

草地早熟禾高频再生体系建立

麻冬梅¹, 杨亚亚², 杨赛飞¹, 许 兴¹

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 研究了草地早熟禾愈伤组织的诱导和分化的最适培养基, 建立了早熟禾高频率的再生体系。结果表明, 品种优异的胚性愈伤诱导率最高, 其中含 2.0 mg/L 2, 4-D 和 0.2 mg/L 6-BA 的培养基处理胚性愈伤组织的诱导频率最大, 可以达到 65.26%。早熟禾品种肯塔基、午夜、优异与新哥莱德最适分化激素浓度与配比分分别为 6-BA 1.0+KT 0.2、6-BA 2.0+2, 4-D 0.1、6-BA 1.0+2, 4-D 0.2、KT 2.0 愈伤组织分化率分别达到 27.93%、52.38%、66.67% 和 60%。早熟禾再生芽在 1/2 MS+0.2 NAA 培养基上生根率可达到 100%。

关键词: 早熟禾; 愈伤组织; 高频再生体系

中图分类号: S 688.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)07-0198-03

草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 为禾本科早熟禾属多年生草本植物, 是世界广泛种植的重要草坪草种^[1]。草地早熟禾许多品种是优良的草坪用草, 既喜光也耐荫, 耐寒能力强, 具有生长速度慢, 不需经常修剪、耐践踏、绿色期长、秋季保绿性和春季返青性能好、抗寒能力强、用途广等优点, 已是混播草坪的主栽品种, 但抗旱性、耐热性、耐盐能力差, 易受病、虫危害^[2,3], 这些性状可通过基因工程手段进行品种改良。植物再生体系建立是遗传转化的前提工作, 在草地早熟禾再生体系中, 存在着出愈时间长、愈伤组织诱导率低、基因型限制、基因型的再生能力差^[4,5]、分化率低^[6,7]等问题, 从而延长了遗传转化的时间, 降低了遗传转化效率, 影响了草坪草品种改良的基因工程研究。因此, 研究一个草地早熟禾良好的组织培养条件和高效的植株再生体系仍具有重要的意义, 研究旨在建立早熟禾高频率的再生体系, 为进一步早熟禾遗传转化和分子育种的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用早熟禾主栽品种肯塔基、新哥莱德、优异和午夜的成熟种子为外植体。

1.2 方法

1.2.1 种子发芽试验 选取肯塔基、新哥莱德、优异和午夜各 500 粒饱满的成熟种子置于放有湿润滤纸的培养皿中, 每皿 100 粒种子, 培养温度 (25±1) °C, 2 周后统

计发芽率。

1.2.2 愈伤组织诱导与继代培养 选取饱满成熟的种子放入三角瓶中, 加入 50% 的浓硫酸, 在 200 r/min 摇床震荡 2~3 min 后, 在 75% 酒精中浸泡 1 min, 然后用 0.1% 氯化汞消毒 8~10 min, 最后用无菌水冲洗 5~7 次。消毒好的种子置于不同激素配比的诱导愈伤组织培养基中, 温度 (25±2) °C 暗培养 1 周后去芽, 以诱导形成愈伤组织, 4 周后挑取愈伤组织于继代培养基中, 每 2 周继代培养 1 次。

1.2.3 愈伤组织分化 愈伤组织继代培养 6 周后, 挑取浅黄色、紧密、颗粒状胚性愈伤组织于分化培养基中。

1.2.4 再生植株的生根和移栽 分化出 1~2 cm 的芽转至 1/2 MS+0.2 NAA 的生根培养基中。1 个月后将生根的植株移到室外, 在遮光的 50% 的自然光下不打开瓶口练苗 2~3 d 后移栽至土壤中。

2 结果

2.1 早熟禾种子愈伤组织的诱导

发芽试验中, 早熟禾种子 3~5 d 萌发, 5~8 d 长出小芽, 2 周后统计种子的发芽率达到 93% 以上。

2.1.1 不同外植体对愈伤组织再生频率的影响 将成熟种子消毒处理后, 接到 MS 基本培养基中, 得到无菌苗, 取叶片、根及胚轴接到愈伤组织诱导培养基, 同时将成熟种子接到相同培养基。结果表明 (见表 1), 叶片与根没有诱导出愈伤组织, 胚轴愈伤诱导率仅为 7.4%, 种子出愈率为 24.59%~35.45%, 因此, 选定种子为诱导愈伤组织的外植体材料。比较 4 个品种愈伤组织的诱导情况, 品种优异的胚性愈伤诱导率最高, 达到 35.45%。该品种的组培再生性略好于品种肯塔基、午夜与新哥莱德, 品种午夜、优异与新哥莱德愈伤组织继代培养 2 次以后愈伤组织多呈浅黄色、颗粒状、结构致密, 品种肯塔

第一作者简介: 麻冬梅 (1978), 女, 宁夏贺兰人, 硕士, 助教, 现从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: yyy_y2006@nxu.edu.cn.

通讯作者: 许兴。

基金项目: 国家“973”资助项目 (2006CB100106)。

收稿日期: 2008-03-02

基的愈伤诱导率最低,愈伤组织生长缓慢,多呈半透明、结构松散。

表 1 不同外植体对草地早熟禾愈伤组织诱导率的影响 %

品种	叶片	根	胚轴	种子
Kentucky	0	0	3.2	24.59
Michingt	0	0	6.9	27.26
Merit	0	0	7.4	35.45
Nuglade	0	0	5.7	28.68

2.1.2 2,4-D 和 6-BA 对诱导品种愈伤组织的影响 早熟禾种子在培养基中诱导 30 d 左右的愈伤组织透明、结构松软,在继代培养基继代 2 次以后,愈伤组织浅黄色、干燥、致密,有颗粒状突起。表 2 列出了草地早熟禾种子在不同浓度 2,4-D 和 6-BA 培养基上愈伤组织诱导的结果。接种 1 周后,种子开始发芽,并在芽基部出现乳白色愈伤组织(图 1)。试验表明草地早熟禾种子在含有不同浓度 2,4-D 和 6-BA 的 MS 培养基中诱导愈伤组织差异明显,MS 培养基中 2 mg/L 的 2,4-D 和 0.2 mg/L 的 6-BA 诱导效果最好。

表 2 2,4-D 和 6-BA 对愈伤组织诱导频率的影响 mg · L⁻¹

处理	激素配比 2,4-D+6-BA	愈伤组织 诱导率/%	愈伤大小 / mm	愈伤诱导 启动时间/d
1	1+0	40.73	1	14
2	1+0.1	42.58	1	13
3	1+0.2	47.63	2	10
4	1+0.3	37.96	2	10
5	2+0	39.08	2	8
6	2+0.1	43.11	3	8
7	2+0.2	65.26	4	6
8	2+0.3	58.16	3	7
9	3+0	47.83	3	8
10	3+0.1	50.09	2	7
11	3+0.2	64.73	3	9
12	3+0.3	58.41	1	11

2.2 不同基因型和不同浓度激素对比对愈伤组织分化的影响

光照培养约 14 d 后,愈伤组织开始分化出白色的根和少量绿芽(图 3),继续培养则长出绿苗(图 4)。不同浓度和配比的 6-BA、2,4-D、NAA 及 KT 对胚性愈伤组织分化成苗的频率有显著影响,早熟禾不同基因型与不同浓度激素对比对愈伤组织分化的结果见表 3。结果表明 处理 2,4,6,9 是早熟禾品种肯塔基、午夜、优异与新哥莱德的最适分化激素浓度,其促进早熟禾愈伤组织的分化效果与其它处理相比差异显著,分化率低的愈伤组织只是原来的诱导形成的体细胞的继续生长,芽的继续分化很少,有的形成的芽均为白化苗,愈伤组织有褐化现象。

2.3 再生植株的生根和移栽

早熟禾再生芽在 1/2 MS 培养基上培养 20 d 左右

生根率可达到 100%(图 4),根长度达到 3 cm 左右即可进行移栽(图 5)。移栽到花盆中的再生苗在人工气候箱中,温度(25±1)℃,光周期为光照 14 h、黑暗 10 h,培养 2 周即可移栽到大田中。

表 3 不同基因型和不同浓度激素配比的愈伤组织分化率 %

处理	激素配比 / mg · L ⁻¹	Kentucky	Michingt	Merit	Nuglade
1	6-BA 1.0+2,4-D 0.1	15.26	17.46	48.00	20.00
2	6-BA 1.0+2,4-D 0.2	13.16	16.38	66.67	19.73
3	6-BA 1.0+NAA 0.5	21.73	36.36	37.50	7.69
4	6-BA 1.0+KT 0.2	27.93	18.75	54.55	30.77
5	6-BA 2.0	23.16	27.27	63.64	29.17
6	6-BA 2.0+2,4-D 0.1	13.74	52.38	52.38	33.72
7	6-BA 2.0+2,4-D 0.2	16.83	32.14	48.00	47.62
8	6-BA 3.0+2,4-D 0.1	8.62	9.68	57.14	20.00
9	KT 2.0	19.59	25.93	53.85	60.00

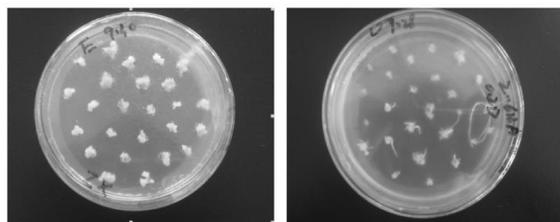


图 1 草坪草的接种和愈伤组织的诱导继代

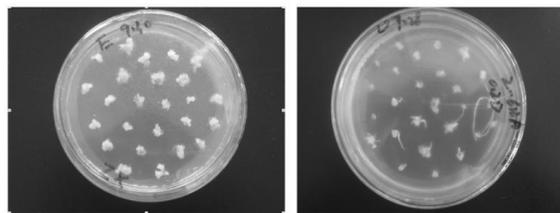


图 2 继代 2 次的愈伤组织 图 3 愈伤组织的分化

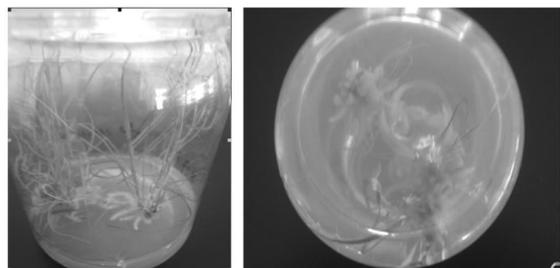


图 4 草地早熟禾组培再生苗的生根培养



图 5 草地早熟禾再生苗的移栽

3 结论

在植物组织培养中,生长素在诱导愈伤组织的形成、胚状体的产生以及试管苗的生根中发挥着重要作用,其中 2,4-D 对大多数草坪草诱导愈伤组织起着主要作用。马忠华等^[8]发现 3.0 mg/L 2,4-D 是早熟禾诱导愈伤组织的最佳浓度组合。结果表明 早熟禾愈伤组织的诱导率随 2,4-D 浓度的增加而提高,最适浓度是 2.0 mg/L,浓度继续增加愈伤组织的诱导率反而降低。品种优异的胚性愈伤诱导率最高,其中含 2.0 mg/L 2,4-D 和 0.2 mg/L 6-BA 的培养基中胚性愈伤组织的诱导频率最大,可以达到 65.26%。大多数愈伤组织呈疏松光滑、不生长或生长缓慢的非胚性状态,无法继续分化成绿苗,挑选浅黄色、颗粒状、结构紧密的胚性愈伤组织进行继代,最终形成正常植株。在分化培养基中 2,4-D 的浓度很低,甚至有的品种只有除去它才可获得再生植株。皮伟等报道在加有 0.1、0.3 mg/L 2,4-D 的培养基上不能长成幼苗,2,4-D 的存在抑制了幼芽的生长^[9]。有些研究报道 0.1 mg/L 2,4-D 是诱导肯塔基草地早熟禾愈伤组织分化的最佳浓度^[8,10],NAA 和 6-BA 配合使用没有单独使用 2,4-D 诱导分化效果好。该试验中,早熟禾品种肯塔基、午夜、优异与新哥莱德的最适分化激素浓度与配比各不相同,这可能是由于品种间基因型差异,肯塔基、午夜、优异与新哥莱德的最适分化激素浓度与配比分别为 6-BA 1.0+KT 0.2、6-BA 2.0+2,4-D 0.1、6-BA 1.0+2,4-D 0.2、KT 2.0。早熟禾再生芽在 1/2 MS 培养基上生根率可达到 100%。

参考文献

- [1] Kirsten Annette Nielsen, Elisabeth Knudsen. Regeneration of green plants from embryogenic suspension cultures of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. J. Plant Physiol., 1993, 141: 589-595.
- [2] 黄文惠 苏加楷. 牧草—草地农业科学[M]. 4版. 张玉发译. 北京: 农业出版社, 1992: 78-79.
- [3] Hu Xiao-ni, Yang Ai-fang, Zhang Ke-wen, et al. Optimization of in Vitro Multiple Shoot Clump Induction and Plantlet Regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2006, 84: 89-98.
- [4] Mc Donnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass [J]. Crop Sci., 1984, 24: 573-578.
- [5] She J M, Zhang B L, Chen Z Y, et al. A Study on the technique of plant regeneration from mature seed embryo of Kentucky bluegrass in vitro [J]. Acta Agraria Sin., 2003, 11(1): 58-62.
- [6] Nielsen K A, Larsen E, Knudsen E. Regeneration of protoplast-derived green plants of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Plant Cell Rep., 1993(12): 537-540.
- [7] Griffin J D, Dibble M S. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Plant Cell Rep., 1995, 14: 721-724.
- [8] 马忠华, 张云芳, 徐传祥, 等. 早熟禾的组织培养和基因枪介导的基因转化体系的初步建立 [J]. 复旦大学学报(自然科学版), 1999, 38(5): 540-544.
- [9] 皮伟, 李名扬, 郑丽. 草地早熟禾组织培养研究 [J]. 西南农业学报, 2004, 17(2): 267-270.
- [10] 丁路明, 龙瑞军, 王长庭. 肯塔基草地早熟禾愈伤组织的诱导及再生体系的建立 [J]. 中国草地, 2005, 27(3): 31-36.

Establishment of the High-efficient Plant Regeneration System of *Poa pratensis* L.

MA Dong-mei¹, YANG Ya-ya², YANG Sai-fei¹, XU Xing¹

(1. Academy of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. Academy of Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: The best culture medium of the callus induction, differentiation were studied. The plant regeneration system has been established. The results showed that embryo callus inducing ratio of Merit was the highest, reached 65.25% on the modified MS medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L 6-BA. The best callus differentiation medium of Kentucky, Midningt, Merit and Nuglade was different due to different genotype. The best callus differentiation medium of Kentucky, Midningt, Merit and Nuglade was 6-BA 1.0+KT 0.2, 6-BA 2.0+2,4-D 0.1, 6-BA 1.0+2,4-D 0.2, KT 2.0 individually, the ratio of callus differentiation of the Kentucky, Midningt, Merit and Nuglade was 27.93%, 52.38%, 66.67% and 60%. The rate of rooting of *Poa pratensis* L. on half strength MS medium+0.2 NAA reached 100%.

Key words: *Poa pratensis* L.; Callus; High frequency regeneration system