

杨 冉,黄 萍,祁珊珊,等. 柳枝稷种子组培快繁技术[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):46-48.

柳枝稷种子组培快繁技术

杨 冉¹,黄 萍^{1,2},祁珊珊¹,杨淞惠¹,杜道林¹

(1. 江苏大学环境与安全工程学院,江苏镇江 212013; 2. 江苏大学农业工程研究院,江苏镇江 212013)

摘要:柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)是一种理想的能源作物。以柳枝稷成熟种子为外植体,探索愈伤诱导过程中最佳外源激素配比,从而建立柳枝稷种子组培快繁体系。结果表明,不同浓度配比的激素愈伤诱导率差异较大,以 MS 培养基为基本培养基,添加 6 mg/L 2,4-D、1 mg/L 6-BA、0.6 mg/L NAA 进行诱导,愈伤诱导率可高达 82%。

关键词:柳枝稷;愈伤诱导;植株再生

中图分类号:S943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-0046-03

柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)为多年生草本 C₄ 植物,在北美洲广泛种植^[1]。柳枝稷植株高大,具有根系发达、防风固沙能力强、耐瘠薄等优点,是沙漠绿化的理想植物^[2]。柳枝稷可合成燃料乙醇、甲醇、沼气和氢气等,由于其能源产出率高,在乙醇生产过程中易降解,被美国政府确定为替代玉米生产燃料乙醇的首选能源植物^[3]。保存并快速繁殖优质材料是现代生物育种技术的重要研究内容。Xi 等研究发现,柳枝稷是一种异型杂交的多倍体单子叶植物,具有高度的自交不亲和性^[4]。因此,通过遗传转化获得具有高遗传力的柳枝稷转基因品种变得尤为重要,转基因育种的前提是建立高效的植物组织培养体系。现有的柳枝稷组培研究中,外植体多为叶片、茎尖、节间及幼穗,以这些材料作为外植体,愈伤诱导率普遍较低,且容易受生长周期及季节限制。本研究以柳枝稷成熟种子为材料,探索愈伤诱导过程中最佳外源激素配比,从而建立柳枝稷种子组培快繁体系,旨在为开发利用柳枝稷资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2013-07-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170386、31200316);江苏省科技支撑计划(编号:BE2011369、BE2012419);中国博士后科学基金(编号:2012M520999);江苏大学高级人才基金(编号:09JDG020、11JDG150)。

作者简介:杨 冉(1988—),男,河南信阳人,硕士,主要从事能源植物新品种培育研究。E-mail:Ranyang0804@163.com。

通信作者:杜道林,博士,研究员,主要从事生态学研究。Tel:(0511)88790955;E-mail:ddl@ujs.edu.cn。

柳枝稷品种为 Alamo(北京市农林科学院),用自来水冲洗脱壳后的成熟种子,去掉杂质,用无菌水浸泡 12 h,冲洗后风干,置于 4 ℃冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制 愈伤组织诱导及分化以 MS 为基础培养基,采用 3 因素 3 水平进行试验(表 1),pH 值为 8.0。生根培养基为 1/2MS + NAA (0.4、0.8、1.2、1.6 mg/L) + 3% 蔗糖 + 0.75% 琼脂,pH 值为 8.0。配制完成后,121 ℃高压灭菌 15 min,待温度冷却至 50~60 ℃时摇匀,倒入培养皿中,置于超净台风干备用。

1.2.2 种子处理 挑选干燥饱满的种子,首先用 6% NaClO 溶液消毒 2.5 h,轻轻搅动使 NaClO 与种子充分接触,然后用无菌水清洗 3~5 遍,浸泡 12 h。之后用 6% NaClO 溶液消毒 20 min,用无菌水清洗种子 3~5 遍^[5]。在无菌条件下,将处理好的种子接种到愈伤诱导培养基中进行培养。

1.2.3 培养条件 选择同一批成熟种子作为外植体进行愈伤组织诱导及分化试验,每处理重复 5 次,每个培养皿中接种 30 粒种子,置于光照培养箱中培养。培养 30~45 d 后,选择株高为 2~4 cm 的再生苗,切下幼苗转入生根培养基中,继续置于光照培养箱中培养,每个组培瓶接种 12 个外植体,每浓度重复 4 次,培养 10~15 d。愈伤组织诱导培养基试验因素及水平见表 1。GZX-300BS-4 光照培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)培养温度设置为 24 ℃,光照培养时间为 16 h/d,光照强度为 12 000 lx。

1.2.4 生长指标测定 接种后,每 3 d 统计 1 次胚芽数目、胚根出现时间及数目、愈伤组织出现时间及数目等指标。培养 30~45 d 后,统计种子发芽率及愈伤诱导率,确定最佳愈伤组织诱导培养基激素配比。在诱导培养基上培养一段时间后观察愈伤组织的生长情况,观察并统计分化出的不定芽生

[3] 苏雅拉图. 蓖麻抗生育研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2011,26(3):316-319.

[4] 张红菊,赵怀勇. 蓖麻对盐渍土的改良效果研究[J]. 中国水土保持,2010(7):43-44,66.

[5] 张智勇,陈永胜,倪娜,等. 蓖麻产品在农药中的应用及研究进展[J]. 内蒙古农业科技,2011(6):74-76.

[6] 赵青余,桂荣,那日苏. 蓖麻饼脱毒的研究进展[J]. 饲料工业,2002,23(11):35-39.

[7] 孙媚华,陈迁,宋光泉,等. 蓖麻毒蛋白的研究与应用[J]. 广东化工,2009,36(9):144-145,162.

[8] 温燕梅,冯亚非,郑明珠. 蓖麻不同部位杀虫活性成分蓖麻碱的提取及含量[J]. 农药,2008,47(8):584-585,606.

[9] 曾佑炜,宋光泉,彭永宏,等. 蓖麻毒蛋白的分离纯化和毒理作用研究[J]. 中国农学通报,2004,20(4):23-25,32.

[10] 赵建兴,张树怀,余国珍,等. 蓖麻毒素粗提物杀虫作用的研究[J]. 内蒙古农业大学学报:自然科学版,2001,22(4):78-80.

表 1 愈伤组织诱导培养基试验因素及水平

组合	2,4-D 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)
1	6	0.5	0.2
2	6	1.0	0.6
3	6	1.5	1.2
4	4	0.5	0.6
5	4	1.0	1.2
6	4	1.5	0.2
7	2	0.5	1.2
8	2	1.0	0.2
9	2	1.5	0.6

长情况及数目。愈伤诱导分化培养完成后,接种到生根培养基中继续培养 10~15 d,观察不同浓度 NAA 对再生苗生根的影响,记录生根外植体及根的数目。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对种子萌发时间及萌发率的影响

由表 2 可知,培养 5~7 d 后,大多数种子都能在愈伤组织诱导培养基上萌发,且不同浓度激素对柳枝稷种子的萌发时间及萌发率均有显著影响。当 2,4-D 浓度为 6 mg/L、6-BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.6 mg/L 时,种子接种后 3 d 即开始萌发,萌发率达 82%。当 2,4-D 浓度为

6 mg/L、6-BA 浓度为 1.5 mg/L、NAA 浓度为 1.2 mg/L 时,种子萌发时间延迟,接种后 7 d 才开始萌发,且萌发率仅为 35%。由此可知,柳枝稷种子萌发的最佳培养基为 MS + 2,4-D 6 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.6 mg/L。

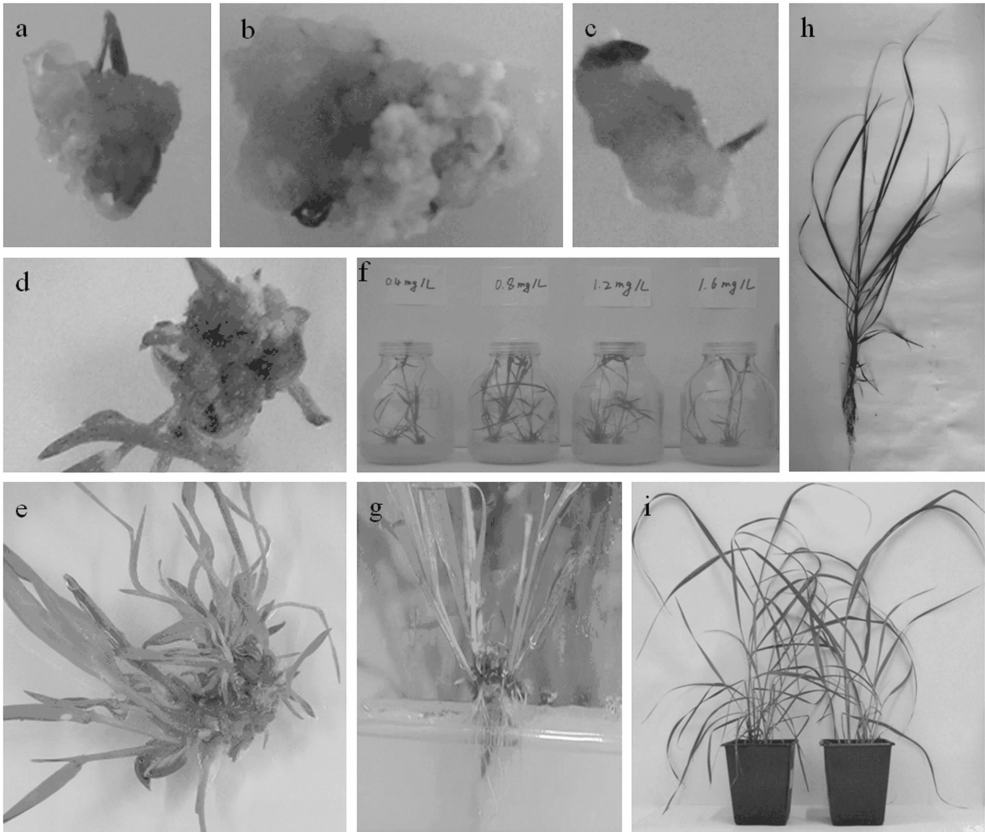
表 2 不同浓度激素对比对芽形成及愈伤组织诱导的影响

组合	萌发时间 (d)	芽形成数 目(个)	愈伤诱导率 (%)	愈伤出现 时间(d)	生长情况
1	4	80	60±6.52	7	+++
2	3	108	82±5.15	9	+++
3	7	28	35±4.18	10	+
4	3	40	47±6.04	11	+
5	3	80	59±5.34	7	++
6	3	64	51±6.40	7	++
7	5	32	43±4.64	12	+
8	3	48	56±6.40	5	++
9	4	76	50±5.70	9	++

注:“+++”表示愈伤组织长势极好,形成的愈伤组织数目、大小均比较理想;“++”表示长势良好;“+”表示长势一般,形成的愈伤组织数目较少,体积较小。

2.2 不同激素配比对愈伤组织诱导及分化培养的影响

经消毒处理的成熟种子培养 5 d 后,部分培养基上开始有愈伤组织形成,随后逐渐变大,并且随着愈伤组织的增大其表面逐渐变得干燥,质地紧密结实,颜色多为黄色、嫩绿色(图 1-a)。当 2,4-D 浓度为 2 mg/L、6-BA 浓度为



a—诱导形成的愈伤组织; b—MS+6 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA+0.6 mg/L NAA培养基中形成的愈伤组织; c—MS+6 mg/L 2,4-D+1.5mg/L 6-BA+1.2 mg/L NAA培养基中形成的愈伤组织; d—初步形成的分化组织; e—分化培养基上培养一段时间后的分化组织; f—不同浓度NAA对生根的影响; g—生根培养基上形成的根; h、i—炼苗移栽

图1 柳枝稷种子组织培养

0.5 mg/L、NAA 浓度为 1.2 mg/L 时,形成愈伤组织所需的时间最长,即培养 12 d 后才能观察到愈伤组织的形成。不同激素配比下,外植体愈伤组织的长势也有显著差别(图 1-b)。在愈伤诱导培养基上培养 25 d 后,不同激素配比处理下愈伤组织在色泽、大小等指标方面差异较大,愈伤诱导率最高可达 82%,最低仅为 35%(表 2)。一部分愈伤组织色泽淡黄,体积较小且表面干燥疏松;另一部分愈伤组织色泽嫩绿,体积较大且表面紧实,具有较强的再分化能力,可用于诱导成苗。这些生长状态良好的愈伤组织培养一段时间后体积逐渐增大,且伴随出现一些白色颗粒状胚状体。继续培养 10 d 后,有些原本白色的胚状体凸起,分化为嫩绿色的幼芽(图 1-c)。随着培养时间的延长,新形成的幼芽逐渐变绿,并且直立生长,有的幼芽长势较快,接种到培养基上 15 d 后可长至 2~3 cm。体积较小的愈伤组织接种一段时间后,分化出一些零星的幼芽,随后幼芽停止生长。将切割后的分化组织接种到新培养基上培养 20 d,有的芽能长出长约 4~6 cm 的新叶,并从嫩绿色变成翠绿色(图 1-d)。愈伤组织诱导及分化的最佳培养基为 MS + 6 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 0.75% 琼脂,pH 值为 8.0。

2.3 不同浓度 NAA 对不定芽生根的影响

在愈伤组织诱导及分化的最佳培养基上培养 40 d 后,愈伤组织开始分化出大小不一的不定芽。选择长势较一致的不定芽切割后接种到含有不同浓度 NAA 的生根培养基上进行生根诱导(图 1-e)。结果表明,当 NAA 浓度为 0.8 mg/L 时,生根时间最短,7 d 后即可观察到白色凸起并逐渐形成新根,生根率可达 90% 以上(表 3),每棵再生苗均能诱导出 15~20 条新生根(图 1-f)。当 NAA 浓度过低(0.4 mg/L)或者过高(1.6 mg/L)时,新根都会延迟出现。在生根的同时,新生苗新叶长势良好(图 1-g),平均长约 10 cm,部分甚至高达 20 cm(图 1-g)。

表 3 不同浓度 NAA 对不定芽生根率及生根数目的影响

NAA (mg/L)	外植体数目 (个)	生根数 (条)	生根率 (%)
0.4	48	32	66.6 ± 3.40
0.8	48	45	93.7 ± 5.89
1.2	48	34	70.8 ± 5.37
1.6	48	27	56.2 ± 3.89

2.4 炼苗

当大部分新生苗长出数量不一的新根后,将组培瓶上的封口膜去掉,继续在培养箱中培养 2~3 d,随后将培养基取出置于室温下培养,并在培养基表面加入少许无菌水,继续培养 3 d 后,将新苗从培养基中轻轻取出,避免损伤根部。用无菌水将幼苗表面的培养基冲洗干净,移栽至花盆中继续培养,用塑料薄膜覆盖以防止水分大量流失。每天用无菌水浇洒新苗,待新苗长势稳定后,将花盆搬至室外继续培养炼苗(图 1-h)。当培养条件适合时,大部分幼苗都能正常存活,并且稳定生长(图 1-i)。

3 结论

Gupta 等研究发现,2,4-D、TDZ 结合使用对柳枝稷愈伤组织的形成起促进作用^[6]。Denchev 等认为,添加不同浓度

的 2,4-D 及 6-BA 对柳枝稷的愈伤诱导、分化再生有明显影响^[7]。传统的柳枝稷组培步骤较繁琐,包括愈伤诱导、继代、分化及生根等环节,耗时较长,且产率较低。许文志等利用柳枝稷成熟种子作为外植体进行愈伤组织的诱导及分化,研究灭菌处理及不同浓度激素组合对愈伤组织诱导及分化的影响,包括愈伤组织诱导、分化、生根等环节,耗时较长^[8]。在愈伤诱导过程中,添加一定浓度的 6-BA 可改变愈伤组织的质量,提高植物分化再生频率^[9]。有研究表明,2,4-D 对愈伤组织形成有比较明显的促进作用,很少被植物细胞所代谢^[10],且不同浓度的 2,4-D 与其他一些细胞分裂素结合,可以建立高效组培体系^[11]。NAA 是广谱型植物生长调节剂,能促进细胞分裂和扩大,诱导分化组织形成不定根^[12]。本研究表明,不同浓度配比的激素愈伤诱导率差异较大,以 MS 培养基为基本培养基,添加 6 mg/L 2,4-D、1 mg/L 6-BA、0.6 mg/L NAA 进行愈伤组织诱导,愈伤诱导率可高达 82%。愈伤组织诱导增殖后,在最佳激素配比培养基上可直接进行分化培养,能进一步分化出大量新生芽。本方法有效缩短了再生时间,节约了试验成本,提高了效率。室内炼苗 7 d 后,将柳枝稷新生苗移至室外培养,可正常存活。

参考文献:

[1] 王勇锋,柴乖强,徐开杰,等. 柳枝稷成熟胚愈伤组织诱导的影响因素[J]. 西北农业学报,2012,21(6):140-145.

[2] 孟 敏,李华军,徐开杰,等. 柳枝稷的组织培养技术研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(4):1477-1478.

[3] 刘吉利,朱万斌,谢光辉,等. 能源作物柳枝稷研究进展[J]. 草业学报,2009,18(3):232-240.

[4] Xi Y J, Fu C X, Ge Y X, et al. *Agrobacterium* - mediated transformation of switchgrass and inheritance of the transgenes[J]. Bioenergy Research, 2009, 2(4): 275-283.

[5] Li R Y, Qu R D. High throughput *Agrobacterium* - mediated switchgrass transformation [J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35 (3): 1046-1054.

[6] Gupta S D, Conger B V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of switchgrass[J]. Crop Science, 1999, 39(1):243-247.

[7] Denchev P D, Conger B V. *In vitro* culture of switchgrass; influence of 2,4-D and picloram in combination with benzyladenine on callus initiation and regeneration[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Cult, 1995, 40(1):43-48.

[8] 许文志,张新全,黄琳凯,等. 柳枝稷种子愈伤组织诱导及分化[J]. 草业科学,2012,29(1):45-50.

[9] 李会珍,刘培培,张志军,等. 紫苏子叶组织培养植株再生的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(22):13369-13371.

[10] Arnold S V, Sabala I, Bozhkow P, et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2002, 69(3):233-249.

[11] Gupta S D, Conger B V. *In vitro* differentiation of multiple shoot clumps from intact seedlings of switchgrass[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant, 1998, 34(3):196-202.

[12] Ramamoorthy R, Kumar P P. A simplified protocol for genetic transformation of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(10):1923-1931.