

文章编号:1673-5021(2007)02-0050-04

扁穗牛鞭草组织培养体系建立

刘金平^{1,2}, 张新全²

(1. 西华师范大学生命科学院, 四川 南充 637002; 2. 四川农业大学草业科学系, 四川 雅安 625014)

摘要:以扁穗牛鞭草茎段为外植体, 进行组织培养体系研究, 结果表明: 初代培养最佳配方为 MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L, 芽诱导率可达 100%; 继代增殖最佳增殖配方为 MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.2mg/L, 增殖系数为 5.4; 生根阶段以 1/2MS+IBA 0.2mg/L 为最佳的生根培养基配方, 生根效果最好, 生根率最高; 初代培养生根苗与增殖后生根培养苗移栽成活率都在 97% 以上。

关键词:扁穗牛鞭草; 组织培养; 外植体**中图分类号:** S543**文献标识码:** A

扁穗牛鞭草 [*Hemarthria compressa* (L. F.) R. Br.] 是禾本科牛鞭草属多年生根茎型草本植物, 为热带、亚热带优质饲用及水土保持草种。近年来, 我国学者对扁穗牛鞭草野生资源分布、生态类型、生产性能^[1~4]、适应性、抗逆性和遗传基础^[5~8] 等方面进行了研究。野生资源使扁穗牛鞭草自然结实率低、难以形成植物学意义上的种子, 多以营养体进行繁殖, 这就给资源收集、共享、运输、保存带来不便, 营养体在运输过程容易发热变质、丧失活力, 并且用常规异地栽培法进行种质资源保存不仅需要大量投入, 也容易受到环境条件、保存年限等因素的限制, 所以探寻方便、安全的种质资源保护、保存方法是急待解决的问题。

试验采用组织培养的方法, 采用外植体(茎)→愈伤组织→丛芽→生根培养→完整小植株→炼苗→移栽的技术线路, 对不同初代、继代培养基的结果进行比较, 分析适合扁穗牛鞭草组织培养组成, 建立培养再生体系, 探讨种质资源保护、保存的可行方法, 为扁穗牛鞭草无性繁殖与迅速扩繁提供理论和技术依据。

1 材料与方 法

1.1 初代培养

初代培养以‘广益’幼嫩茎为外植体。外植体在用自来水冲洗 30min 后切成 1~1.5cm 小段, 用 0.1% 的升汞溶液浸泡 3min, 用无菌水冲洗 5~6 次, 吸干表面水分后接种。初代培养基本培养基为 MS 附加琼脂 5g/L、蔗糖 3%, pH 5.8~6.0。激素水平如表 1 进行组合。每处理每次接种 10 管, 设 3 次重复。测定分化率(未污染外植体分化数/未污染外植体总数×100%)。

表 1 初代培养试验因子水平

Table 1 The table of factor and level in initial culture

处理 Treatment	水平 Level (mg/L)				
	1	2	3	4	5
NAA	0	0.05	0.1	0.5	1
6-BA	0	0.5	1.0	1.5	2

1.2 继代培养

材料为初代培养得到的芽苗。基本培养基为 MS 附加琼脂 5g/L、蔗糖 3%, pH 5.8~6.0, 激素 6-BA (0.5 mg/L、1.5 mg/L、2.5 mg/L)、NAA (0.05 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L)。每处理每次接种 9 瓶, 每瓶接种 1 株。统计和计算增殖系数(30d 后统计的芽苗数/接种时的芽苗数), 并观察试管苗质量。

1.3 生根培养

采用 3cm 以上生长粗壮的无根试管苗。基本培养基为 1/2MS, 分别附加 IBA (0.0.1、0.2、0.5mg/L) 和 NAA (0.1、0.2、0.5mg/L), 附加糖 20g/L, 琼脂 5g/L, 每处理每次接种 20 瓶, 每瓶 1 株芽苗, 30d 观察并测量生根率、平均根长、平均根数。

$$\text{生根率} = \text{生根株数} / \text{接种株数} \times 100\%$$

$$\text{平均根长} = \text{生根单苗根总长} / \text{生根单苗总根数}$$

$$\text{平均根数} = \text{生根总数} / \text{生根株数}$$

1.4 炼苗与移栽

由于牛鞭草生命力较强, 生根容易, 移栽易成活, 所以将初代培养已生根的芽苗和生根培养后的

收稿日期: 2006-09-17; 修回日期: 2007-01-11

基金项目: 西华师范大学科研启动项目(06B032)

作者简介: 刘金平(1972-), 男, 山西人, 博士, 主要从事牧草及草坪草育种与种质资源教学与研究。

试管苗开瓶炼苗 3~4d,然后洗去培养基室内放置 1d,最后移栽在消毒处理后的 20%河沙+30%腐熟锯末+50%园土的基质。

移栽成活率(%)= 30d 时未死亡植株总数/移栽植株总数×100

1.5 数据统计

采用 Excell 和 SPSS for Windows10.0 统计软件对试验观察数据资料进行数据统计、方差分析和差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 初代培养(启动培养)

接种 5d 后,各处理外植体开始出现愈伤组织,逐渐形成浅绿色芽点(芽原基与根原基);15d 后开始从不定根中心形成明显突起(芽原基);30d 后分化出蜷曲的芽苗。初代培养试验结果见表 2。

表 2 初代培养结果
Table 2 Results of initial culture

处理 Treatment	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage(%)		不定根分化率 Rooting percentage(%)		不定芽分化率 Adventitious bud formation percentage(%)		
	15d	30d	15d	30d	15d	30d	60d
MS+NAA 0mg/L+BA 0mg/L	0.00	0.00	30.00	56.67	0.00	10.00	46.67
MS+NAA0.05mg/L+BA0.5 mg/L	53.33	53.33	13.33	26.67	0.00	6.67	30.00
MS+NAA0.05mg/L+BA1.0 mg/L	93.33	56.67	13.33	40.00	0.00	10.0	50.0
MS+NAA0.05mg/L+BA1.5 mg/L	93.33	56.67	20.00	93.33	0.00	26.67	56.67
MS+NAA0.05mg/L+BA2.0 mg/L	56.67	53.33	13.33	43.33	0.00	3.33	6.67
MS+NAA0.1mg/L+BA0.5 mg/L	43.33	10.00	40.00	76.67	0.00	16.67	50.00
MS+NAA0.1mg/L+BA1.0 mg/L	100.00	76.67	13.33	36.67	0.00	0	40.00
MS+NAA0.1mg/L+BA1.5 mg/L	80.00	10.00	20.00	80.00	0.00	36.67	83.33
MS+NAA0.1mg/L+BA2.0 mg/L	60.00	20.00	13.33	30.00	0.00	0	3.33
MS+NAA0.5mg/L+BA0.5 mg/L	80.00	86.67	20.00	33.33	0.00	0	30.00
MS+NAA0.5mg/L+BA1.0 mg/L	60.00	0.00	13.33	90.00	0.00	10.00	76.67
MS+NAA0.5mg/L+BA1.5mg/L	83.33	26.67	46.67	80.00	0.00	16.67	90.00
MS+NAA0.5mg/L+BA2.0 mg/L	40.00	23.33	23.33	36.67	0.00	3.33	20.00
MS+NAA1.0mg/L+BA0.5 mg/L	53.33	23.33	20.00	60.00	0.00	20.00	33.33
MS+NAA1.0mg/L+BA1.0 mg/L	56.67	0.00	30.00	56.67	0.00	30.00	43.33
MS+NAA1.0mg/L+BA1.5 mg/L	33.33	0.00	50.00	86.67	0.00	10.00	76.67
MS+NAA1.0mg/L+BA2.0 mg/L	31.33	0.00	24.00	37.33	0.00	0.00	21.33

对 15d、30d 的愈伤组织诱导率进行的方差分析结果见表 3,说明 15d 时 NAA 与 BA 浓度对诱导率无显著影响。30d 时 6-BA 对诱导率有显著影响(P<0.05),而 NAA 对诱导率无显著性差异。

激素浓度对不定根分化率无显著影响;在 15d、30d 时不定芽诱导率差异不显著,而在 60d 时 NAA 处理间表现出显著不同(P<0.05),随着 NAA 浓度的升高,不定芽诱导率呈上升趋势。

对 30d 时 6-BA 处理对愈伤组织诱导率进行新复极差(SSR)多重比较,结果表明 6-BA 浓度为

2.0 mg/L 时效果最差,6-BA 1.0mg/L 对愈伤组织诱导效果最好,6-BA 0.5mg/L 与 6-BA 1.5mg/L 差异不显著。而 NAA 处理 0.1mg/L 与 0mg/L、0.05mg/L、0.5mg/L 之间差异呈极显著,当 NAA 为 0.1mg/L 时芽分化率最高。综合分析,确定 MS+NAA1.0mg/L+BA 0.1mg/L 茎诱导出芽的最佳培养基配方。

2.2 继代培养(增殖培养)

将初代培养得到的 3cm 左右的芽苗接种到增殖培养基中,20d 后统计芽苗的增殖系数,结果见表 4。

表 3 愈伤组织、不定根、不定芽诱导率的方差分析

Table 3 Rate of callus induction and rooting and adventitious bud

变异来源 Variance source	愈伤组织诱导率 Callus induction rate				不定根诱导率 Rooting rate				不定芽诱导率 Adventitious bud rate			
	15d		30d		15d		30d		15d		30d	
	NAA	6-BA	NAA	6-BA	NAA	6-BA	NAA	6-BA	NAA	6-BA	NAA	6-BA
平方和 Sum of squares	2263.557	2717.309	675.243	4496.095	275.282	270.696	1750.399	788.459	656.161	300.590	3103.144	594.933
自由度 df	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
均方 Mean square	754.519	905.770	225.081	1498.698	91.761	90.232	583.466	48.506	218.720	100.197	1034.381	198.311
F	5.660	6.795	1.983	13.206	1.515	1.490	2.951	1.329	1.304	0.598	9.767	1.872
P	0.094	0.075	0.294	0.031	0.371	0.376	0.199	0.410	0.416	0.659	0.047	0.310

表 4 6-BA 与 NAA 对继代增殖系数的影响

Table 4 Effect of 6-BA and NAA on multiplication rate of subculture

处理 Treatment(mg/L)		增殖系数 Multiplication rate(%)	平均苗高 Length(cm)
BA	NAA		
0.5	0.05	1.85	2.54
0.5	0.2	2.44	3.40
0.5	0.5	2.29	2.65
1.5	0.05	4.59	4.34
1.5	0.2	5.44	5.23
1.5	0.5	3.48	4.0
2.5	0.05	4.29	3.78
2.5	0.2	4.11	3.65
2.5	0.5	3.74	3.39

对增殖系数进行方差分析,说明 6-BA、NAA、6-BA+NAA 处理浓度间存在极显著差异;多重比较结果(表 5)说明,6-BA 处理间均达到极显著水平,6-BA 1.5mg/L 处理增殖最高;NAA 0.05mg/L 与 NAA 0.2mg/L 间差异不显著,与 NAA 0.5mg/L 间达到极显著水平,说明低浓度 NAA 对增殖起促进作用,过高浓度抑制芽苗增殖,0.2mg/L NAA 为增殖的最适浓度。综上所述,增殖培养最佳组合为 MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.2mg/L。

2.3 生根培养

采用 1/2 MS 分别附加 NAA(0.1、0.2、0.5mg/L)和 IBA (0.1、0.2、0.5mg/L)进行生根培养,选取无根苗转入生根培养基中培养。30d 后统计生根情况。结果表明(表 6):各处理都能诱导牛鞭草幼苗生根,但生根率有显著差异;低浓度处理较易生根,而高浓度处理对生根有抑制作用。IBA 浓度为 0.2mg/L 时生根最早,15d 左右可形成发达的根系。

表 5 6-BA 处理新复极差分析结果

Table 5 SSR analysis of the four levels of 6-BA

处理 Treatment (mg/L)	增殖系数 (%) Multiplication rate	差异显著性 Significance level	
		0.05	0.01
6-BA	0.5	1.432	c
	1.5	3.519	a
	2.5	3.073	b
NAA	0.05	2.939	d
	0.2	2.961	d
	0.5	2.124	e

表 6 不同生长调节剂对生根的影响

Table 6 Effect of different growth regulators on rooting

处理 Treatment (mg/L)	生根率 Rooting percentage(%)	生根时间 Rooting time(d)	根长 Root length(cm)	平均根数 Root number
0	41.67	17	2.94	5.50
NAA0.1	61.67	18	2.73	8.0
NAA0.2	65.0	14	3.81	14.7
NAA0.5	40.0	21	2.22	3.83
IBA0.1	78.33	14	3.37	6.85
IBA0.2	98.67	12	5.55	10.05
IBA0.5	38.33	17	2.35	2.98

2.4 炼苗与移栽

对生根苗进行了炼苗与移栽,结果说明初代培养生根苗的成活率 97.8%,表现为植株低矮,叶片较少;而生根培养试管苗成活率 100%,且植株壮,叶片多,株型紧凑。可见,两种生根苗移栽成活率差异不大,但植株表型与生长速度不同,是因为增殖生根苗较壮,而初代培养生根苗较弱小,造成两种植株自身营养物质积累不同,导致了植株表型与生长速度不同;或许由于两种苗来源于不同培养基,体内激素含量差异也是导致植株表

型与生长速度不同的原因,有待于进一步研究。

3 结论

以扁穗牛鞭草茎段为外植体进行组织培养,初代培养最佳配方为 MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L,芽诱导率可达 100%;继代增殖最佳增殖配方为 MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.2mg/L,增殖系数为 5.4;生根阶段以 1/2MS+IBA 0.2mg/L 为最佳的生根培养基配方;初代培养生根苗与增殖后生根培养苗移栽成活率都在 97%以上。

利用组织培养体系进行种质资源的收集与保存,采用适当的培养基与培养条件,可以加速或者减慢材料的生长速度,这为种质资源的快速扩繁或长期保存提供了可行的办法。尤其对于营养繁殖为主的扁穗牛鞭草种质资源,其变异往往来自芽的变异,通过组织培养可以在人工控制的生态条件下对变异芽进行筛选与快速扩繁,并且可以通过培养基与培养条件的变化诱导新的变异。所以,组织培养是种质资源保护、优异性状保存与扩繁、新品种(系)选育的重要手段,应当加强建立与健全组织培养体系的研究。

参考文献(References):

- [1] 杜逸,吴彦奇,王天群. 重庆和广益牛鞭草割草与营养动态的研究[J]. 草业科学,1989,(3):53-67.
Du Y, Wu Y Q, Wang T Q. The study on relation between mowing and nutrient dynamics of *Hemarthria compressa* cv. Chongqing and Guangyi [J]. *Pratacultural Science*, 1989,(3):53-67.
- [2] 刘金平,张新全,陈永霞. 无性繁殖扁穗牛鞭草基株分蘖形成与生长特点[J]. 植物遗传资源学报,2004,(4):338-341.
Liu J P, Zhang X Q, Chen Y X. Study on production index of genet for wild gompessed limpgrass[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004,(4):338-341.
- [3] 杨春华,张新全,李向林,杜逸,吴彦奇. 牛鞭草属种质资源及育种研究[J]. 草业学报,2004,(2):7-12.
Yang C H, Zhang X Q, Li X L, Du Y, Wu Y Q. *Hemarthria* germplasm resources and breeding[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2004,(2):7-12.
- [4] 吴彦奇,杜逸. 扁穗牛鞭草几个有性生殖特性的研究[J]. 四川农业大学学报,2000,(3):262-264.
Wu Y Q, Du Y. Some reproductive characteristics of *Hemarthria compressa* [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2000,(3):262-264.
- [5] 徐胜,张新全,李建龙,赵德华,朱明. 19份野生扁穗牛鞭草种质农艺性状遗传变异的数量化研究[J]. 中国草地,2003,(4):15-20.
Xu S, Zhang X Q, Li J L, Zhao D H, Zhu M. A quantitative study and analysis of inheritable variation on nineteen wild *Hemarthria compressa* germplasms in agronomic traits [J]. *Grassland of China*, 2003,(4):15-20.
- [6] 刘金平,张新全,陈永霞. 西南区扁穗牛鞭草野生资源匍匐性研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(5):796-798.
Liu J P, Zhang X Q, Chen Y X. Study about stolon characteristic of *Hemarthria compressa* in southwest region[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2005,33(5):796-798.
- [7] 刘金平,张新全,游明鸿,刘江. 扁穗牛鞭草水培无性苗构件组成特点的研究[J]. 福建林业科技,2005,32(4):111-113.
Liu J P, Zhang X Q, You M H, Liu J. The characteristic of components of cloned seedling in water for *Hemarthria compressa* [J]. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*, 2005,32(4):111-113.
- [8] 刘金平,张新全,陈永霞. 扁穗牛鞭草资源无性繁殖根系形成发育多样性的研究[J]. 安徽农业科学,2005,(10):1819-1821.
Liu J P, Zhang X Q, Chen Y X. Diversity about formation and growth of root system for cloning genet of *Hemarthria compressa* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2005,(10):1819-1821.

Establishment of Tissue Culture System for *Hemarthria compressa*

LIU Jin-ping^{1,2}, ZHANG Xin-quan²

(1. College of Life Science, West Normal University, Nanchong 737002, China;
2. Department of Grassland, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: The stems were used as explants to establish the system of tissue culture for *Hemarthria compressa*. The result showed that: MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L gave rise to the best result in inducing adventitious buds from explants, in which the inducement rate could be 100%, and MS+6-BA 1.5mg/L+0.2mg/L NAA was favorable to the proliferation of buds, in which the multiplication rate could be 5.44. The rooting rate could be 100% on 1/2MS+IBA 0.2mg/L. Both survival rates of adventitious buds and proliferation buds were higher than 97%.

Key words: *Hemarthria compressa*; Tissue culture; Explants

【责任编辑 刘天明】