

普通狗牙根种子组培技术优化及植株再生

姜 茜, 张 琪, 郑丽屏, 蔡 平

(苏州大学 建筑与城市环境学院, 江苏 苏州 215123)

摘 要:以普通狗牙根的成熟种子作外植体, 通过胚性愈伤组织的发生进行植株再生。结果表明: 诱导狗牙根种子产生愈伤组织的最佳培养基为: MS+2,4-D 3 mg/L+壳聚糖 4 g/L; 暗培养优于光培养, 最高出愈率为 87.0%; 所诱导愈伤组织在 1/2 原激素浓度下继代, 以 MS+6-BA 0.1 mg/L 为分化培养基, 获得了再生植株; 半透明粘稠状愈伤组织的分化率最高, 为 63.1%。

关键词: 普通狗牙根; 种子; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 543⁺.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)10-0162-05

普通狗牙根[*Cynodon dactylon* (L.)Pars.] 为禾本科狗牙根属多年生草本植物 又名百慕达、绊根草、地板根 广布于温带地区, 我国黄河流域以南各地均有野生, 欧洲和非洲也有广泛分布^[1]。狗牙根极耐热和抗旱^[2], 根茎和匍匐茎在适宜的气候条件下, 能形成致密、整齐的优质草坪, 常用于温暖潮湿和温暖半干旱地区的草地、公园、墓地、公共场所、高尔夫球道、果岭、发球台、高草区及路旁、机场、运动场等地方的草坪绿化^[3], 它是分布最广的暖季型草坪草之一。近年来, 狗牙根与冷季型草坪草种混播用作公路、河堤等地方的水土保持护坡绿化工程, 应用极为广泛。

狗牙根具有很多品种, 其生态特性有一定差别。普通狗牙根是最初从狗牙根属中选择出来并被广泛应用的草坪型狗牙根, 其再生体系的建立, 可为进一步采用生物技术进行品种改良, 培育抗寒抗旱、耐盐耐荫、抗病和抗除草剂的新品种提供技术参考^[4]。草坪草的组培再生比较困难^[5], 而相对于冷季型草坪草而言, 暖季型草坪草的组培再生更加困难^[6]。目前, 以狗牙根种子为外植体的愈伤组织培养和植株再生仍是一个难题^[7], 虽然有报道成功地进行了愈伤组织的培养和植株再生, 但该方面的文献甚少, 并且组织培养和再生系统还有待于进一步优化。现以普通狗牙根成熟的种子为材料, 研究以狗牙根种子为外植体的愈伤组织最佳诱导条件和植株再生方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

普通狗牙根的成熟种子, 由苏州市星火绿化物资中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理方法 选取饱满的普通狗牙根的成熟种子, 浸于 0.1% 升汞溶液中 8~10 min, 滤去浮在表面的种子, 剩下的种子用无菌水冲洗 7 次后, 以手术刀横断切开, 接种于愈伤组织诱导培养基上。每处理 10 个重复。诱导培养基类型及添加物见表 1。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将接种好的种子均分为 2 批, 分别在 25℃ 恒温箱进行光照培养和暗培养(光照培养条件为 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx)。

1.2.3 愈伤组织的继代 接种后第 42 天将愈伤组织取出, 转移至基础培养基不变, 激素浓度为诱导培养基激素浓度的 1/2, 壳聚糖浓度不变的继代培养基中继代培养。每 14 d 继代 1 次。

1.2.4 愈伤组织的分化与植株再生 待愈伤组织长至一定大小(直径约 5 mm 左右)后, 转入分化培养基中光照培养(25℃, 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx)。分化培养基为 MS+6-BA 0.1 mg/L。

2 结果与分析

2.1 普通狗牙根种子愈伤组织诱导率

2.1.1 仅添加 2,4-D 时愈伤组织诱导率 狗牙根切开的成熟种子诱导培养 8~12 d 后, 开始出现白色胶状物, 随后逐渐膨大形成愈伤组织。第 42 天(6 周)时计算出愈率, 最高达 73.3%(图 2)。2,4-D 浓度显著地影响愈伤组织的诱导率^[8]。在 MS 培养基上, 光培养条件下, 使愈伤组织诱导率达到最高的 2,4-D 浓度为 1 mg/L; 暗培养条件下, 使愈伤组织诱导率最高的 2,4-D 浓度为 3 mg/L(图 1)。在 N6 培养基上, 光培养条件下, 使愈伤组织诱导率达到最高的 2,4-D 浓度为 3 mg/L; 暗培养条件下, 使愈伤

第一作者简介: 姜茜(1983-), 女, 安徽合肥人, 硕士, 现主要从事农业害虫防治方面研究工作。E-mail: jqbaby@sina.com。

通讯作者: 蔡平(1955-), 男, 博士, 教授, 现主要从事园艺园林植物保护的研究工作。E-mail: caip@suda.edu.cn。

基金项目: 苏州市科技支撑(农业)资助项目(SNG0909)。

收稿日期: 2010-02-22

表 1

诱导培养基

MS 培养基		N6 培养基	
MS+2, 4-D 0.1 mg/L	(M1)	N6+2, 4-D 0.5 mg/L	(N1)
MS+2, 4-D 0.7 mg/L	(M2)	N6+2, 4-D 1 mg/L	(N2)
MS+2, 4-D 1 mg/L	(M3)	N6+2, 4-D 3 mg/L	(N3)
MS+2, 4-D 3 mg/L	(M4)	N6+2, 4-D 4 mg/L	(N4)
MS+2, 4-D 4 mg/L	(M5)	N6+2, 4-D 7 mg/L	(N5)
MS+2, 4-D 5 mg/L	(M6)	N6+2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	(N6)
MS+2, 4-D 3 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	(M7)	N6+2, 4-D 1 mg/L+NAA 1 mg/L	(N7)
MS+2, 4-D 3 mg/L+NAA 1 mg/L	(M8)	N6+2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L	(N8)
MS+2, 4-D 3 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1 mg/L	(M9)	N6+2, 4-D 1 mg/L+壳聚糖 0.5 g/L	(N9)
MS+2, 4-D 3 mg/L+壳聚糖 0.5 g/L	(M10)	N6+2, 4-D 1 mg/L+壳聚糖 1 g/L	(N10)
MS+2, 4-D 3 mg/L+壳聚糖 1 g/L	(M11)	N6+2, 4-D 1 mg/L+壳聚糖 2 g/L	(N11)
MS+2, 4-D 3 mg/L+壳聚糖 2 g/L	(M12)	N6+2, 4-D 1 mg/L+壳聚糖 4 g/L	(N12)
MS+2, 4-D 3 mg/L+壳聚糖 4 g/L	(M13)	N6+2, 4-D 1 mg/L+壳聚糖 6 g/L	(N13)
MS+2, 4-D 3 mg/L+壳聚糖 6 g/L	(M14)		

注 上述所有培养基的 pH 5.8 琼脂含量为 0.8%。

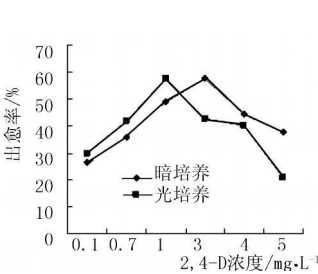


图 1 MS 培养基中不同 2,4-D 浓度和培
养条件对狗牙根种子出愈率的影响

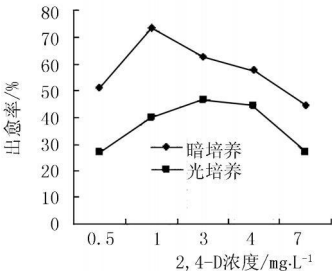


图 2 N6 培养基中不同 2,4-D 浓
度对狗牙根种子出愈率的影响

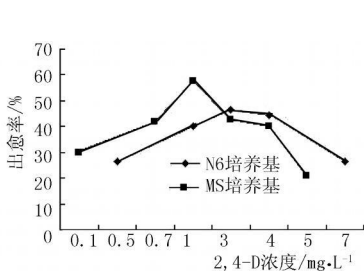


图 3 光培养条件下不同基础培
养基对狗牙根种子出愈率的影响

组织诱导率最高的 2,4-D 浓度为 1 mg/L (图 2)。基础培养基的不同对普通狗牙根种子愈伤组织的诱导率也有影响。在光照条件下, MS 培养基中的狗牙根种子最高出愈率大于在 N6 培养基中最高出愈率, 即在光照条件下, 选用 MS 作为基础培养基有利于愈伤组织的发生。但是在黑暗条件下, 选用 N6 培养基作为基础培养基更有利于愈伤组织的发生。在 N6 培养基上黑暗培养的狗牙根种子出愈率达到最高, 为 73.3%, 单就出愈率来说, 用 N6 培养基作为基础培养基更利于狗牙根种子愈伤组织的发生 (图 3、4)。

2.1.2 添加 6-BA、NAA、壳聚糖对愈伤组织发生率的影响 在含有最佳诱导浓度的 2,4-D 培养基中, 添加 6-BA、NAA、壳聚糖, 进行光照和暗培养, 愈伤组织发生率随添加物不同和添加物浓度不同有所变化。在光照培养下, 含 2,4-D 3 mg/L 的 MS 培养基和含 2,4-D 1 mg/L 的 N6 培养基中, 分别添加 6-BA、NAA 和添加 6-BA+NAA, 都对狗牙根种子愈伤组织的发生产生了一定程度的抑制作用。但壳聚糖的添加对出愈率没有抑制作用, 而且在 MS 培养基中壳聚糖浓度为 1~2 g/L 之间时, 狗牙根种子的出愈率有较大提高, 分别为 58.3% 和 62.0%。在 N6 培养基中壳聚糖浓度为 2 g/L 时, 狗牙

根种子的出愈率达 47.1% (图 5)。在暗培养下, 在含 2,4-D 3 mg/L 的 MS 培养基中添加 6-BA 和 NAA 也对狗牙根种子愈伤组织的发生产生了抑制作用。但是在含 2,4-D 1 mg/L 的 N6 培养基中添加 6-BA 后, 狗牙根种子出愈率为 77.2%。添加一定浓度的壳聚糖对 MS 培养基中的狗牙根种子的愈伤组织发生率有较大的促进作用, 壳聚糖最佳浓度为 4 g/L, 最高出愈率为 87.0%。N6 培养基中壳聚糖的添加也能够促进狗牙根种子的愈伤组织发生率, 在添加 2 g/L 的壳聚糖时, 最高出愈率为 83.3% (图 6)。

2.2 普通狗牙根种子愈伤组织的形态

2.2.1 仅添加 2,4-D 时愈伤组织形态的发生 在愈伤组织诱导过程中, 出现了几种不同形态的愈伤组织: ①白色疏松状愈伤组织 (图 7-A), 通常发生在愈伤诱导初期, 可以转变为后 3 种形态的愈伤组织; ②浅黄色愈伤组织 (图 7-B), 稍致密; ③半透明粘稠状愈伤组织 (图 7-C), 通常不形成团聚, 透光可看见许多白点; ④褐化的愈伤组织 (图 7-D)。除 N6 培养基暗培养条件外, 愈伤类型①占大多数, 在光照条件下含 2,4-D 7 mg/L 的 N6 培养基中最多, 占 73%。在黑暗条件下含 2,4-D 0.7 mg/L 的 MS 培养基中, 愈伤类型②最多, 占 41%。在黑暗条件下

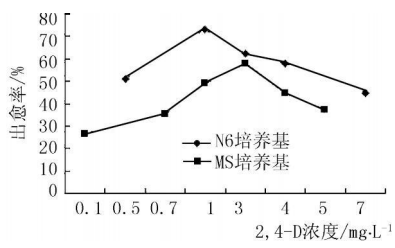


图4 暗培养条件下不同基础培养基对
狗牙根种子出愈率的影响

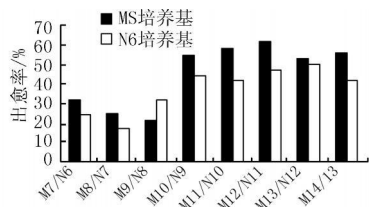


图5 光培养下培养基中不同添加剂
对出愈率的影响

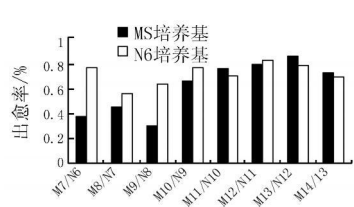


图6 光培养下培养基中不同添加剂
对出愈率的影响

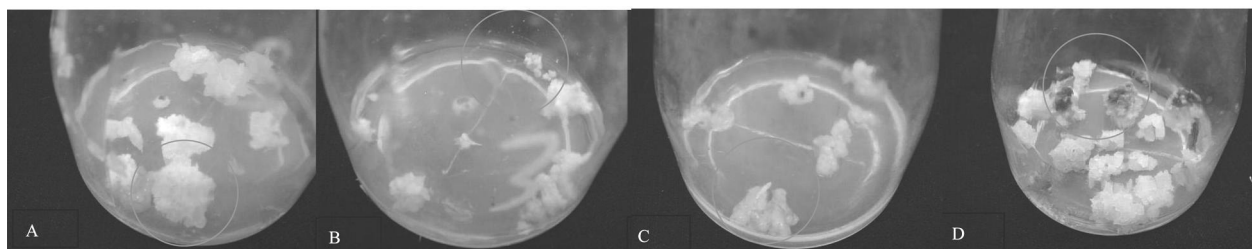


图7 4种不同形态的愈伤组织

注 A. 白色疏松愈伤组织 B. 浅黄色稍致密愈伤组织 C. 半透明粘稠状愈伤组织 D. 褐化的愈伤组织在愈伤诱导第 42 天(6 周), 统计各培养条件下愈伤组织形态的数量比。

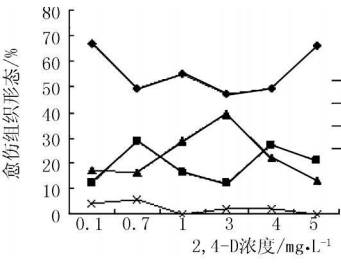


图8 光照条件下 MS 培养基中不同
形态愈伤组织数量百分比

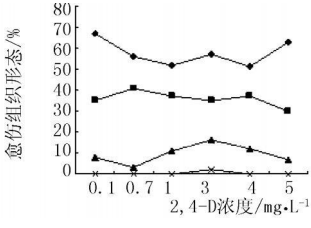


图9 黑暗条件下 MS 培养基中
不同形态愈伤组织数量

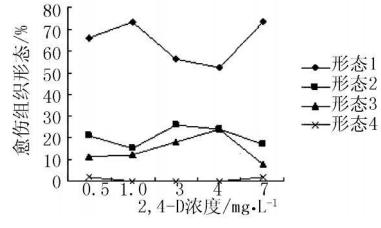


图10 光照条件下 N6 培养基中
不同形态愈伤组织数量

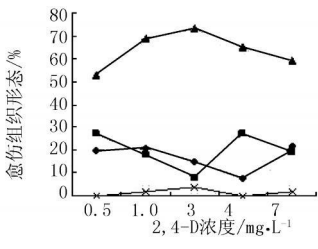


图11 黑暗条件下 N6 培养基中
不同形态愈伤组织数量

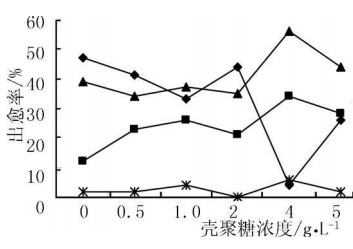


图12 光照条件下添加壳
聚糖的 MS 培养基中不同
形态愈伤组织数量百分比

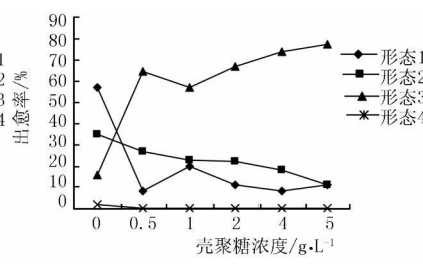


图13 黑暗条件下添加壳聚糖
的 MS 培养基中不同形态愈
伤组织数量百分比

含 2,4-D 3 mg/L 的 N6 培养基中, 愈伤类型③最多, 占 73%。愈伤类型④在各培养条件下都只有少量发生, 在 MS 培养基上光照条件下发生较多(图 6~9)。

2.2.2 添加壳聚糖对愈伤组织形态的影响 壳聚糖的添加使 MS 培养基和 N6 培养基中的狗牙根种子愈伤组织的形态结构发生了变化, 半透明粘稠状愈伤组织的数量显著增加, 特别是在 N6 培养基上黑暗培养条件下, 添

加 5 g/L 的壳聚糖使半透明粘稠状愈伤组织百分比达到 82%, 并且此种类型的愈伤组织还随培养基中壳聚糖浓度的增加有增加的趋势(图 12~15)。

2.3 愈伤组织继代及分化

接种后第 42 天将愈伤组织取出, 转移至继代培养基, 在原有光暗条件下继代。继代 2~3 次, 转入分化培养基。在分化培养基中, 白色疏松状愈伤组织大多无变

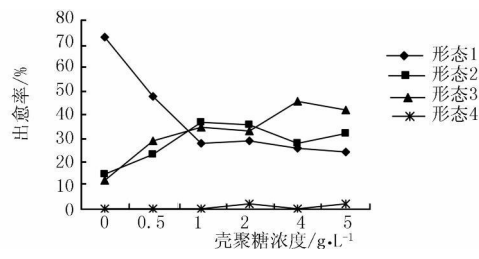


图 14 光照条件下添加壳聚糖的 N6 培养基中不同形态愈伤组织数量百分比

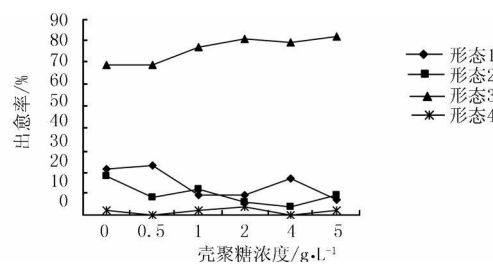


图 15 黑暗条件下添加壳聚糖的 N6 培养基中不同形态愈伤组织数量百分比

化,仅有小部分愈伤长根,并很快出现褐化现象,很难再生为植株(图 16)。浅黄色稍致密愈伤组织 5~7 d 有部分出现小点,7~10 d 小点变绿,15 d 左右出现绿色小芽,小芽逐渐长大成苗,分化率 26%。半透明粘稠状愈伤组织 3~7 d 白点变绿,10 d 后出现绿色小芽,小芽逐渐长大成苗,分化率 63%(图 17)。由此可见半透明粘稠状愈伤组织的分化率最高。



图 16 褐化长根的愈伤组织

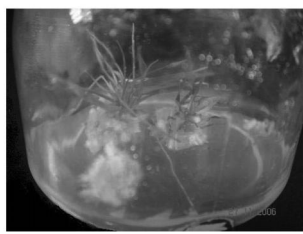


图 17 分化成苗

3 讨论

3.1 胚性愈伤组织的形态鉴别

由于愈伤类型③具有较高的分化率,由此可见形态类似于愈伤类型③为胚性愈伤的可能性极大。愈伤类型①无分化,所以白色疏松状愈伤组织可以基本肯定为非胚性愈伤组织。愈伤类型②有分化,但分化率低,不能确定其是否一定为胚性愈伤。愈伤类型④为褐化的组织,会很快死亡。

3.2 不同光暗条件和培养基狗牙根种子对 2,4-D 的敏感性

光暗条件对愈伤组织的发生是有一定作用的^[19]。在 MS 培养基上,光培养条件下,狗牙根种子在激素浓度为 1 mg/L 时愈伤组织诱导率即达到最大值;在暗培养

条件下,狗牙根种子在激素浓度为 3 mg/L 时才达到最大值。光培养条件下的狗牙根种子对 2,4-D 的敏感程度大大超过暗培养条件下的狗牙根种子对 2,4-D 的敏感程度。

相反,在 N6 培养基上暗培养,狗牙根种子在激素浓度为 1 mg/L 时愈伤组织诱导率即达到最大值;在光培养条件下,狗牙根种子在激素浓度为 3 mg/L 时才达到最大值。暗培养条件下的狗牙根种子对 2,4-D 的敏感程度大大超过光培养条件下的狗牙根种子对 2,4-D 的敏感程度。

这一现象表明,在 MS 培养基上,光照在一定程度上会促进狗牙根种子愈伤组织的发生,但是在 N6 培养基上,光照在一定程度上会抑制狗牙根种子愈伤组织的发生。

3.3 光暗条件对胚性愈伤组织发生的影响

试验证明,在 MS 培养基上,光培养条件下和最佳 2,4-D 浓度时,胚性愈伤组织的发生率高于黑暗培养条件下和最佳 2,4-D 浓度时的胚性愈伤组织的发生率。这说明在 MS 培养基条件下,光培养比暗培养有利于胚性愈伤组织的发生。在 N6 培养基上,暗培养比光培养更有利于胚性愈伤组织的发生,光照不仅在一定程度上抑制狗牙根种子愈伤组织的发生,对胚性愈伤组织的发生也有一定的抑制作用^[11]。

3.4 壳聚糖对出愈率和愈伤组织形态发生的影响

壳聚糖(Chitosan)是一种存在于低等植物、节肢动物及昆虫外壳中的天然物质,据报道壳聚糖对作物生长和营养代谢具有调节功能。该研究证明了在培养基中添加一定浓度的壳聚糖可以提高狗牙根愈伤组织的发生率,特别是在 MS 培养基中添加壳聚糖并采用黑暗培养,可以使狗牙根种子的出愈率有较大的提高。

壳聚糖的添加对狗牙根种子愈伤组织形态的发生也有一定的影响,在添加了壳聚糖之后,狗牙根种子的愈伤组织大部分形成带有白点的半透明粘稠状,这是其形成较多胚性愈伤组织的标志。壳聚糖对狗牙根种子愈伤组织发生及形态的影响仍有待进一步试验证实。

3.5 2,4-D、6-BA 和 NAA 对出愈率的影响

6-BA 属于生长素类植物激素,具有促进细胞分裂的作用;NAA 广泛用于生根,并能够与细胞分裂素相互作用促进植株的增殖。据报道,2,4-D 配合 6-BA、NAA 的使用可以提高外植体的出愈率^[12]。该研究显示,在添加最佳浓度 2,4-D 的 MS 培养基和 N6 培养基中分别添加 6-BA 0.5 mg/L、NAA 1 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L 及 NAA 1 mg/L,都没有对狗牙根种子出愈率产生显著的促进作用,这可能与激素浓度、配比不同有关。

在普通狗牙根种子诱导愈伤组织过程中,2,4-D 的重要作用显著的。在禾本科植物的愈伤组织诱导中,

2, 4-D是通常起着决定作用的植物生长调节剂^[13-15], 过高或过低的2, 4-D浓度都不利于胚性愈伤组织的形成和分化作用^[16,17]。该研究证明2, 4-D对普通狗牙根种子愈伤组织诱导重要作用的同时, 也发现过高浓度的2, 4-D对愈伤组织诱导的抑制作用。诱导狗牙根种子愈伤组织的适宜激素浓度在MS培养基上为2, 4-D 3 mg/L, 在N6培养基上为2, 4-D 1 mg/L。

3.6 培养和继代过程中愈伤组织的变化

在早期愈伤组织的培养和继代过程中, 起初为白色疏松状愈伤的组织一部分会逐渐改变形态, 有的逐渐变为淡黄色稍致密的愈伤组织, 有的变为半透明粘稠状有白点的愈伤组织, 表明了培养过程中非胚性愈伤组织是可以转化为胚性愈伤组织。但是在长期的继代培养过程中, 狗牙根种子愈伤组织出现了不同程度的褐变, 可能与愈伤组织的次生代谢中某些物质的积累有关, 或者与愈伤组织细胞内酚的含量活性有关^[18], 说明了愈伤组织的继代时间对愈伤组织的再生有重要影响。

3.7 诱导狗牙根种子愈伤组织和分化的最佳条件

普通狗牙根种子的愈伤组织诱导、分化和植株再生受多种因素制约, 组织培养及植株再生比较困难, 诱导愈伤组织所需要的时间较长, 分化率也不是特别高。在该研究的范围内, 最适于狗牙根种子的组织培养体系是采用含2, 4-D 3 mg/L添加壳聚糖 4 g/L的MS培养基, 或含2, 4-D 1 mg/L添加壳聚糖 2 g/L的N6培养基进行愈伤组织诱导, 进行2~3次继代, 分化培养基为含6-BA 0.1 mg/L的MS培养基。

参考文献

- [1] 刘建秀, 周久亚, 郭海林, 等. 草坪·地被植物·观赏草[M]. 南京: 东南大学出版社, 2001: 3-4.
- [2] Atkin RK, Barton G E. The establishment of tissue culture of temperature grasses[J]. J. Exp. Bot, 1973 24: 689-699.

- [3] 白昌军, 韦家少, 蔡黎云. 暖季型草坪草品种选育及开发利用研究[J]. 草业科学, 1997(6): 61-70.
- [4] 陈志一, 顾立新. 草坪草自然地带分类初探[J]. 草业科学, 1999(1): 54-59.
- [5] Ahn B J, Huang F H, King J W. Regeneration of bermudagrass cultivars and evidence of Somatic embryogenesis[J]. Crop Science, 1987, 27(3): 594-597.
- [6] 单兰兰, 毛碧增, 夏波, 等. 草坪草组织培养和遗传转化研究进展[J]. 热带农业科学, 2005, 25(4): 70-74.
- [7] 胡张华, 陈火庆, 吴关庭, 等. 百慕大成熟胚的组织培养及植株再生[J]. 草业学报, 2003 12(1): 85-89.
- [8] 张志豪. 激素对兰引1号草坪草型狗牙根愈伤组织及器官形成的影响[J]. 草业科学, 1996, 13(2): 45-47.
- [9] 谢海燕, 毛碧增, 单兰兰, 等. 狗牙根颖果胚性愈伤组织的诱导和胚性细胞的超微结构及植株再生[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(2): 209-215.
- [10] 梁一池, 杨华. 植物组织培养技术的研究进展[J]. 福建林学院学报, 2000, 22(1): 93-96.
- [11] Blanche F E G, Krans J V, Coats G E. Improvement in callus and plantlet formation in creeping bent grass[J]. Crop Science, 1986 26(6): 1245-1248.
- [12] 杜雪玲, 张振霞, 刘萍, 等. 中华结缕草组织培养与植株再生[J]. 草业学报, 2006 15(4): 87-93.
- [13] Bhaskaren S, Smith R H. Regeneration in cereal tissue culture: A review[J]. Crop Science, 1990, 30: 1328-1338.
- [14] Bai Y, Qu R. Factors in influencing tissue culture responses of mature seed and immature embryos in turf type tall fescue[J]. Plant Breeding, 2001, 120(2): 239-242.
- [15] Torello W A, Symington A G. Regeneration of perennial Ryegrass callus tissue[J]. Hort. Science, 1984 19: 56-57.
- [16] Linacero R, Vazquez A M. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of rye[J]. Plant Science, 1990 72: 253-268.
- [17] 张磊, 吴殿星, 胡繁荣, 等. 结缕草组织培养及农杆菌介导转化的主要因子优化[J]. 草业学报, 2004, 13(4): 100-105.
- [18] 余叔文. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 37-52.

Optimization of Common Bermudagrass Tissue Culture and Plantlet Regeneration

JIANG Qian, ZHANG Qi, ZHENG Li-ping, CAI Ping

(School of Architecture and Urban Environment, Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract: A tissue culture system for plant regeneration of common bermudagrass was developed. Using mature seeds as experimental material, explant callus was produced in the dark on MS medium containing 2, 4-D 3 mg/L and chitosan 4 g/L. The highest frequencies of inducement was 87.0%. Maintaining the callus in the former conditions and medium, with the 1/2 level of 2, 4-D. Then moved the to MS medium to obtain regenerated plantlets, with 6-BA 0.1 mg/L. The highest regeneration frequency was 63.1%, result in the ropy translucency callus.

Key words: common bermudagrass; seed; tissue culture; plantlet regenerated