农学院, 内蒙古呼和浩特 010019)

摘要 [目的] 筛选适宜加拿大披碱草 × 肥披碱草种间杂种 F₁ 愈伤组织诱导、幼苗分化和生根的最适培养基。[方法] 以加拿大披碱草 × 肥披碱草种间杂种 F₁ 幼穗为外植体, 以 MS 为基本培养基, 添加不同的激素和营养物, 探讨了 2,4-D、6-BA、NAA 与 IBA 4 种激素不同浓度对杂种 F₁ 愈伤组织的诱导、分化及生根的影响, 建立了组培再生体系。[结果] 激素 2,4-D 对杂种 F₁ 愈伤组织诱导起决定性作用。适宜杂种 F₁ 愈伤组织诱导的最佳培养基为: MS + CH 300.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L, 诱导率达 100%; 适宜幼苗分化的最佳培养基为: MS + CH 300.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L, 分化率达 73.3%; 适宜生根的最佳培养基为: MS + CH 300.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L, 生根率达 86.7%; 组培苗经过炼苗移栽得到了完整植株。[结论] 杂种 F₁ 组培再生体系的建立为新种质的保存奠定了基础。2,4-D 适宜浓度为 2.0 mg/L。

关键词 加拿大披碱草; 肥披碱草; 种间杂种 F₁; 愈伤组织诱导; 植株再生

中图分类号 Q343.2⁺44 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)06-02235-03

Studies on the Tissue Culture and Regeneration System of Hybrid F₁ of *Elymus canadensis* × *E. excelsus*

LI Xiao-lei et al (Agronomy College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019)

Abstract [Objective] The aim of research was to screen the optimal medium of callus induction, plantlets differentiation and rooting of hybrid F₁ of *Elymus Canadensis* × *E. excelsus*. [Method] With the young spikes of hybrid F₁ of *E. Canadensis* × *E. excelsus* as explant and MS as basic medium, the different hormones and nutrients were added to the MS medium to discuss the effect of 4 kinds of hormones including 2,4-D, 6-BA, NAA and IBA on the callus induction, plantlet differentiation and rooting of hybrid F₁ and the plant regeneration system was established. [Result] The hormone 2,4-D played a decisive role in the callus-inducing of hybrid F₁. The optimal medium of callus induction of hybrid F₁ was MS + CH 300.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L with the induction rate of 100%. The optimal medium of plantlets differentiation was MS + CH 300.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L with the differentiation rate of 73.3%. The optimal medium of rooting was MS + CH 300.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L with the rooting rate of 86.7%, and the regenerated plant was obtained after acclimatization and transplanting. [Conclusion] The establishment of tissue culture and regeneration system laid a foundation for preservation of germplasm resource.

Key words *Elymus canadensis*; *E. excelsus*; Interspecific hybrid F₁; Callus tissue induction; Plant regeneration

具有高产、优质等特性的四倍体(2n = 4x = 28)北美洲草原栽培牧草——加拿大披碱草(*Elymus canadensis* L., 染色体组 SSHH)与产于内蒙古草原具抗旱、抗倒伏、抗病虫、耐瘠薄等特性的六倍体(2n = 6x = 42)野生驯化草种——肥披碱草(*E. excelsus* Turcz., 染色体组 SeSeHeHeYY)组配杂交, 成功地获得了具有双新优良特性的多年生五倍体(2n = 5x = 35)种间杂种 F₁ 代, 观察发现, 杂种 F₁ 植株生长势强, 育种潜力大, 但杂种高度不育^[1-4]。有关加拿大披碱草与肥披碱草种间的远缘杂交育种研究国内外尚未见报道。笔者对加拿大披碱草 × 肥披碱草 F₁ 进行愈伤组织诱导和植株再生研究, 旨在为 F₁ 新种质保存及利用离体染色体加倍方法克服杂种的不育性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 加拿大披碱草 × 肥披碱草种间杂种 F₁, 取自内蒙古农业大学农作物试验场的披碱草属种间杂交圃。

1.2 培养基设置 以 MS 为基本培养基, 添加不同的激素和营养物, 设置不同的浓度梯度, 以筛选最适培养基。所有培养基均含 30 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂粉、300.0 mg/L 水解酪蛋白(CH), pH 值 5.8, 121 °C 灭菌 25 min。

1.2.1 诱导愈伤组织培养基。 MS + 2,4-D(0.0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L)。

1.2.2 幼苗分化培养基。 MS + 6-BA(2.0 mg/L) + NAA(0、

0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L)。

1.2.3 生根培养基。 MS + IBA(0.0.5、1.0、2.0 mg/L)。

1.3 外植体处理及培养过程 F₁ 处于小穗分化期时, 取生长一致的植株剥去主茎外层叶鞘, 保留含嫩叶部分的幼穗。在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 2 min, 无菌水冲洗 3 次, 然后用 0.1% 次氯酸钠消毒 7 min, 无菌水冲洗 5 次, 再切成 2~3 mm 的小段, 接种到诱导培养基上, 24~26 °C 暗培养 30 d 后统计诱导率。挑选诱导形成的色泽暗黄、结构致密、颗粒较小的胚性愈伤组织, 转接到继代培养基培养 15~20 d, 待大部分愈伤组织开始膨大时, 再转接到幼苗分化培养基中培养, 温度 26~28 °C, 相对湿度 75%, 光强 2 000~3 000 lx, 光照时间 14~16 h/d, 培养 10 d 后统计绿色芽点率。待幼苗长到 5 cm 以上时转至生根培养基上培养, 20 d 后统计生根率。

1.4 炼苗与移栽 将生根培养 20 d 后的培养瓶封口膜打开放在阴凉处, 7 d 后将幼苗取出, 用清水洗净根部残留的培养基, 稍蘸取 0.1 mg/L 的 IBA 溶液移栽至经高温灭菌过的装有沙壤土的塑料盆中, 室温下遮阴培养 1 周后, 可在阳光下正常生长, 并定期浇水保证水分需求。

1.5 数据处理 愈伤诱导率 = (形成愈伤块数/接种外植体总块数) × 100%; 愈伤分化率 = (有芽形成的愈伤组织块数/接种的总愈伤组织块数) × 100%; 生根率 = (生根幼芽数/接种幼芽数) × 100%^[5]。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及继代培养 F₁ 代幼穗在含有不同浓度 2,4-D 的诱导培养基中暗培养 30 d, 幼穗切段的不同部位开始产生乳白色且表面湿润的愈伤组织, 其体积比较小, 35 d 后愈伤组织体积逐渐增大, 表面开始变干燥、结构致密且为黄色、呈颗粒状生长良好的胚性愈伤组织(图 1a), 观察统计

基金项目 国家自然科学基金项目(30560100); 内蒙古自然科学基金项目(200607010505)。

作者简介 李小雷(1980-), 男, 黑龙江绥化人, 博士研究生, 研究方向: 饲用作物遗传育种研究。* 通讯作者, E-mail: yuzhuo58@sina.com。

收稿日期 2008-02-04

其愈伤诱导率(表1)。由表1可知,在含有2,4-D的MS培养基中,供试材料都能长出愈伤组织,而不含2,4-D的MS培养基中没有长出愈伤组织;随着培养基中2,4-D浓度的增加,愈伤组织的诱导率逐渐增加,当2,4-D浓度达到2.0 mg/L时

愈伤组织的诱导率为100%,当2,4-D浓度继续增加时其诱导率反而下降。这表明激素2,4-D对愈伤组织诱导起决定性作用,2,4-D适宜浓度为2.0 mg/L。

表1 不同浓度的2,4-D对供试材料幼穗愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different 2,4-D concentration on callus induction of immature spikes of tested plants

2,4-D 浓度//mg/L	接种外植体数	形成愈伤数	诱导率//%	愈伤组织状况
Concentration of hormone 2,4-D	No. explants	No. callus produced	Frequency of callus induction	Callus state
0	80	0	0	逐渐变为褐色,死亡 Brown gradually, died
0.5	80	28	35.0	雪白色,较松散 Snowy white, looser
1.0	80	58	72.5	白色,松软 White, short
1.5	80	66	82.5	淡黄色,较致密 Light yellow, more compact
2.0	80	80	100	淡黄色,致密,颗粒状 Light yellow, compact, grainy
2.5	80	70	87.5	淡黄色,较致密,团状 Light yellow, more compact, clump
3.0	80	62	77.5	乳白色,较致密,团状 Milk white, more compact, clump

2.2 愈伤组织的分化 由表2可知,当6-BA浓度为2.0 mg/L时,随着NAA浓度的增加,愈伤组织的分化率逐渐增加;在6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L时,愈伤组织的分化率达73.3%,且再生植株生长良好(图1b~d);随着NAA浓度的

继续增加,愈伤组织的分化率开始降低且植株矮小,同时有少量根系出现;当NAA浓度达到1.0 mg/L时,愈伤组织分化很慢,并有大量的须根出现。表明6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L为F₁代的适宜分化培养基。

表2 不同浓度的6-BA与NAA组合对供试材料愈伤组织分化的影响

Table 2 Effect of different 6-BA and NAA concentration combination on callus differentiation of tested plants

激素和浓度//mg/L	接种愈伤数	分化芽的愈伤数	分化率//%	再生植株状况
Hormone and concentration	No. callus cultured	No. callus differentiated	Frequency of differentiation	The state of the regenerated plants
6-BA 2.0	60	34	56.7	分化快,苗细弱,生长快 Differentiated fast, slim and fragile seedling, grow fast
6-BA 2.0 + NAA 0.2	60	36	60.0	分化较快,株形高,生长快 Differentiated fast, taller height, grow fast
6-BA 2.0 + NAA 0.4	60	44	73.3	分化较快,苗健壮深绿,有少量根 Differentiated fast, lusty seedling and darken green, a few of roots appeared
6-BA 2.0 + NAA 0.6	60	32	53.3	分化较慢,苗子高矮不均,有少量根 Differentiated fast, Irregular seedling, a few of roots appeared
6-BA 2.0 + NAA 0.8	60	24	40.0	分化慢,植株矮,叶片大,有部分根 Differentiated fast, shorter seedling, big leaves, partial roots appeared
6-BA 2.0 + NAA 1.0	60	22	36.7	分化很慢,植株小,有大量须根 Differentiated fast, small seedling, grow slowly, a mass of roots appeared

表3 不同浓度的IBA对供试材料生根的影响

Table 3 Effect of different IBA concentration on rooting of tested plants

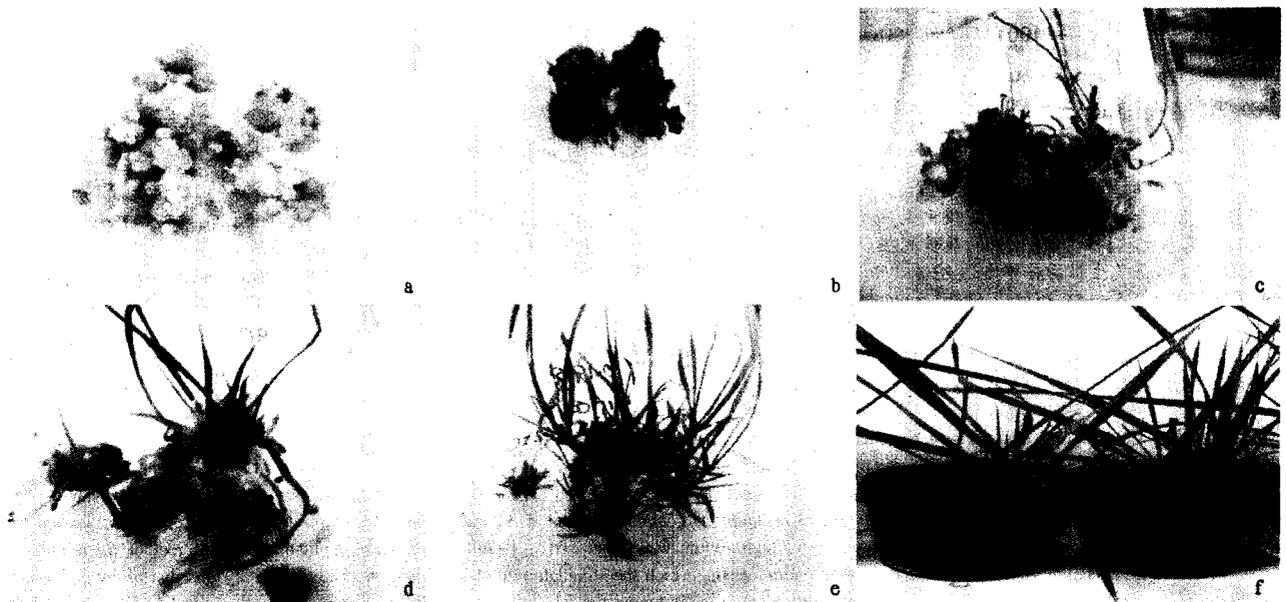
IBA 浓度//mg/L	接种的小苗数	生根数	生根率//%	根的形态
IBA concentration	No. seedling	No. roots	Frequency of roots	Shape of roots
0	45	24	53.3	根粗壮,须根较少 Brawny roots, lesser fibrous root
0.5	45	39	86.7	根粗壮,须根多 Brawny roots, much fibrous root
1.0	45	27	60.0	根较粗壮,须根较多 More brawny roots, more fibrous root
2.0	45	21	46.7	根细长,数量少 Acerose roots, small amount

苗在IBA浓度为0.0.5.1.0.2.0 mg/L培养基中均能诱导生根,但以IBA 0.5 mg/L的生根率最高(86.7%),且根系粗壮,数量多,移栽后更容易成活(图1f)。

3 讨论与结论

在植物组织培养中,常用生长激素和细胞分裂素刺激和诱导细胞脱分化,并控制植物的生长发育,一般2,4-D、NAA对细胞分裂、愈伤组织生长表现为促进作用,6-BA对细胞分裂、愈伤组织生长表现为抑制作用^[6]。该试验以加拿大披碱草×肥披碱草种间杂种F₁的幼穗为外植体,探讨了2,4-D、6-BA、NAA与IBA 4种激素不同浓度对愈伤组织的诱导、分化及生根的影响,建立了组培再生体系。在愈伤组织诱导过程中,MS培养基添加2.0 mg/L的2,4-D最适于愈伤组织诱导,

2.3 生根培养基的筛选 由表3可知,分化出来的健壮小



注:a.诱导的愈伤组织;b~e.愈伤组织分化成苗;f.移栽后的成活再生植株。

Note:a.Callus induction;b~e.Process of callus differentiation;f.Regenerated plants after transplanting.

图1 加拿大披碱草×肥披碱草杂种F₁再生植株的形成过程

Fig.1 Plant regeneration of hybrid F₁ of *Elymus canadensis* × *E. excelsus*

其诱导率高达100%,且愈伤组织生长状况好;在诱导幼苗分化时,以MS培养基添加6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L分化率最高(73.3%),且再生苗生长健壮;采用MS培养基添加IBA进行生根培养,当IBA浓度为0.5 mg/L时,生根率达86.7%,生根效果最好,而且幼苗移栽之后易于成活。

参考文献

[1] 马艳红,于卓,李小雷,等.加拿大披碱草与2种国产披碱草杂种F₁愈伤组织诱导及植株再生研究[J].西北植物学报,2006,26(9):1888-

1892.

- [2] 于卓,王晓娟,刘杰,等.加拿大披碱草与肥披碱草杂种F₁的形态学及细胞学分析[J].麦类作物学报,2004,24(4):6-10.
- [3] 于卓,李造哲,云锦凤.几种小麦族禾草及其杂交后代农艺特性的研究[J].草业学报,2003,12(3):83-89.
- [4] 于卓,宋永富,李造哲,等.加拿大披碱草×披碱草杂种F₁的生育及细胞遗传学研究[J].草地学报,2002,10(4):258-264.
- [5] 霍秀文,魏建华,张辉,等.冰草属植物组织培养再生体系的建立[J].华北农学报,2004,19(1):17-20.
- [6] 刘海学,王罡,李静,等.向日葵不同外植体组织培养及其再生的研究[J].中国农业科学,2006,39(11):2208-2213.

(上接第2234页)

小尾寒羊多胎性能分子标记研究方面作了初步探讨,筛选出若干与小尾寒羊产羔性能相关的微卫星标记。笔者用5个微卫星基因座对小尾寒羊的产羔数进行标记研究,找到了3个显著标记,进一步丰富了小尾寒羊高繁性能分子机制的内容。BM1329的5个等位基因中,148 bp的效应值最高(0.432),且与其他等位基因的效应值之间差异显著($P < 0.05$),这与储明星等的结果明显不同。储明星等^[5]研究了两个微卫星基因座(OarAE101和BM1329),找到了与小尾寒羊产羔数显著正相关的基因型146 bp/158 bp及等位基因146 bp/148 bp,与小尾寒羊的产羔数显著负相关。结果的差异可能与种群和采样有关。OarHH55位点未找到显著的标记,与雷雪芹等^[6]研究结果是一致的。该研究对小尾寒羊乃至其

他绵羊产羔性能进行标记辅助选择具有借鉴意义。

参考文献

- [1] MONTGOMERY G W, LORD E A, PENTY J M, et al. The Booroola fecundity gene (*FecB*) gene maps to sheep chromosome 6[J]. *Genetics*, 1994, 22: 148-153.
- [2] LORD E A, DAVIS G H, DODDS K G, et al. Identification of Booroola carriers using microsatellite markers[C]//Proceeding of the 6th World Congression Genetics Applied to Livestock Production. Australia: Armidale, NSW, 1998, 27: 19-22.
- [3] BOSTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.
- [4] BISHOP M D, KAPPES S M, KEELE J W, et al. A genetic linkage map for cattle[J]. *Genetics*, 1994, 136: 619-639.
- [5] 储明星,程金华,过纬.微卫星标记OarAE101和BM1329在五个绵羊品种中的初步研究[J].遗传学报,2001,28(6):510-517.
- [6] 雷雪芹,陈宏,徐廷生,等.小尾寒羊产羔性状的微卫星标记研究[J].畜牧兽医学报,2003,34(6):530-535.