

壳聚糖对狗牙根种子愈伤组织诱导和分化的影响

张琪, 姜茜, 郑丽屏, 蔡平* (苏州大学城市科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要 [目的]为优化狗牙根的组织培养体系。[方法]以普通狗牙根的成熟种子作外植体,研究了直接添加壳聚糖和用壳聚糖水溶液浸种对愈伤组织诱导和植株分化的影响。[结果]结果表明,N6培养基较适合用于诱导狗牙根种子的愈伤组织;壳聚糖的直接添加和浸种均能够显著提高愈伤组织的诱导率。其中,在N6培养基中,直接添加2 g/L壳聚糖时狗牙根种子出愈率最高,为88.00%。MS培养基较适合用于狗牙根种子愈伤组织的分化,添加1 g/L壳聚糖时愈伤组织分化率最高,为35.00%。

关键词 普通狗牙根;组织培养;分化;壳聚糖

中图分类号 S543+.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)16-06666-03

The Influence of Chitosan on the Induction and Differentiation of Bermuda grass

ZHANG Qi et al (School of Urbanology, Suzhou University, Jiangsu, Suzhou 215123)

Abstract [Objective] The study aimed to optimize the tissue culture system for Bermuda grass. [Method] With mature seed of Bermuda grass as explant, the influence of directly addition of chitosan and soaking seeds in the water solution of chitosan on the callus induction and differentiation of Bermuda grass were studied. [Result] N6 medium was more fitted for the callus induction of Bermuda grass seeds, and directly addition of chitosan and soaking seeds in the water solution of chitosan all could obviously improve the callus induction rate. Callus rate of Common Bermuda grass seed in N6 medium with 2 g/L chitosan was highest (88.00%). MS medium was better for the callus differentiation of Common Bermuda grass, and the callus differentiation rate in the treatment with addition of 1 g/L chitosan was highest (35.00%).

Key words Bermuda grass; Tissue culture; Differentiation; Chitosan

普通狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] 又名百慕达、绊根草、地板根,为禾本科狗牙根属多年生草本植物,广布于温带地区,我国黄河流域以南各地均有野生,欧洲和非洲也有广泛分布^[1]。狗牙根根茎和匍匐茎在适宜的气候条件下,能形成致密、整齐的优质草坪,常用于温暖潮湿和温暖半干旱地区的草地、公园、公共场所、高尔夫球道、果岭、发球台、高草区及路旁、机场、运动场等地方^[2-3],是分布最广的暖季型草坪草之一。近年来,狗牙根与冷季型草坪草种混播用作公路、河堤等的水土保持护坡绿化工程,应用极为广泛。

狗牙根有很多品种,生态特性有一定差别。普通狗牙根是最初从狗牙根属中选择出来并被广泛应用的草坪型狗牙根,其再生体系的建立,可为进一步采用生物技术进行品种改良,培育抗寒抗旱、耐盐耐阴、抗病和抗除草剂的新品种提供技术参考^[4]。草坪草的组培再生比较困难^[5],而相对于冷季型草坪草而言,暖季型草坪草的组培再生更加困难^[6]。目前,以狗牙根种子为外植体的愈伤组织培养和植株再生仍是一个难题^[7],虽然有报道成功地进行了愈伤组织的培养和植株再生,但该方面的文献甚少,并且组织培养和再生系统还

有待于进一步优化。因此,笔者以普通狗牙根成熟的种子为材料,研究了不同基础培养基、2,4-D 浓度及壳聚糖水溶液浓度的添加对狗牙根愈伤组织诱导和分化的影响,旨在为优化狗牙根的组织培养体系,提高遗传转化效率提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 普通狗牙根的成熟种子由苏州市星火绿化物资中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导、继代和分化培养基。壳聚糖处理方式分为2种,一种为直接添加于诱导和分化培养基中,愈伤组织诱导培养基类型及添加物见表1。继代培养基为1/2激素浓度原培养基。分化培养基类型及添加物见表2。另一种为壳聚糖水溶液浸种,所用诱导培养基为MS+2,4-D 2 mg/L、N6+2,4-D 2 mg/L、B5+2,4-D 2 mg/L,分化培养基为MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L、N6+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L、B5+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。上述培养基pH值为5.8,琼脂含量为0.8%。

1.2.2 材料的前处理与消毒。选取普通饱满的狗牙根的成

表1 诱导培养基

Table 1 The induction media

基本培养基 Basic medium	添加物 Additive	基本培养基 Basic medium	添加物 Additive	基本培养基 Basic medium	添加物 Additive
MS	2,4-D 2	N6	2,4-D 2	B5	2,4-D 2
MS	2,4-D 2 + chitosan 100	N6	2,4-D 2 + chitosan 100	B5	2,4-D 2 + chitosan 100
MS	2,4-D 2 + chitosan 500	N6	2,4-D 2 + chitosan 500	B5	2,4-D 2 + chitosan 500
MS	2,4-D 2 + chitosan 1000	N6	2,4-D 2 + chitosan 1000	B5	2,4-D 2 + chitosan 1000
MS	2,4-D 2 + chitosan 2000	N6	2,4-D 2 + chitosan 2000	B5	2,4-D 2 + chitosan 2000
MS	2,4-D 2 + chitosan 4000	N6	2,4-D 2 + chitosan 4000	B5	2,4-D 2 + chitosan 4000

注:浓度单位为mg/L。下同。

Note: Concentration unit was mg/L. The same as follows.

作者简介 张琪(1984-),女,回族,湖南邵阳人,硕士研究生,研究方向:草坪草生物技术。*通讯作者。

收稿日期 2008-03-31

熟种子,浸于0.1%升汞溶液中8~10 min,滤去浮在表面的种子,剩下的种子分成2种处理方式,一种用无菌水冲洗7次后,以手术刀横断切开,接种于含不同浓度壳聚糖的愈伤组

织诱导培养基上,以不含壳聚糖的培养基培养为空白对照。另一种用不同浓度壳聚糖水溶液浸种 12 h,取出后以手术刀横断切开,接种于无壳聚糖的愈伤组织诱导培养基上,以灭

菌蒸馏水浸种相同时间后接种为空白对照。壳聚糖水溶液浓度为:0.1、0.5、1、2、4 g/L,每瓶 15 颗种子,每处理 5 个重复。

表 2 分化培养基

Table 2 The differentiation media

基本培养基 Basic medium	添加物 Additive	基本培养基 Basic medium	添加物 Additive	基本培养基 Basic medium	添加物 Additive
MS	6-BA 2 + NAA 0.5	N6	6-BA 2 + NAA 0.5	B5	6-BA 2 + NAA 0.5
MS	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 100	N6	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 100	B5	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 100
MS	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 500	N6	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 500	B5	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 500
MS	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 1000	N6	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 1000	B5	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 1000
MS	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 2000	N6	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 2000	B5	6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 2000

1.2.3 愈伤组织的诱导和继代。将接种好的种子在 25 ℃ 恒温箱进行暗培养。接种后第 42 天将愈伤组织取出,转移至基础培养基不变,激素浓度为诱导培养基激素浓度的 1/2 的继代培养基中继代培养。每 14 d 继代一次。

1.2.4 愈伤组织的分化与植株再生。待愈伤组织长至一定大小(直径约 5 mm 左右)后,分别转入分化培养基中光照培养(25 ℃, 12 h/d, 光照强度 1 500 ~ 2 000 lx)。每瓶 4 团愈伤组织,每处理 10 个重复。

1.3 统计计算 愈伤组织诱导率(即出愈率)及再生植株率公式为:

$$\text{愈伤组织诱导率}(\%) = (\text{愈伤组织块数} / \text{接种种子数}) \times 100$$

$$\text{分化率}(\%) = (\text{产生分化的愈伤组织块数} / \text{进行分化的}$$

$$\text{愈伤组织总数}) \times 100$$

对试验数据采用 TTEST 法显著性检验。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖的直接添加对愈伤组织诱导的影响 由表 3 可以看出,在各培养基中直接添加一定量的壳聚糖能够提高狗牙根种子的愈伤组织诱导率。在 MS 培养基中添加 0.5 ~ 4 g/L 壳聚糖时,诱导率均高于对照组,其中 1 和 4 g/L 的添加量可以使愈伤组织诱导率显著提高,分别高出对照组 9.33% 和 12.00%。在 N6 培养基中添加 2 g/L 壳聚糖时对愈伤组织诱导率促进作用显著,出愈率提高了 6.67%。在 B5 培养基中加入 0.1 ~ 2 g/L 的壳聚糖均能提高愈伤组织诱导率,其中 0.5 g/L 壳聚糖产生的促进作用最显著,出愈率提高了 10.67%; 4 g/L 壳聚糖的添加量对 B5 培养基上的愈伤组织诱

表 3 壳聚糖的添加对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of chitosan on the rate of callus induction

添加物 Additive	MS 出愈率 MS callus rate	N6 出愈率 N6 callus rate	B5 出愈率 B5 callus rate
2,4-D 2	72.00	81.33	46.67
2,4-D 2 + chitosan 100	68.00	84.00	48.00
2,4-D 2 + chitosan 500	74.67	78.67	57.33*
2,4-D 2 + chitosan 1000	81.33*	85.33	49.33
2,4-D 2 + chitosan 2000	78.67	88.00*	52.00
2,4-D 2 + chitosan 4000	84.00**	82.67	41.33

注: * 表示在 0.05 水平差异显著, ** 表示在 0.01 水平差异极显著。下同。

Note: * means significant difference at 0.05 level, ** means extremely significant difference at 0.01 level. The same as below.

导率产生了一定的抑制,但作用并不显著。

2.2 壳聚糖水溶液的添加对愈伤组织诱导的影响 由表 4 可以看出,采用壳聚糖水溶液浸种能够提高狗牙根种子的愈伤组织诱导率。在 MS 培养基中添加 0.1 ~ 2 g/L 壳聚糖时,诱导率均高于对照组,其中采用 0.5 和 2 g/L 的壳聚糖水溶液浸种可以使愈伤组织诱导率显著提高,高出对照组 10.67% 和 6.67%。在 N6 培养基上接种 1 g/L 壳聚糖溶液浸种后的狗牙根种子,愈伤组织诱导率显著提高,比对照组增加了 6.67%。在 B5 培养基中,0.1 ~ 1 g/L 的壳聚糖水溶液浸种均能提高愈伤组织诱导率,其中 1 g/L 壳聚糖产生的促进作用最显著,出愈率提高了 7.33%。高浓度壳聚糖水溶液浸种对愈伤组织的诱导率有一定的抑制作用。

2.3 壳聚糖的添加对愈伤组织分化的影响 由表 5 可以看出,一定浓度的壳聚糖的添加对狗牙根种子愈伤组织的分化

有不同程度的促进作用。在 MS 培养基中添加 0.5 ~ 2 g/L 壳聚糖时,愈伤组织分化率均高于对照组,其中 1 g/L 的添加量可以使愈伤组织分化率显著提高,比对照组高出 7.50%。在 N6 培养基中添加壳聚糖浓度除 1 g/L 外,对愈伤组织分化也有一定的促进,但作用并不显著,添加 0.5 mg/L 壳聚糖时分化率最高提高了 5.00%。在 B5 培养基中加入 0.1 ~ 2 g/L 的壳聚糖均能提高愈伤组织分化率,其中 2 g/L 壳聚糖产生的促进作用显著,分化率提高了 7.50%。

3 结论与讨论

(1) 壳聚糖(chitosan)是氨基多聚葡萄糖的直链糖,是从虾、蟹壳中提取的天然活性高分子化合物,可广泛应用于工业、生物医学等领域。近几年,有关壳聚糖在农业上的应用研究开始有报道^[10],如壳聚糖具有促进作物生长的功能,用其浸种,可使小麦产量提高,单位面积穗数增加,种籽蛋白质含量提高。目

前对壳聚糖的试验研究主要集中在种子处理以提高植物园艺性状^[11],将壳聚糖应用于组织培养尚属首次。

表 4 壳聚糖水溶液浸种对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of soaking seeds with chitosan solution on the rate of callus induction

添加物 Additive	MS 出愈率 MS callus rate	N6 出愈率 N6 callus rate	B5 出愈率 B5 callus rate
2,4-D 2	74.67	80.00	50.67
2,4-D 2 + chitosan 100	78.67	85.33	53.33
2,4-D 2 + chitosan 500	85.33 ^{**}	81.33	56.00
2,4-D 2 + chitosan 1000	80.00	86.67 [*]	57.33 [*]
2,4-D 2 + chitosan 2000	81.33 [*]	82.67	49.33
2,4-D 2 + chitosan 4000	70.67	78.67	45.33

表 5 壳聚糖的添加对愈伤组织分化的影响

Table 5 Effects of adding chitosan on the rate of callus differentiation

添加物 Additive	MS 分化率 MS differentiation rate	N6 分化率 N6 differentiation rate	B5 分化率 B5 differentiation rate
6-BA 2 + NAA 0.5	27.50	20.00	5.00
6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 100	27.50	22.50	7.50
6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 500	32.50	25.00	7.50
6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 1000	35.00 [*]	17.50	10.00
6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 2000	30.00	20.00	12.50 [*]
6-BA 2 + NAA 0.5 + chitosan 4000	25.00	22.50	2.50

(2)在培养基中直接添加壳聚糖或用壳聚糖水溶液浸种后,狗牙根种子愈伤组织诱导率和分化率均有显著提高,其中在 N6 培养基中,直接添加 2 g/L 壳聚糖时,出愈率高达 88%,经继代后的愈伤组织在含 1 g/L 壳聚糖的 MS 培养基中分化率达到 35.00%。结果表明壳聚糖可能成为提高草坪草组织培养效率的调节剂。在壳聚糖种子处理试验中,壳聚糖的水溶液较多地被采用,但试验结果表明在培养基中直接添加壳聚糖对愈伤组织诱导率的促进作用更加明显,这可能由于在组织培养过程中,培养基经过高压灭菌,使壳聚糖或部分壳聚糖物理降解,更加有利于植物组织培养。所以在培养基中直接添加壳聚糖粉末是有效的优化愈伤组织诱导及再生方法。

(3)壳聚糖对愈伤组织诱导的促进作用可能通过多种途径实现。有文献报道壳聚糖溶液浸种能提高烟草种子活力,促进幼苗生长,可提高呼吸速率、幼苗可溶性蛋白含量及过氧化物酶、硝酸还原酶及淀粉酶活性^[12]。杨越冬等研究发现,玉米、小麦、花生以壳聚糖浸种,可明显提高萌发种子胚乳和幼苗中 GA₃、IAA 含量^[13-15]。壳聚糖溶液浸泡可使烟草叶、沿街草、早熟禾、蚕豆和小麦叶片细胞膜透性增加^[16-17]。壳聚糖处理对结缕草种子愈伤组织的诱导率和分化率的提高,也可能是通过酶活性、内源激素变化来作用的,相关研究正在进行中。

参考文献

[1] 刘建秀,周久亚,郭海林,等.草坪·地被植物·观赏草[M].南京:东南大

学出版社,2001:3-4.

- [2] ATKIN R K, BARTON G E. The establishment of tissue culture of temperature grasses[J]. J Exp Bot, 1973, 24: 689-699.
- [3] 白昌军, 韦家少, 蔡黎云. 暖季型草坪草品种选育及开发利用研究[J]. 草业科学, 1997(6): 61-70.
- [4] 陈志明, 顾立新. 草坪草自然地带分类初探[J]. 草业科学, 1999(1): 54-59.
- [5] AHN B J, HUANG F H, KING J W. Regeneration of bermudagrass cultivars and evidence of somatic embryogenesis[J]. Crop Science, 1987, 27(3): 594-597.
- [6] 单兰兰, 毛碧增, 夏波, 等. 草坪草组织培养和遗传转化研究进展. 热带农业科学, 2005, 25(4): 70-74.
- [7] 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.
- [8] 余叔文. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 37-52.
- [9] 张志豪. 激素对兰引 1 号草坪草型狗牙根愈伤组织及器官形成的影响[J]. 草业科学, 1996, 13(2): 45-47.
- [10] 柴建萍, 白兴荣, 谢道燕. 壳聚糖——一种极具开发利用价值的活性物质[J]. 云南农业科技, 2005(1): 26-27.
- [11] 陈惠萍, 徐朗莱. 壳聚糖调节植物生长发育及诱发植物抗病性研究进展[J]. 云南植物研究, 2005, 27(6): 613-619.
- [12] 张燕, 方力, 王宝. 壳聚糖对烟草种子萌发及幼苗生理生化特性的影响[J]. 吉林农业大学学报, 1998, 20(3): 28-30.
- [13] 杨越冬, 张智猛, 周永国, 等. 壳聚糖对玉米种子萌发和幼苗生长过程中生理活性的影响[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2001, 15(4): 9-12.
- [14] 杨越冬, 周永国, 齐印阁, 等. 壳聚糖对冬小麦种子萌发过程中生理活性影响[J]. 种子, 2002(3): 3-5.
- [15] 周永国, 杨越冬, 齐印阁, 等. 壳聚糖对花生种子萌发过程中某些生理活性的影响[J]. 花生学报, 2002, 31(1): 22-25.
- [16] 李荣贵, 黄祥辉, 张志良. 脱乙酰几丁质对烟草叶片一些生理生化特性的影响[J]. 华东师范大学学报, 1997(3): 69-74.
- [17] 巫钢, 张志良, 张利华, 等. 脱乙酰几丁质的制备及其对细胞透性和脱乙酰几丁质酶活性的影响[J]. 华东师范大学学报, 1995(2): 102-106.

(上接第 6645 页)

尚不清楚,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] WRIGHT R J. 土壤铝毒与植物生长[J]. 土壤学进展, 1992, 20(2): 29-33.
- [2] 刘鹏, 徐根娣, 姜雪梅. 铝对大豆种子萌发的影响[J]. 种子, 2003, 127(1): 30-32.

- [3] 黄咏梅. 花生铝毒害的生理生化特性研究[D]. 桂林: 广西大学, 2005.
- [4] 王芳, 刘鹏, 徐根娣, 等. 铝对荞麦生理影响的研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(4): 678-681.
- [5] 杨振德, 方小荣, 牟继平. 铝对桉树幼苗生长及某些生理特性的影响[J]. 广西科学, 1996, 3(4): 30-33.
- [6] 刘鹏, YANG Y S, 徐根娣, 等. 铝胁迫对大豆幼苗根系形态和生理特性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(4): 49-54.
- [7] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.