

多枝赖草、高羊茅的组织培养和愈伤组织诱变

葛荣朝¹, 赵宝存¹, 秘彩莉¹, 郭光艳¹, 赵茂林²

(1. 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016; 2. 北京市农林科学院 农业生物技术研究中心, 北京 100089)

摘 要:以多枝赖草、高羊茅的种子为材料,在诱导培养基上进行暗培养,产生愈伤组织.愈伤组织经多次继代培养后仍可保持分化潜力.在分化培养基上进行光照培养后,可以分化出丛生状幼苗,并大量生根,形成再生植株.用 EMS 溶液对 2 种愈伤组织进行诱变处理,结果表明:不同体积分数的 EMS 对愈伤组织的致死率不同,随着体积分数的提高,致死率逐步升高.经统计,初步确定 EMS 溶液对多枝赖草、高羊茅愈伤组织的半致死体积分数分别为 6 mL/L 和 8 mL/L.

关键词:多枝赖草;高羊茅;组织培养;愈伤组织;EMS 诱变

中图分类号:S 543

文献标识码:A

文章编号:1000-5854(2007)04-0531-04

随着世界经济的飞速发展和人们生活水平的日益提高,人类对环境质量越来越重视.草坪具有调温、调湿、降低空气污染、降低城市噪音、防止水土冲刷和泥土上路等功能,在城市环境绿化中起着重要的作用.我国的草坪业起步较晚,草坪草育种相对落后,为了满足城市绿化的需求,我国每年都要进口大量的草籽,且呈逐年上升趋势.因此,培育出一些适宜于本地种植的优良草种及草种组合是当务之急^[1,2].多枝赖草具有很好的耐盐碱性,对黄矮病具有突出的抗性;同时还具有耐干旱、耐瘠薄、耐污染、光能利用率高的特性;具有横向生长的地下茎,横向扩展性较好;具有较好的耐践踏、耐刈割特点,可用于各种绿地.所以,多枝赖草具有培育成优良抗逆草坪草种的潜力^[3,4].本文中,笔者主要是对多枝赖草、高羊茅进行组织培养,然后对其愈伤组织进行诱变处理,并获得再生植株,以期从再生植株或其后代中筛选出较为优良的草坪草品种.

1 材料与方法

1.1 实验材料

多枝赖草、高羊茅的种子.

1.2 实验方法

1.2.1 培养基组成

基本培养基为 MS 培养基,附加 30 g/L 蔗糖、5 g/L 琼脂,用 NaOH 调溶液至 pH 5.8.

诱导培养基为 MS+3 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L Kt;继代培养基为 MS+1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L Kt;分化培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA.

1.2.2 再生体系的建立

选取籽粒饱满的草籽反复清洗,室温浸泡 24 h,然后于超净台上用 700 mL/L 的乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用含 2 mL/L Tween20 的有效氯为 20 mL/L 的 NaClO 溶液浸泡 20 min,之后用无菌水冲洗 3 次.将消毒的种子接种于诱导培养基上,25℃暗培养.

种子诱导出愈伤组织后,将生长良好的愈伤组织块从种子上剥离,接种到继代培养基上,移至光照培养箱中培养.愈伤组织生长到合适大小时,将生长旺盛的愈伤组织一部分用于诱变处理,一部分接种到分化培养基,诱导生芽、生根.以上培养条件均为(25±2)℃,每天 16 h 光照.

1.2.3 愈伤组织的诱变处理

用无菌水分别配置 2,4,6,8,10 mL/L 的甲基磺酸乙酯(EMS)溶液,将 2 种愈伤组织在预先灭菌的培养

收稿日期:2006-12-07;修回日期:2007-03-02

基金项目:国家自然科学基金(30070461,30370905);北京市自然科学基金(5032009)

作者简介:葛荣朝(1974-),男,河北故城人,副教授,主要从事小麦、草坪草、饲草育种和分子细胞遗传学研究.

通讯作者:赵茂林(1965-),男,研究员,主要从事小麦边缘杂交育种.E-mail:zhaomaolin@baafs.net.cn

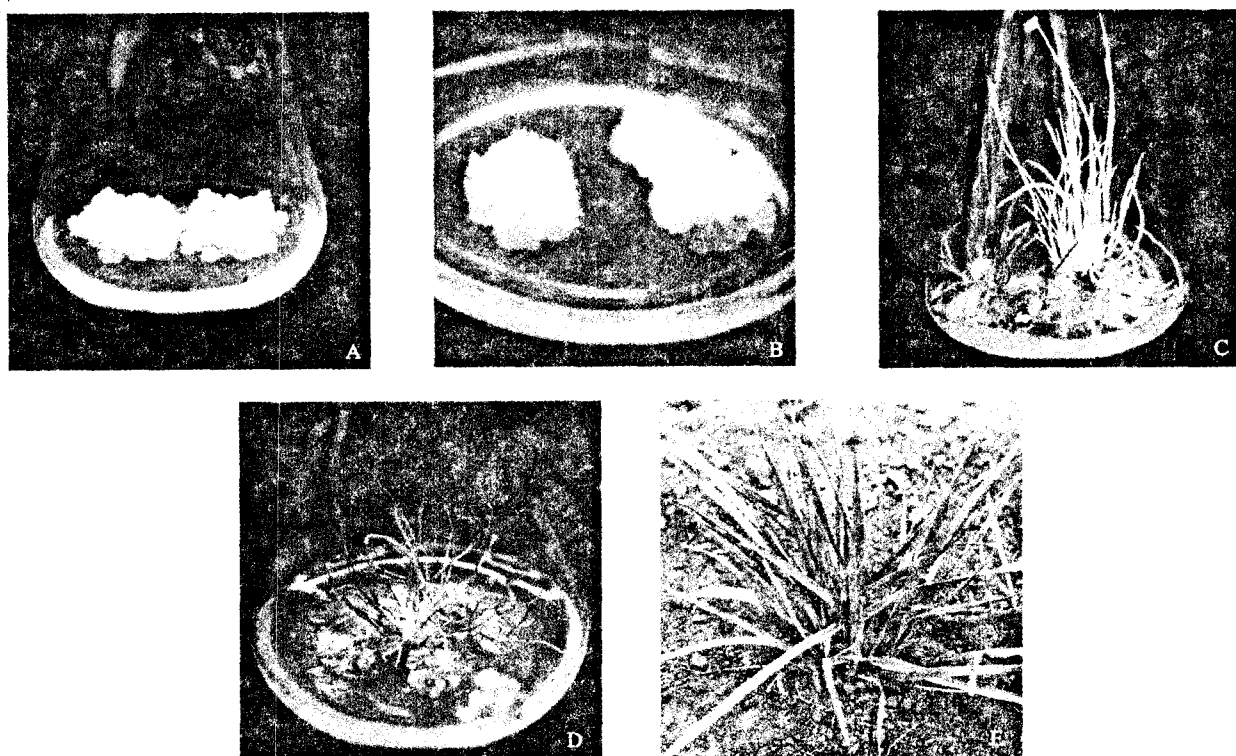
皿中用解剖刀切成 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 大小,分别倒入不同的 EMS 进行诱变处理,2 h 后用无菌水冲洗 3 次,将诱变后的愈伤组织块接种在继代培养基上,每瓶接种大约 30 块,每处理接种 10 瓶.每隔 1 周统计 1 次,计算各处理的愈伤组织致死率:

$$\text{致死率} = \frac{\text{褐化死亡的愈伤组织块数}}{\text{接种的愈伤组织总块数}} \times 100\%.$$

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导与生长

2 种草坪草种子接种到诱导培养基上,暗培养 7 d 左右,高羊茅出现萌动、生芽,14 d 后,多数种子萌发,一些幼芽的基部生长出愈伤组织.多枝赖草的种子在培养到 21 d 时,种胚处观察到白色突起,形成愈伤组织.生长约 40 d 后,将 2 种愈伤组织转移到继代培养基上继续暗培养,愈伤组织生长趋于旺盛,大约 30 d 继代 1 次.在继代的过程中,高羊茅的部分愈伤组织有分化出绿苗的现象.



A. 高羊茅愈伤组织; B. 多枝赖草愈伤组织; C. 高羊茅愈伤组织出苗; D. 多枝赖草愈伤组织出苗; E. 高羊茅幼苗移栽到大田.

图 1 多枝赖草和高羊茅的组织培养

2.2 愈伤组织的分化与生根

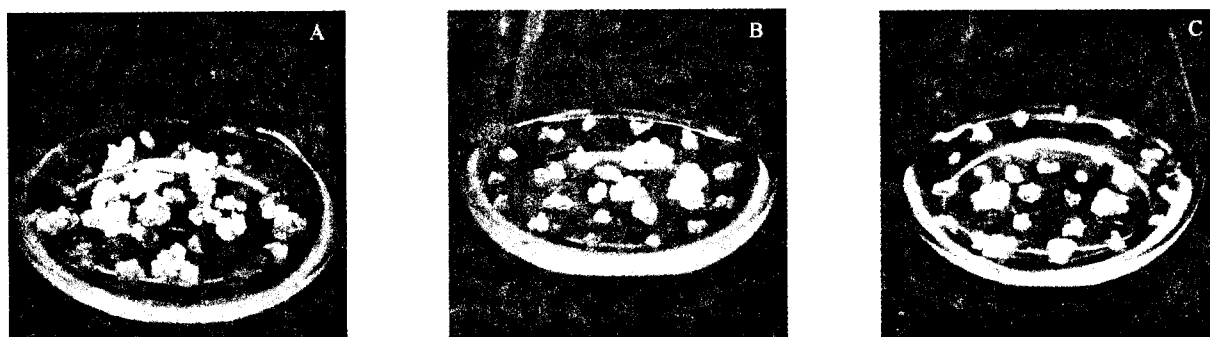
将暗培养的愈伤组织移至分化培养基上,在光照条件下诱导形态建成.高羊茅愈伤组织在 20 d 左右即分化出幼苗,分化率达 83.9 % 以上.多枝赖草的愈伤组织表面约 14 d 后产生若干淡绿色芽点,25 d 左右长成丛生状幼苗,平均每块愈伤组织块可以分化出 20~30 个小植株,其分化率约为 63.9 % 以上.在 2 种幼苗生长的同时会生出大量须根,生根率可达 100 %.

成苗后打开瓶口炼苗 7 d.然后取出小苗洗净琼脂,移栽于大田,覆盖塑料薄膜培养 10 多天后,去掉塑料薄膜,使其自然生长,成活率可达 95 % 以上.

2.3 愈伤组织的诱变

2 种草坪草的愈伤组织经过 EMS 诱变,分别接种到继代培养基上.在培养到第 3 周时,不同诱变处理间的愈伤组织出现明显的生长差异;培养到第 4 周时,统计愈伤组织的致死率.分析统计结果可以发现,多枝赖草和高羊茅的愈伤组织经过 EMS 溶液处理后,其生长明显受到抑制,而且随着处理液体积分数的提高,其

生长受抑制的现象更加明显,褐化死亡的数目明显增加(见图2、表1)。多枝赖草愈伤组织经过6 mL/L EMS溶液处理2 h后,308块愈伤组织只有42块出现明显生长,187块褐化死亡,致死率达到60.7%;而高羊茅的愈伤组织经8 mL/L EMS溶液处理后,310块愈伤组织有25块出现明显生长,195块褐化死亡,致死率为62.9%。所以通过本试验初步确定EMS溶液对多枝赖草愈伤组织的半致死体积分数为6 mL/L,对高羊茅愈伤组织的半致死体积分数为8 mL/L。



A. 2 mL/L EMS 溶液诱变的高羊茅愈伤组织; B. 6 mL/L EMS 溶液诱变的多枝赖草愈伤组织;
C. 8 mL/L EMS 溶液诱变的高羊茅愈伤组织。

图2 多枝赖草和高羊茅愈伤组织的 EMS 诱变

表1 多枝赖草和高羊茅愈伤组织 EMS 的诱变结果

EMS 溶液/ (mL·L ⁻¹)	多枝赖草愈伤组织				高羊茅愈伤组织			
	接种数	褐化数	明显生长	致死率/%	接种数	褐化数	明显生长	致死率/%
2	310	79	101	25.5	327	49	187	15.0
4	320	123	76	38.4	324	88	95	27.2
6	308	187	42	60.7	317	133	59	42.0
8	320	276	26	86.3	310	195	25	62.9
10	331	315	3	95.2	303	249	11	82.2

3 讨论

试验中多枝赖草由种子诱导出愈伤组织的时间偏长,且出愈率较低,分析其原因主要是由于多枝赖草种子本身发芽所需时间较长,约15 d左右,且发芽率较低。在愈伤组织诱导过程中,生长素与细胞分裂素的协同调控作用在组织培养中非常重要。试验中同时添加了生长素2,4-D和细胞分裂素Kt 2种植物激素,其中2,4-D主要诱导愈伤组织产生、Kt则促进了愈伤组织的快速生长,二者协同作用,使愈伤组织得以顺利诱导和旺盛生长。

化学诱变是通过采用一些分子结构不太稳定的化学诱变剂进行,常见的化学诱变剂包括甲基磺酸乙酯(EMS)、硫酸二乙酯(DES)和叠氮化钠(NaN_3)等,其中EMS是当前已研究证明使用效果最明显的化学诱变剂。EMS主要是通过鸟嘌呤的O₆位置进行烷基化,然后在DNA复制过程中,烷基化鸟嘌呤与胸腺嘧啶形成配对,造成G:C转换成A:T,从而造成单一碱基对的改变而形成点突变^[5,6]。这些点突变植株可以最大限度保持原品种的全部优良特性,同时增加一些新的性状,如抗病性、耐盐性、耐寒性等^[7]。在笔者的诱变试验中,生长状态较好的高羊茅愈伤组织对EMS溶液的损伤具有更高的抵抗力,其半致死体积分数要高于多枝赖草。经过初步实验得出了2种草坪草的组织培养方法和EMS诱变的半致死体积分数,这对进一步利用EMS诱变这2种愈伤组织、获得优良草种具有很好的应用价值。

参考文献:

- [1] 谢盛椿,李杰.浅谈北京的草坪草种及其应用[J].绿化与生活,2005,121(3):11-14.
- [2] 张殿京,白冬梅,李悦生,等.我国草坪业生产发展中存在的问题及解决途径[J].天津农业科学,2001,3:52-54.

- [3] 黄春堂,廖帆,杨光,等.克拉玛依地区冷季型草坪草引种栽培[J].林业科技通讯,2000,6:26-30.
- [4] 葛荣朝,赵茂林,李国亮,等.赖草属的优良基因导入小麦的研究进展[J].河北师范大学学报(自然科学版),2001,25(4):512-516.
- [5] 王瑾,刘桂茹,杨学举.EMS诱变小麦愈伤组织选择抗旱突变体的研究[J].中国农学通报,2005,21(12):190-193.
- [6] 董颖苹,连勇,何庆才,等.植物化学诱变技术在育种中的运用及其进展 I——化学诱变技术及诱变效率[J].种子,2005,24(7):54-58.
- [7] 梁小红,韩烈保.体细胞无性系变异及其在草坪草育种上的应用[J].草业科学,2006,23(2):85-91.

Tissue Culture and Callus Induced Mutation of *Leymus multicaulis* and Tall Fescue (*Festuca arundinacea*)

GE Rong-chao¹, ZHAO Bao-cun¹, BEI Cai-li¹, GUO Guang-yan¹, ZHAO Mao-lin²

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Hebei Shijiazhuang 050016, China;

2. Beijing Research Center of Agri-biotechnology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: Tissue culture of *Leymus multicaulis* and tall fescue (*Festuca arundinacea*) were optimized by using mature seeds as explants. The callus could keep the ability of differentiation after many times subculturing. On the medium of differentiation medium, many seedlings were induced from the callus, and grew out a lot of roots at the same time. Two kinds of callus were induced and handled by EMS (ethyl methane sulphonate). The results showed that the lethality rate of callus was increasing when we increased the concentration of EMS. By analyzing the results, the median lethal concentration of EMS for the callus of *Leymus multicaulis* and tall fescue was 6 mL/L and 8 mL/L respectively.

Key words: *Leymus multicaulis*; tall fescue; tissue culture; callus; EMS mutation

(责任编辑 柴 键)

(上接第 530 页)

- [16] 毛国红,汤文强,郭毅,等.白芷细胞外 ECP21 全长 cDNA 克隆[J].科学通报,2002,47(9):689-692.
- [17] MEYEROWITZ E M. Plants Compared to Animals: The Broadest Comparative Study of Evelopment [J]. Science, 2002, 295: 1 482-1 488.

The Comparison of the Structure Between Extracellular Polypeptide of Plant and Human Cytokines

LIU Hui^{1,2}, GUO Yi¹

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Hebei Shijiazhuang 050016, China;

2. School of Science, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract: Extracellular polypeptides of plant have been proved to be important signals in signal transduction. Using tools of bioinformatics, the amino acid sequence of these extracellular polypeptides of plant, animal and microbe were studied. Some interesting results were found that there is some common character about extracellular polypeptide from different species, which is the very correlative 3D structure. Using bioinformatics tool, the 3D structure of receptor of calmodulin, an important new extracellular polypeptides of plant was given. What were found would help to identify new extracellular polypeptides of plant.

Key words: extracellular polypeptide; cytokine; structure; bioinformatics

(责任编辑 柴 键)