

鲍荣静,梁 栋,梁慧敏. 剪股颖不同外植体高频植株再生的研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):91-94.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.019

剪股颖不同外植体高频植株再生的研究

鲍荣静,梁 栋,梁慧敏

(江苏农林职业技术学院/江苏省农业种质资源保护与利用平台,江苏句容 212400)

摘要:以剪股颖品种高地的吸涨种子、胚芽生长点和胚根生长点为主进行不同外植体高频植株再生的研究,结果表明,不论是愈伤组织的诱导还是胚性愈伤组织的形成以及丛生芽的分化,均以胚芽生长点为最高,其次是吸涨种子,胚根生长点最低;高浓度的 2,4-D 有利于愈伤组织的诱导;但适时调整激素配比及继代时间对形成胚性愈伤组织及丛生芽的分化更关键有效。试验分析得出高频胚性愈伤组织形成的激素配比为 2.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,高频丛生芽分化的激素配比为 2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。

关键词:剪股颖;外植体;愈伤组织诱导;胚性愈伤组织形成;丛生芽分化

中图分类号:S688.404. +3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)20-0091-04

剪股颖(*Agrostis stolonifera*)是一种多年生冷季型草坪草,耐低修剪、匍匐生长力强、叶片细密成坪速度快,易形成观赏性高的草坪,在世界各地被广泛种植,也是我国北方地区高档草坪及高尔夫果岭等运动场建植的常用草种^[1]。我国目前所用的多种剪股颖草种均由国外引进,由于生长环境差异大,这些草种在我国很多地区表现不尽如人意,尤其是在华东及其以南高温高湿的地区常常表现耐热性、抗病虫害能力弱、耐磨性低等,使得草坪质量在使用过程中很快变差,养护管理成本加大,易出现斑秃、绿期缩短等问题。因此,利用现代细胞生物工程技术进行剪股颖品种改良将是一条快捷有效的途径。而建立剪股颖合适的外植体高频组培再生体系是进行品种遗传改良的重要前提。

本研究以剪股颖品种高地为主,选其 3 种外植体,以在 MS 基本培养基中添加不同浓度激素的配方设计为处理,并进行相应培养条件的调控,诱导 3 种外植体形成愈伤组织和胚性愈伤组织,进而分化出丛生芽及完成种苗壮苗生根培养等过程,摸索出剪股颖高频组培再生植株合适的外植体、适宜

的激素配比或配方、不同生长发育阶段合适的培养条件等,为剪股颖进一步的品种改良打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的剪股颖品种为高地(Highland),种子由北京克劳沃草业中心提供。

1.2 方法

1.2.1 试验时间和地点 试验从 2016 年 3 月至 2018 年 3 月在江苏农林职业技术学院农学院园艺学院组培实验室进行。

1.2.2 材料消毒与处理 将上述剪股颖成熟种子先用洗涤剂浸泡 10 min,再用流水冲洗 5~10 min,之后用 2% NaClO 溶液搅拌消毒 10 min,放入 75% 乙醇浸泡 40 s,取出用 0.1% HgCl₂ 搅拌消毒 5~8 min,用灭菌水冲洗 6~8 遍,然后再放入灭菌温水(35~40 ℃)浸泡,直至种子吸涨种皮变软后,用无菌滤纸吸干水分,即可用于接种。

1.2.3 不同外植体的获得与初始培养 通过下述方法可获得 3 种外植体用于初始培养。吸涨种子(A):取一部分种皮变软的吸涨种子直接接种到诱导培养基上;带生长点胚芽(B):将吸涨种子先接种到只含琼脂的空白培养基上,待种子长出胚芽后,切取 0.5~1.5 cm 大小的具有生长点的胚芽作为外植体接种到诱导培养基上;带生长点胚根(C):将吸涨种子先接种到只含琼脂的空白培养基上,待种子长出胚根后,切取 0.5~1.0 cm 大小的带有生长点的胚根作为外植体接种到诱导培养基上。

1.2.4 愈伤组织的诱导及继代胚性愈伤组织形成的培养

收稿日期:2018-06-19

基金项目:江苏农林职业技术学院重点科技创新类项目(编号:2017kj09)。

作者简介:鲍荣静(1962—),男,江苏镇江人,高级工程师,主要从事园林园艺植物栽培研究。E-mail:1204725417@qq.com。

通信作者:梁慧敏,博士,教授,主要从事园林及草坪植物生物育种研究。E-mail:278151187@qq.com。

[16]于一帆,朱小彬,葛会敏,等. 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):58-61.

[17]邢国芳,杜伟建,张雁明,等. 玉米昼夜节律钟基因 *CCA1* 的克隆及表达分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2011,31(4):332-337.

[18]邢国芳,宋 萌,姚 涵,等. 大麦(*Hordeum vulgare*)昼夜节律钟基因 *CCA1* 的克隆及表达分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2012,32(3):207-212.

[19]刘无双,杜明会,陶维康,等. 杨树生物钟节律基因 *PtCCA1* 的克

隆及表达模式研究[J]. 林业科学研究,2013,26(5):649-654.

[20]Portolés S, Más P. The functional interplay between protein kinase CK2 and *CCA1* transcriptional activity is essential for clock temperature compensation in *Arabidopsis*[J]. PLoS Genetics,2010,6(11):e1001201.

[21]周道云,肖 栋,申浩冉,等. 白菜类作物开花时间相关基因 *BraA.FLM.a* 的 CAPS 标记开发与利用[J]. 南京农业大学学报,2017,40(6):971-976.

接种外植体的诱导培养基及继代培养基以 MS 培养基为基本培养基,其中又添加了不同生长素与细胞分裂素等激素调配成不同浓度组成的配方;每个培养瓶接种 10 个外植体,每个配方接种 30 瓶,放置在(25±3)℃培养架上暗培养 25~30 d 后,统计愈伤组织诱导率;中间继代 1 次,即 50~60 d 后,统计胚性愈伤组织的形成率。

1.2.5 丛生芽的分化培养 将继代培养 50~60 d 的愈伤组织,转接到设计好的添加不同浓度激素的以 MS 培养基为基本培养基的分化培养基上,每个处理每瓶接种 6 个愈伤组织,每个配方接种 20 瓶,进行分化培养。培养条件:白天 22~25℃,夜晚 18~20℃,光照时间 16 h/d,光照度 1 500~2 000 lx;50~60 d 后,统计丛生芽分化率。

1.2.6 壮苗生根培养 将分化的丛生芽转接到设计好的添加不同浓度生长素的以 MS 培养基或 1/2 MS 培养基为基本培养基的生根培养基上,每个处理每瓶接种 6 个丛生芽,每个配方接种 20 瓶,同样放置在白天 22~25℃,夜晚 18~20℃,光照时间 16 h/d,光照度 2 000~2 500 lx,进行壮苗生根培养,20~25 d 后,观察再生植株的生长情况并统计根的诱导率。

1.3 数据处理与指标计算公式

采用 Excel 2007 进行计算与制表,各项指标的计算公式如下:

愈伤组织诱导率 = 形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 × 100%;

胚性愈伤组织形成率 = 胚性愈伤组织数/接种的愈伤组织数 × 100%;

丛生芽分化率 = 形成丛生芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数 × 100%;

生根率 = 生根的丛生芽数/接种的丛生芽数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对不同外植体愈伤组织诱导及胚性愈伤组织形成的影响

2.1.1 不同激素浓度配方对不同外植体愈伤组织诱导的影响 在愈伤组织诱导培养基上,通过加入不同浓度的 2,4-D、6-BA 和 NAA,设置 6 个配方处理,处理时间为 30 d,研究其对剪股颖的不同外植体的愈伤组织诱导的影响。从表 1 可以看出,3 种外植体经过 6 个配方处理 30 d 后,均能诱导出愈伤组织,证明诱导愈伤组织的成败关键主要不是试验材料,而是培养条件,尤其是激素成分配比很重要^[2];但出愈率高低快慢是和取材的外植体部位有关系的。本试验结果表明,3 种外植体在同一配方条件下出愈率差异显著($P<0.05$),其中以胚芽生长点为最高,6 个配方处理均高于吸涨种子和胚根生长点;其次是吸涨种子,胚根生长点最低,说明胚芽生长点细胞在离体状态下对培养条件特别是激素很敏感,可快速进入脱分化状态,成为迅速增殖的愈伤组织。试验所设置的 6 个配方之间出愈率差异也较大,总体趋势:随着 2,4-D 质量浓度的升高,出愈率增加,当 2,4-D 质量浓度为 3.0 mg/L (配方 4)时,3 种外植体出愈率均高于其他配方,达到最大;随着 2,4-D 质量浓度的降低,3 种外植体出愈率均下降,综合顺序表现为配方 4>配方 6>配方 3>配方 5>配方 2>配方 1;其中配方 1 中无 2,4-D,但添加较高浓度的 NAA,说明生长素对愈伤组织的诱导起关键作用,但 2,4-D 对提高出愈率更有利^[3]。

表 1 不同激素浓度配方处理对不同外植体愈伤组织诱导的影响

配方	激素及浓度(mg/L)			出愈率(%)		
	2,4-D	6-BA	NAA	吸涨种子	胚芽生长点	胚根生长点
1	0	0.1	2.0	23.1b	31.5a	13.2c
2	1.0	0.1	2.0	50.4b	60.7a	33.2c
3	2.0	0.1	0	59.6b	79.6a	40.8c
4	3.0	0.1	0	67.5b	92.5a	44.7c
5	1.0	0.1	0.5	54.8b	76.8a	40.4c
6	2.0	0.1	0.5	63.6b	89.6a	43.2c

注:表中同行不同小写字母表示不同外植体间差异显著($P<0.05$)。表 2、表 3 同。

2.1.2 不同激素浓度配方处理对不同外植体胚性愈伤组织形成的影响 3 种外植体在 6 个配方处理下生长 58~60 d (中间继代 1 次)后,统计胚性愈伤组织形成率。由表 2 可见,胚芽生长点经过 6 个配方 60 d 左右处理后,除配方 1 外其他 5 个配方胚性愈伤组织形成率明显高于吸涨种子和胚根生长点;吸涨种子稍差,胚根生长点最差;说明胚芽生长点不论是作为愈伤组织诱导还是胚性愈伤组织形成都是最好的外植体。从 6 个配方处理来看,配方 1 处理胚性愈伤组织形成率很低甚至没有,说明 2,4-D 是剪股颖外植体形成胚性愈伤组织的关键因子;配方处理 6 胚性愈伤组织形成率最高,其他配方依次下降,顺序为配方 5>配方 4>配方 2>配方 3。

结合表 1 与表 2 结果发现,6 个配方处理愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织形成率并不一致,愈伤组织诱导率受 2,4-D 浓度的影响较大,而胚性愈伤组织形成率主要是培养

基中不同种类激素之间的相互作用的综合表现^[2]。

2.1.3 继代培养时间对胚性愈伤组织形成的影响 脱分化的细胞在形态发生上具有较大的可塑性^[2],3 种外植体培养 28~30 d 继代 1 次,接种到新鲜的原培养基培养 50~60 d 时,所有成熟细胞逐渐脱分化转变为由各种类型的细胞组成的愈伤组织,随着继代次数的增加及培养时间的延长,3 种外植体不管是放在哪个配方下愈伤组织的分化能力都是逐渐下降甚至消失的(图 1、图 2、图 3 和图 4);同时观察到,经过长时间继代的愈伤组织易产生毛状物,褐变率也有明显的上升。

导致愈伤组织分化能力下降的原因主要是愈伤组织的类型有差异,主要分为 3 类:第 1 类生长迅速,初期愈伤组织乳白色,但后期易发褐并产生纤细根毛,这种愈伤较难分化出芽;第 2 类愈伤组织生长较快,呈淡乳黄色,黏性较大,触碰能

表 2 不同激素浓度配方处理对不同外植体胚性愈伤组织形成的影响

配方	激素及浓度 (mg/L)			胚性愈伤组织形成率 (%)		
	2,4-D	6-BA	NAA	吸涨种子	胚芽生长点	胚根生长点
1	0.0	0.1	2.0	0.3	0.5	0.0
2	1.0	0.1	2.0	18.2b	33.8a	3.2c
3	2.0	0.1	0.0	15.5b	31.3a	4.8c
4	3.0	0.1	0.0	22.6b	37.7a	9.5c
5	1.0	0.1	0.5	44.9b	64.9a	20.6c
6	2.0	0.1	0.5	58.6b	79.2a	27.8c

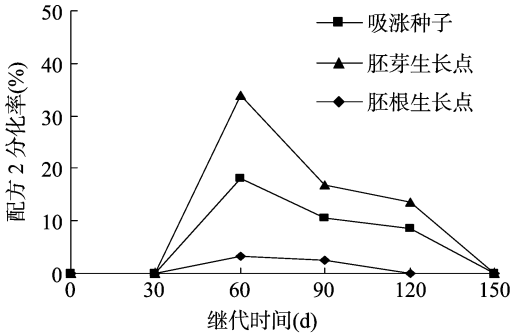


图1 配方 2 下 3 种外植体愈伤组织分化能力的比较

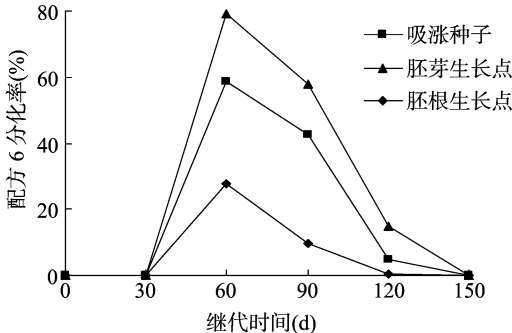


图4 配方 6 下 3 种外植体愈伤组织分化能力的比较

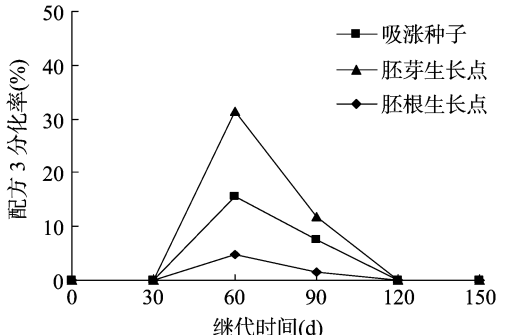


图2 配方 3 下 3 种外植体愈伤组织分化能力的比较

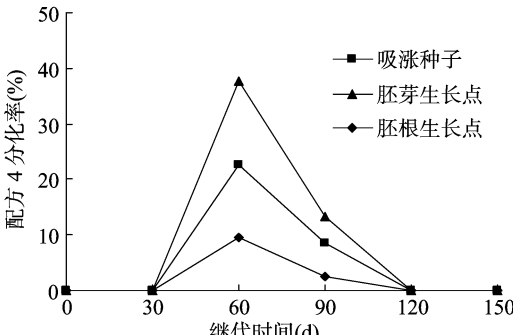


图3 配方 4 下 3 种外植体愈伤组织分化能力的比较

明显感觉到紧实的瘤状结构,这种愈伤大部分为胚性愈伤,易萌出丛生芽;第 3 类愈伤组织呈水渍状易褐化,这种愈伤也较难分化。3 种外植体均可形成这 3 类愈伤组织但差异明显,其中胚芽生长点易形成第 2 类胚性愈伤组织;吸涨种子以第 2 类居多,第 1 类较少;胚根生长点主要是第 1 类。在 6 个配方之间这 3 类愈伤组织也存在明显差异,其中配方 1 以第 3 类愈伤为主;配方 2、配方 3、配方 4 以第 1 类愈伤居多,第 2 类愈伤较少;配方 5 和配方 6 主要产生第 2 类愈伤。

2.2 不同激素浓度配方对不同外植体丛生芽分化率的影响

由表 3 可见,胚芽生长点的 6 个配方丛生芽分化率均明显高于吸涨种子,吸涨种子又均明显高于胚根生长点,说明最好的外植体是胚芽生长点。6 个配方丛生芽分化率也有差异,排序为配方 5 > 配方 4 > 配方 6 > 配方 3 > 配方 2 > 配方 1,可以看出最好的配方配比是配方 5,最差的是配方 1。

2.3 基本培养基营养减半及 IBA 浓度不同对生根的影响

从表 4 可以看出,基本培养基营养成分是否减半对剪股颖丛生芽的生根率没有明显影响,所以在实际应用时,若需大量生产组培苗,为节约成本可以使用低浓度的无机盐培养基即 1/2MS。试验结果也表明培养基中添加不同浓度 IBA 对生根率影响不明显,但若无 IBA,则对生根率有明显的影响。

3 讨论

剪股颖组培外植体一般采用的是成熟种子,目前还未见有以剪股颖吸涨种子、胚芽生长点及胚根生长点作为外植体,系统地研究植株高效再生技术的报道。通常多细胞植物都有诱导产生愈伤组织的潜在可能性^[2],但不同外植体的分化能力会有明显的差异,其中胚性愈伤组织的诱导率可作为分化能力的指标^[4]。本试验结果也印证了上述说法,即 3 种不同外植体间尽管都能诱导出愈伤组织,但不论是愈伤组织的诱导率还是胚性愈伤组织的形成率以及丛生芽的分化率,均表现出了明显的差异,而胚性愈伤组织的形成率和丛生芽的分化率表现出高度的一致性,这也说明胚性愈伤组织的诱导率作为分化率的指标是可行的。试验结果也说明了胚芽生长点具有很强的脱分化及再分化形成再生植株的能力,是最佳的高频外植体,为建立一个高效的剪股颖组培再生体系奠定了试验基础;其次吸涨种子也可以作为一个备选外植体,但胚根生长点太低可以淘汰掉。

较高浓度的生长素和较低浓度的细胞分裂素或无细胞分裂素的固体培养基对大部分草坪草愈伤组织的诱导是没有问

表 3 不同激素浓度配方对不同外植体丛生芽分化率的影响

配方	激素及浓度 (mg/L)		丛生芽分化率 (%)		
	6 - BA	NAA	吸涨种子	胚芽生长点	胚根生长点
1	0.0	0.0	21.3b	39.5a	0c
2	0.5	0.0	36.6b	53.2a	3.7c
3	0.5	0.1	47.2b	58.5a	6.2c
4	1.0	0.1	63.7b	74.5a	10.7c
5	2.0	0.1	69.5b	79.8a	11.6c
6	2.0	0.5	56.4b	65.6a	8.5c

表 4 培养基营养减半及 IBA 浓度不同对生根的影响

基本培养基	IBA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)
1/2MS	0.0	66.6
	0.1	95.5
	0.2	100.0
MS	0.0	67.9
	0.1	96.3
	0.2	100.0

题的,但是否形成胚性愈伤组织乃至能否分化出丛生芽则与外植体的年龄、生理状态、培养基的组成、激素的种类和浓度、培养条件等有关,其中培养条件是关键^[5],尤其是激素成分及配比很重要^[2],2,4 - D 是诱导胚性愈伤组织的重要激素^[6],较高浓度的 2,4 - D 也有利于胚性愈伤组织的形成^[7-9],但合适的激素配比及继代时间对胚性愈伤组织的形成以及丛生芽的分化更高效;依据本试验的结果,分析得出高频胚性愈伤组织形成的激素配比为 2.0 mg/L 2,4 - D + 0.1 mg/L 6 - BA + 0.5 mg/L NAA;高频丛生芽分化的激素配比为 2.0 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA。高浓度的 2,4 - D 有利于愈伤组织的诱导,但愈伤大多为松散的高度液泡化的薄壁细胞组成,所以并不利于胚性愈伤组织的形成及丛生芽的分化,而诱导培养基中加入少量的 6 - BA 和 NAA 反倒对胚性愈伤组织的形成起促进作用并有利于丛生芽的分化。本试验的研究结果为建立一个高效的剪股颖组培再生体系提供了一条有效地途径,图 5 至图 8 是剪股颖高频组培再生植株的现场图片。



图5 愈伤组织诱导

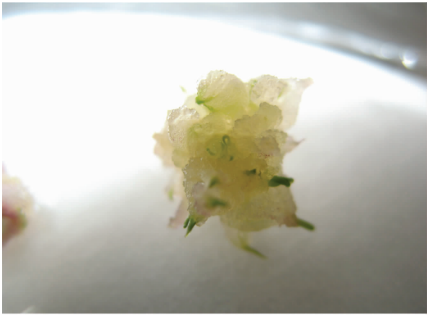


图6 胚性愈伤组织的形成

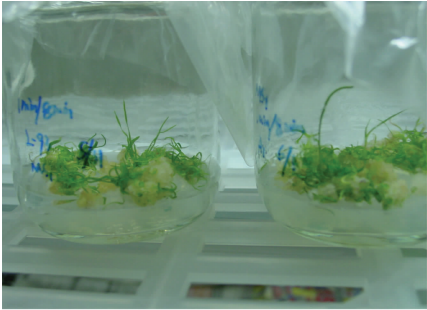


图7 高频丛生芽分化培养

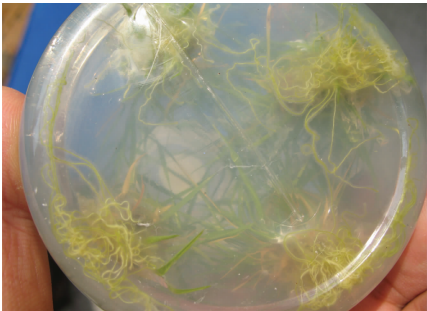


图8 生根的再生植株

参考文献:

[1]王明蓉,罗富成. 优质草坪草 - 匍匐剪股颖[J]. 四川草原,2003 (6):60 - 61.

[2]崔凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社,2000:4 - 29.

[3]Chai M, Jia Y, Chen S, et al. Callus induction, plant regeneration, and long - term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* (L.) Merr. [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2011, 104(2):

187 - 192.

[4]梁慧敏,黄 剑,夏 阳,等. 苜蓿外植体再生系统的建立研究 [J]. 中国草地,2003,25(4):8 - 14.

[5]梁慧敏,夏 阳,王永平,等. 草坪草体胚发生及应用于现代育种 [J]. 山东林业科技,2008,38(5):83 - 86,108.

[6]崔凯荣,邢更生,周攻克,等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节[J]. 遗传,2000,22(5):349 - 354.

[7]王晓春,师尚礼,梁慧敏,等. 2,4 - D 和 6 - BA 组合对比对金达苜蓿愈伤组织诱导与分化的影响[J]. 草地学报,2010(2):219 - 222.

[8]陈智勇,易自力,赵廷林. 匍匐剪股颖愈伤组织诱导及其分化的研究[J]. 园艺学报,2003,30(5):562 - 562.

[9]梁月香,梁慧敏,燕丽萍,等. 红叶石楠茎段再生快繁体系的建立 [J]. 江苏农业科学,2011,39(6):68 - 70.