

杂交狼尾草胚性愈伤组织的诱导与植株再生

刘逸泠, 祝建波*

石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室, 新疆石河子 832003

摘要: 以杂交狼尾草初级愈伤为材料, 运用方差分析的方法研究不同因素对杂交狼尾草胚性愈伤诱导率与植株再生率的影响。结果发现, 2,4-D和TDZ对杂交狼尾草胚性愈伤诱导影响显著, 最佳的胚性愈伤诱导培养基为MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ TDZ, 诱导率为54%; 愈伤分化培养基以附加0.1 mg·L⁻¹ TDZ+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA +3.2 mg·L⁻¹ CuSO₄的MS培养基为最佳, 再生率为68.33%, 褐化率为8.33%; 分化培养基中添加0.8~3.2 mg·L⁻¹的CuSO₄均能促进杂交狼尾草愈伤组织分化, 而添加AgNO₃对杂交狼尾草愈伤分化无显著影响。该技术为离体诱变获得杂交狼尾草低温种质材料奠定了基础。

关键词: 杂交狼尾草; 胚性愈伤组织; 诱导; 植株再生

Embryonic Callus Induction and Plant Regeneration from *Pennisetum* Hybrid

LIU Yi-Ling, ZHU Jian-Bo*

Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China

Abstract: In order to obtain *Pennisetum* hybrid low temperature material by induced mutation *in vitro*, primary callus of *Pennisetum* hybrid were used to investigate factors that affect callus induction and plant regeneration. The experiment results indicated that there was a significant effect of 2,4-D and TDZ on embryonic callus induction and plant regeneration of *Pennisetum* hybrid. The suitable embryonic callus induction culture medium was MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ TDZ, induction rate was 54%; MS+0.1 mg·L⁻¹ TDZ+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA +3.2 mg·L⁻¹ CuSO₄ was optimal to plant regeneration; regeneration rate was 68.33%, browning rate was 8.33%. The addition of 0.8–3.2 mg·L⁻¹ CuSO₄ in differentiation culture medium improved the regeneration of shoots, but the addition of AgNO₃ couldn't improve the regeneration of shoots.

Key words: *Pennisetum* hybrid; embryonic callus; induction; plant regeneration

杂交狼尾草(*Pennisetum americanum* × *P. purpureum*)禾本科狼尾草属, 是四倍体象草(*Pennisetum purpureum* Schum)和二倍体美洲狼尾草[*Pennisetum alopecuroides* (L.) Spreng]种间杂交后代, 三倍体后代不结实, 生产上通常用无性繁殖或杂交一代种子繁殖(陈志彤等2006)。杂交狼尾草结合了双亲的优良性状具有明显的杂种优势, 在长江中下游广泛种植。然而, 杂交狼尾草不耐寒耐冻, 遇到霜冻天气如果未进行覆盖处理, 则容易死亡, 给生产上造成了严重损失。因此筛选培育杂交狼尾草耐低温材料对解决生产实际问题具有重要的意义。

离体诱变是获得耐低温材料的重要途径之一(马三梅和王永飞2005), 而离体诱变的前提是建立遗传性稳定、再生效率高的再生体系。虽然有大量文献报道了如美洲狼尾草(Vasil和Vasil 1981)、象草(Haydu和Vasil 1981)、绒毛狼尾草(*Pennisetum*

setaceum) (缪珊和范继红2011)、御谷(*Pennisetum glaucum*) (Goldman等2003)等狼尾草属植物组织培养和植株再生, 但杂交狼尾草组织再生培养文献报道相对较少, Vasil和Vasil (1981)首次用美洲狼尾草再生体系获得了杂交狼尾草再生苗, 而后王凭青等(2005)与谢好和张子雯(2012)以杂交狼尾草茎节、顶芽为外植体也成功获得再生苗。杂交狼尾草作为禾本科杂交种比普通禾本科植物再生更为困难(刘芳等2010), 谢好和张子雯(2012)的研究也发现获得的杂交狼尾草愈伤普遍存在分化率低再生苗量少、易出现内生菌污染等问题, 进一步研究提高杂交狼尾草愈伤组织诱导再生绿苗的频率成为当前杂交狼尾草基因工作中需要解决的

收稿 2014-11-12 修定 2014-11-24

资助 国家自然科学基金(31160049和31360053)。

* 通讯作者(E-mail: zjbshz@126.com; Tel: 15199586884)。

重要课题。通过杂交狼尾草成熟种子可诱导出形态稳定、内生菌污染率低、适合进行下一阶段实验的初级愈伤(龚束芳等2010), 本文以该途径诱导出的初级愈伤为材料, 探讨胚性愈伤组织诱导和分化的影响因素, 为离体诱变获得杂交狼尾草低温材料奠定基础。

材料与方法

1 实验材料

实验材料为杂交狼尾草(*Pennisetum americanum* × *P. purpureum*)初级愈伤, 保存于石河子大学农业生物技术重点实验室。

2 杂交狼尾草胚性愈伤组织的诱导

将生长15~20 d白色质地较软的初级愈伤放在诱导培养基上进行胚性愈伤诱导, 诱导培养基为: MS +30 g·L⁻¹蔗糖+7.8 g·L⁻¹琼脂粉, pH 5.8, 同时添加不同种类和浓度的激素。激素的种类为因素, 激素的浓度为水平, 采用L₁₆(4³)正交设计的方法形成16个处理(表1), 每个处理接种50块初级愈伤, 设3次重复, 于25 °C黑暗条件下进行胚性愈伤诱导, 每30天更新一次培养基, 90 d后统计胚性愈伤诱导率, 选出最佳的诱导培养基激素配比。诱导率(%)=诱导出的胚性愈伤数/接种初级愈伤数×100%。

表1 胚性愈伤诱导的因素与水平

Table 1 Factors and levels of of embryonic callus induction

水平	因素		
	2,4-D/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹	TDZ/mg·L ⁻¹
1	1.5	0.1	0.1
2	3.0	0.2	0.2
3	4.5	0.3	0.3
4	6.0	0.4	0.4

3 杂交狼尾草愈伤的分化

将诱导出的胚性愈伤放在分化培养基上诱导分化绿苗, 分化培养基为: MS +0.1 mg·L⁻¹TDZ+0.2 mg·L⁻¹6-BA+30 g·L⁻¹蔗糖+7.8 g·L⁻¹琼脂粉, pH 5.8, 同时添加不同浓度的TDZ和6-BA。以TDZ和6-BA为因素, 以它们各自不同的浓度为水平, 采用L₁₆(2⁴)正交设计的方法形成16个处理(表2), 每个处理接种20块胚性愈伤, 3次重复, 置于25 °C冷光源下培养(O'Kennedy等2004), 光照时间16 h·d⁻¹, 光照强

表2 愈伤分化的因素与水平

Table 2 Factors and levels of callus differentiation

水平	因素	
	TDZ/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹
1	0.05	0
2	0.10	0.1
3	0.15	0.2
4	0.20	0.4

度36 μmol·m⁻²·s⁻¹, 30 d后统计再生率, 选出最佳的激素配比。再生率(%)=再生苗的愈伤数/接种胚性愈伤数×100%。

杂交狼尾草酚类化合物含量较高(宣朴等2001), 绿色小芽从愈伤上掰下时形成的伤口极易产生醌类化合物引起褐化抑制生长, 因此实验中在1/2MS生根状苗培养基中添加0.5 g·L⁻¹活性炭抑制绿色芽体和培养基褐化。将生长旺盛、根系发达的杂交狼尾草试管苗在室温下炼苗3~4 d, 移栽至有机土中, 移栽过程中剪去发黄发褐的叶子, 注意幼苗的保温保湿, 光照时间16 h·d⁻¹, 光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹, 培养温度28 °C。

4 CuSO₄和AgNO₃对愈伤分化的影响

为了明确CuSO₄和AgNO₃对杂交狼尾草愈伤分化的影响及适宜的浓度, 以胚性愈伤为材料, 在分化培养基中分别加入浓度为0、0.8、1.6、3.2和8.0 mg·L⁻¹的CuSO₄和浓度为0、0.8、1.6、3.2和8.0 mg·L⁻¹的AgNO₃, 对CuSO₄和AgNO₃分别进行单因子梯度实验, 30 d后统计再生率和褐化率。褐化率(%)=褐化愈伤数/接种愈伤数×100%。

实验结果

1 胚性愈伤组织的诱导

将杂交狼尾草初级愈伤放在诱导培养基上诱导胚性愈伤, 在不同种类和浓度的激素下, 胚性愈伤诱导率有明显的不同, 表3显示了正交设计的结果, 最高诱导率达到54%, 最低诱导率为24%。极差分析可知, 各因素不同水平对诱导率的影响大小为2,4-D>TDZ>6-BA, 最优诱导培养基激素配比为3.0 mg·L⁻¹2,4-D +0.4 mg·L⁻¹6-BA +0.2 mg·L⁻¹TDZ。

同时对诱导率反正弦转换值方差分析, 可知

表3 胚性愈伤诱导的正交实验结果

Table 3 The orthogonal test results of embryonic callus induction

处理	因素			初级愈伤数/个	诱导率/%
	2,4-D/ mg·L ⁻¹	6-BA/ mg·L ⁻¹	TDZ/ mg·L ⁻¹		
1	1 (1.5)	1 (0.1)	1 (0.1)	50	38
2	1	2 (0.2)	2 (0.2)	50	40
3	1	3 (0.3)	3 (0.3)	50	26
4	1	4 (0.4)	4 (0.4)	50	34
5	2 (3.0)	1	2	50	54
6	2	2	1	50	48
7	2	3	4	50	36
8	2	4	3	50	52
9	3 (4.5)	1	3	50	36
10	3	2	4	50	30
11	3	3	1	50	42
12	3	4	2	50	46
13	4 (6.0)	1	4	50	28
14	4	2	3	50	24
15	4	3	2	50	40
16	4	4	1	50	32

表中数据为3次重复平均值,表3同此。

在杂交狼尾草胚性愈伤诱导中2,4-D对胚性愈伤诱导有极显著影响, TDZ对胚性愈伤诱导有显著影响, 6-BA对胚性愈伤诱导无显著影响。2,4-D和TDZ各浓度间差异达显著水平, 2,4-D为3.0 mg·L⁻¹时与6.0 mg·L⁻¹水平形成极显著差异, 与1.5 mg·L⁻¹水平形成显著差异; TDZ为0.2 mg·L⁻¹时与0.4 mg·L⁻¹水平形成显著差异。

诱导培养基中2,4-D浓度水平为3.0 mg·L⁻¹时杂交狼尾草愈伤变化明显, 这个浓度水平下愈伤表面无褐化出现, 从乳白色、没有结构、水分含量高的初级愈伤组织(图1-A)转为松散半透明、有结节状颗粒、水分含量依旧高的非正常的愈伤组织(图1-B); 黑暗条件下继代培养5~6周后, 半透明湿润结节状的愈伤部分变的干燥, 部分转为乳黄色、排列紧凑的愈伤(图1-C), 而这些乳黄色不停增殖, 最后形成一整块颗粒明显、干燥易脆、排列紧凑淡黄色或乳白色的胚性愈伤组织(图1-D), 这时胚性愈伤表面出现明显的绿色芽点。

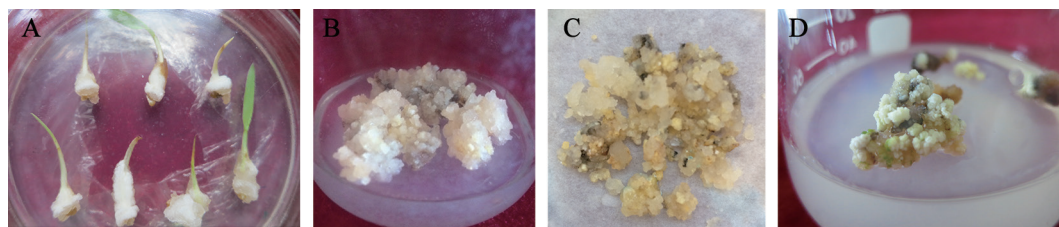


图1 胚性愈伤组织的诱导

Fig.1 Embryonic callus induction of *Pennisetum americanum* × *P. purpureum*

A: 初级愈伤组织; B~C: 诱导胚性愈伤组织, 其中B为中间态愈伤, C为胚性愈伤组织增殖; D: 胚性愈伤组织。

2 杂交狼尾草愈伤的分化

2.1 TDZ和6-BA对愈伤分化的影响

将杂交狼尾草胚性愈伤放在分化培养基上诱导愈伤分化再生, 在不同种类和浓度的激素下, 胚性愈伤再生率有明显的不同, 表4显示了正交设计的结果, 最高再生率达到61.67%, 最低诱导率为26.67%。极差分析可知, 各因素不同水平对诱导率的影响大小为TDZ>6-BA, 最优诱导培养基激素配比为0.1 mg·L⁻¹ TDZ+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA。

同时对再生率反正弦转换值方差分析, 可知在杂交狼尾草愈伤分化中TDZ对愈伤分化有极显著影响, 6-BA对胚性愈伤诱导有显著影响。同时, TDZ各浓度间差异达显著水平, TDZ为0.1 mg·L⁻¹

时与其他3个水平浓度形成极显著差异。

2.2 CuSO₄和AgNO₃对愈伤分化的影响

实验结果表明培养基中CuSO₄添加浓度为8.0 mg·L⁻¹再生率最低, 褐化率最高, 其再生率和褐化率与其他4个处理有显著差异; CuSO₄添加浓度在0.8~3.2 mg·L⁻¹差异不显著, 但CuSO₄浓度为3.2 mg·L⁻¹时, 再生率均值最大, 褐化率均值较低, 因此最适CuSO₄添加浓度为3.2 mg·L⁻¹(图2-A)。在愈伤分化培养基中添加不同浓度水平的AgNO₃, 从再生率均值来看, 不含AgNO₃时, 杂交狼尾草植株再生率最高, 各处理间褐化率差异不显著(图2-B)。

2.3 杂交狼尾草再生苗的获得

胚性愈伤在分化培养基上培养20 d后可看到

表4 愈伤分化的正交实验结果

Table 4 The orthogonal test results of callus differentiation

处理	因素		愈伤数/个	再生率/%
	TDZ/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹		
1	1 (0.05)	1 (0)	20	26.67
2	1	2 (0.1)	20	38.33
3	1	3 (0.2)	20	33.33
4	1	4 (0.4)	20	28.33
5	2 (0.10)	1	20	38.33
6	2	2	20	53.33
7	2	3	20	61.67
8	2	4	20	56.67
9	3 (0.15)	1	20	45.00
10	3	2	20	50.00
11	3	3	20	46.67
12	3	4	20	48.33
13	4 (0.20)	1	20	40.00
14	4	2	20	48.33
15	4	3	20	50.00
16	4	4	20	50.00

明显的绿色丛生芽(图3-A), 待绿芽长至1~2 cm高, 及时掰下置于生根培养基中生根壮苗(图3-B), 丛生芽在生根壮苗阶段生长较为迅速, 15 d左右可长至6~7 cm高, 而后将长出根系的试管苗(图3-C)在室温下炼苗3~4 d, 移栽至土里(图3-D), 幼苗移栽成活率可达100%。

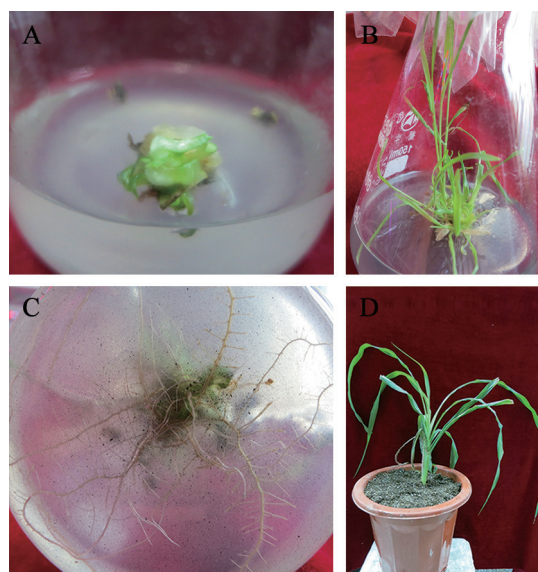
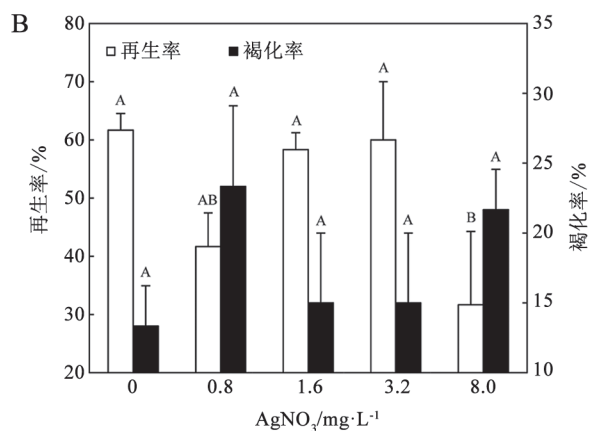
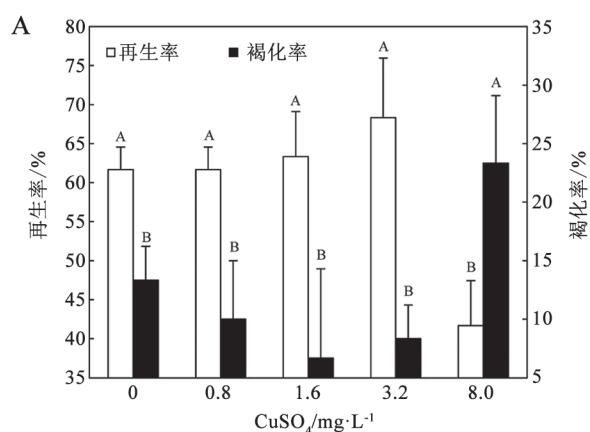


图3 愈伤的分化和植株再生

Fig.3 Callus differentiation and plant regeneration of *Pennisetum americanum* × *P. purpureum*

A: 愈伤组织形成芽; B: 生长15 d的丛生芽; C: 生根; D: 移栽至土里生长3个月的成苗。

图2 CuSO₄和AgNO₃对愈伤组织分化的影响Fig.2 CuSO₄ and AgNO₃ effect on callus differentiation

不同字母表示在 $P < 0.01$ 水平有显著差异。

讨 论

狼尾草属植物愈伤组织诱导中, 2,4-D通常是起着决定作用的激素(缪珊和范继红2011; O'Kennedy等2004)。实验中发现, 不论2,4-D浓度的高低均能诱导杂交狼尾草胚性愈伤, 但在形成胚性愈伤的过程中, 低浓度的2,4-D使白色初级愈伤表面出现轻微褐化, 乳黄色颗粒状的胚性愈伤出现在褐化的愈伤中心部位, 而这个浓度下形成的胚性愈伤团较小, 形成的胚性愈伤少; 高浓度的2,4-D使初级愈伤组织不停分化或严重褐化, 少量初级愈伤诱导成胚性愈伤, 这个浓度下形成的胚性愈伤较难出苗; 分析其原因, 与2,4-D在诱导胚状体中具有双重效应有关(崔凯荣和戴若兰2000), 低浓度的2,4-D无法顺利启动胚状体发生中胚胎蛋白合成的早期反应, 而高浓度的2,4-D会造成胚性细胞无法正常发育。

在诱导植物愈伤组织时, 2,4-D也通常与其他植物生长素类或细胞分裂素类物质一起使用(李文静等2012), Goldman等(2003)在御谷愈伤分化培养基中添加TDZ成功获得御谷苗, 目前TDZ在狼尾草属植物组培中的应用报道较少。本实验采用2,4-D与TDZ共同诱导胚性愈伤, 数据表明 TDZ 的使用在一定程度上能够增加了愈伤的体细胞胚的形成率; 而在愈伤组织分化绿苗阶段, TDZ对愈伤分化出芽有极显著影响, 与6-BA结合使用时, 低浓度的TDZ促进胚性愈伤分化出芽, 随着TDZ浓度的升高, 分化出的幼芽出现褐化死亡的现象; TDZ单独使用时, 易使胚性愈伤表面绿色芽点消失, 继续增殖, 说明低浓度的TDZ与6-BA对杂交狼尾草愈伤分化有很好的协同促进作用。

铜和银元素对器官分化有影响, 在水稻等禾本科愈伤组织培养再生植株过程中有促进作用(袁玲2003)。实验发现向杂交狼尾草愈伤分化培养基中添加浓度为 $0.8\sim 3.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CuSO_4 均能促进杂交狼尾草植株的再生, 而愈伤的褐化率也会一定程度的降低; 当我们供给一定剂量 AgNO_3 时, 绿苗再生率则无明显变化。说明添加适当浓度的 CuSO_4 能促进杂交狼尾草植株的再生, 而 AgNO_3 则无明显作用。

参考文献

陈志彤, 应朝阳, 林永生, 黄毅斌(2006). 杂交狼尾草的栽培技术与利用价值. 福建农业科技, (2): 44~45
崔凯荣, 戴若兰(2000). 植物体细胞胚发生的分子生物学. 北京: 科学出版社

龚束芳, 张瀚俪, 张晓莹, 康英(2010). 狼尾草成熟种子的无菌播种与组织培养. 植物生理学通讯, 46 (6): 611~612
李文静, 李学强, 贾毛毛, 唐洪梅, 宋乾江, 连少英(2012). 6-BA、NAA和2,4-D不同对比对芥菜愈伤组织诱导、生长及植株再生的影响. 植物生理学报, 48 (2): 141~146
刘芳, 周翠红, 李丽雅, 侯文卓, 王强, 郭蔼光, 刘香利(2010). 不同遗传背景小麦成熟胚再生体系的初步研究. 麦类作物学报, 30 (1): 39~42
马三梅, 王永飞(2005). 植物驯化、传统育种和基因工程育种. 世界农业, (6): 47~48
缪珊, 范继红(2011). 绒毛狼尾草幼穗的愈伤组织诱导与植株再生. 安徽农业大学学报, 38 (2): 255~258
王凭青, 段传人, 王伯初, 周兴龙, 谢伟伟(2005). 杂交狼尾草不同外植体材料组织培养实验. 重庆大学学报(自然科学版), 28 (6): 118~120
谢好, 张子雯(2012). 杂交狼尾草离体培养植株再生体系的建立. 宜春学院学报, 34 (12): 97~99
宣朴, 徐利远, 岳春芳, 尹春蓉(2001). 皇竹草组织培养再生植株研究. 中国草地, 23 (1): 41~45
袁玲(2003). 铜、银元素对水稻愈伤组织绿苗分化率的作用. 湖北农业科学, (1): 17~18
Goldman JJ, Hanna WW, Fleming G, Ozias-Akins P (2003). Fertile transgenic pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence-, and immature embryo-derived embryogenic tissues. Plant Cell Rep, 21 (10): 999~1009
Haydu Z, Vasil IK (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum.. Theor Appl Genet, 59 (5): 269~273
O'Kennedy MM, Burger JT, Botha FC (2004). Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase. Plant Cell Rep, 22: 684~690
Vasil V, Vasil IK (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and the *Pennisetum americanum* × *Pennisetum purpureum* hybrid. Amer J Bot, 68 (6): 864~872