

# 白羊草成熟种子组织培养再生体系研究

于 娜<sup>1</sup>, 董 宽 虎<sup>2</sup>

(1. 山西省林业职业技术学院 园林系, 山西 太原 030009; 2. 山西农业大学 动物科技学院, 山西 太谷 030801)

**摘 要:**以白羊草成熟种子为外植体,采用组织培养的方法,研究不同种子处理方法对愈伤组织诱导差异的影响。结果表明:手工剥去外稃为较好的处理方式,在愈伤组织诱导阶段,以MSB+2,4-D 2.0 mg/L和MSB+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L诱导效果较好,愈伤诱导率达到70%和75%,经继代后,分化率明显提高。

**关键词:**白羊草;成熟种子;继代;愈伤组织;植株再生

**中图分类号:**S 543.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0104-04

白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)属禾本科孔颖草属多年生草本植物,又名白草、茎草,其生长势强、产草量高、抗旱、耐盐碱、适应性广,以其营养价值高而在牧草生产中具有广阔的前景<sup>[1]</sup>。白羊草在世界各暖温带都有分布,我国主要分布于华北和西北的南部、中南区北部的山区坡地和黄土高原<sup>[2]</sup>。为充分利用这一广布建群优势种,培育优良的白羊草品种,课题组在以其成熟种子、真叶、茎段不同外植体为研究对象的基础上<sup>[3-6]</sup>,进一步研究以白羊草成熟种子为外植体,完善相应组培快繁的技术措施和培养基配方。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试白羊草种子于2006年10月采自山西省太谷县凤山,海拔1100 m,植被为喜暖灌草丛类草地,建群种为白羊草(*Bothriochloa ischaemum*),千粒重0.6975 g<sup>[7]</sup>。

以MSB培养基加3%蔗糖,加5%琼脂粉制备基础培养基,pH值调至5.8;在参考大量资料基础上设计在基本培养基上附加不同水平的激素。

MSB培养基:MS无机盐+B<sub>9</sub>有机成分。

### 1.2 试验方法

1.2.1 白羊草种子的处理 取充分成熟,结构完整的供试白羊草种子;先用无菌水浸泡15 min,然后用75%酒

精浸泡40 s,期间不断摇动,用无菌水冲洗3遍,再用0.1%升汞溶液消毒15 min,用无菌水冲洗4~5次后,用滤纸吸干水渍。然后接种到诱导愈伤组织培养基上;拨去外稃,先用无菌水浸泡10 min,去除杂质并使其沉淀,然后用75%酒精浸泡30 s,期间不断摇动,用无菌水冲洗3次,再用0.1%升汞溶液消毒15 min,用无菌水冲洗4~5次后,用滤纸吸干水渍。然后接种到诱导愈伤组织培养基上。

1.2.2 以成熟种子为外植体的组培体系 以成熟种子为外植体时,试验基本可以不受季节限制,也不受采样数量限制,所以在试验时可以有更多的选择。该试验共设计了9种愈伤诱导培养基进行愈伤诱导和组织培养,1种继代培养基,8种分化培养基,pH均为5.8。愈伤诱导培养基:1~9号培养基是以MSB培养基内加入不同组合的生长调节物质。1号培养基:MSB+2,4-D 1.6 mg/L;2号培养基:MSB+2,4-D 1.8 mg/L;3号培养基:MSB+2,4-D 2.0 mg/L;4号培养基:MSB+2,4-D 2.2 mg/L;5号培养基:MSB+2,4-D 2.4 mg/L;6号培养基:MSB+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;7号培养基:MSB+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;8号培养基:MSB+2,4-D 4.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;9号培养基:MSB+2,4-D 6.0 mg/L+KT 0.5 mg/L。11种继代培养基:F1培养基:6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.04 mg/L;F2培养基:6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.06 mg/L;F3培养基:6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.05 mg/L。分化培养基:F4培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.02 mg/L;F5培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.03 mg/L;F6培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.04 mg/L;F7培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L;F8培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.06 mg/L;F9培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.07 mg/L;F10

**第一作者简介:**于娜(1979-),女,山西阳城人,硕士,助教,研究方向为草地资源与草地管理。E-mail:yuna1023@126.com。

**责任作者:**董宽虎(1956-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为草地资源与草地管理。E-mail:dongkuanhu@126.com。

**基金项目:**山西省科技攻关资助项目(20120311011-1);山西省科技基础条件平台建设资助项目(2012091004-0101);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20101403110002)。

**收稿日期:**2013-09-10

培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.08 mg/L;F11培养基:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.10 mg/L。生根培养基:分化出绿芽的小苗在 15~25 d 内迅速生长为小植株,并伴有纤细的根状物,转入生根培养基(无附加成分)1 周后便产生根,形成完整小植株。

1.2.3 培养条件 诱导愈伤为黑暗、室温 25±2℃;分化、生根培养光照为 16 h/d、室温 25±2℃、光照强度 2 000~3 000 lx。

1.2.4 练苗与移栽 将壮根后的白羊草幼苗进行移栽。移栽前先去掉封口膜在培养室中锻炼 2~3 d 后,把幼苗基部的残留琼脂洗净,移栽至小盆内,移栽基质为腐殖质、细沙和菜园土以 1:1:1 的比例混匀配制而成。

1.3 数据分析

出芽率(%)=出芽种子数/接种种子数×100%;出愈率(%)=产生愈伤组织块数/接种种子数×100%;污

表 1 白羊草去稃种子与未去稃种子愈伤组织诱导情况

Table 1 Comparison of callus induction from whole seeds and disposed seeds

| 出愈速度<br>Callus induction speed |                      | 培养基表面<br>Surface of the culture medium | 愈伤质量<br>Callus quality       | 愈伤诱导率<br>Induction rate of callus |
|--------------------------------|----------------------|--|------------------------------|-----------------------------------|
| 未去稃种子<br>Whole seeds           | 接种 7 d 左右能<br>看到部分长出 | 表面干燥,干净                                | 颜色发白或发黄,结<br>构较紧密,表面干燥       | 低                                 |
| 去稃种子<br>Disposed seeds         | 接种 2 d 左右能<br>看到部分长出 | 表面较湿,干净                                | 颜色透明或发白,结构疏松,<br>表面湿润,少许胚性愈伤 | 高                                 |

2.2 愈伤组织的诱导

2.2.1 2,4-D 浓度和培养基组合对白羊草愈伤组织诱导的影响 肖辅珍等<sup>[8]</sup>指出 2,4-D 2.0 mg/L 出愈率最好,课题组以前的试验中也得到证明<sup>[3-4]</sup>。从表 2 可以看出,2,4-D 浓度在 1.6~2.2 mg/L 时对白羊草种子发芽率、出愈率没有显著差异,以 2,4-D 2.0 mg/L 的出芽率、出愈率最高。只有当 2,4-D 2.4 mg/L 时发芽率、出愈率具有显著降低( $P<0.05$ )。可见在 2,4-D 浓度在 1.6~2.4 mg/L 时,种子出芽率、出愈率随 2,4-D 浓度增高而递减的趋势,在 2.0 mg/L 时出愈率最高。在出愈率最高的 2,4-D 2.0 mg/L 浓度条件下研究不同培养基对愈

表 2 不同 2,4-D 浓度对发芽率和愈伤组织诱导率的影响

Table 2 The effect of different 2,4-D concentration on rate of buds and callus induction

| 培养基<br>Medium | 2,4-D 浓度<br>Concentration of 2,4-D<br>/mg·L <sup>-1</sup> | 出芽率<br>Number of<br>buds/% | 愈伤组织诱导率<br>Induction rate of<br>callus/% |
|---------------|---|----------------------------|--|
| 1             | 1.6   | 69.56±1.56a                | 68.89±1.10ab                             |
| 2             | 1.8   | 71.33±4.06a                | 66.00±6.40ab                             |
| 3             | 2.0   | 72.33±3.71a                | 70.67±5.36a                              |
| 4             | 2.2   | 65.00±2.89ab               | 65.00±2.89ab                             |
| 5             | 2.4   | 56.67±1.67bc               | 56.67±1.67c                              |

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: Means in the same column with different small letters are significantly difference( $P<0.05$ ). The same below.

染率(%)=污染种子数/接种种子数×100%;胚性愈伤组织诱导率(%)=产生胚性愈伤组织块数/接种愈伤组织数×100%;分化率(%)=出芽愈伤数/接种愈伤数×100%。

2 结果与分析

2.1 白羊草种子去稃种子与未去稃种子的比较

有研究表明白羊草组织培养均用去稃完整种子或幼穗作外植体<sup>[1,3,8]</sup>,鉴于白羊草种子太小,千粒重只有 0.6 g 左右<sup>[7]</sup>,在肉眼下手工剥离内外稃费时费力,因此对其成熟种子在愈伤组织诱导阶段进行去稃、不去稃的对比试验。从表 1 可知,去稃后种子愈伤组织出现早,后期诱导率高,完整种子愈伤组织迟 5 d 才出现,与胚芽鞘结合紧密,使愈伤组织不易与之分离,这直接影响分化率(图 1A、B)。

伤组织诱导的影响。由表 3 可知,在相同 2,4-D 浓度下,白羊草愈伤组织诱导以 MSB 培养基表现较好,比 MS 培养基愈伤组织诱导率高 16.6 个百分点。

表 3 相同 2,4-D 浓度下不同培养基对愈伤组织诱导率的影响

Table 3 Effect of different medium on callus induction

| 培养基<br>Medium | 接种数<br>Inoculate<br>/个 | 形成愈伤<br>Number of callus<br>induced/块 | 愈伤组织诱导率<br>Induction rate<br>of callus/% | 愈伤状态<br>Induction condition |
|---------------|------------------------|---------------------------------------|--|-----------------------------|
| MS            | 117                    | 68                                    | 58.1b                                    | 透明或发白,疏松,少许<br>胚性愈伤         |
| MSB           | 119                    | 89                                    | 74.7a                                    | 透明或发白,疏松较软,<br>表面湿润,少许胚性愈伤  |

2.2.2 不同 2,4-D 和 KT 浓度组合对愈伤组织诱导的影响 由表 4 可知,在含 2,4-D 培养基中加入 KT 后,对愈伤组织诱导率的影响显著,随着 2,4-D 浓度的增加愈伤诱导率下降,在 2,4-D 浓度 2.0 mg/L 时加入 KT 0.5 mg/L,愈伤组织诱导率显著高于其它处理( $P<0.05$ ),同时它对愈伤组织的质量也起着重要作用,与只添加 2,4-D 的各处理比较,愈伤组织致密,量大。

2.2.3 愈伤组织的继代改造 种子经过 30 d 的暗培养后,形成的愈伤组织大多为白色透明状,质地较柔软,有的呈水浸棉絮状,这种愈伤组织在各种分化培养基中很难分化成苗,为初生愈伤组织。把这些愈伤组织转继到继代培养基上,经过 2 次(10 d 1 次)的继代培养,部分愈

表 4 不同 2,4-D 和 KT 浓度组合对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different level 2,4-D and KT concentrations on callus induction

| 培养基<br>Medium | 激素浓度<br>Hormone concentrations/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |     | 出芽率<br>Rate of buds<br>/% | 出愈率<br>Rate of induction<br>/% |
|---------------|---|-----|---------------------------|--------------------------------|
|               | 2,4-D   | KT  |                           |                                |
| 6             | 1.0   | 0.5 | 64.32±12.23a              | 54.91±4.31d                    |
| 7             | 2.0   | 0.5 | 72.47±5.43a               | 75.01±13.53a                   |
| 8             | 4.0   | 0.5 | 69.31±8.93a               | 71.51±6.28ab                   |
| 9             | 6.0   | 0.5 | 69.21±21.72a              | 58.61±4.09bc                   |

伤组织发生转变,可转化为淡黄色、质地致密、颗粒状愈伤组织,在分化培养基中可分化成苗,为胚性愈伤组织(图 1C)。经过 15~20 d 继代培养才能产生致密的胚性愈伤组织。由表 5 可知,继代后分化率显著高于不继代,同时褐化率降低,与不继代差异显著。

表 5 继代培养对胚性愈伤组织褐化率及分化率的影响

Table 5 The effect of subculture on callus browning and differentiation rate

| 培养基<br>Medium | 激素浓度<br>Hormone concentrations<br>/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 分化率<br>Differentiation<br>rate/% | 褐化率<br>Browning rate/% |
|---------------|---|----------------------------------|------------------------|
| 继代            | F1 6-BA 0.10+NAA 0.04   | 64.18±5.93a                      | 17.32±13.04b           |
|               | F2 6-BA 0.10+NAA 0.06   | 54.44±4.75ab                     | 2.78±2.78b             |
|               | F3 6-BA 0.05+NAA 0.05   | 40.14±2.17abc                    | 0b                     |
| 不继代           | F1 6-BA 0.10+NAA 0.04   | 29.88±13.63bc                    | 64.06±9.82a            |
|               | F2 6-BA 0.10+NAA 0.06   | 23.23±7.31c                      | 67.34±13.42a           |
|               | F3 6-BA 0.05+NAA 0.05   | 36.67±13.71abc                   | 56.67±11.71a           |

2.3 不同激素配比对胚性愈伤组织分化的影响

将胚性愈伤组织置于 MSB 附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 F4~F11 培养基上,研究不同组合对愈伤组织分化的影响。非胚性愈伤组织,在使用各种激素配比的分化培养基中只有极少量能分化出植株;而胚性愈伤组织在含有适宜浓度 6-BA 和 NAA 的培养基上,多数能分化出绿色小苗(图 1D)。

在 6-BA 保持 0.1 mg/L 不变的情况下,NAA 从 0.02~0.10 mg/L 浓度比例来促进白羊草愈伤组织的分化。从表 6 可以看出,NAA 在 8 个水平中胚性愈伤组织保持均较好,但在 F4、F11 号培养基中愈伤组织质地显著差于其它培养基,相应的在 F4、F11 号培养基中分化率也显著低于其它培养基,说明 NAA 浓度过低过高都不利于胚性愈伤组织的保持和分化。随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织分化率呈现先上升后下降的趋势,F6、F7 显著高于其它激素组合( $P<0.05$ ),F8 次之,F9、F10、F5 显著高于 F4,说明 NAA 0.04、0.05 mg/L 时分化达到最高,且胚性愈伤保持最高,说明这 2 个激素组合在以白羊草成熟种子为外植体分化中作用最好。F5、F9、F10 分化率差异不显著( $P<0.05$ ),当 NAA 浓度降到 0.02 mg/L 时分化率差异显著,只有 2.56%。

2.4 生根与移栽

分化出绿色小苗待芽长到 6~7 cm 左右,根长 3~4 cm 时转到没有激素培养基上壮根(图 1E)。将壮根后的白羊草幼苗进行移栽即可成活并生长良好(图 1F)。

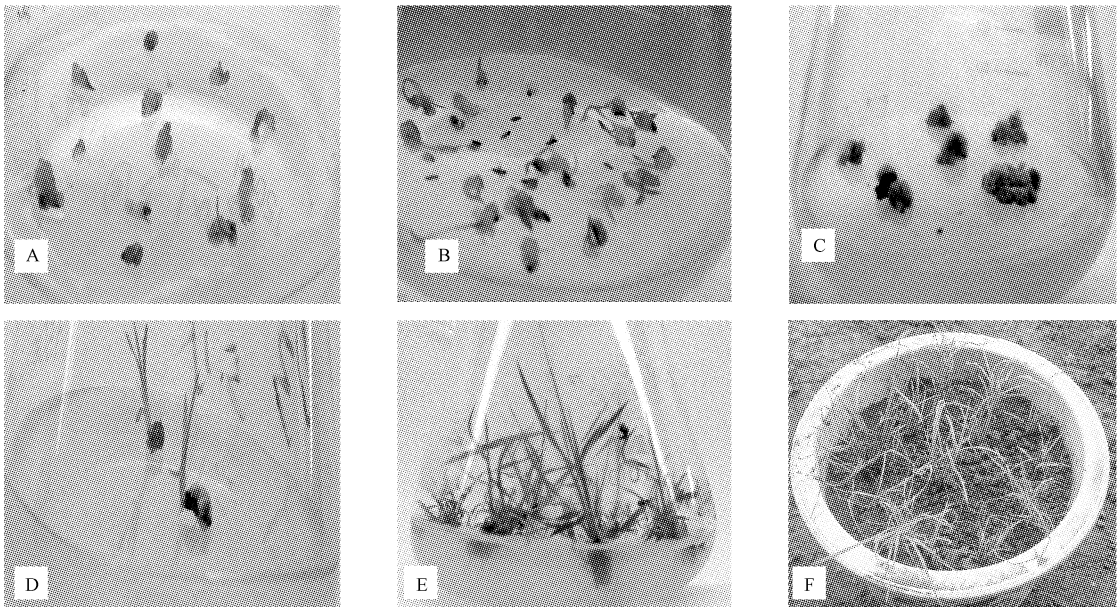


图 1 白羊草植株再生过程

注:A.完整成熟种子诱导出的非胚性愈伤组织;B.手工剥去外稃种子诱导出的非胚性愈伤组织;C.继代后干燥、紧密、颗粒状的愈伤组织;D.分化培养基上分化的簇生苗;E.壮根阶段;F.再生植株。

Fig. 1 The course of plant regeneration in *Bothriochloa ischaemum*

Note: A. Nonembryogenic callus induced from whole nature seeds; B. Nonembryogenic callus induced from disposed nature seeds; C. Callus of dry, compact, small pellet after callus subculture; D. Shoots regenerated in regeneration medium; E. Stage of rooting; F. Regenerated plants.



表 6 不同培养基对白羊草成熟种子为  
外植体愈伤分化的影响

Table 6 Effect of different medium on  
callus differentiation from mature embryo

| 培养基<br>Medium | 激素浓度<br>Hormone concentrations/mg · L <sup>-1</sup> |      | 胚愈率<br>Rate of embryogenic<br>callus/ % | 分化率<br>Differentiation<br>rate/ % |
|---------------|---|------|---|-----------------------------------|
|               | 6-BA  | NAA  |   |                                   |
| F4            | 0.1   | 0.02 | 66.35±1.48c                             | 2.56±2.56e                        |
| F5            | 0.1   | 0.03 | 92.59±3.70a                             | 17.61±4.63cd                      |
| F6            | 0.1   | 0.04 | 96.97±3.03a                             | 64.18±5.93a                       |
| F7            | 0.1   | 0.05 | 88.89±11.11ab                           | 54.44±4.75a                       |
| F8            | 0.1   | 0.06 | 83.81±5.32ab                            | 38.88±7.33b                       |
| F9            | 0.1   | 0.07 | 82.22±9.69ab                            | 22.73±3.67c                       |
| F10           | 0.1   | 0.08 | 85.35±4.83ab                            | 17.93±5.47cd                      |
| F11           | 0.1   | 0.10 | 66.16±9.19c                             | 7.04±3.53de                       |

### 3 讨论与结论

尽管早在 20 世纪 50 年代植物细胞的全能性理论就已确立,但是细胞全能性的表达在各种植物之间甚至不同属种之间的植物都有很大差别,植物的再生性由它们的基因型决定。白羊草不同组织或器官来源的外植体再生能力也有很大差别。可能因为它们对激素等外源信号的感应程度不同,须改变培养条件,提高其再生能力。

成熟种子与真叶、茎段相比,易于获取,且不受季节、植株发育时期等因素限制,具备取材方便、操作简单等优点,同时愈伤组织诱导率、分化率都比另 2 种外植体要高,故认为成熟种子是较好的外植体。

外植体有无去稃处理对诱导愈伤组织的结果有很大差异,可能是由于去稃后对培养基敏感度增强的原因。去稃后种子愈伤组织出现早、质量优、诱导率高,完整种子愈伤组织多在第 7 天左右才出现,且较硬、干燥、与胚芽鞘结合紧密,使愈伤组织不易与之分离,这直接影响分化率。根据以上结果,以手工剥离成熟种子内外稃,颖果消毒后为外植体进行愈伤组织诱导情况较优。

除了以上因素外,其它因素如所用的基本培养基、培养基的碳源、维生素、pH 值以及培养温度等都对白羊草愈伤组织的形成和变化都有一定程度的影响。

植物生长调节剂的诱导作用对植物的脱分化有着重要的意义,不同的植物生长调节剂及其配比可能对愈伤组织的诱导作用不同。从不同的诱导培养基上形成的愈伤组织,愈伤组织的生长情况明显不同。KT 对于白羊草愈伤组织继代和分化效果明显,在附加 KT 的培养基上白羊草成熟种子愈伤组织诱导率高,生长较快,当 2,4-D 的浓度保持在 2.0 mg/L,KT 的浓度保持在 0.5 mg/L 时,成熟种子愈伤组织就会有较高诱导率,良好的结构,同时保持较高的增殖速度。加低浓度的细胞分裂素 6-BA,能有效的提高植物细胞诱导愈伤组织的再生能力。6-BA 作为外源激素,能改善细胞内源生长素和细胞分裂素的比例,调节细胞生理生化状态,有利于胚性愈伤组织的发生,从而增加分化频率。

### 参考文献

- [1] 时永杰,孙晓萍,刘晓强,等. 白羊草幼穗的组织培养[J]. 草业科学, 1998,15(6):19-20.
- [2] 徐朗然,张继敏,于士友. 黄土高原白羊草的基本特征及其地理学意义[J]. 西北植物学报,1997,17(1):88-93.
- [3] 于娜,董宽虎. 白羊草成熟胚组织培养及植株再生体系的建立[J]. 草地学报,2008,16(5):466-469.
- [4] 于娜,董宽虎. 白羊草成熟种子组织培养影响因素的研究[J]. 现代农业科技,2011(8):322-324.
- [5] 于娜,董宽虎. 白羊草茎段愈伤组织诱导和植株再生[J]. 山西农业科技杂志,2012(6):575-578.
- [6] 于娜,董宽虎. 白羊草真叶愈伤组织诱导和植株再生[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2010,30(1):61-64.
- [7] 黄锋华,董宽虎. 白羊草灌丛草地植物量及优势种牧草营养动态研究[J]. 草原与草坪,2007(2):14-17.
- [8] 肖辅珍,王景林. 从白羊草成熟胚和幼穗培养诱导再生植株[J]. 首都师范大学学报,1996,17(4):76-78.

## Research on Tissue Culture of Regeneration System of the Mature Seeds of *Bothriochloa ischaemum*

YU Na<sup>1</sup>, DONG Kuan-hu<sup>2</sup>

(1. Department of Landscape, Shanxi Forestry Vocational Technical College, Taiyuan, Shanxi 030009; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

**Abstract:** Using the seeds of *Bothriochloa ischaemum* as the explants, with the method of tissue culture, the effect of different treatments of seeds on induction medium were studied. The results showed that hand stripping lemma for better processing method, during the callus induction phase, the culture medium of callus induction was MSB + 2,4-D 2.0 mg/L and MSB+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L combined complete darkness culture that callus induction reached 70% and 75%; callus differentiation were improved evidence in the callus subculture medium.

**Key words:** *Bothriochloa ischaemum*; mature embryo; subculture; embryogenic callus; plant regeneration