

白羊草成熟胚组织培养及植株再生体系的建立

于 娜, 董宽虎*

(山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 以白羊草(*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng)成熟胚为外植体,研究不同激素及其不同对比对愈伤组织诱导发生与生长状态及其绿苗分化能力的影响。从而建立了白羊草植株再生体系,为开展生物技术育种提供参考。结果表明:在愈伤组织诱导培养基中添加 2.0 mg/L 2,4-D 诱导频率为 86.7%,MSB 和 MS 培养基对愈伤组织诱导效果相近;在其继代培养基中添加 1.0 mg/L 2,4-D 愈伤组织增殖快,且保持胚胎发生能力;适宜的分化培养基为 6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L,分化率达 61.3%;愈伤组织在不添加任何生长调节剂的培养基上即可生根。

关键词: 白羊草;成熟胚;愈伤组织;植株再生

中图分类号: S336

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2008)05-0466-04

Tissue Culture and Establishment of Plant Regeneration System from Mature Embryo of *Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng

YU Na, DONG Kuan-hu*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi Province 030801, China)

Abstract: Effects of hormones and their combinations on callus induction, growth state, and shoot regeneration were studied using the mature embryos of *Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng as example plants. At same time, in order to provide groundwork for the biotechnology breeding, the plant regeneration system of *B. ischaemum* was set up. Results indicate that the callus induction frequency reached 86.7% in the callus induction medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D and similar effectiveness was detected between MSB and MS medium. Rapid growth of callus and embryogenesis were maintained in the callus subculture medium with addition of 1.0 mg/L 2,4-D. After callus subculture, the shoot regeneration rate from callus were 61.3% in the differentiation medium supplemented with 0.1 mg/L 6-BA and 0.05 mg/L NAA, and the root development was independent upon any hormone compositions.

Key words: *Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng; Mature embryo; Embryogenic callus; Plant regeneration

组织培养技术作为生物技术的主要组成部分和基础,只有建立起成熟的高频再生无性系,才能进行细胞工程育种和基因转化的研究。白羊草(*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng)是禾本科孔颖草属多年生草本植物^[1],是一种丛生、具匍匐茎的多年生暖季型牧草,具有固土保水,生活力强,高产耐牧、耐践踏,适口性好等优点,是饲用价值较高的放牧型禾草之一,广泛分布于我国暖温带落叶阔叶林地带,是控制水土流失和提供家畜饲草的重要草种^[2]。目前

关于白羊草组培再生体系的研究较少,仅上个世纪 90 年代肖辅珍等分别以白羊草成熟胚和幼穗为外植体,诱导出胚性愈伤组织,但在诱导植株时需转至无激素培养基进行分化,这样会直接影响再生植株的诱导频率^[3]。因此,本试验以白羊草成熟种子为外植体,在愈伤组织诱导、分化阶段中试图寻求更适宜的激素组合配比,以建立白羊草的植株再生体系,为白羊草的育种及转基因研究奠定基础。

收稿日期: 2008-02-29; 修回日期: 2008-05-26

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD56B01)

作者简介: 于娜(1979-),女,山西阳城县人,硕士研究生,研究方向为草地资源与草地管理, E-mail: yuna1023@126.com; * 通讯作者: Author for correspondence, E-mail: dongkuanhu@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

供试的白羊草种子 2006 年 10 月采自山西省太谷县凤山,海拔 1100 m,植被为喜暖灌草丛类草地,建群种为白羊草 (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng),种子千粒重约 0.70 g^[1]。

1.2 方法

1.2.1 白羊草种子的处理

取完全成熟、结构完整的白羊草种子,人工拨去外稃,先用无菌水浸泡 10 min,去除杂质并使其沉淀,然后用 75%酒精浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3 次,再用 0.1%升汞溶液消毒 15 min,期间不断摇动,用无菌水冲洗 3 次后,用滤纸吸干水渍。

1.2.2 愈伤组织的诱导

将消毒晾干的白羊草种子接种于不同的愈伤组织诱导培养基上,每瓶 25 粒种子,重复 3 次,置于 25±2℃,完全黑暗条件下诱导产生愈伤组织,自种胚开始萌发时每隔 4 d 记数 1 次,包括发芽数和出愈数,直到出愈数稳定时停止计数。诱导培养基分别为:1)MSB+2,4-D,2,4-D 浓度设置 6 个梯度分别为:0、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 mg/L;2)MS、MSB+2,4-D,2,4-D 浓度为 2.0 mg/L;

MSB 培养基:MS 无机盐+B₅ 有机成分,以及蔗糖(30 g/L),琼脂(5 g/L),以上培养基的 pH 值调至 5.8,在 121℃条件下灭菌 20 min。

1.2.3 愈伤组织的继代改造

25-30 d 后将初生愈伤组织从母体上切下,转移至降低 2,4-D 浓度的改造培养基上,继代 4~5 d,继

代培养基为 MSB+1.0 mg/L2,4-D。

1.2.4 愈伤组织的分化

将继代生长致密的胚性愈伤组织转移到附加不同浓度的 KT、ZT、6-BA、NAA 以及蔗糖(30 g/L)、琼脂(5 g/L)MSB 分化培养基上进行分化。培养温度 25±2℃,光照强度 2000~3000 Lx,光周期为 16 h/d。接种 30 d 统计分化率,待芽长到 6~7 cm,根长 3~4 cm 时转至无激素的培养基上生根。

1.3 离体培养方法

种子在愈伤组织诱导培养基上培养 25 d 后,将愈伤组织转移到愈伤组织继代培养基上。挑选外表呈干燥、紧密、颗粒状愈伤组织在愈伤组织继代培养基上继代培养 4-5 d,经继代培养的愈伤组织转到愈伤组织分化培养基上,培养 30 d 后统计绿苗分化率。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

成熟胚接种到固体培养基后,大多数愈伤组织从幼苗的下胚轴处形成,有发芽能力的种子均能诱导产生愈伤组织,不萌动的种子则没有愈伤组织产生,少数是在种子的胚着生处直接形成愈伤组织。

在黑暗条件下 2 d 种子开始萌动,出芽后 7 d 形成可见的愈伤组织,25 d 增长到出愈高峰,愈伤组织质地和外形均为一致,表面呈乳白色,质地松软,水浸棉絮状。2 种培养基的培养效果如表 1。在供试的两种培养基中,出芽率和愈伤组织诱导率都在 80%左右,但 MSB 培养基显著高于 MS 培养基 ($P<0.05$)。愈伤组织质地和外形在这两种培养基上较为一致,都呈水渍状,透明,松软(见图 1A)。

表 1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different basal medium on callus induction of mature embryos

培养基种类 Basal medium	种子数 Seed number	出芽数 Bud number	出愈数 Callus number	出芽率(%) Budding rate	出愈率(%) Induction rate
MS	75	61	61	80.09±1.74 ^b	80.09±1.74 ^b
MSB	75	65	65	86.28±2.80 ^a	86.28±2.80 ^a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下表同此注

Note: Means with different small letters in the same column are significantly different at the 0.05 level, the same as below

2.2 激素浓度对白羊草出芽、出愈的影响

从表 2 中可看出,白羊草的出芽率在不含激素的处理 6 培养基上最高,经激素处理,出芽率反而下降。2,4-D 浓度对白羊草种子出愈率有一定影响,随着 2,4-D 浓度提高,出愈率下降。在 2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 的条件下,白羊草种子有较高的出愈率;在浓度为 6.0 mg/L 时,出愈率下降到 46.11%;处理 2,3,5 次之;处理 6 的种子萌发后,生长为完整的幼苗,

即无菌苗,在整个发育过程中均未形成愈伤组织。考虑到高浓度 2,4-D 对愈伤质量和分化的影响,诱导白羊草愈伤组织的 2,4-D 浓度以 2.0 mg/L 为宜。

2.3 白羊草愈伤组织的可改造性

本试验中白羊草成熟胚的胚性愈伤组织只能在形成松软的非胚性愈伤之后,通过降低培养基中 2,4-D 的浓度,使致密或疏松的颗粒中胚性愈伤组织发生率提高(见图 1B)。

表 2 不同 2,4-D 浓度处理种子的出芽、出愈率 (第 30 d)

Table 2 Budding and induction rates from seeds on the 30th day under the treatment of different concentrations of 2,4-D

编号 No.	2,4-D 浓度(mg/L) Concentration of 2,4-D, mg · L ⁻¹	种子数 Number of seeds	出芽率(%) Budding rate, %	出愈率(%) Induction rate, %
1	6.0	75	63.36±8.44 ^d	46.11±2.42 ^c
2	4.0	75	81.19±2.08 ^c	59.79±1.94 ^b
3	3.0	75	85.51±1.60 ^{bc}	61.23±2.09 ^b
4	2.0	75	86.57±7.95 ^{ab}	86.56±7.95 ^a
5	1.0	75	82.03±1.51 ^{bc}	47.83±1.72 ^c
6	0	75	90.62±1.72 ^a	0 ^d

表 3 不同激素配比组合愈伤组织的分化情况

Table 3 Callus differentiation under different combination of hormones

编号 No.	激素配比组合(mg/L) Hormone composition mg · L ⁻¹				接种愈伤数 Number of inoculation	胚性愈伤组织发生率(%) Induction frequency of embryogenic callus, %	分化率(%) Differentiation frequency, %
	NAA	KT	ZT	BA			
1	0.1	0	0	0.2	87	41.64±2.31 ^{bc}	18.35±1.50 ^{ef}
2	0	0.2	0	0.2	89	31.33±2.39 ^{cd}	24.95±2.94 ^{de}
3	0	0	0.5	0	81	20.42±4.57 ^d	16.69±3.21 ^f
4	0	0	0.1	0.04	86	81.94±3.59 ^a	43.47±2.65 ^b
5	0	0	0.1	0.05	87	51.52±3.55 ^b	59.73±2.34 ^a
6	0	0	0.1	0.06	88	90.90±2.62 ^a	34.62±2.65 ^c
7	0	0	0.1	0.07	86	85.56±9.88 ^a	28.26±2.22 ^{cd}

2.4 不同激素配比对白羊草愈伤组织分化的影响

由表 3 可知,白羊草在 4、5、6 三种分化培养基上的分化率较高,分别达到 43.47%、59.73%、34.62%,而在 1、2、3 三种培养基上分化率较低。对于不同的激素组合愈伤组织均可以分化出绿色小苗。以 6-BA、NAA 的培养基上的分化率较高,但部分胚性愈伤都会发生褐变。其中以 MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的配比最为合适,分化率最高为 59.73%。适宜的低浓度 6-BA 和 NAA 组合分化率较高,提高 NAA 浓度会抑制愈伤组织的分化,以附加 NAA 0.05mg/L 为最适浓度,低于或高于这一浓度的分化率都会下降(见图 1C)。

2.5 生根与移栽

经过 30~40 d 培养,在愈伤组织表面会出现许多绿色的点状组织区,即芽点。3~6 d 后芽点逐渐发育为不定芽。当不定芽形成后,将其转移到不含任何激素的培养基上^[3],30~40 d 以先长芽后长根的途径分化出再生苗,苗高最高可达 10 cm,并且有发达的根系,根长可达 4 cm。炼苗 3~4 d 后移入盆栽,生长良好,小苗成活率达 100%(见图 1D)。

3 讨论与结论

3.1 白羊草种子相对较小,千粒重只有 0.70 g 左右,采用常规的灭菌时间和方法效果理想。白羊草种子在消毒前必须浸泡,以达到彻底消毒又不浪费材料的目的。

3.2 白羊草种子的愈伤是在发芽的基础上产生的,出芽率与出愈率成正相关。接种后第 2 d 开始发芽,第 6 d 就可见白色非胚性愈伤出现,且增长很快,第 9 d 时出现少量颗粒状胚性愈伤,第 17 d 达到发芽高峰,第 24 d 左右达到最大出愈率,第 27 d 愈伤组织直径可达 0.5~0.6 cm,但大部分为疏松的非胚性愈伤。2,4-D 在 1.0~6.0 mg/L 时都能诱导出明显的体积较大的胚性愈伤组织,随着 2,4-D 浓度的增大,愈伤组织出现的比例下降,继代阶段胚性愈伤出现也越迟,以 2,4-D 2.0 mg/L 时愈伤组织的出愈率高且诱导的愈伤组织致密而具有较强的胚性。白羊草愈伤组织是由下胚轴处产生,包裹着胚芽,所以将愈伤组织从母体上切下的过程中,对愈伤组织的处理至关重要,试验发现切割下来的愈伤中没有胚芽部分,继代后很容易产生胚性愈伤,否则容易出现逆转现象,可能是因为愈伤中的胚芽吸收培养基中的营养,并在愈伤组织中生长,这样就抑制了愈伤组织的分生能力,使分裂减慢,并使其逐渐老化,变硬,最终失去转化为胚性愈伤组织的能力。

3.3 本试验中白羊草成熟胚胚性愈伤组织只能在形成松软的非胚性愈伤组织之后,需在较低浓度的 2,4-D 诱导培养基上继代培养,才能产生致密的胚性愈伤组织^[6~7]。从而胚性愈伤发生率明显增大,提高愈伤组织的分化率^[8~11]。由于胚性愈伤组织经继代极易产生,因此继代时间较短。继代时挑选的胚性愈伤组织在以后的连续继代培养过程中不会发生逆转,能够顺利的分化出小苗,表现出较高的植株再生能力,这与余建明等的结论一致^[12]。

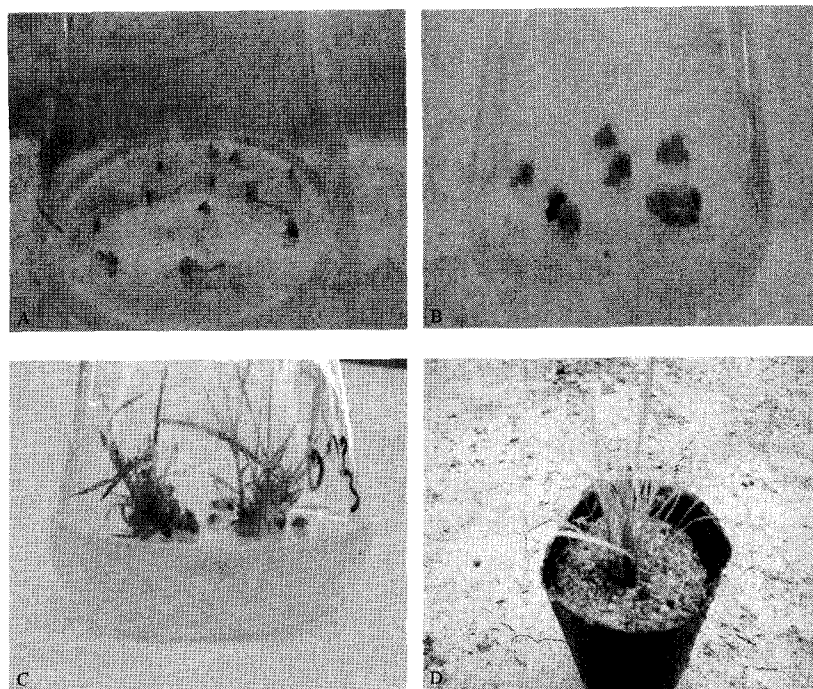


图1 白羊草植株再生过程

Fig. 1 The plant regeneration process of *B. ischaemum*

A. 种子诱导产生的愈伤组织; B. 外表呈干燥、紧密、颗粒状愈伤组织; C. 在分化培养基上愈伤组织分化绿苗; D. 移植再生苗

A. Callus induced from mature seeds; B. Dry, compact, and small pellet status of callus;

C. Shoots regenerated from callus; D. Transplantation of the regenerated plant in pot on the differentiation medium.

3.4 胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织是可以相互转化的,其中激素的作用尤为重要^[13]。本试验中KT、ZT与NAA的激素组合分化率低,将褐化、不分化愈伤组织从KT、ZT+NAA的培养基上转移到6-BA和NAA组合的培养基上时,这些愈伤在一周内长出芽点,进入分化阶段,说明低浓度的6-BA和NAA组合适宜愈伤组织分化,试验表明,愈伤组织在分化阶段对NAA浓度非常敏感,以附加6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L为最适浓度,低于或高于这一浓度的分化率将会下降。

3.5 本试验已摸索出一套再生频率较高的组织培养方法,可以利用组织培养快速繁殖白羊草,不受季节、时间的影响,可大大提高繁殖系数和工作效率,迅速获得大量优质苗,为种质资源保存和加速良种化进程提供条件,同时所诱导的愈伤组织可作为基因研究的受体材料,可为进一步生物工程遗传改良提供前提条件^[14]。

参考文献

- [1] 时永杰,孙晓萍. 白羊草幼穗的组织培养[J]. 草业科学,1998,(12):19-20
- [2] 董宽虎. 山西白羊草草地生产性能种群生态位及草地培育的研究[D]:[学位论文]. 北京:中国农业大学,2004
- [3] 肖辅珍,王景林. 从白羊草成熟胚和幼穗培养诱导再生植株[J]. 首都师范大学学报(自然科学版),1996,(17):76-78
- [4] 黄锋华,董宽虎. 白羊草灌丛草地植物量及优势种牧草营养动态研究[J]. 草原与草坪,2007,(02):14-17
- [5] 曲同宝,王丕武,关淑燕,等. 羊草组织培养及再生系统的建立[J]. 草业学报,2004,(10):91-94
- [6] 张辉. 蒙农杂种冰草成熟胚愈伤组织诱导、植株再生及转基因研究[D]:[学位论文]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2004
- [7] 贺杰,校现周,李瑞芬. 结缕草成熟胚愈伤组织的诱导及再生体系的研究[J]. 山西农业大学学报,2005,25(3):211-213
- [8] 鲍亮,米富贵. 长穗偃麦草与中间偃麦草杂种成熟胚离体培养与再生体系的建立[J]. 草地学报,2007,15(4):348-351
- [9] 刘公社,汪恩华,刘杰,等. 羊草幼穗离体培养诱导植株再生的研究[J]. 草地学报,2002,10(3):198-202
- [10] 候建华,张颖,云锦凤,等. 灰草与灰色赖草杂种F₁再生体系的建立[J]. 草地学报,2007,15(2):109-112
- [11] 王铖,李青,辛燕. 高羊茅种子愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26,(1):66-69
- [12] 余建民,张保龙,陈志一,等. 草地早熟禾成熟胚离体培养植株再生技术的研究[J]. 草地学报,2003,11(1):58-62
- [13] Henry Y, Marcotte J L, Buyser J. The effect of aneuploidy on karotye abnormalities in wheat plant regenerated from short- and long-term somatic embryogenesis [J]. Plant Science, 1996, 114: 101-109
- [14] 程忠恕. 沟叶结缕草组织培养技术体系的研究[D]:[学位论文]. 武汉:华中农业大学,2004

(责任编辑 梁艳萍 李 平)