

文章编号: 1007-1032(2006)05-0494-03

柱花草组织培养研究

钟 军^{a, b}, 智旭丹^b, 杨 波^b

(湖南农业大学 a.农学院; b.细胞工程实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以 6 个柱花草品种为材料, 研究了柱花草愈伤组织的诱导、芽和根的分化等组织培养技术, 结果表明, 外植体和培养基对柱花草组织培养的影响较大. 愈伤组织的诱导, 6 个品种之间无显著性差异, 但不同的外植体却表现出极显著的差异, 其中真叶的出愈率最高; 芽和根的分化, 真叶的分化系数、生根率和生根系数最高, 最佳芽和根的分化培养基分别为 MS+1.0 mg/L NAA+ 4.0 mg/L KT, 1/2MS+1.0 mg/L NAA+ 0.5 mg/L KT.

关 键 词: 柱花草; 组织培养; 外植体; 培养基

中图分类号: Q949.751.9

文献标识码: A

On Tissue Culture of *Stylosanthes*

ZHONG Jun^{a, b}, ZHI Xu-dan^b, YANG Bo^b

(a.College of Agronomy; b.Key Laboratory of Cell Engineering, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: A study the tissue culture technique of the inducing callus, and buds and roots differentiation on six different *Stylosanthes*, showed that explants and medium have bigger to the tissue culture of *Stylosanthes*. In the inducing callus, they have not remarkable difference among the six varieties, but have the remarkable difference among the different explants and the inducing-callus rate of the first outspread foliage was the highest. In the buds and roots differentiation, the dedifferentiation coefficient, the rhizogenesis rate and the rhizogenesis coefficient of the first outspread foliage was the highest, and the best buds and roots differentiation medium was respectively MS+1.0 mg/L NAA+ 4.0 mg/L KT and 1/2MS+1.0 mg/L NAA+ 0.5 mg/L KT.

Key words: *Stylosanthes*; tissue culture; explant; medium

柱花草(*Stylosanthes* spp.)原产于中南美洲, 是一种优良的热带豆科牧草, 该属有 44 个以上的种或亚种^[1]. 由于柱花草炭疽病是威胁其推广种植的主要障碍, 因而国内外近年来在柱花草种质资源的收集以培育抗病品种、引种选育、从体细胞变异和体细胞融合技术中获得抗炭疽病植株以及利用遗传工程获得抗病转基因植株等方面展开了多项工作^[2-6], 其中利用遗传工程获得抗病品种具有广阔的前景, 而这一技术成功的关键又依赖于组织培养技术. 虽然国外在 20 世纪 60 年代就开展了柱花草的组织培养研究^[7-8], 但由于所使用的基因型有限, 因此取得的成果不显著. 随着遗传工程技术的

日益成熟, 有希望通过该技术来培育更多更优良的柱花草品种.

笔者在借鉴前人工作的基础上, 选用不同柱花草品种、不同外植体和不同培养基来研究柱花草的组织培养技术, 以期建立成熟完善的柱花草组织培养体系奠定一定的理论和技术基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

热研 2[#], 5[#], 7[#], 10[#], 13[#], 西卡柱花草共 6 个品种, 由湖南农业大学细胞工程实验室提供.

1.2 方 法

1.2.1 培养基的配制

无菌苗生长培养基(M₁): 1/2MS; 愈伤组织诱导培养基(M₂): MS+1.0 mg/L NAA+ 4.0 mg/L KT; 芽

收稿日期: 2006-06-29

基金项目: 湖南农业大学引进人才科研基金(03YJ 007)

作者简介: 钟 军(1973-), 女, 湖南沅江人, 博士, 湖南农业大学副教授. 研究方向: 作物遗传育种.

分化培养基 1(M₃): MS+1.0 mg/L NAA+4.0 mg/L KT; 芽分化培养基 2(M₄): MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L KT; 生根培养基 1(M₅): 1/2MS+1.0 mg/L NAA; 生根培养基 2(M₆): 1/2MS+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L KT. 培养基的 pH 均为 6.0, 琼脂质量分数均为 0.8%, 蔗糖质量分数: M₁~M₄ 培养基为 3.0%, M₅, M₆ 培养基为 1.0%, 各阶段培养温度为(28±2)℃, 每天光照时间为 12 h, 光照度为 2 000 lx.

1.2.2 无菌苗的培养

去掉种子表面的褐色种衣, 经 80℃热水处理 5 min, 70%乙醇灭菌 5 min, 无菌水冲洗 1~2 次, 10%次氯酸钠灭菌 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 将种子放在无菌滤纸上吸干表面水分后在超净台上接种, 7 d 后调查无菌苗的生长情况.

1.2.3 愈伤组织的诱导

分别以无菌苗上刚展开的子叶、长出 2 片真叶后的子叶、长出 4 片真叶后的子叶、真叶(第一展开叶)、胚根、胚轴为外植体, 进行愈伤组织诱导培养. 每瓶 10 个外植体, 重复 3 瓶. 15 d 后统计出愈率和愈伤组织的生长情况.

1.2.4 芽的分化培养

挑取色鲜致密的愈伤组织于培养基上进行芽的分化培养, 20 d 后调查分化情况并统计分化系数.

1.2.5 根的培养

待芽伸长至 2~3 cm 时, 从愈伤组织基部切下后将其转至生根培养基上诱导生根. 20 d 后统计生根率和生根系数.

1.2.6 驯化和移栽

敞开培养基瓶口, 让生根的再生苗在室温、自然光条件下锻炼 5~6 d, 然后移栽到含普通土: 蛭石=1:1 并拌有少量复合肥的营养钵里, 淋透水, 在遮阴处培养 2~4 d, 然后转至培养房中培养并适时浇水, 10 d 后统计植株再生率.

2 结果与分析

2.1 无菌苗生长的比较

不同柱花草品种无菌苗的生长情况有所不同, 其中热研 5[#] 的出苗速率最快(接种后的第 4 天就可观察到绿色的芽点), 出苗率最高(达 100%)且苗生长健

壮, 而西卡出苗速率最慢(接种后的第 9 天才观察到绿色的芽点), 出苗率最低(不到 50%), 即使延长调查时间, 其不发芽的种子仍然不发芽, 但发芽的苗生长较健壮. 6 个柱花草品种无菌苗的出苗速率由快至慢依次为热研 5[#], 热研 10[#], 热研 2[#], 热研 7[#], 热研 13[#], 西卡.

2.2 愈伤组织的诱导及其方差分析

不同柱花草品种的出愈率不同, 其中热研 5[#] 最高(94.0%), 热研 10[#] 次之(91.5%), 西卡最低(83.1%), 但差异不显著, 说明本试验所选用的 6 个品种, 在愈伤组织的诱导上差异很小.

不同外植体的出愈率也不相同, 真叶最高(89.5%), 刚展开的子叶次之(82.4%), 胚根最低(只有 8.7%). 方差分析结果表明, 不同外植体的出愈率有极显著差异.

2.3 外植体和培养基对芽分化的影响

6 个柱花草品种的芽分化出现了 3 种类型: 一是在分化的芽上产生了根, 占 4%, 直接将其移栽后能形成完整的植株; 二是只出现了分化芽, 占 87%, 有的芽生长正常且健壮, 属于正常芽; 有的芽生长得快, 但不健壮, 芽苗弱, 属于快速生长芽或不正常芽, 这可能是由于不同的外植体对芽生长的作用不同; 三是只出现了分化根, 占 9%, 在整个试验过程中, 分化的根上始终未产生芽.

对芽分化的新复极差分析表明: ①不同外植体在相同的培养基上, 其分化系数有较大的差异. 在 M₃ 培养基中, 真叶的分化系数最高(10.27), 刚展开的子叶次之(7.16), 胚根最差(只有 1.61); 在 M₄ 培养基中, 也是真叶的分化系数最高(6.80), 刚展开的子叶次之(6.04), 胚根最差(1.12). ②相同的外植体在不同的培养基中, 虽然分化系数的表现趋势相同但分化的效果却有差异, 即无论是在 M₃ 培养基中还是在 M₄ 培养基中, 分化系数由高到低的表现趋势都是: 真叶、刚展开的子叶、有 2 片真叶的子叶、有 4 片真叶的子叶、胚轴、胚根, 但外植体在 M₃ 培养基中的平均分化系数为 6.13, 而在 M₄ 培养基中只有 4.44. 说明在芽分化培养时, M₃ 培养基的分化效果好于 M₄ 培养基. ③不同外植体芽分化系数的新复极差表明: 在 M₃ 培养基中各个外植体之

间的差异分别达显著水平;在 M₄ 培养基中,真叶与其他外植体之间的差异显著。

2.4 外植体和培养基对生根培养的影响

由生根情况及其新复极差分析结果可知:1) 不同外植体在相同的生根培养基上,其生根率和生根系数表现不同。在 M₅ 培养基中,真叶的生根率最高(79.8%),有4片真叶的子叶次之(77.2%),胚根最差(只有18.1%),真叶的生根系数最高(4.0),刚展开的子叶次之(3.3),胚根最差(只有1.1);在 M₆ 培养基中,真叶的生根率最高(66.3%),有2片真叶的子叶次之(63.8%),胚根最差(只有15.0%),真叶的生根系数最高(5.7),有4片真叶的子叶次之(5.4),胚根最差(只有2.8)。同时新复极差法表明:无论在 M₅ 培养基中还是在 M₆ 培养基中,除胚根外,其他外植体之间的差异都不显著。2) 相同的外植体在不同的培养基中,生根率和生根系数的表现也不同。如刚展开的子叶,其生根率和生根系数在 M₅ 培养基中分别为73.3%和3.3,在 M₆ 培养基中分别为54.4%和4.6。不同外植体在 M₅ 培养基中的平均生根率和生根系数分别为61.78%和3.0,在 M₆ 培养基中分别为46.32%和5.0,即外植体在 M₅ 培养基中的生根较好,但在 M₆ 培养基中的生根系数却较高。

在驯化移栽的过程中,有部分根干枯死亡的现象,经过统计发现,在 M₅ 培养基中,植株再生率为69%,而在 M₆ 培养基中却达88%。说明在生根培养时,需要较低浓度 KT 的刺激。

3 结 论

本试验中,6个柱花草品种在愈伤组织的诱导上无明显差异,但在不同的外植体培养中,真叶出愈率最高。在芽的分化中,真叶的分化系数最高,同时得出 M₃ 培养基,即 MS+1.0 mg/L NAA+4.0

mg/L KT 更有利于芽的分化。在诱导根的生长中,外植体在 M₅ 培养基中的生根率较高,但在 M₆ 培养基中的生根系数却较高,进一步通过驯化移栽分析植株在两种培养基中的再生率,得出 M₆ 培养基,即 1/2MS+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L KT 有利于生根培养。

参考文献:

- [1] Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, et al. Immunogenicity in humans of are combinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato[J]. Nat Med, 1998(4): 607-609.
- [2] Ehsani P, Khabiri A, Domansky N N. Polypeptides of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 190: 107-111.
- [3] Rodrigo S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Stylosanthes guianensis* and production of transgenic planta [J]. Plant Science, 1994, 96: 119-127.
- [4] 冯淑芬, 李凤娥, 何朝族, 等. 笔花豆炭疽病菌生物学特性和流行条件研究[J]. 热带作物研究, 1994(1): 87-94.
- [5] 蒋侯明, 何朝族, 李居正, 等. 热带优良豆科牧草——热研2号柱花草的选育和推广[J]. 热带作物研究, 1992(1): 62-66.
- [6] 梁英彩, 赖志强, 腾少花, 等. 907 柱花草的选育研究 [J]. 草业科学, 1998, 15(2): 27-30.
- [7] Clements R J. Pasture for prosperity 3 the future for new tropical pasture plants[J]. Tropical Grasslands, 1996, 30: 31-36.
- [8] Edye L A, Maass B L. Recent advances in studies of an tyracnose of *Stylosanthes* I. The biogeography of *Styloanthus hamata*, cabraand "*Styloanthus seabrana*" [J]. Tropical Grasslands, 1997, 31: 417-423.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平