

高羊茅成熟种子组织培养的影响因素研究： II. 不同因素对胚性愈伤组织继代发生的影响

吴关庭¹, 胡张华¹, 陈笑芸¹, 郎春秀¹, 王伏林¹, 金卫¹, 陈锦清^{1,*}, 夏英武²

(¹浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021; ²浙江大学 原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 以从4个草坪型高羊茅品种成熟种子直接诱导获得的初始愈伤组织为起始材料^[1], 研究3种因素对胚性愈伤组织继代发生的影响。结果表明, 继代培养基中添加BAP和硫酸铜以及提高蔗糖浓度均能促进胚性愈伤组织形成, 提高胚性愈伤组织频率, 其适宜浓度分别为: BAP 0.1~0.2 mg/L, 硫酸铜 2.5 mg/L, 蔗糖 60 g/L。这3种因素中, 又以添加BAP的效果最好, 添加硫酸铜次之。4个供试品种间胚性愈伤组织发生能力存在明显差异。

关键词: 高羊茅; 组织培养; 胚性愈伤组织; 继代

中图分类号: S543.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-1524(2006)05-0369-04

Factors affecting tissue culture responses of mature seeds in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.): II. The effects of different factors on subculture production of embryogenic calli

WU Guan-ting¹, HU Zhang-hua¹, CHEN Xiao-yun¹, LANG Chun-xiu¹, WANG Fu-lin¹, JIN Wei¹, CHEN Jin-qing^{1,*}, XIA Ying-wu²

(¹Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The effects of three different factors on subculture production of embryogenic calli were investigated with ones induced directly from mature seeds of four turf-type tall fescue cultivars as starting materials. The results showed that supplementing BAP and cupric sulphate and increasing sucrose concentration in subculture medium stimulated formation of embryogenic calli, with appropriate concentration being 0.1-0.2 mg/L for BAP, 2.5 mg/L for cupric sulphate, and 60 g/L for sucrose. Among these three factors, BAP addition was the most effective, followed by supplementation of cupric sulphate. It was also demonstrated that apparent differences in productivity of embryogenic callus existed among the four tested cultivars.

Key words: tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.); tissue culture; embryogenic callus; subculture

高羊茅组织培养已由胚性愈伤组织、胚性悬浮培养物、原生质体、高频再生组织以及花药—

幼穗再生获得植株^[2]。胚性愈伤组织既是最基本的再生组织, 又分别是胚性悬浮培养物和原生质体的主要直接来源和间接来源^[3,4], 而高频再生组织也同样起源于胚性愈伤组织^[5]。因此, 胚性愈伤组织的诱导获得是高羊茅组织培养的首要基础。然而, 由高羊茅成熟种子直接诱导获得的初始愈伤组织质量往往不理想, 绝大多数属于

收稿日期: 2006-01-15

基金项目: 浙江绿洲生态股份有限公司风险投资项目; 浙江省“151人才基金”资助项目

作者简介: 吴关庭(1963-), 男, 浙江萧山人, 博士, 研究员, 从事植物基因工程研究。

* 通讯作者 E-mail: j. q. chen@zaas.org

非胚性类型,不同程度表现为松软、水渍状,半透明甚至透明,再生频率极低,必须加以继代改造。为此,作者建立高羊茅胚性愈伤组织高效植株再生体系,在为农杆菌介导转化的基础研究中,对胚性愈伤组织继代发生影响的几种主要因素进行研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为草坪型高羊茅品种凌志、猎狗5号、美洲虎3号和可奇思,其成熟种子由浙江绿洲生态股份有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 初始愈伤组织诱导

4个供试品种的成熟种子人工去壳,70%酒精漂洗30 s,在30%左右的花王漂白水(2/3体积的无菌水加1/3体积的花王漂白水)中灭菌40 min,然后用无菌水漂洗4~5次。灭菌种子逐个纵切,接种于含2,4-D 8 mg/L, ABA 2 mg/L,水解酪蛋白和谷氨酰胺各0.5 g/L的MS诱导培养基上,在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下暗培养4周左右,诱导获得初始愈伤组织。

1.2.2 继代改造基本过程

将诱导获得的初始愈伤组织转移到含2,4-D 2 mg/L、水解酪蛋白和谷氨酰胺各0.5 g/L的MS培养基上进行继代改造,每处理接种的愈伤组织数为 250 ± 20 块,培养条件为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,暗培养。从第一次继代开始,每3~4周转继1次,连续转继5次,每次转继时统计胚性愈伤组织数,并将所有愈伤组织(包括褐化的愈伤组织)转移到新的培养基上。胚性愈伤组织数占接种愈伤组织数的百分比即为胚性愈伤组织频率。

1.2.3 继代改造影响因素及其设计

(1)BAP添加:在继代培养基中添加细胞分裂素BAP,浓度为0.05,0.10,0.20和0.40 mg/L,以不添加BAP作为对照。(2)硫酸铜添加:在继代培养基中添加硫酸铜,浓度为0.10,0.50,2.50和12.50 mg/L,以不添加硫酸铜作为对照。(3)提高蔗糖浓度:将继代培养基中的蔗糖浓度由通常的30 g/L提高到40,50和60 g/L,并以30 g/L作为对照。

2 结果与分析

2.1 添加BAP对胚性愈伤组织继代发生影响

在研究多种因素对高羊茅成熟种子愈伤组织诱导的影响时曾观察到,培养基中添加BAP后,诱导获得的初始愈伤组织的状态普遍好于不加BAP的对照。为此,作者首先观测了BAP对高羊茅胚性愈伤组织继代发生的影响(表1),在不含BAP的培养基上继代,高羊茅胚性愈伤组织也会发生,其频率随继代次数的增加逐步提高,但速度较慢;培养基中加入BAP,促进了愈伤组织的胚性化,胚性愈伤组织数增加,每次继代后,4种BAP浓度的胚性愈伤组织频率均高于对照。对胚性愈伤组织发生的促进作用以0.10~0.20 mg/L BAP浓度最大,只有品种凌志经3次继代后的情况稍有不同,但仍以0.10 mg/L的胚性愈伤组织频率最高。BAP浓度提高到0.40 mg/L时,4个供试品种的胚性愈伤组织频率在

表1 继代培养基中添加细胞分裂素BAP对高羊茅胚性愈伤组织发生的影响

Table 1 Effects of addition of 6-benzylaminopurine (BAP) to subculture medium on induction of embryogenic callus in tall fescue

品种	BAP/ mg·L ⁻¹	不同继代胚性愈伤组织频率/%				
		1次	2次	3次	4次	5次
凌志	0	7.7	10.6	13.4	17.1	19.1
	0.05	13.0	18.0	25.1	31.0	34.7
	0.10	11.8	19.3	28.0	34.3	39.8
	0.20	10.3	19.5	23.0	27.6	31.4
	0.40	9.5	12.4	15.7	20.2	24.8
猎狗5号	0	4.3	6.3	8.6	11.3	12.5
	0.05	6.8	10.6	15.5	18.1	20.4
	0.10	8.4	13.2	19.6	25.2	28.4
	0.20	9.3	13.8	18.6	23.5	26.7
	0.40	7.5	10.0	13.7	17.8	21.6
美洲虎3号	0	2.5	3.8	5.0	6.3	8.8
	0.05	3.9	6.7	8.6	11.4	13.3
	0.10	5.3	9.4	11.1	14.3	17.6
	0.20	6.0	8.8	11.6	13.3	14.9
	0.40	4.3	6.3	6.7	9.5	10.7
可奇思	0	5.3	6.6	7.8	9.5	10.7
	0.05	5.6	9.3	12.5	16.5	18.1
	0.10	9.1	11.0	15.7	19.3	22.4
	0.20	8.5	12.8	16.6	20.4	22.1
	0.40	6.9	10.7	12.6	14.5	16.8

各次继代中都无一例外地开始下降。不同品种间胚性愈伤组织发生能力和改造效果有较大差异,凌志的愈伤组织在含 0.10 mg/L BAP 的培养基上连续继代 5 次后,胚性愈伤组织频率达到 39.8%,而美洲虎 3 号在同样条件下仅为 17.6%,两者相差 1 倍以上。

2.2 添加硫酸铜对胚性愈伤组织继代发生影响

据报道高浓度 Cu^{2+} 对愈伤组织筛选和植株再生具有明显效果^[6~10]。本试验在继代培养基中添加 0.10~12.50 mg/L 的硫酸铜,结果表明,愈伤组织转移到这些培养基上,大约从 10 d 左右开始,一部分逐渐褐化,另有一部分停止生长或生长减慢,发生褐化和生长受到抑制的愈伤组织的比例随添加的硫酸铜浓度和继代次数的增加而提高。在连续继代过程中,从一些褐化的愈伤组织表面长出了结构疏松、鲜黄色呈颗粒状的胚性愈伤组织。由表 2 可知,0.50,2.50 和 12.50 mg/L 的硫酸铜对高羊茅胚性愈伤组织培养起到筛选作用,其中以 2.50 mg/L 的筛选效果最好,胚性愈伤组织频率最高。继代培养基中添加硫酸铜对 4 个供试品种的胚性愈伤组织筛选都有效,效果大小与品种本身的胚性愈伤组织发生能力有关。与添加 BAP 试验相似,经 5 次连续继代后,4 个品种的胚性愈伤组织频率按高低依次为:凌志 > 猎狗 5 号 > 可奇思 > 美洲虎 3 号。

2.3 提高蔗糖浓度对胚性愈伤组织继代发生的影响

高浓度蔗糖能在一定程度上抑制非胚性愈伤组织生长,促进胚性愈伤组织形成^[11,12]。本试验结果表明,高羊茅继代培养基中,提高蔗糖浓度有利于胚性愈伤组织的发生(表 3),将继代培养基中蔗糖浓度由 30 g/L 提高到 40,50 和 60 g/L,各次继代后的胚性愈伤组织频率绝大多数高于 30 g/L,并随浓度的增加而提高。从连续 5 次继代过程中胚性愈伤组织频率的增幅来看,其后 3 次尤其是第 3 和第 4 次继代的增幅较大,这说明在含高浓度蔗糖的培养基上对高羊茅愈伤组织进行继代改造,应尽可能继代 4 次以上。提高继代培养基中蔗糖浓度对促进 4 个供试品种的胚性愈伤组织发生均有效,且品种间的反应与 BAP 和硫酸铜添加试验中的结果一致。

表 2 继代培养基中添加硫酸铜对高羊茅胚性愈伤组织发生的影响

Table 2 Effects of addition of cupric sulphate to subculture medium on induction of embryogenic callus in tall fescue

品种	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /mg·L ⁻¹	不同继代胚性愈伤组织频率/%				
		1次	2次	3次	4次	5次
凌志	0	6.8	9.6	12.4	15.3	17.7
	0.10	7.4	10.5	12.8	14.7	16.7
	0.50	7.7	11.7	18.2	22.7	24.7
	2.50	9.5	18.6	25.6	29.8	32.6
	12.50	8.6	15.1	19.4	20.3	20.3
猎狗 5 号	0	3.8	5.4	8.5	10.4	11.9
	0.10	4.5	6.5	8.9	11.4	12.6
	0.50	5.7	8.6	13.5	16.4	18.4
	2.50	6.3	14.3	19.4	22.8	24.5
	12.50	7.8	11.8	14.5	14.9	15.3
美洲虎 3 号	0	3.0	3.8	5.5	7.6	9.3
	0.10	3.3	4.1	5.8	6.6	8.7
	0.50	4.3	6.3	9.1	10.7	11.5
	2.50	5.7	10.2	12.5	14.3	15.5
	12.50	4.8	8.3	11.1	11.5	11.9
可奇思	0	4.6	6.7	7.9	10.5	12.6
	0.10	4.1	6.5	8.6	10.6	12.2
	0.50	5.4	8.2	12.1	14.4	15.6
	2.50	5.6	11.3	14.9	17.3	19.4
	12.50	6.4	10.6	13.6	14.0	13.6

表 3 提高继代培养基中蔗糖浓度对高羊茅胚性愈伤组织发生的影响

Table 3 Effects of increased sucrose concentrations in subculture medium on induction of embryogenic callus in tall fescue

品种	蔗糖 /g·L ⁻¹	不同继代胚性愈伤组织频率/%					
		1次	2次	3次	4次	5次	
凌志	30	7.3	10.8	13.5	16.2	18.5	
	40	8.0	9.5	14.1	18.7	20.2	
	50	7.8	10.3	15.6	20.2	23.5	
	60	8.5	11.3	17.8	23.5	27.9	
	猎狗 5 号	30	4.5	6.9	8.6	10.2	11.4
猎狗 5 号	40	4.7	6.4	9.4	11.6	13.3	
	50	5.6	7.6	11.2	14.7	17.1	
	60	6.2	8.9	14.0	17.9	21.8	
	美洲虎 3 号	30	3.1	4.6	6.1	7.7	8.4
		40	3.0	4.3	6.0	8.2	9.5
50		3.5	5.1	7.5	9.8	10.6	
60		4.2	5.4	8.8	11.3	13.3	
可奇思		30	5.0	6.3	8.4	9.7	12.2
	40	4.7	6.7	7.9	10.7	13.0	
	50	5.2	6.9	9.3	12.5	14.1	
	60	5.7	7.7	11.0	13.8	16.7	

3 讨论

对高羊茅组织培养的试验证明,以成熟种子

作为外植体,要获得较高的愈伤组织诱导率并不困难,但直接诱导获得的初始愈伤组织往往绝大部分为再生频率极低的非胚性类型,而再生能力强的胚性类型的比例非常低,这是目前高羊茅组织培养研究中存在的主要问题之一^[2]。在这种情况下,通过继代诱导产生足够数量的胚性愈伤组织就自然成为高羊茅组织培养的一个重要环节。本研究结果表明,将初始愈伤组织转移到添加有 BAP 的培养基上继代,能整体改善高羊茅愈伤组织质量,促进胚性愈伤组织发生,效果十分明显,其浓度以 0.10 ~ 0.20 mg/L 较为适宜。继代培养基中添加适当浓度的硫酸铜(2.50 mg/L)也能对高羊茅胚性愈伤组织产生良好的筛选作用,据报道这是由于愈伤组织大多由多种类型的细胞组成^[13],较高浓度的 Cu^{2+} 有助于其中的胚性细胞的保留和增殖,同时又能抑制其它类型细胞的生长或致其死亡^[10]。提高继代培养基中蔗糖浓度同样有利于抑制非胚性愈伤组织生长,促进胚性愈伤组织形成^[11,12],从而使高羊茅胚性愈伤组织频率得到明显提高,其合适浓度为 60 g/L。上述 3 种影响因素中,按照各自适宜浓度条件下连续继代 5 次后的胚性愈伤组织频率比较,以添加 BAP 的效果最好,添加硫酸铜次之。

基因型是植物组织培养的一个重要影响因素。Dahleen LS 等研究表明,高羊茅组织培养反应存在很大的品种间差异^[14-16]。作者在研究多种因素对高羊茅成熟种子愈伤组织诱导的影响时,也观察到 4 个供试品种间出愈率有一定差异^[1]。本研究中,这 4 个供试品种的胚性愈伤组织继代发生能力同样表现出明显的不同,如诱导获得的初始愈伤组织在分别添加有 0.10 mg/L BAP, 2.50 mg/L 硫酸铜和蔗糖浓度为 60 g/L 的培养基上连续继代 5 次,凌志与美洲虎 3 号的胚性愈伤组织频率相差 14.6 ~ 22.2 个百分点,相差幅度均在 1 倍以上。结果表明,在高羊茅组织培养中,品种的选择既要依据愈伤组织诱导率的高低,同时也必须考虑胚性愈伤组织发生能力的大小。

参考文献:

[1] 郎春秀,吴关庭,胡张华,等. 高羊茅成熟种子组织培养的

- 影响因素研究. I. 多种因素对愈伤组织诱导的影响[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(4): 182 - 186.
- [2] 吴关庭,胡张华,陈锦清. 高羊茅和其他羊茅植株再生与遗传转化研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(2): 146 - 155.
- [3] Rajoelina SR, Alibert G, Planchon C. Continuous plant regeneration from established embryogenic cell suspension cultures of Italian ryegrass and tall fescue[J]. *Plant Breed*, 1990, 104: 265 - 271.
- [4] Takamizo T, Sugino KI, Ohsugi R. Plant regeneration from suspension culture derived protoplasts of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) of a single genotype[J]. *Plant Sci*, 1990, 72: 125 - 131.
- [5] Cho MJ, Ha CD, Lemaux PG. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 1084 - 1089.
- [6] Garcia-Sogo B, Roig LA, Moreno V. Enhancement of morphogenetic response in cotyledon-derived explants of *Cucumis melo* induced by copper ions[J]. *Acta Hort*, 1991, 289: 229 - 230.
- [7] Pumhauser L, Gyulai G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 35: 131 - 139.
- [8] Dahleen LS. Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1995, 43: 267 - 269.
- [9] 杨跃生,简玉瑜,郑迎冬. 铜在水稻愈伤组织培养再生植株中的促进作用[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 95 - 98.
- [10] 余舜武,朱永生,余毓君,等. 快速建立胚性细胞悬浮系的培养程序初探[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 325 - 328.
- [11] 凌定厚,吉田昌一. 影响籼稻体细胞胚胎发生几个因素的研究[J]. 植物学报, 1987, 29(1): 1 - 8.
- [12] 胡张华,陈火庆,吴关庭,等. 百慕大成熟胚的组织培养及植株再生[J]. 草业学报, 2003, 12(1): 85 - 89.
- [13] 王海波. 组织培养中细胞状态的调控[J]. 作物杂志, 1991, (3): 3 - 6.
- [14] Dahleen LS, Eizenga GC. Meiotic and isozymic characterization of plants regenerated from euploid and selfed monosomic tall fescue embryos[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 79: 39 - 44.
- [15] Eizenga GC, Dahleen LS. Callus production, regeneration and evaluation of plants from cultured inflorescence of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1990, 22: 7 - 15.
- [16] 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 and Forage Sci*, 2000, 55(4): 326 - 330.

(责任编辑 袁醉敏)