

南荻的组织培养与快速繁殖技术

郭夏宇, 李合松, 彭克勤, 黄志刚, 萧浪涛*

湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 长沙410128

摘要:以南荻幼穗为外植体, 进行了组织培养与快速繁殖技术的研究。结果表明: 最佳诱导培养基: MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 g·L⁻¹ 水解酪蛋白+0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸; 最佳分化培养基: MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 g·L⁻¹ 水解酪蛋白+0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸; 最佳生根培养基: MS+1.0 mg·L⁻¹ NAA+0.25 mg·L⁻¹ Met。炼苗后, 移入营养土与珍珠岩(1:1)的基质中, 移栽成活率高达100%。该体系的建立为南荻规模化生产及遗传改良提供了前提条件。

关键词: 南荻; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation Technology of *Triarrhena lutarioriparia* L. Liu sp. nov.

GUO Xia-Yu, LI He-Song, PENG Ke-Qin, HUANG Zhi-Gang, XIAO Lang-Tao*

Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: Young ears of *Triarrhena lutarioriparia* were used as explant in the study of tissue culture and rapid propagation. The results indicate that the best induced medium for callus induction was MS medium with 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D, 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.5 g·L⁻¹ casein acids hydrolysate and 0.5 g·L⁻¹ proline. The best medium for bud differentiation was MS medium with 0.5 mg·L⁻¹ NAA, 0.5 mg·L⁻¹ KT, 0.5 mg·L⁻¹ IAA, 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.5 g·L⁻¹ casein acids hydrolysate and 0.5 g·L⁻¹ proline. The best medium for root differentiation was MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ NAA and 0.25 mg·L⁻¹ Met. After acclimatization, the culture-bottle seedlings were transplanted into base materials which contains nutritious soil and perlite (1:1). The survival rate was up to 100%. The established system provided preconditions for large-scale production and genetic modification improvement of *Triarrhena lutarioriparia*.

Key words: *Triarrhena lutarioriparia* L. Liou. sp. nov.; tissue culture; rapid propagation

南荻(*Triarrhena lutarioriparia* L. Liu sp. nov.)是我国特有的芒荻类植物新种, 原产于我国长江流域, 在植物学分类中归属禾本科荻属。南荻以无性繁殖为主、有性繁殖为辅, 常伴生于芦苇丛中, 为水陆两生的高大草本植物, 在我国鄱阳湖区和洞庭湖区等很多湿地均有分布(刘亮等2001), 具有水土保持、固堤防洪、净化水体、空气、维护自然生态系统等作用。近年来, 随着石油枯竭、粮食短缺和温室气体大量排放导致全球气候变暖等多重危机重压下, 新能源的开发迫在眉睫。南荻是C₄植物, 是一种较为理想的纤维素乙醇原料(孙逸和贺稚非2009), 同时也是一种可持续利用的高生物量资源。因此, 大面积种植开发南荻意义重大。

传统的南荻繁殖方法有种子繁殖、扦插繁殖等。南荻种子发芽力强, 外界条件合适就可迅速

定植发展成群落, 但其种子生命期短, 30~50 d内发芽率为85%~95%, 60 d后种子活力迅速下降。南荻扦插繁殖属于无性繁殖, 扦插苗入土过后, 笋芽迅速生长, 2个月左右株高可达2~3 m, 但是经过多代无性繁殖后, 易造成种性退化, 甚至病毒积累(刘亮1997)。南荻组培无性繁殖具有节约繁殖材料、繁殖速度快、繁殖系数大并可进行周年工厂化大批量生产等优点, 开发潜力巨大。南荻幼穗来源广, 取材方便, 接种操作简便, 出愈率与分化率高, 是南荻组织培养的最佳外植体。易自力等(2001)曾成功地诱导出南荻的愈伤组织并开展了遗传转化,

收稿 2011-07-28 修定 2011-08-25

资助 国家“973”前期研究专项(2010CB134403)和湖南省科技计划项目(2009FJ1004-2、2009WK4002和2011FJ3015)。

* 通讯作者(E-mail: langtaoxiao@163.com; Tel: 0731-84635261)。

但未对分化后的试管苗生根率及移栽成活率进行相关研究。本试验在前人基础上,研究了南荻的愈伤组织诱导、分化、生根直至得到南荻幼苗的整个过程,对南荻的再生体系进行了系统的研究与优化。以幼穗为外植体在MS基础培养基上添加不同种类、浓度的植物生长物质,得到了更好的试验结果。同时进行了不同基质对南荻幼苗移栽影响的研究,提高了幼苗的成活率。建立了一种稳定而高效的南荻组织培养与快繁技术体系,从而为南荻规模化生产及遗传改良提供了前提条件。

材料与方法

1 材料

供试材料为南荻(*Triarrhena lutarioriparia* L. Liu sp. nov.)‘突节荻’品种幼穗,由湖南沅江市芦苇研究所提供。

2 方法

2.1 外植体处理

本试验选取南荻幼穗作为外植体进行离体培养的研究。接种幼穗的最佳时期为颖花原基形成期(何立珍等1995),用70%酒精进行表面消毒,无菌剥离幼穗,整穗接种时的长度为1.0~1.5 cm。

2.2 培养基

本试验选用了MS为基本培养基。愈伤组织诱导及继代培养基为MS+2,4-D+6-BA+0.5 g·L⁻¹水解酪蛋白+0.5 g·L⁻¹脯氨酸,其中2,4-D浓度处理为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg·L⁻¹;6-BA浓度处理为0.1、0.2 mg·L⁻¹。30 d后统计不同植物生长物质浓度对比对南荻幼穗愈伤组织诱导的影响。10 d继代培养一次。

愈伤组织分化培养基为MS+NAA+KT+IAA+6-BA+0.5 g·L⁻¹水解酪蛋白+0.5 g·L⁻¹脯氨酸,NAA和IAA浓度为0.5 mg·L⁻¹,KT浓度为0、0.5 mg·L⁻¹,6-BA浓度为1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹。20 d后统计不同激素与浓度对芽诱导的影响。

生根培养基为MS+NAA+Met,NAA浓度为0、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹,Met浓度为0.25 mg·L⁻¹。10 d后统计不同激素与浓度对试管苗生根的影响。

上述培养基均添加3%的蔗糖和7.0 g·L⁻¹琼脂,pH值为5.8。培养温度(28±1) °C,愈伤组织诱导阶

段为暗培养,待愈伤组织长势良好,转移至分化培养基。诱导出芽点后采用光照培养,时间12 h·d⁻¹,光照强度30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹。分化出的无根幼苗转移到生根培养基上约10 d后长出新根。

2.3 练苗与移栽

生根培养20 d后,将完整试管苗移到与培养温度相同的温室中炼苗,打开瓶口,使嫩苗逐渐与外界接触,提高适应能力,保持较高的空气湿度。炼苗7 d后用镊子把苗从培养瓶中取出,用流水将根部的培养基冲洗干净,然后移入已消毒的基质中,本实验选用了3种基质:(1) $V_{\text{营养土}}:V_{\text{砂}}=1:1$;(2) $V_{\text{营养土}}:V_{\text{珍珠岩}}=1:1$;(3)纯砂。3 d内注意给幼苗喷施营养液,7 d内注意遮荫,并及时喷水保持湿度,30 d后记录其存活率。

实验结果

1 不同植物生长物质浓度对比对南荻幼穗愈伤组织诱导的影响

如表1所示,当2,4-D浓度较低时,愈伤组织出愈率较低且生长缓慢。随着2,4-D浓度的升高,出愈率有较大的提高。在2,4-D浓度为2.0 mg·L⁻¹,出愈率达到100%,而随着2,4-D浓度继续升高,出现了抑制愈伤组织生长的现象,诱导率随之下降。6-BA浓度为0.1 mg·L⁻¹时,诱导率略高。因此,2,4-D浓度为2.0 mg·L⁻¹、6-BA浓度为0.1 mg·L⁻¹时的浓度配比是本试验最适合的浓度。诱导出的愈

表1 不同植物生长物质浓度配比的培养基上愈伤组织诱导率

Table 1 Induction rate of callus on mediums with different concentrations of plant growth substance

生长物质浓度/mg·L ⁻¹		出愈率/%
2,4-D	6-BA	
1.0	0.1	73.33±2.72 ^d
1.5	0.1	85.83±3.19 ^b
2.0	0.1	100.00±0.00 ^a
2.5	0.1	80.00±2.72 ^c
3.0	0.1	15.83±7.39 ^f
1.0	0.2	65.00±1.92 ^e
1.5	0.2	82.50±4.19 ^{bc}
2.0	0.2	100.00±0.00 ^a
2.5	0.2	65.83±4.19 ^e
3.0	0.2	7.50±5.00 ^g

数字旁小写字母不同表示在0.05水平上差异显著,下表同。

伤组织有淡黄、黄褐、褐、浅紫、紫褐色, 其中淡黄色或浅紫色的胚性愈伤组织结构致密、色泽鲜

艳、成颗粒状, 增殖能力强。将其继代培养, 可以产生大量淡黄色致密型胚性愈伤组织(图1-A、B)。

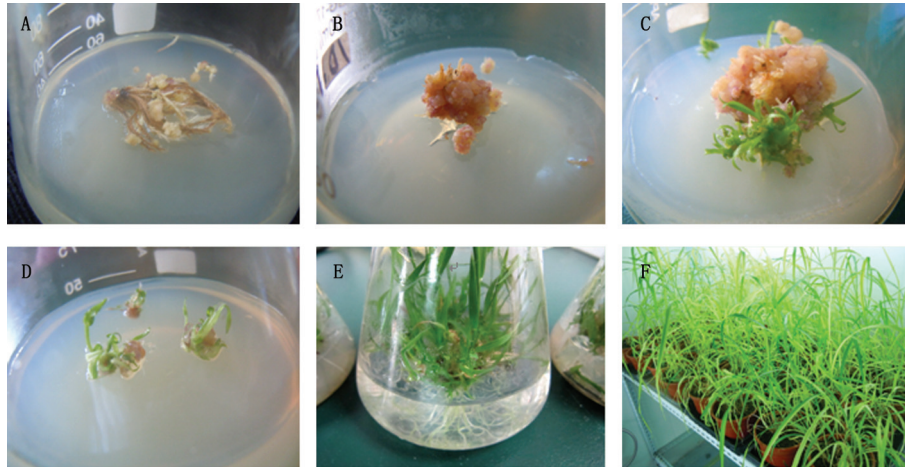


图1 南荻幼穗再生体系的建立

Fig.1 Establishment of plantlet regeneration system from young ears of *Triarrhena lutarioriparia*

A: 幼穗诱导培养20 d; B: 愈伤组织继代培养10 d; C: 愈伤组织分化培养10 d; D: 幼芽接种至生根培养基; E: 幼芽生根培养15 d; F: 生长在V_{营养土}:V_{珍珠岩}=1:1基质上的再生植株。

2 不同植物生长物质浓度对比对愈伤组织分化率的影响

将继代培养2~3次保持良好生长状态的愈伤组织转至MS培养基添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA和NAA以及不同浓度的6-BA和KT的分化培养基上, 统计不同处理对愈伤组织分化频率的影响, 结果如表2所示。6-BA浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 分化率较高, 加入KT后, 分化率明显提升, 最高的分化率达到了92.72%, 因此本实验确定MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白+ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脯氨酸为适宜的分化培养基。愈伤组织转移后7 d左右就出现绿芽点, 而后逐渐发育成丛芽(图1-C)。20 d后转入生根培养基。

3 不同植物生长物质浓度对比对试管苗生根的影响

将无根壮苗转入生根培养基中进行生根诱导(图1-D)。本试验在MS培养基基础上添加 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Met和不同浓度的NAA, 统计不同处理对试管苗生根的影响。从表3可以看出, NAA浓度过高或过低都不利于根的生长, 最适宜的浓度是 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此最适宜的生根培养基是MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Met。在此培养基中, $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下10 d后试管苗基部长出新根, 获得完整植株(图1-E)。

表2 不同植物生长物质浓度配比的培养基上愈伤组织分化率

Table 2 Differentiation rate of callus on mediums with different concentrations of plant growth substance

生长物质浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				分化率/%
6-BA	KT	IAA	NAA	
1.0	0	0.5	0.5	65.04 ± 1.11^e
2.0	0	0.5	0.5	75.16 ± 1.24^c
3.0	0	0.5	0.5	70.49 ± 2.25^d
1.0	0.5	0.5	0.5	80.75 ± 2.14^b
2.0	0.5	0.5	0.5	92.72 ± 1.11^a
3.0	0.5	0.5	0.5	76.62 ± 1.63^c

表3 不同植物生长物质浓度配比的培养基上试管苗生根率

Table 3 Rooting rate of regenerated plantlet on mediums with different concentrations of plant growth substance

生长物质浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		生根率/%
NAA	Met	
0	0.25	52.60 ± 0.99^d
1.0	0.25	92.42 ± 2.10^a
2.0	0.25	75.77 ± 2.96^b
3.0	0.25	69.67 ± 0.39^c

4 不同基质对试管苗移栽成活的影响

生根培养20 d后,将完整试管苗移到与培养温度相同的温室中炼苗,1周后从培养瓶中取出试管苗,用流水将根部的培养基冲洗干净,然后移入已消毒的基质中。在试验的几种基质中, $V_{\text{营养土}}:V_{\text{珍珠岩}}=1:1$ 炼苗成活率达到了100%,且幼苗生长迅速(图1-F), $V_{\text{营养土}}:V_{\text{砂}}=1:1$ 次之,纯砂存活率较低(表4)。南荻试管苗在炼苗的过程中,纯砂基质中的幼苗随着时间的延长成活率不断降低,30 d时间内下降了40%左右,分析其原因,可能是纯砂虽然透气性好但保水性较差,这说明南荻幼苗适宜生长在水分充足的环境中。营养土与砂混合虽然保水性好,但透气性与透水性一般,而营养土与珍珠岩混合则结合了保水性与透气性,适合南荻幼苗生长,幼苗成活率高。

表4 不同基质对试管苗移栽成活的影响

Table 4 Survival rate of the transplanting seedling on different base material

基质	成活率/%			
	5 d	10 d	15 d	30 d
砂	100	80	63	57
$V_{\text{营养土}}:V_{\text{珍珠岩}}$	100	100	100	100
$V_{\text{营养土}}:V_{\text{砂}}$	100	100	90	86

讨论

目前有关南荻组织培养和快速繁殖体系的研究报道很少。易自力等(2001)对南荻的组织培养及转基因方面进行了研究,其试验结果表明:幼穗是南荻组培的最佳外植体,CC培养基是南荻愈伤组织的最适培养基。本试验在其基础上,对南荻的再生体系进行了系统的研究与优化,以幼穗为外植体在MS基础培养基上添加不同植物生长物质,得到了更好的试验结果:南荻幼穗愈伤组织诱导率为100%,愈伤组织最高分化率达到92.72%,试管苗生根率为92.42%,试管苗移栽成活率为100%。南荻幼穗愈伤组织形成时间约为20 d,生长比较缓慢,这是由于南荻幼穗常分泌一种紫色物质,会影响愈伤组织的产生和活力,所以及时更换新鲜的诱导培养基,是诱导成功的关键。诱导出的愈伤组织有淡黄、黄褐、褐、浅紫和紫褐色,

淡黄色或浅紫色的胚性愈伤组织结构致密、色泽鲜艳、成颗粒状,增殖能力强,继代培养后能产生大量淡黄色致密型胚性愈伤组织。继代培养时可以适当调高6-BA的浓度,降低2,4-D的浓度。研究表明,在诱导过程中,2,4-D浓度应逐步降低,否则愈伤组织细胞不能成为胚胎细胞(王冬梅等1996)。在分化培养中,添加NAA、KT和IAA后,可以改进愈伤组织的质量(陈惠等2008;陈以峰等1998)。从外形上看,愈伤组织比较致密、较硬、颗粒状结构、易于分化。

胚性愈伤组织的培养时间也是一个重要问题。有研究报告认为,南荻幼穗愈伤组织在继代培养140 d左右,其分化能力下降50%(易自力等2001)。水稻的研究结果表明,不论成熟胚还是幼胚诱导的愈伤组织,继代均比不继代分化频率高(陈惠等2008)。本研究显示,愈伤组织从幼穗上剥离后继代2~3次,也就是20~30 d的胚性状态较好,色泽鲜艳,颗粒圆润紧凑,呈现出生长和分裂旺盛的趋势,是分化的最佳时期,分化率较高。

长期以来,南荻一直作为主要的造纸原料,而没有作为一种特色能源植物进行开发,南荻的细胞和组织培养研究也很少。本研究中以南荻幼穗作为培养材料,获得了较高的愈伤组织诱导、分化和生根率,筛选出了比较容易离体培养南荻幼穗的最适培养基,建立了一种稳定而高效的南荻组织培养与快繁技术体系,从而为南荻工厂化快速育苗及南荻遗传改良提供了技术支持,能够更加有效的开发利用南荻。

参考文献

- 陈惠,赵原,种康(2008).一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统.植物学通报,25(3):322~331
- 陈以峰,周辩,汤日圣,张金榆,梅传生(1998).水稻体细胞培养中胚性细胞出现与IAA的关系.植物学报,40(3):474~477
- 何立珍,周朴华,刘选明,曹学军,曹明德(1995).荻不同外植体离体培养研究.西北植物学报,15(4):307~313
- 刘亮(1997).中国植物志(荻属).北京:科学出版社,10(2):19~26
- 刘亮,朱明,朱太平(2001).芒荻类植物资源的开发和利用.自然资源学报,16(6):562~563
- 孙逸,贺雅非(2009).纤维素发酵生产酒精的研究进展.农产品加工,(4):70~73
- 王冬梅,黄学林,黄上志(1996).细胞分裂素类物质在组织培养中的作用机理.植物生理学报,32(5):373~377
- 易自力,周朴华,储成才,李祥,田文忠,王力,曹守云,唐梓舜(2001).南荻遗传转化系统的建立及转基因植株的获得.高技术通讯,(4):20~24