

文章编号: 0490-6756(2008)01-0205-04

披碱草组织培养体系的建立

张 艺, 李达旭, 张 杰, 赵 建, 杨志荣

(四川大学生命科学学院生物资源生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘 要: 以青藏高原草地优质牧草—短芒披碱草为材料, 通过对该植株再生条件的优化, 获得了适宜短芒披碱草愈伤组织再生的外植体材料和基本培养基, 建立了短芒披碱草愈伤组织再生体系。

关键词: 短芒披碱草; 再生体系; 外植体; 基本培养基

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A

Establishment of regeneration system of *Elymus dahuricus*

ZHANG Yi, LI Da-Xu, ZHANG Jie, ZHAO Jian, YANG Zhi-Rong

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,

College of Life Sciences, SiChuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: High quality pasture *Elymus dahuricus* from Qinghai-Tibet Plateau had been studied to establish regeneration system through optimizing regeneration condition. The moderate explant material and basic culture medium for regeneration had been obtained and regeneration system of *Elymus dahuricus* was established.

Key words: *Elymus dahuricus*, regeneration system, explant, basic culture medium

1 引 言

短芒披碱草(*Elymus breviaristatus*)是我国二级保护禾本科植物, 在分类上属禾本科披碱草属多年生草本植物, 是重要的牧草植物。该品种具有抗逆性强、产草量高、利用年限长和饲草品质优等优点, 现已成为川西北牧区建设高产优质打贮草基地、治理退化和沙化草地的主要栽培草种。但是披碱草的愈伤组织诱导相对困难, 至今还没有建立起该植物稳定高效的再生体系, 这就限制了对其进行遗传转化的研究。本研究通过对披碱草愈伤组织诱导、分化条件的优化, 从外植体材料选择到愈伤组织的诱导与分化建立了一完整的技术路线, 丰富了禾本科单子叶植物的组织培养技术, 为披碱草的遗传转化利用, 快速培育新品种奠定了基础。

但对于多数单子叶植物来说, 特别是禾本科牧草, 通过组织培养再生植株难度较大^[1]。禾本科牧草的组织培养再生相对较难, 主要是适用的外植体较单一^[2,3]。McDonnell、Conger、Boyd 和 Dale 等人用草地早熟禾的成熟种胚作外植体, 得到了愈伤组织和再生苗, 但分化率很低^[4,5]。迄今为止, 只有部分禾本科作物和某些牧草可以通过组织培养再生出完整植株, 如水稻^[6,7], 玉米^[8], 小麦^[9], 芦苇^[10], 狗尾草和香蒲^[11-14]等。

2 材料与方法

2.1 试验材料:

2.1.1 植物材料 短芒披碱草种子(由四川省草原研究院提供)。

2.1.2 培养基 Murashige and Skoog medium

收稿日期: 2007-01-18; 修回日期: 2007-04-15

基金项目: 科技部科技攻关项目(JY03-B-31)

作者简介: 张艺(1982-), 女, 四川省江油市人, 硕士, 主要研究领域为牧草组培及转基因研究。

通讯作者: 杨志荣, E-mail: bioyang@163.com

(MS 培养基)^[15], N6 培养基^[16], B5 培养基^[17]

2.1.3 主要试剂 包括植物生长调节剂及其它试剂, 植物生长调节剂有: 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、3-甲基-2,4-戊二烯酸(Absciscic acid, ABA 即脱落酸)、萘乙酸(Naphthleneacetic acid, NAA), 激动素(Kinetin, KT)。

2.2 实验方法

2.2.1 外植体的制备 选取成熟干燥的披碱草种子, 脱去外颖壳, 1% 氯化汞表面灭菌, 无菌双蒸水洗涤, 无菌接种于愈伤组织诱导培养基和白琼脂培养基上, 选取发芽后的幼叶及下胚轴, 成熟种子胚 3 种外植体作诱导愈伤组织。

2.2.2 诱导培养基的筛选 将外植体接种到含有不同激素配比的愈伤组织诱导培养基上, 26℃ 暗培养 20~30 d, 统计计算出愈率, 以出愈率最高的作为愈伤组织的诱导培养基。

2.2.3 继代培养愈伤组织 选择生长旺盛, 颜色淡黄, 结构紧密的愈伤组织, 从外植体上剥离后接种到继代培养基上, 每 7 d 更换新鲜培养基, 继续 26℃ 暗培养 20 d 左右。

2.2.4 愈伤组织的分化培养基筛选 分别选取继代培养 30 d、50 d、60 d、80 d、100 d 后的愈伤组织于 3 种分化培养基上(以未添加水解酪蛋白的培养基作为对照), 观察愈伤组织的分化情况, 记录分化率, 确定最佳分化培养基配方及最佳继代时间。26℃, 12 h 光照培养 2 周。统计分析再生植株培养结果, 计算再生率。

诱导率 = (出愈成熟胚数/接种成熟胚数) × 100%

分化率 = (出芽愈伤数/接种愈伤数) × 100%

生根率 = (生根愈伤数/接种愈伤数) × 100%

3 结果与分析

3.1 愈伤组织的诱导

分别以披碱草成熟种子、下胚轴和幼叶作为外植体, 比较激素配比相同(5 mg/L 2,4-D)的三种基本培养基(白琼脂培养基为对照), 研究结果见表 1, 以 MS 培养基的出愈率最高, 故确定 MS 培养基为披碱草诱导培养基的基本培养基; 成熟种子胚的出愈率比另外两种组织的出愈率高, 且在继代与分化时易于存活、分化, 故采用成熟种子胚作为最佳外植体。

表 1 不同基本培养基和外植体的出愈率

Tab.1 Changes in the callus induction frequency of *Elymus sibiricus* as effected byous medium

培养基	外植体类型	诱导率(%)
MS	成熟胚	47.82
	下胚轴	35.69
	幼叶	20.60
N6	成熟胚	14.43
	下胚轴	4.64
	幼叶	2.57
B5	成熟胚	16.27
	下胚轴	6.24
	幼叶	2.94
Control	成熟胚	0.00
	下胚轴	0.00
	幼叶	0.00

表 2 2,4-D 和 KT, ABA 三因素四水平正交表

Tab.2 The orthogonal tests of various growth regulators

No	2,4-D	ABA	KT	诱导率
1	2	0	0	0.14
2	2	0.05	0.5	0.32
3	2	0.1	1	0.25
4	2	0.2	2	0.18
5	5	0	0.5	0.45
6	5	0.05	0	0.49
7	5	0.1	2	0.43
8	5	0.2	1	0.39
9	7	0	1	0.35
10	7	0.05	2	0.37
11	7	0.1	2	0.34
12	7	0.2	0.5	0.36
13	9	0	2	0.21
14	9	0.05	1	0.25
15	9	0.1	0.5	0.23
16	9	0.2	0	0.20

植物生长调节剂的筛选结果见表 2, 从表 2 中看出, 单独使用 2,4-D 或其它植物生长调节剂时, 种子出愈率极低且愈伤组织胚性不高, 难于再生。应用正交试验将 2,4-D 和 KT, ABA 作为影响出愈率的 3 个因素, 设置四个水平, 筛选最适激素浓度。根据 Duncan 新复极差法分析得出, 2,4-D 的浓度为影响出愈率的主要因素。ABA 主要用于抑制种子胚分化, 对出愈率影响不大, 但是添加 2 mg/L 的 ABA 可以抑制种子出芽, 易于剥离愈伤组织。同时发现添加 1 mg/L 左右的酪蛋白水解液能够明显提高愈伤组织的生长质量。因此确定最佳诱导培养基配方为:

MS + 5 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L KT + 2 mg/L ABA + 1 mg/L CH + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 pH 5.8

3.2 愈伤组织的继代培养

披碱草成熟胚诱导后,选取结构致密,颜色淡黄的愈伤接种到继代培养基上.诱导出的愈伤组织并不是全都能形成愈伤组织有再生能力的胚性愈伤组织,且沿用诱导培养基配方作为继代培养基时,愈伤组织生长停滞甚至死亡.降低基本培养基无机盐浓度及替换有机物成分后,愈伤组织生长良好,直径明显变大,且多数在分化培养基中出现绿

点.继代培养基配方为:1/2MS+B5 有机物+NAA 3 mg/L+KT 0.01 mg/L+2%蔗糖+0.8%琼脂,pH 5.8

3.3 胚性愈伤组织的分化与再生

胚性愈伤组织的分化与再生研究结果见表 3,从表 3 中看出,培养时间为 50 d 左右的愈伤组织在 1 号培养基的分化率最高,添加酪蛋白对愈伤组织的分化率影响不显著.

表 3 不同继代时间愈伤组织的分化率

Tab.3 Differentiation frequency of callus after different subculture time

培养基类型	分 化 率(右边数据为对照,%)									
	20d		30d		40d		50d		80d	
1	12	10	16	20	24	30	48	40	14	16
2	8	10	8	6	16	12	24	20	10	8
3	4	6	6	8	6	8	8	10	4	2

1. 1/2 基本培养基无机盐+B5 有机物+NAA 0.5 mg/L+KT 0.01 mg/L;2. 1/2 基本培养基无机盐+B5 有机物+NAA 1 mg/L+KT 0.01 mg/L;3. 1/2 基本培养基无机盐+B5 有机物+NAA 2 mg/L+KT 0.01 mg/L

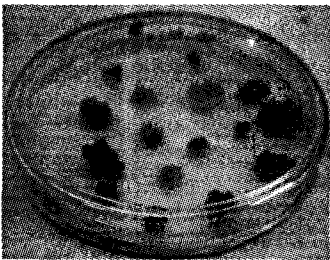


图 1 继代 50 d 后的愈伤组织

Fig.1 Callus after subculture of 50 d



图 2 继代 50 d 后愈伤组织分化所得幼苗

Fig.2 Regenerated plants after differentiation

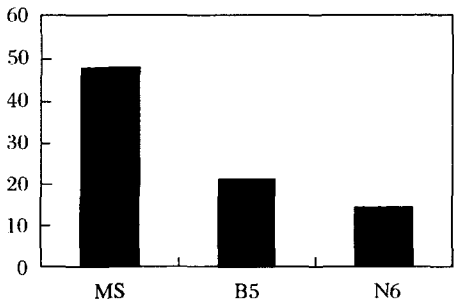


图 3 不同基本培养基对愈伤组织诱导率的影响

Fig.3 Influence of various basic culture medium on callus induction frequency

将培养到最佳继代时间的胚性愈伤组织接种到分化培养基上约 2 周左右,待生苗后将无根幼苗转移到生根培养基上培养至长出幼根,练苗后移栽至土中.

4 讨 论

4.1 愈伤组织诱导中的影响因素

4.1.1 植物生长调节剂对披碱草愈伤组织诱导的影响 披碱草的组织培养建立在植物细胞全能性的基础上.在愈伤组织的培养过程中,植物生长调节剂起了极大的作用,没有激素,整个组培体系是无法构建起来的.植物激素是植物新陈代谢产生的化合物,以极微的量影响植物许多生理活动,在培养基的各种成分中,植物激素的影响最大.研究发现,单独使用细胞生长素时,披碱草的出愈率极低

或不出愈,且愈伤组织的副产品多,结构松散,易于死亡,分化能力弱.本研究采用了三种细胞生长素和分裂素的组合进行愈伤组织诱导:结果表明仅 2,4-D+KT 激素组合才能诱导出愈伤组织.

2,4-D 及 KT 的浓度对愈伤组织的诱导也有很大的影响.在本研究中,当 2,4-D 浓度逐渐升高时,愈伤组织的出愈率与之并不成正比,而当 2,4-D 浓度为 9 mg/L 时,出愈率最高(60.68%).考虑到 2,4-D 浓度过高会影响分化培养,因此选择 5 mg/L 作为 2,4-D 浓度.

4.1.2 基本培养基对披碱草愈伤组织诱导的影响

基本培养基的成分对愈伤组织诱导的影响不如激素大,但在相同的激素条件下,不同的基本培养基出愈率仍然相差甚远,从图 3 看出,MS 培养基的出愈率远远高于其它两种培养基.同时,愈伤组

织对培养基体系的 pH 相当敏感,当培养基的酸碱度在 5.8+(-)0.03 之间波动时,才能出愈。

4.2 继代培养中的影响因素

披碱草的继代培养是披碱草再生体系建立的一个重要环节,诱导出的愈伤组织生长到一定程度,生长停滞甚至褐化而死去。这说明 2,4-D 及 KT 的激素配比只能诱导出愈伤组织,而愈伤组织的继续生长需要另外的植物生长调节剂。在换成 NAA+KT 组合后,愈伤组织直径明显增大。褐化现象是继代培养中常出现的问题,可能是由于培养基的渗透压引起,尝试用以下几种方法解决:加入硝酸银或坏血酸,降低铵盐浓度,尽量减少培养基水分。结果表明,前一种方法虽然能有效减轻褐化现象,但同时也抑制了愈伤组织在继代过程中的生长。而降低铵盐浓度和减少培养基水分的相结合的方法,则能在有效减轻褐化的同时促进愈伤生长。

许多学者在研究中发现,在培养基中加入蛋白水解物有利于促进胚性愈伤组织的启动。Shetty 等在对一些重要的禾本科植物的研究中发先,脯氨酸和谷氨酰胺有利于组织培养中胚性愈伤组织的发生^[18]。本试验中,水解酪蛋白能明显提高继代愈伤组织的质量,但对分化率没有显著影响(表 3)。

继代时间也是影响愈伤组织分化的一个重要因素。当诱导出愈伤组织后,如果在原来的培养基上继续培养愈伤组织,会由于培养基中营养不足或有毒代谢物的积累,导致愈伤组织停止生长,必须定期(每 12 d)将它们接种到新鲜的培养基上,这样愈伤组织可以长期保持旺盛的生长。

4.3 继代培养时间对分化的影响

分别挑取 20 d,30 d,40 d,50 d,60 d 后的愈伤组织接种于分化培养基,实验表明:继代时间过短或过长都会影响愈伤组织的分化率。培养时间为 50 d 左右的愈伤组织胚性最好,分化率最高,培养时间过短,则愈伤组织不易分化,继代时间过长,愈伤组织则会失去胚性而褐化死亡。

参考文献:

- [1] Olsanti J, Tyers M, Sundarsan V, *et al.* Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cd2 homologue from *Zea mays*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3377.
- [2] Chen Q J. Cauderon Production of embryocallus regenerated hybrids between *Triticum aestivum* and *A. gropyron cristatum* possessing one B chromosome [J]. *Plant Improvement*, 1992(12): 551.
- [3] Gyulai G, Janovazky J, Kiss E, *et al.* Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordium of the intergeneric hybrid *A. gropyron repens* (L.) Beauv. *x* *Bromus inermis* Leyss CV nanus on a modified nutritive medium [J]. *Plant Cell Reports*, 1992(11): 266.
- [4] McDonnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass [J]. *Crop Science*, 1984(24): 573.
- [5] Boyd L A, Dale P J. Callus production and plant regeneration from mature embryo of *Poa pratensis* L. [J]. *Plant Breed*, 1986(97): 246.
- [6] Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J*, 1994, 6: 271.
- [7] Rashid H, Yokoi K, Toriyama K, *et al.* Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 727.
- [8] Ishida Y, Saito H, Ohta S, *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nature Biotechnol*, 1996, 14: 745.
- [9] Cheng M, Fry J E, Pang S, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 97.
- [10] Bettany A J, Dalton S J, Timms E, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(5): 437.
- [11] Batra S, Kumar S. *Agrobacterium*-mediated transient GUS gene expression in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) [J]. *J Appl Genet*, 2003, 44(4): 449.
- [12] Chai M L, Wang B L, Kim J Y, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of herbicide resistance in creeping bentgrass and colonial bentgrass [J]. *J Zhejiang Univ Sci*, 2003, 4(3): 346.
- [13] Akutsu M, Ishizaki T, Sato H. Transformation of the monocotyledonous *Alstroemeria* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(8): 561.
- [14] Nandakumar R, Chen L, Rogers S M. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (*Broadleaf cattail*) [J]. *Cell Rep*, 2005, 23(10-11): 744.
- [15] 文启孝. 土壤有机质研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1984.
- [16] 付凤玲, 李晚枕, 荣廷昭, 等. 提高 N6 培养基钙浓度对玉米幼胚培养的影响 [J]. 西北农业科技大学学报, 2003, 31(1): 81.
- [17] 冯耀华, 张杨珠. 土壤有机磷分级研究进展 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(3): 259.
- [18] Shetty K, Asano Y. The influence of organic nitrogen sources on the induction of embryogenic callus in *Agrostis alba* L [J]. *Plant Physiol*, 1991, (139): 82.

[责任编辑: 白林含]