

高羊茅组培再生体系建立的研究

李志亮¹, 叶嘉¹, 杨杰¹, 吴忠义², 王刚³

(1.邯郸学院 生物科学系, 河北 邯郸 056005; 2.北京农业生物技术研究中心, 北京 100089;

3.河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016)

摘要: 植物组培再生体系的建立是进行基因转化的前提。本文对高羊茅的组培再生体系的建立进行了初步研究。(1)研究了不同的种子灭菌处理方式对高羊茅种子萌发率和污染率的影响, 结果显示: 高羊茅种子最佳灭菌方式是将种子先在水中进行浸泡1~3 h, 然后用70%酒精灭菌30 s, 无菌水冲洗5次, 再用50%次氯酸钠灭菌20 min, 无菌水冲洗6次。采用此灭菌方式, 种子萌发率约为80%, 而污染率为0%。(2)将高羊茅下胚轴接种在含有不同浓度2,4-D的MS培养基上进行愈伤组织诱导, 结果表明: 10 mg/L的2,4-D是下胚轴愈伤组织诱导的最佳浓度, 过高的2,4-D浓度对愈伤组织的形成有负作用。(3)将高羊茅下胚轴接种在含有10 mg/L 2,4-D的MS、B5、N6培养基上进行愈伤组织诱导, 结果表明: 3种不同培养基中, MS培养基为最适培养基。

关键词: 高羊茅; 下胚轴; 2,4-D; 愈伤组织诱导

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1673-2030(2006)03-0060-04

收稿日期: 2006-02-26

基金项目: 北京市基金项目(5062012)资助

作者简介: 李志亮(1966—), 男, 河北魏县人, 邯郸学院生物科学系讲师, 硕士。通讯作者: 吴忠义(1969—), 男, 福建德化人, 北京农业生物技术研究中心副研究员, 博士。

高羊茅(*Festuca arundinacea*)又称苇状羊茅, 系禾本科(*Gramineae*)羊茅属(又名狐茅属)植物, 是一种多年生冷季型草坪草, 其营养价值极高, 是世界上重要的牧草。由于它具有抗干旱、耐瘠薄、抗病、适应性广等特点, 在城市绿化和运动场地的建设中有广泛应用。^{[1]46}同时, 高羊茅具有绿期长、耐修剪、观赏性高等优点, 在世界各国广泛应用, 是我国北方地区建植草坪和用于水土保持的重要草种。但是, 高羊茅的抗旱、耐寒性还需进一步提高, 采用转基因技术培育抗旱节水、耐寒的高羊茅新品种是目前研究的热点。^{[2]66}

要进行高羊茅的遗传转化, 必须建立组织培养体系。研究表明, 高羊茅的成熟种子^{[3]247}、成熟胚^{[4]397}、幼穗^{[5]46}、节外植体^{[5]46}都可用于胚性愈伤组织的诱导。在高羊茅的组织培养中, 种子的萌发, 愈伤组织诱导和分化的难点在于高羊茅共生着一种顶孢霉属真菌(*Acremonium coenophialum*), 诱导时容易污染、出愈时间过长及分化率低等。^{[1]46-47}本文拟通过改进高羊茅种子的处理方式, 以提高种子的萌发率, 降低污染率。同时, 通过调节植物激素浓度配比, 首次用高羊茅下胚轴诱导愈伤组织, 优化愈伤组织诱导条件, 以便建立较完善的组织培养体系, 为高羊茅的转基因研究打下良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用高羊茅品种羚羊种子由北京草业与环境研究发展中心提供。

1.2 方法

1.2.1 高羊茅种子最佳灭菌方式的选择

实验前, 将高羊茅种子用70%的酒精灭菌30s, 无菌水冲洗5次, 然后用10~50%的次氯酸钠对种子进行

不同时间的灭菌处理。(1)用10%、20%、30%、40%、50%的次氯酸钠灭菌20min,无菌水冲洗6次。(2)用50%的次氯酸钠分别灭菌5min、10min、20min、30min、40min,无菌水冲洗6次;最后,挑取灭菌后的种子接种在培养基MS+6-BA 1mg/L+IAA 0.1mg/L,蔗糖30g/L,琼脂5g/L, pH5.8上,每个三角瓶接种20粒,每个处理做5个重复,接种完后,放入培养室中,26±1℃,光照12 h/d,观察并记录种子萌发和污染情况。

1.2.2 筛选适宜的高羊茅愈伤组织诱导的激素浓度

高羊茅下胚轴的愈伤组织诱导是高羊茅植株再生的关键,本实验以MS培养基为基本培养基,蔗糖30g/L,琼脂5g/L,附加不同浓度2,4-D, pH值调节至5.8,配制成愈伤组织的诱导培养基。无菌条件下,取高羊茅下胚轴接种在不同的诱导培养基上,每个三角瓶接种20个,每个处理做4个重复,接种完后,放入培养室中,26±1℃,黑暗条件下培养,观察并记录下胚轴愈伤组织的发生情况。研究2,4-D在高羊茅下胚轴的愈伤组织诱导中的作用效果,筛选高羊茅下胚轴愈伤组织诱导的最佳激素浓度。

1.2.3 适合高羊茅愈伤组织诱导的培养基类型的筛选

无菌条件下,取高羊茅下胚轴接种在含2,4-D浓度为10mg/L的MS、B5、N6诱导培养基上,每个三角瓶接种20个,每个处理做4个重复,接种完后,放入培养室中,26±1℃,黑暗条件下培养,观察并记录下胚轴愈伤组织的发生情况。

1.2.4 高羊茅愈伤组织分化培养

以MS培养基为基本培养基,蔗糖30g/L,琼脂5g/L,附加6-BA 1mg/L、IAA 0.1mg/L, pH值调节至5.8,作为愈伤组织分化培养基。将愈伤组织分离下来,接种于分化培养基上,放入培养室中,在26±1℃条件下,光照12 h/d,进行分化培养。

1.2.5 生根培养

以MS培养基为基本培养基,附加KT 0.2mg/L、IAA 0.5mg/L,蔗糖30g/L,琼脂5g/L,作为生根培养基,进行高羊茅无性系的生根培养。

1.2.6 数据处理

将实验中统计的数据进行如下处理:

种子萌发率(%) = (萌发的幼苗数 ÷ 接种的种子数) × 100

种子污染率(%) = (污染的种子数 ÷ 接种的种子数) × 100

愈伤组织诱导率(%) = (产生愈伤组织的下胚轴数 ÷ 接种的下胚轴数) × 100

2 结果与分析

2.1 高羊茅种子的最佳处理方式

组织培养过程中,选择外植体的最佳处理方式是实验成功的基础。结果见图1和图2。

2.2 适宜的高羊茅愈伤组织诱导培养基

无菌条件下,将高羊茅下胚轴接种在8种浓度梯度的2,4-D的MS培养基上,26±1℃条件下,黑暗培养28d后发现,当2,4-D浓度为10mg/L时,愈伤组织诱导率最高(见表1)。

2.3 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

无菌条件下,将高羊茅下胚轴接种含2,4-D浓度为10mg/L的MS、B5、N6诱导培养基上,26±1℃条件下,黑暗培养28d后发现,3种培养基中,MS培养基诱导率最高(见表2)。

2.4 高羊茅组培再生

将高羊茅愈伤组织接种在MS+6-BA 1mg/L+IAA 0.1mg/L培养基上,蔗糖30g/L,琼脂5g/L, pH5.8, 26±1℃,光照12h/d。约7d后生出绿点并逐渐发育成新的再生小植株。然后,移入MS+IAA 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L的生根培养基中,20d开始生根,30d后植株根长0.3~0.8 cm(见图3)。

3 讨论

3.1 外植体的处理方式

为有效解决种子的高污染问题,把次氯酸钠浓度由2~10%提高到20%、30%、40%、50%,灭菌时间为20min,以摸索次氯酸钠灭菌的最适浓度和最佳时间。从图1可以看出,50%次氯酸钠灭菌20min时,萌发率最高(约

80%), 而污染率最低(0%)。得到初步实验结果为: 50%次氯酸钠灭菌 20min。然后, 选择最佳灭菌时间, 用 50%次氯酸钠, 灭菌时间设置为 5、10、20、30、40min, 从图 2 可以看出, 当灭菌时

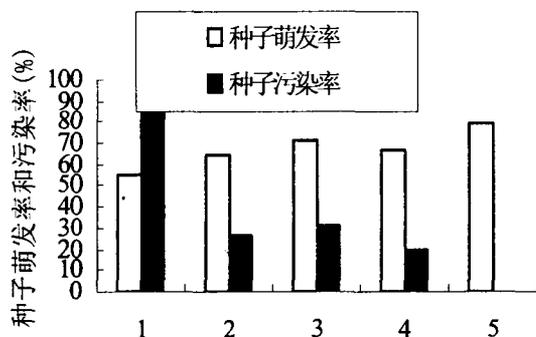


图 1 不同表面处理方式对种子的影响

1. 10%次氯酸钠灭菌 20 min;
2. 20%次氯酸钠灭菌 20 min;
3. 30%次氯酸钠灭菌 20 min;
4. 40%次氯酸钠灭菌 20 min;
5. 50%次氯酸钠灭菌 20 min.

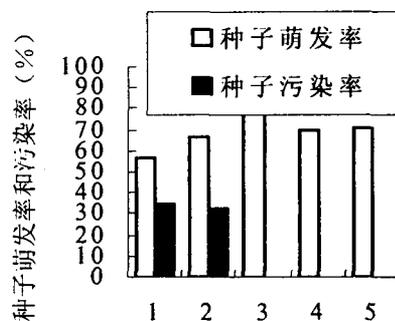


图 2 不同表面灭菌方式对种子的影响

1. 50%次氯酸钠灭菌 5 min;
2. 50%次氯酸钠灭菌 10 min;
3. 50%次氯酸钠灭菌 20 min;
4. 50%次氯酸钠灭菌 30 min;
5. 50%次氯酸钠灭菌 40 min.

表 1 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导率的影响

2,4-D 浓度(mg/L)	接种数	出愈数	出愈率(%)
0	80	0	0
2	80	21	26.25
4	80	32	40
6	80	38	47.5
8	80	47	58.75
10	80	57	71.25
12	80	44	55
14	80	39	48.75

表 2 不同培养基对愈伤组织诱导率的影响

培养基	接种数	出愈数	出愈率(%)
MS	80	58	72.5
B5	80	47	58.75
N6	80	51	63.75

间最短为 20min 时, 污染率为 0%, 萌发率为最高(约 80%), 因此, 对于高羊茅来说, 种子经 70%的酒精灭菌 30s 后, 用 50%的次氯酸钠对种子灭菌 20 min, 即可达到灭菌目的。虽然用 50%的次氯酸钠对种子灭菌处理 30min 和 40min 时, 污染率也为 0%, 但萌发率有所降低, 同时, 从节约处理时间考虑, 宜采用 50%的次氯酸钠对种子灭菌 20min 的处理方式。

3.2 最佳激素浓度的选择

实验中, 设置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14mg/L 共 8 个浓度梯度, 来筛选高羊茅下胚轴愈伤组织的最佳激素浓度。从表 1 可知, 随着 2,4-D 浓度的增加, 高羊茅下胚轴的愈伤组织诱导率逐渐升高, 当 2,4-D 浓度为 10mg/L 时, 诱导率高达 70% 以上, 而当 2,4-D 浓度超过 10mg/L 时, 愈伤组织的诱导率反而会下降, 且愈伤组织的质量也不高, 因此, 选用的 2,4-D 浓度为 10mg/L。

3.3 培养基类型的筛选

为了筛选适合高羊茅愈伤组织诱导的培养基类型, 将高羊茅下胚轴接种在含 2,4-D 浓度为 10mg/L 的 MS、B5、N6 诱导培养基上。从表 2 可知, MS 培养基为最适培养基。

通过本实验不仅得到高羊茅种子的最佳处理方式: 将种子先用 70% 酒精灭菌 30 s, 无菌水冲洗 5 次, 50% 次氯酸钠灭菌 20min, 再用无菌水冲洗 6 次。采用此处理方式, 种子萌发率约为 80%, 污染率为 0%。而且也得到高羊茅下胚轴愈伤组织诱导的最佳组合: 2,4-D 浓度为 10 mg/L, 最适培养基为 MS 培养基。采用这种组合, 愈伤组织诱导率高达 70% 以上。本研究建立的高羊茅组织培养体系, 为高羊茅品种的遗传改良奠定了基础。

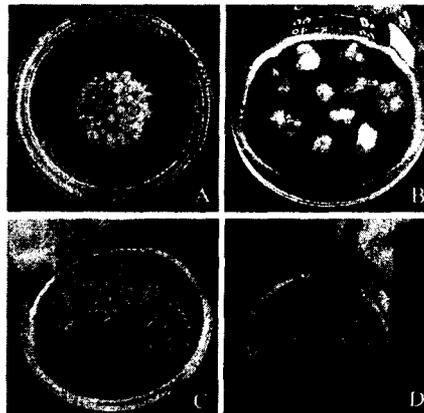


图 3 高羊茅植株再生体系的建立
A. 高羊茅下胚轴诱导的愈伤组织;
B. 愈伤组织分化成小绿点; C. 具有茎、叶小植株; D. 再生植株

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, 24(1).
- [2] 王毓, 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).
- [3] 钱海丰, 薛庆中. 高羊茅的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3).
- [4] Lowe K W, Conger B V. Root and Shoot Formation from Callus Cultures of Tall Fescue [J]. Crop Science, 1979, 19.
- [5] 支月娥, 何亚丽, 田蓁. 高羊茅组织培养研究初报[J]. 上海农学院学报, 1998, 16(1).

Studies on the Establishment of Tall Fescue Tissue Culture Regeneration System

LI Zhi-liang¹, YE Jia¹, YANG Jie¹, WU Zhong-yi², WANG Gang³

(1. Department of Biology Science, Handan College, Handan 056005, China;

2. Beijing Research Center of Agro-Biotechnology, Beijing 100089, China;

3. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: The establishment of tissue culture regeneration system for tall fescue is the foundation for its transformation. In this paper, the establishment of tall fescue tissue culture regeneration system was studied. (1) Different ways of seeds treatment were done to investigate their effects on the germination and pollution of seeds, and the results showed that the optimum method for the sterilization of tall fescue seeds is to soak the seeds for 1~3 h in sterile water and 30 s in 70% alcohol, wash them 5 times with sterile water, then sterilize them for 20 min in 50% sodium hypochlorite and wash them 6 times with sterile water. Using this sterilization method, the ratio of germination is 80%, while that of pollution is 0%. (2) The lower plumular axes of tall fescue were inoculated on the MS mediums with different 2,4-D concentration to induce calli, and the results indicated that 10 mg/L 2,4-D was the optimum concentration on calli induction of tall fescue, high concentration of 2,4-D had negative effect on callus induction. (3) The lower plumular axes of tall fescue were inoculated on the MS、B5、N6 mediums with 10 mg/L 2,4-D concentration to induce calli, and the results indicated that MS is the optimal medium in all of the three media tested.

Key words: tall fescue (*Festuca arundinacea*); lower plumular axes; 2,4-D; callus induction