

高羊茅愈伤组织再生体系研究进展

唐小艳¹, 易自力¹, 蒋建雄¹, 刘清波², 陈智勇¹

(1.湖南农业大学细胞工程重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 高羊茅是温带地区一种重要的多年生冷季型草坪草, 生物技术在品质改良中具有很大的应用潜力。本文综述了影响高羊茅愈伤组织再生体系建立的各个方面及研究进展, 分析了目前该领域研究中存在的问题, 并对今后的研究提出了展望。

关键词: 高羊茅; 组织培养; 再生体系; 研究进展

中图分类号: S543

文献标识码: A

文章编号: 1006-1932(2006)05-0008-04

近年来, 随着人们环保和美化意识的增强, 草坪业进入了一个前所未有的发展时期。高羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.) 是温带地区的一种重要的冷季型草坪草, 由于它具有抗干旱、耐瘠薄、抗病虫害强、适应性广等特点, 并且具有耐践踏、弹性强、绿期长、颜色浓绿等优点, 因此在城市绿化和运动场地的建设中被广泛运用, 并且作为一个极具开发潜力的草坪草种而倍受关注。但高羊茅存在叶片粗糙、没有匍匐茎、夏季生长缓慢、易遭杂草侵害等不足^[1]。因此, 尝试利用遗传转化手段改良其品质性状成为目前草业工作者研究的热点, 而植株高频再生体系的建立是遗传转化成功的前提和保障。

高羊茅的组织培养开始于 20 世纪 70 年代, Dale^[2]1977 年首先从高羊茅的分生组织顶端培育出小

植株。此后, 随着研究的深入, 建立了原生质体再生系统、悬浮细胞再生系统、愈伤组织再生系统等。对于单子叶植物高羊茅来说, 选用愈伤组织再生系统是最为理想的, 因为单子叶植物悬浮系的建立和原生质体的再生十分困难, 而由器官直接分化再生植株难度更大。因此, 要对草坪草进行遗传转化, 建立高效的愈伤组织再生体系十分重要。本文总结了高羊茅愈伤组织再生体系建立的各个方面及研究现状, 能为该领域今后的发展提供有益的信息。

1 不同基因型的影响

基因型是影响高羊茅愈伤组织诱导与植株再生的一个重要因素, 不同品种之间愈伤诱导率及其再生率有显著差异, 这种差异有时可达数倍甚至 10 倍以上。Bai^[3]对美国 20 个常见高羊茅品种进行了比较研究, 愈伤诱导率变幅在 16.7%~58.8%, 分化成苗率从 1%~22%; 余桂红等^[4]以 5 种草坪型高羊茅成熟种子为外植体, 研究得出不同品种的成熟种子在相同培养基上出芽率和出愈率差异很大, 如在 MS+0.2 mg/L BA +8.0 mg/L 2, 4-D 的诱导培养基上猎狗 5 号的出芽率和出愈率最高, 以下依次是领

收稿日期: 2006-01-10

基金项目: 湖南省自然科学基金 (05JJ3036) 和湖南省教育厅科学研究重点项目 (05A022) 资助

作者简介: 唐小艳 (1970-), 女, 湖南永州人, 在读硕士, 研究方向: 遗传育种。

《四川草原》于2006年7月正式更名为《草业与畜牧》

歌、新秀、野火，野马2号最低。研究者还发现产生愈伤组织最多的基因型，再生植株也未必最多。

2 基本培养基的影响

高羊茅组织培养采用最多的基本培养基是MS，此外，常用的有N₆、CC、NB、MB、改良MS、改良SH等培养基，目前对高羊茅的最适基本培养基有不同的报道。易自力等^[9]研究了高羊茅3个品种，比较了MS、CC、NB3种培养基对其诱导率的影响，发现CC培养基对三者诱导率都最高，其中猎狗5号诱导率可高达86.25%，与常用的MS培养基诱导相比，其诱导率提高了18%~46%，且得到的愈伤组织质量较好；而钱海丰等^[10]报道培养基MS、N₆、MB对高羊茅种子出芽率和出愈率都无明显差异，认为高羊茅种子发芽和愈伤诱导与培养基中无机盐、有机物及微量元素相关不密切；张万军等^[11]报道用于愈伤诱导和分化的最佳基本培养基分别是改良MS培养基(MSM)和改良SH培养基(MSH)，得到愈伤组织诱导率和分化率分别达92%和96%，是目前再生率报道中最高的。该实验认为B族维生素和水解酪蛋白代替MS培养基中的有机物对植株再生有利，另外MSH培养基中的低含氮量更适合高羊茅愈伤组织的分化，这验证了Lirio等^[7]报道的培养基中不同氮源的平衡对愈伤组织的诱导和分化有很大影响。

3 外植体的影响

高羊茅不同的外植体或同种外植体的不同部位、不同生理状态有不同的出愈和再生效果。如种子一般要选择成熟度高的，其他外植体一般选择幼嫩的材料进行离体培养效果较好。高羊茅的茎节、花序、幼穗、下胚轴、叶片基部、未成熟胚和成熟种子均可用于愈伤组织的诱导。Takamizo T等报道了叶片基部的切片可用于高羊茅胚性愈伤组织的诱导；支月娥等用高羊茅的幼穗、节外植体诱导出愈伤组织，但未见再生植株分化的报道；支大英等^[12]以高羊茅下胚轴为外植体，得到100%的出愈率和70%~80%的分化率。Bai^[13]研究指出高羊茅茎段和花序出愈率和愈伤组织分化率较低，幼胚的愈伤组织诱导率高于成熟种子，但植株再生频率却相对较低，幼穗出愈率和愈伤分化率都较高，但取材受到时间的限制。成熟种子或成熟胚离体操作方便，一年四季均可以获取，因而是高羊茅草种组培外植体的主要选择。

4 外植体的预处理及消毒的影响

高羊茅难以进行组织培养在于高羊茅种子共生着一种顶孢霉属(*Acremonium coenophialum*)真菌

不易被杀灭，诱导时容易污染^[10]。另外，出愈时间过长及分化率过低等，也给组培再生造成了一定的难度。因此研究者采取了多种措施预处理外植体和改进消毒方法以降低污染和缩短出愈时间。

将高羊茅成熟种子剥去种皮或切掉胚乳或沿胚部纵切成两半有利于降低污染和缩短出愈时间，同时能提高出愈率和愈伤质量。陈智勇等^[14]研究发现切掉胚乳的种子比完整种子出愈率分别提高了15%~20%；马生健等^[12]发现完整种子比离体胚诱导率要低20%~30%，而且愈伤组织出愈慢，质量差。吴关庭等^[13]将成熟种子经 γ 射线处理后发现5~20Gy辐照使其出愈率比对照提高4.4%~11.2%，其中以10Gy处理的效果最好。

研究初期，高羊茅外植体表面消毒方法主要有以下几种：采用70%的酒精浸泡20min、5.25%次氯酸钠和0.5%去污剂(Alconox)短时间浸泡；对未成熟胚采用0.01%升汞处理10min，对成熟胚用盐酸酸化15min后再采用10%次氯酸钠灭菌10min；以叶基部为外植体采用次氯酸钠和酒精不同时间的浸泡；把叶、节、茎和幼穗各外植体分别切成小块，放于漂粉精片饱和溶液中消毒15min等。但上述方法都存在不同程度的污染，有的高达44%。改进后，先用70%或75%的酒精浸泡种子或成熟胚1~3min，再用0.1%HgCl₂处理10~15min，其间不断振荡，能将污染降低到1%~5%^[1]。吴关庭等^[13]将种子经70%酒精漂洗30s，在30%左右的花王漂白水(2/3体积的无菌水中加入1/3体积的花王漂白水)中灭菌40min效果较好。

5 外源激素的影响

在植物组织培养中，合适外源生长素和细胞分裂素浓度及两者之间的适宜的配比不但可以诱导细胞分裂和生长，而且能控制细胞分化和形态建成。高羊茅诱导愈伤时，激素通常单用2,4-D或2,4-D与细胞分裂素等配合使用，而在继代培养与分化培养时，一般降低2,4-D的浓度或改用NAA同时增加BA(或KT)等细胞分裂素的浓度。生根培养大多采用无激素培养。

5.1 愈伤组织的诱导

2,4-D是诱导高羊茅外植体形成愈伤组织的关键因素，高羊茅外植体在高浓度2,4-D存在下才能诱导出最佳的愈伤组织，这与一般禾本科作物诱导愈伤组织2,4-D浓度通常为2mg/L有差异。据报道，高羊茅愈伤组织诱导最佳2,4-D浓度是

5~9 mg/L^[13], 高于 12 mg/L 或低于 2 mg/L 则对愈伤组织的诱导有强烈抑制作用^[1]。王诚等^[14]报道 MS 培养基中分别加入 IAA、NAA、KT、6-BA 均无愈伤组织形成, 惟有 MS+2, 4-D 上产生了愈伤组织; 张万军等^[9]发现高浓度的 2, 4-D 是使高羊茅愈伤组织形成毛状根的直接原因, 因此, 添加适当比例的细胞分裂素 KT 可以降低 2, 4-D 浓度, 同时还可以提高愈伤组织的质量, 该实验指出 MS+5 mg/L 2, 4-D+0.02 mg/L KT 是高羊茅种子愈伤组织诱导最佳组合, 诱导率达 92%, KT 浓度升高对愈伤组织有抑制作用。这与钱海丰^[11]研究发现添加 0.2 mg/L BA 对高羊茅的愈伤组织诱导存在负效应相一致。

ABA 能增加诱导培养基的渗透势, 使愈伤组织处于逐渐脱水状态, 从而有利于非胚性愈伤组织转变为结构致密的胚性愈伤组织。胡张华等^[15]在培养基 N₆+9 mg/L 2, 4-D 上添加 2.0 mg/L ABA 时发现愈伤组织诱导率明显提高, 且能有效抑制胚芽和根的形成。马生健等^[12]研究认为 ABA 在高羊茅胚性愈伤组织诱导中是一种具有全面生理功能的物质, 能抑制多种畸形胚胎的产生, 维持细胞胚性结构不被破坏。

5.2 愈伤组织的继代

愈伤组织的继代培养一方面可使愈伤组织增大, 另一方面可促使非胚性愈伤组织转变为具有再生能力的胚性愈伤组织。适时地降低继代培养基中的 2, 4-D 浓度以及适当增加 BA 或 KT 等细胞分裂素浓度将有利于高羊茅愈伤组织的保持和体细胞胚的形成。钱海丰等^[11]先将在 9 mg/L 2, 4-D 上培养的愈伤组织转移到 5 mg/L 2, 4-D 继代培养基上, 10~15 d 后再转移至分化培养基上光照培养, 分化率达 73.3%; 支大英等^[9]对比研究了 MB+5 mg/L 2, 4-D 和 MB+3 mg/L 2, 4-D 两种培养基上愈伤继代情况, 发现 3 mg/L 2, 4-D 培养基上继代 5 个月的愈伤组织仍保持很高分化能力, 而在 5 mg/L 2, 4-D 上继代 3 个月后的愈伤组织分化能力明显降低。

5.3 愈伤组织的分化和幼苗生根

在高羊茅愈伤组织分化过程中, BA 是重要的激素之一, BA 浓度一般为 1.0~3.0 mg/L, 其次是 KT, 一般认为 BA 比 KT 促进分化能力强。高羊茅胚性愈伤组织的分化对 2, 4-D 的浓度要求很低, 有的品种只有在除去它才可获得再生植株。研究者指出分化培养基上增添低浓度 NAA 有利于植株分化,

同时可促使再生苗生根^[14], 但 NAA 不宜过高, 否则会导致芽过多过高又抑制根的发生, 从而使再生植株成活率降低。

高羊茅再生苗生根较容易, 一般在低浓度生长素或无激素的培养基中就有较好的生根效果。常用的生根培养基是 1/2 MS。

6 其他因素的影响

通常情况下, 黑暗环境中愈伤组织诱导率比在光照下高, 并且产生的愈伤组织形态结构较好; 芽的分化一般在光照下进行, 光照是高羊茅愈伤组织分化所必须的^[14]。

适宜浓度的琼脂不仅有利于胚性愈伤组织的形成和分化, 而且能大大缩短出愈和分化的时间。胡张华等^[20]将经高渗处理的致密愈伤组织分别置于用 0.8%、1.2% 和 1.6% 琼脂固化的 N₆ 培养基上, 结果发现 1.2% 琼脂浓度比 0.8% 的琼脂浓度再生频率提高 1 倍以上, 而 1.6% 琼脂浓度的愈伤组织再生频率比 1.2% 的低。

铜离子作为许多植物酶的激活因子, 对植物生长和发育具有重要作用。胡张华等^[19]以 2.5 mg/L CuSO₄·5H₂O 处理高羊茅成熟胚初生愈伤组织, 发现高浓度的 Cu²⁺ 对愈伤组织生长和植株再生具有显著的促进作用。

水晶洋菜代替琼脂充当凝固剂, 有促进高羊茅愈伤组织生长及向胚性愈伤组织转化的作用。余桂红等^[2]把诱导的无色透明愈伤组织接种到含 3 g/L 水晶洋菜的继代培养基上, 无色透明愈伤组织转为淡黄色胚性愈伤组织。

7 存在的问题及展望

7.1 高羊茅再生体系的建立仍不健全

高羊茅通过愈伤组织再生途径获得再生植株相对于其他途径来说成功的范例最多, 但愈伤组织出愈率仍不够高, 愈伤组织分化仍比较困难。针对这些问题今后可以对培养条件和培养基进行改良, 以提高出愈率和确定分化最适条件; 还可以通过对培养材料不间断观察, 确定分化的最有利时期来提高培养材料的分化率, 从而建立起一套高再生率的再生体系。

7.2 外植体的选择范围较窄, 灭菌仍不彻底

高羊茅外植体如幼胚、幼穗、花药、原生质体、悬浮细胞等取材困难, 或受季节限制, 常用成熟种子作为外植体。但高羊茅成熟种子出愈时间长、愈伤组织质量差, 通过去种皮或切胚乳等以降低污染

《四川草原》于2006年7月正式更名为《草业与畜牧》

和提高出愈率,工作繁琐,劳动量大,且污染仍有一定程度的发生。今后可以拓宽以盾片、胚轴、根尖分生区等为外植体获得再生植株。

7.3 诱导的胚性愈伤组织比例低,再生周期长

增殖足够数量的胚性愈伤组织是胚性悬浮培养物的建立以及高频再生组织产生的基础,因而是高羊茅植株再生与遗传转化的首要条件。但在高羊茅组培中最常用的成熟种子(胚)诱导的愈伤组织中胚性愈伤组织的比例极低。因此,必须对这些愈伤组织进行继代改造,促进胚性愈伤组织的产生和增殖,这不仅工作量大,而且延长了再生周期,且继代时间的延长,又是愈伤组织分化率下降和再生植株中白化苗比例升高的一个因素。因此,极需优化胚性愈伤组织的诱导。

7.4 高羊茅再生率不稳定,可重复性差

据报道,高羊茅最高再生率可以达到96%^[6],低的只有百分之几,因各种原因造成很多实验重复后无法得到相同结果,即使对同一个品种,不同的研究者得出的结果也不尽相同,甚至是矛盾的结论。这说明再生体系的方案还不够完善。

7.5 草坪草组培过程中添加外源激素凭借经验,具有盲目性

至今人们对各种激素相互作用的机理仍不明确,对内源和外源激素间相互关系的研究甚少,且不够深入^[7]。今后可在深入测定内源激素的基础上,探明内源激素与外源激素间的相互关系,通过测定内源激素的种类及水平来直接指导外源激素的添加。

参考文献

- [1] 钱海丰,薛庆中.激素对高羊茅愈伤组织诱导及其分化的影响[J].中国草地,2002,1(1):46-60.
- [2] Dale P J.Meristem tip culture in Lolium,Festuca,Phloem, and Dactylis[J].Plant Sci.1977,(9):333-338.
- [3] Bai Y,Qu R.An evaluation of callus induction and plant regeneration

in twenty-five turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) cultivars[J].Grass Forage Sci,2000,(55):326-330.

- [4] 余桂红,马鸿翔,余建明,等.草坪型高羊茅成熟种子胚性愈伤组织诱导及植株再生[J].江苏农业学报,2004,20(1):38-43.
- [5] 易自力,陈智勇,蒋建雄,等.三种冷季型草坪草愈伤组织再生体系的建立[J].中南林学院学报,2005,25(1):25-28.
- [6] 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.
- [7] Lirio L,Dal Wesco,Miguel P Cuerra.The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture,2001,(64):19-25.
- [8] 支大英,韩晓光,赵军胜,等.8种基因型的高羊茅的组织培养与植株再生[J].山东大学学报(理学版),2004,(8):109-114.
- [9] Bai Y,Qu R.Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue [J]. Plant Breeding,2001,(120):239-242.
- [10] Chom J,Lemau xP G Transgenic orchard grass (*Dactylis glomerata*L.) plant produced from highly regenerative tissues [A].In:Congress in Vitro Bio [C],LA:Ann Arbor Press,1999,(10):89.
- [11] 陈智勇,易自力.提高高羊茅愈伤组织诱导率的研究[J].草业学报,2003,12(4):69-72.
- [12] 马生健,曾富华,余炳生,等.高羊茅愈伤组织的诱导与内源激素含量研究[J].湛江师范学院学报,2002,(23):53-56.
- [13] 吴关庭,胡张华,陈笑芸,等.高羊茅辐射敏感性和辐射处理对其成熟种子愈伤诱导的影响[J].核农学报,2004,18(2):104-106.
- [14] 王诚,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):66-69.
- [15] 胡张华,陈大庆,吴关庭,等.高羊茅悬浮细胞系的建立及绿色植株的高频再生[J].草业学报,2003,12(3):95-99.

Research Progress on Regeneration System from Callus of Tall Fescue

TANG Xiao-Yan¹, YI Zi-Li¹, JIANG Jian-Xiong¹, LIU Qing-Bo², CHEN Zhi-Yong¹

(1.Key Laboratory of Cell Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2.Bio-science and technology college, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Biotechnology has a great application potential in variety improvement of Tall Fescue, which is an important cool-season perennial turf grass in the temperate region. All aspects of regeneration system from Callus of Tall Fescue were summarized. And the limitation of tissue culture for Tall Fescue was analyzed and the strategy for the future development of Tall Fescue regeneration system was prospected as well.

Key words: *Festuca arundinacea* Schreb.; Tissue culture; Regeneration system; Research progress