

黄 静,张超腾,郑 燕. 应用正交测验法优选巨菌草诱导培养基[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):74-76.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.020

应用正交测验法优选巨菌草诱导培养基

黄 静,张超腾,郑 燕

(国家菌草工程技术研究中心/福建农林大学生命科学学院,福建福州 350002)

摘要:以巨菌草幼茎作为试验材料,研究不同浓度的防褐化物质对巨菌草组织培养褐化的影响,应用正交测验法研究生长激素 2,4-D、KT、IAA 不同的浓度对巨菌草愈伤组织诱导的影响。结果表明:最佳防褐化物质是 1.0 mg/L PVP;2,4-D 对巨菌草幼茎愈伤组织诱导的影响最小,KT 居于二者之间,没有达到显著水平,而 IAA 影响最大,达到了显著水平($P < 0.05$);巨菌草诱导愈伤组织的最佳培养基配方是 MS + 2,4-D 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + KT 1.0 mg/L。

关键词:巨菌草;防褐化;正交测验法;愈伤组织;培养基;激素

中图分类号:S646.904 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0074-03

巨菌草(*Pennisetum* sp.)属于单子叶植物禾本科狼尾草属,是一种适宜在热带、亚热带和温带生长的高产优质菌草。其抗逆性强,根系发达,为直立丛生的多年生植物,植株高大,一般为 3~5 m,有的也可达到 6~8 m^[1-2]。巨菌草是典型的 C₄ 植物,光合效率很高,是其他阔叶树的 4~7.46 倍,年产鲜草达 200~400 t/hm²^[3]。巨菌草原产于南非,1983 年引入我

国,并由于其巨大的经济价值得到了广泛推广。

巨菌草是一种高产优质的菌草,抗逆性极强,一般不会有病虫害发生,管理简单,利用期长,生长速度快,粗蛋白含量很高,营养价值丰富^[3],可作为生产饲料和保持水土、绿化环境的优良草种^[4],也被用作香菇、灵芝、平菇、猴头菇等的栽培培养料^[5]。此外,巨菌草还是能源草的典型草种,可用于生产乙醇等生物燃料。巨菌草种植简单,既可以进行有性繁殖,也可以进行无性繁殖。无性繁殖一般用腋芽进行,有性繁殖用种子,但是发芽率一般都很低^[4]。目前,巨菌草在我国南方的种植范围越来越广,由于不耐寒,在北方寒冷的冬季无法自然越冬,使得在北方的推广受到严重限制^[6]。

长期以来,巨菌草品种选育方面基本是依靠常规育种的方法,因而无法快速解决巨菌草耐寒性、品质及产量改良等问题。植物基因工程技术是解决品种改良的一种高效手段,而

收稿日期:2014-09-06

基金项目:国家菌草工程技术研究中心开放基金(编号:JCJJ13003)。
作者简介:黄 静(1988—),女,山东泗水人,硕士研究生,研究方向为草业育种学。Tel:(0591)83789338;E-mail:hj880866@126.com。

通信作者:郑 燕,博士,副教授,从事草业育种学研究。Tel:(0591)83789338;E-mail:swallow1318@126.com。

- [2] Liesch J M, Sweeley C C, Staffeld G D, et al. Structure of hc-toxin, a cyclic tetrapeptide from helminthosporium-carbonum [J]. Tetrahedron, 1982, 38(1): 45-48.
- [3] Horbach R, Navarro-Quesada A R, Knogge W, et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(1): 51-62.
- [4] Yamane H, Konno K, Sabelis M, et al. Chemical defence and toxins of plants [J]. Chemical Ecology, 2010, 4: 339-385.
- [5] Stachelhaus T, Hüser A, Marahiel M A. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases [J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 913-921.
- [6] Turgeon B G, Oide S, Bushley K. Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants [J]. Mycological Research, 2008, 112(2): 200-206.
- [7] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb viewer: an environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [8] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.

- [9] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [10] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 343-350.
- [11] 张广辉,李翠婷,王建军,等. 灯盏花黄酮合成酶II基因克隆及其生物信息学分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2231-2236.
- [12] Gao J, Cheng A C, Wang M. Bioinformatics analysis of the complete nucleotide sequence of the duck enteritis virus (DEV) US2 gene [J]. Management and Control, 2012(2): 484-487.
- [13] 周建红,艾观华,方慧生,等. 蛋白质结构从头预测方法研究进展[J]. 生物信息学, 2011, 9(1): 1-5.
- [14] Gao Q, Jin K, Ying S H, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum* [J]. Plos Genetics, 2011, 7(1): 1-18.
- [15] Nadine M, Christian H. Fungal phytotoxins as mediators of virulence [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(4): 390-398.
- [16] Jones M J, Dunkle L D. Factors regulating the synthesis of a cyclic peptide pathotoxin produced by *Cochliobolus carbonum* [J]. Mycological Research, 1998, 102(11): 1381-1386.

完整的巨菌草组织培养体系是对其进行基因工程遗传改良的前提和技术保障。目前国内尚未见巨菌草组织培养体系构建的报道。本研究拟参考其他禾本科植物如甘蔗、杂交狼尾草、绒毛狼尾草等的组织培养方法,优选巨菌草诱导培养基,为巨菌草品种改良提供试验依据,也为其更大范围的应用和推广提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为巨菌草幼茎,由福建农林大学国家菌草工程技术研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的准备及消毒 选取幼嫩并且生长良好的巨菌草茎秆,用 75% 乙醇逐层擦拭较老的叶鞘表面并剥除直至所需要材料的前 2 层,用刀切下茎尖部分,然后置于 2% 次氯酸钠中消毒 10 min,用无菌水冲洗 3 ~ 5 次,在无菌滤纸上吸干水分^[7]。

1.2.2 防止褐化 为了防止外植体的褐变,采用组织培养中常用的活性炭(activated carbon,AC)和聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone,PVP)2 种防褐化物质,在相同培养基下添加不同浓度的 2 种物质,观察对巨菌草出愈率的影响^[8]。所用培养基组合如表 1 所示。

表 1 2 种防褐化物质浓度设计

处理编号	防褐化物质	浓度(mg/L)
I 1	AC	0.1
I 2	AC	0.2
I 3	AC	0.3
I 4	PVP	0.5
I 5	PVP	1.0
I 6	PVP	1.5

注:基本培养基均为 MS + 2,4 - D 3.0 mg/L。

用手术刀把茎尖分生组织部分切成 0.1 ~ 0.2 cm 厚的小薄片,接种于表 1 中培养基上,每瓶接种 6 块外植体,3 次重复。然后置于 26 ~ 28 ℃ 的暗培养箱中培养^[9-10],10 d 后比较出愈情况,运用 Excel 和统计分析软件 DPS 进行统计分析。

1.2.3 正交测验法筛选最佳诱导培养基配方 采用 $L_9(3^3)$ 正交设计,使用的正交表如表 2 所示^[8],设置 3 个影响因子,分别为 2,4 - D、KT 和 IAA。基本培养基为 MS,3 种激素 2,4 - D、KT 和 IAA 各设 3 个浓度水平,2,4 - D 浓度为 1.0、2.0、3.0 mg/L;KT 浓度为 0.5、1.0、1.5 mg/L;IAA 浓度为 0.1、0.2、0.3 mg/L^[7,9,11-12]。共 9 个处理,每个处理接种 3 瓶,每瓶 5 块外植体,3 次生物学重复(时间重复),统计愈伤率,运用 Excel 和 DPS 进行方差分析和差异显著性测验,确定最佳激素组合。

2 结果与分析

2.1 不同防褐化物质对愈伤组织诱导的影响

从表 3 可看出,在相同培养基 MS + 2,4 - D 3.0 mg/L 下,采用不同浓度的防褐化物质 AC 与 PVP 对巨菌草幼茎愈伤组织诱导的效率明显不同。用 AC 作为防褐化物质时,不同浓度下出愈率虽然有变化,但差异不显著;用 PVP 作为防

表 2 巨菌草诱导培养基筛选 $L_9(3^3)$ 正交试验设计

处理编号	2,4 - D	KT	IAA
Ⅱ 1	1	1	1
Ⅱ 2	1	2	2
Ⅱ 3	1	3	3
Ⅱ 4	2	2	1
Ⅱ 5	2	3	2
Ⅱ 6	2	1	3
Ⅱ 7	3	3	1
Ⅱ 8	3	1	2
Ⅱ 9	3	2	3

褐化物质时,在 5% 显著水平下,1.0 mg/L PVP 比 1.5 mg/L PVP 对出愈率的提高有明显的效果,但未达到极显著差异($P < 0.01$)。

2 种不同防褐化物质 AC 与 PVP 相比,采用 PVP 比 AC 产生的出愈率明显更高(表 3)。从图 1 可以看出,巨菌草幼茎在接种 10 d 后,培养基加入 PVP 的外植体已经长出一点愈伤组织,而培养基加入 AC 的外植体还没有长出愈伤组织。特别是采用浓度为 1.0 mg/L 的 PVP 产生的出愈率最高,故本研究都采用此浓度。

表 3 不同防褐化物质对愈伤组织诱导的影响

处理编号	防褐化物质	浓度(mg/L)	出愈率(%)	$P_{0.05}$	$P_{0.01}$
I 1	AC	0.1	2.96	c	B
I 2	AC	0.2	1.85	c	B
I 3	AC	0.3	4.81	c	B
I 4	PVP	0.5	58.52	ab	A
I 5	PVP	1.0	76.30	a	A
I 6	PVP	1.5	55.93	b	A

注:基本培养基均为 MS + 2,4 - D 3.0 mg/L。



图 1 接种 10 d 后加入 AC(左)与 PVP(右)的巨菌草愈伤组织

2.2 正交测验法筛选最佳诱导培养基配方

生长素和细胞分裂素对植物生长影响很大,其浓度大小是组织培养研究的关键环节,本研究以 2,4 - D、KT 和 IAA 作为巨菌草外植体诱导愈伤组织的主要激素,并运用正交测验法研究了三者不同浓度的组合对外植体诱导愈伤组织的影响^[10-11]。

以上述各处理的 3 次重复数据平均值为结果数据(表 4),运用 Excel 和 DPS 进行数据的显著性测验和分析。从方差分析结果(表 5)可以看出,IAA 对巨菌草幼茎愈伤组织诱导率的影响最大,达到显著水平($P < 0.05$),2,4 - D 的影响最小,各因素的影响显著性依次为 IAA > KT > 2,4 - D。从单因素的水平上来看,2,4 - D 的浓度差异对愈伤组织的诱导影响不明显;而 IAA 的浓度水平使愈伤组织的诱导率差异达到显著水平,其中 IAA 的浓度为 0.2 mg/L 时的诱导率最高;不同浓度的 KT 对愈伤组织的诱导率差异不显著。

表 4 正交试验设计巨菌草愈伤组织诱导结果

处理编号	2,4-D (mg/L)	IAA (mg/L)	KT (mg/L)	出愈率 (%)	$P_{0.05}$	$P_{0.01}$
Ⅱ1	1.0	0.1	0.5	14.81	cd	BCD
Ⅱ2	1.0	0.2	1.0	70.37	a	A
Ⅱ3	1.0	0.3	1.5	11.11	d	CD
Ⅱ4	2.0	0.2	0.5	31.48	b	B
Ⅱ5	2.0	0.3	1.0	27.78	bc	BC
Ⅱ6	2.0	0.1	1.5	27.78	bc	BC
Ⅱ7	3.0	0.3	0.5	7.41	d	D
Ⅱ8	3.0	0.1	1.0	18.52	bcd	BCD
Ⅱ9	3.0	0.2	1.5	18.52	bcd	BCD

注:基本培养基均为 MS。

表 5 正交试验结果的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
区组	0.014 4	2	0.007 2	
2,4-D	0.152 9	2	0.076 5	11.894 2
IAA	0.307 3	2	0.153 6	23.898 2 *
KT	0.249 6	2	0.124 8	19.414 5
误差	0.102 9	16	0.006 4	
总和	0.958 8			

3 讨论与结论

褐化是植物组织培养中经常碰到的问题,本试验在未加入防褐化物质前,也发现了大量的褐化现象,这严重影响了愈伤组织的诱导。吸附剂活性炭(AC)和抗氧化剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是高效的防褐化物质^[13]。前人研究表明,在甘蔗茎尖诱导培养基中加入 0.02% AC 或者加入适量的 PVP 均能够达到理想的防止褐化效果^[14]。在甘蔗培养基中加入 0.03 g/L AC 和 1.5 mg/L PVP 能有效防止褐化^[9]。在本试验巨菌草的防褐化研究中,AC 和 PVP 也均能起到防止褐化的作用,但是 AC 与 PVP 相比,采用 PVP 比采用 AC 产生的出愈率明显更高,因此 PVP 比 AC 的防褐化效果更好。在 5% 显著水平下,1.0 mg/LPVP 比 0.5 mg/LPVP 对出愈率的提高有明显的效果,虽没达到显著差异,但是从实际效果来看,本试验最终选择浓度为 1.0 mg/L 的 PVP 作为防褐化物质。

在应用正交测验法筛选最佳诱导培养基的试验中,采用了 2,4-D、KT 和 NAA 的组合进行研究。前人的很多研究结果表明,2,4-D 是诱导愈伤组织的必需激素,没有 2,4-D 就不可能有愈伤组织出现,而且其用量在不同的植物种类中具有一定的差异^[19,15-16]。张晓莹等对紫穗狼尾草愈伤组织诱导的条件也进行了正交试验和方差分析,结果表明,在不同的激素组合中,2,4-D 起了决定性的作用,而 KT 浓度在 0.5~1.0 mg/L 对愈伤组织诱导具有促进作用^[11]。张艺等认为若仅仅使用一种植物生长调节剂如 2,4-D,则形成的愈伤组织胚性不高,难于进行下一步的分化试验^[17]。本研究结果表明 2,4-D 的浓度差异对愈伤组织的诱导影响最小,KT 居于二者之间且不同浓度的 KT 对愈伤组织的诱导率差异不显著,而 IAA 浓度对巨菌草幼茎愈伤组织的诱导影响最大,当其浓度为 0.2 mg/L 时诱导率最高,达到了显著水平($P<0.05$)。而 2,4-D 是愈伤组织诱导的关键激素,所以诱导培养基中

必须加入 2,4-D。因此,本试验最终采用的巨菌草幼茎诱导愈伤组织的培养基配方是 MS+2,4-D 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L,在此条件下得到的巨菌草愈伤组织见图 2。



图2 巨菌草幼茎愈伤组织

参考文献:

[1]丁 铭,白 璐,王龙清. 巨菌草引进试验及栽培种植技术[J]. 农村科技,2013(12):60-61.

[2]林占煊. 菌草学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2009:2-45.

[3]林兴生,林占煊,林冬梅,等. 荒坡地种植巨菌草对土壤微生物群落功能多样性及土壤肥力的影响[J]. 生态学报,2014,34(15):4304-4312

[4]李志文. 巨菌草作为能源草的特性研究[J]. 农业工程技术·新能源产业,2013(6):12-15.

[5]董晓娜,陈喜蓉,钟剑锋,等. 巨菌草栽培灵芝试验初探[J]. 林业科技,2013,41(1):39-40.

[6]王宝全,左福元,曾子健,等. 杂交狼尾草茎秆无性繁殖技术研究[J]. 四川畜牧兽医,2002,29(1):23-24.

[7]谢 好,张 子. 杂交狼尾草离体培养植株再生体系的建立[J]. 宜春学院学报,2012,34(12):97-99.

[8]曹攸义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002.

[9]杨燕妮. 甘蔗离体培养的胚性细胞团的诱导与分化研究[D]. 南宁:广西大学,2011.

[10]Morrish E M, Hanna W W, Vasil I K. The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryogenic cultures of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (pearl millet)[J]. Theor Appl Genet.,1990,80:409-416.

[11]张晓莹,张瀚俚,牟 彤,等. 外源激素对紫穗狼尾草愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 草业科学,2012,29(7):1066-1071.

[12]Mythili P K,Satyavathi V,Pavankumar G,et al. Genetic analysis of short term callus culture and morphogenesis in pearl millet, *Pennisetum glaucum*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1997,50(3):171-178.

[13]郭 艳,杨海玲. 植物组织培养中的褐化现象及解决途径[J]. 山西农业科学,2009,37(7):14-16.

[14]黄诚梅,李杨瑞,叶燕萍. 甘蔗茎尖培养中减轻酚害[J]. 植物生理学通讯,2004,40(1):39-41.

[15]王 慧,许 瑾,周小梅,等. 几种草坪草组织培养和植株再生的研究[J]. 山西大学学报:自然科学版,2009,32(3):463-467.

[16]王凭青,段传人,王伯初,等. 杂交狼尾草不同外植体材料组织培养实验[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2005,28(6):118-120.

[17]张 艺,李达旭,张 杰,等. 披碱草组织培养体系的建立[J]. 四川大学学报:自然科学版,2008,45(1):205-208.