

# 肯塔基草地早熟禾愈伤组织的诱导及再生体系的建立

丁路明<sup>1,2</sup>, 龙瑞军<sup>1,3</sup>, 王长庭<sup>1</sup>

(1. 中科院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**以肯塔基草地早熟禾成熟种子为外植体, 研究了影响愈伤组织诱导、分化以及再生苗生根、移栽的主要因素, 建立了肯塔基草地早熟禾高频再生体系。结果表明, 在 MS 培养基上, 低浓度的 BA (0.1 mg/L) 配合 2,4-D (3.0 mg/L) 诱导肯塔基草地早熟禾种子出愈率达到 74.9 ± 7.35%; 0.1 mg/L 2,4-D 在 SH 培养基上诱导愈伤组织分化成芽, 分化率平均每块愈伤可达 8.1 ± 0.36 个芽; 最适生根条件为 1/2MS + 1.0 mg/L NAA。

**关键词:**早熟禾; 愈伤组织; 再生体系

**中图分类号:** S688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6311(2005)03-0031-06

**Callus Induction and Establishment of the Plant Regeneration System of Kentucky bluegrass.** DING Lu-ming<sup>1,2</sup>, LONG Rui-jun<sup>1,3</sup>, WANG Chang-ting<sup>1</sup> (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Xining 810001, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Department of Grassland Sciences, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China): *Grassland of China*, No. 3, 2005, pp. 31 ~ 36.

**Abstract:** The main factors which influence the callus induction, differentiation, rooting and transplant of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) from mature seeds were studied. The plant regeneration system has been established. The results showed that the callus inducing ratio reached 74.9 ± 7.35% on the MS medium containing 3.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L 6-BA. 8.1 ± 0.36 sprouts per callus could be obtained in SH medium containing 0.1 mg/L 2,4-D. The optimum condition for rooting was 1/2MS + 1.0 mg/L NAA.

**Key words:** Bluegrass; Callus; Regeneration system

早熟禾属植物是一年生或多年生禾本科牧草和草坪草, 具有兼性无融合生殖特性, 以地下茎生长为主, 是世界范围广泛种植的重要草坪草和牧草<sup>[1,2]</sup>。草地早熟禾有一些突出的缺点, 如生长缓慢、叶量少、易感病、不抗虫、耐高低温性能差、季节变换时易变黄、抗

收稿日期: 2004-11-07; 修回日期: 2005-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(30371021)、中国科学院“百人计划”项目、教育部博士学科点专项科研基金(20040733004)

作者简介: 丁路明(1977-), 男, 博士研究生。

旱力不强<sup>[3]</sup>等,因此,需要对其进行品种改良。通过组织培养技术建立高效早熟禾再生体系,是应用生物技术手段改良和培育早熟禾品种的前提和基础。在组织培养过程中,愈伤组织和胚状体的形成是能否培育出新植株的关键一步。1984年,McDonnell和Conger从早熟禾成熟种子成功地诱导愈伤组织并得到再生植株<sup>[4]</sup>。此后,人们通过幼穗培养<sup>[5]</sup>、胚芽鞘<sup>[6]</sup>、原生质体培养<sup>[7]</sup>等方式获得了再生植株。在基因工程育种过程中,不论是用基因枪,还是通过农杆菌介导的转基因,都需要细胞的脱分化、再分化等过程。本试验以肯塔基草地早熟禾成熟种子作为外植体培养,诱导愈伤组织和芽,探索不同植物生长调节剂对愈伤组织、芽和根诱导的影响,建立高效再生体系,为分化培养提供有效材料,并为肯塔基草地早熟禾基因工程育种奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

以草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 品种 kentucky (引自澳大利亚) 成熟种子为外植体。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 种子发芽试验

选取饱满的肯塔基草地早熟禾种子置于铺有湿润滤纸的培养皿(=9cm)中,每皿80~100粒,共5皿。置于25℃培养箱中,黑暗培养,每天观察记录并保持滤纸湿润,2周后统计出芽率。

#### 1.2.2 愈伤组织的诱导

筛选早熟禾种子,去除杂质,用干净纱布包住在自来水下冲洗30min,然后置于体积比分数为50%的硫酸中搅拌30min,自来水下洗净。在超净工作台上,以70%(体积比)的酒精消毒30~40s,无菌水冲洗3~5次,再用0.1%升汞溶液消毒3~4min,无菌水冲洗8~10次,将消毒后的种子接种于愈伤组

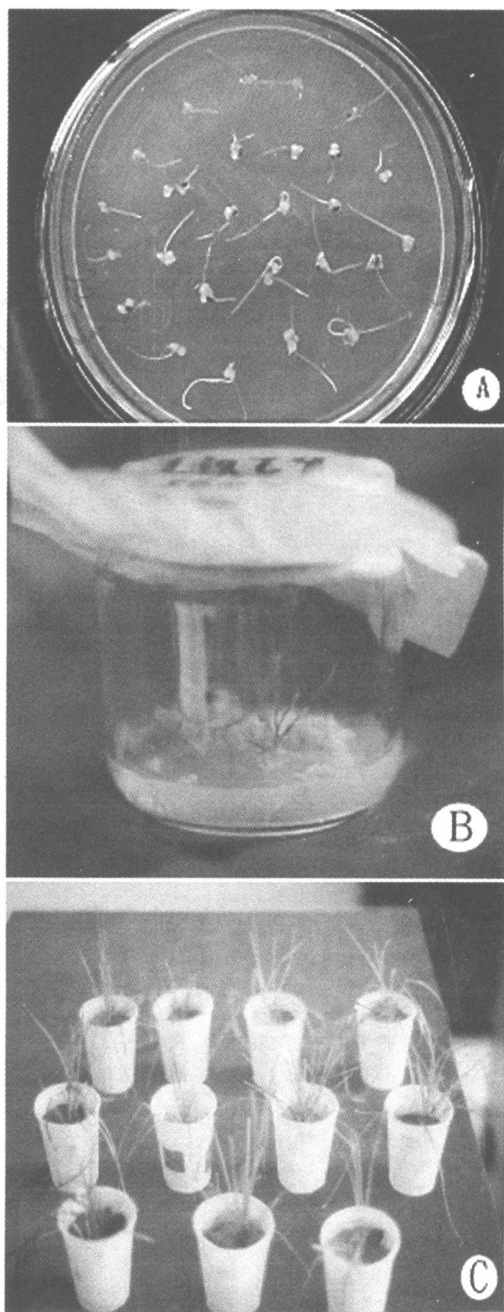


图 1 愈伤组织诱导、芽的分化和组培苗移栽  
Fig. 1 Callus induction, plant regeneration and tube-plant transfer testing

A 为成熟种子诱导 2 周后形成的愈伤组织;

B 为 5 周后形成的小苗;C 为组培苗转移到土壤。

织诱导培养基上,于 25℃ 黑暗培养,3 周继代一次,6 周后统计愈伤组织诱导率。

### 1.2.3 愈伤组织分化

选取淡黄色、块状愈伤组织转接到含有激素的分化培养基上,置于培养室内,给予 16h 光照,光照强度 2000~3000lx,日间温度 25℃,夜间温度 18℃,诱导分化成芽。

### 1.2.4 再生苗的生根和移栽

分化培养基上的芽长至 3 叶期时,转移到生根培养基上进行生根培养,培养条件同分化培养。生根培养基为 1/2MS 培养基,附加不同浓度的 NAA。当大量根出现,并长至 2~3cm 时,进行移栽。选取根量丰富、生长健壮的组培苗进行移栽。移栽前,在温室内打开瓶口封口膜,在有菌环境下锻炼 1 周,期间保持温室内湿度 70% 以上。将炼苗后的早熟禾幼苗从培养基中取出,在 23~25℃ 的温水中洗净根部的培养基,转入无菌沙质土壤中,注意

器皿的消毒。驯化过程中,要逐渐降低室内的湿度,使幼叶逐渐形成蜡质,产生表皮毛,降低气孔开口度,逐渐恢复气孔功能,减少水分散失,促进新根的发生,以适应周围环境。

## 2 结果与分析

### 2.1 肯塔基草地早熟禾种子愈伤组织的诱导

#### 2.1.1 不同培养基和 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

发芽实验中,2 周后统计种子发芽率为 97%。表 1 列出了肯塔基草地早熟禾种子在不同培养基 MS 和 N6 上愈伤组织诱导的结果。接种 2 周后,种子被诱导出畸形芽,并出现乳白色愈伤组织(图 1)。试验表明肯塔基草地早熟禾种子在含有不同浓度 2,4-D 的 MS 和 N6 培养基中诱导愈伤组织差异明显( $P < 0.05$ ),MS 培养基的诱导效果要好于 N6 培养基。

表 1 不同浓度 2,4-D 和培养基对肯塔基草地早熟禾愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different concentrations of 2,4-D and media on callus induction of Kentucky (*Poa pratensis* L.)

基本培养基	2,4-D (mg/L)	接种数/个	出愈数/块	出愈率(%)	愈伤组织状态	愈伤组织质量
MS	1.0	89	41	46.1 ±4.81	乳白色,团状	+
	2.0	94	61	64.9 ±15.98	乳白色,团状	+
	3.0	88	56	63.6 ±21.92	浅白色,粒状	+++
	4.0	90	55	61.1 ±9.05	暗白色,块状	++
N6	1.0	102	26	25.5 ±8.34	乳白色,粘稠状	+
	2.0	126	52	41.3 ±5.79	乳白色,粘稠状	+
	3.0	142	49	34.5 ±8.91	乳白色,粘稠状	+
	4.0	153	51	32.3 ±3.11	乳白色,团状	+

注:“+”越多表明愈伤组织质量越好,下表同;基本培养基为(MS 或 N6) + 3%蔗糖 + 0.7%琼脂, pH = 5.8。

#### 2.1.2 不同 2,4-D 和 6-BA 浓度组合对愈伤组织诱导的影响

细胞分裂素与生长素的种类对不同植物的敏感性不同,因此激素种类的选择应以植物种类而异。同一植物的不同组织在愈伤组

织诱导和芽分化过程中对激素的要求不同,所要求的水平取决于其内源激素的水平。由表 2 可以看出,2,4-D 附加低浓度 6-BA 可以显著提高诱导率,愈伤组织质量明显提高,当 2,4-D 浓度 3.0mg/L,6-BA 浓度为

0.1mg/L 时,出愈率达到 74.9 ±7.35 %,诱导的愈伤组织质量也最好(图 1)。2,4 - D

和 6 - BA 之间的交互效应对肯塔基草地早熟禾愈伤组织诱导影响显著(P < 0.05)。

表 2 不同 2,4 - D 和 6 - BA 浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different concentrations combining with 2,4 - D and 6 - BA on callus induction

处理	激素组成 (mg/L)		接种数/个	出愈数/块	出愈率 (%)	愈伤组织状态	愈伤组织质量
	2,4 - D	6 - BA					
1	1.0	0.1	303	197	65.0 ±6.22	乳白色,块状	+
2	2.0	0.1	239	160	66.9 ±2.69	淡黄色,颗粒状	+++
3	3.0	0.1	311	233	74.9 ±7.35	淡黄色,颗粒状	+++
4	1.0	0.2	306	204	66.7 ±2.26	淡黄色,块状	++
5	2.0	0.2	227	108	47.4 ±4.95	淡黄色,块状	++
6	3.0	0.2	241	141	58.5 ±0.99	淡黄色,颗粒状	+++
7	1.0	0.3	206	91	44.3 ±5.80	乳白色,块状	++
8	2.0	0.3	271	121	44.8 ±7.21	淡黄色,颗粒状	+++
9	3.0	0.3	233	79	33.7 ±2.26	淡黄色,颗粒状	+++

## 2.2 肯塔基草地早熟禾愈伤组织的分化

### 2.2.1 不同培养基对愈伤组织分化的影响

将诱导出的肯塔基草地早熟禾胚性愈伤组织转移到含有 0.1mg/L 2,4 - D 的 MS 和 SH 培养基,诱导分化。20d 继代一次,60d 后统计分化率(平均每块愈伤的分化芽数)。两种培养基在诱导愈伤组织分化方面差异显著(P < 0.05),SH 的效果好于 MS 培养基(表 3)。

表 3 不同基本培养基对愈伤组织分化的影响

Table 3 The effect of different medium on callus differentiation

基本培养基	接种愈伤组织数(个)	诱导出的总芽数(个)	平均分化芽数 SD(个)
SH	61	494	8.1 ±0.36a
MS	52	187	3.6 ±1.25b

注:基本培养基为 (MS 或 SH) + 3 % 蔗糖 + 0.7 % 琼脂;pH = 5.8。

### 2.2.2 不同浓度 2,4 - D 对愈伤组织分化

的影响

低浓度生长素可诱导芽的分化。将肯塔基草地早熟禾的愈伤组织转移到含有不同浓度 2,4 - D 的 SH 培养基中,诱导芽的分化。不同 2,4 - D 浓度间差异显著(P < 0.05)。当 2,4 - D 浓度为 0.1mg/L 时,分化率最高,组培苗生长健康(图 2)。

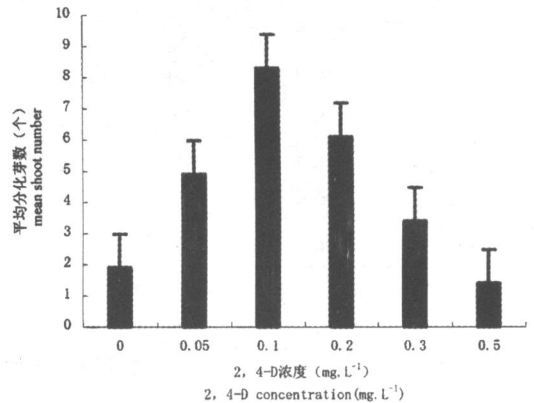


图 2 不同 2,4 - D 浓度对愈伤组织分化的影响

Fig. 2 The effect of 2,4 - D concentration on callus differentiation

### 2.2.3 NAA 和 6 - BA 不同浓度组合对愈伤组织诱导的影响

适宜的生长素与细胞分裂素浓度配比,是诱导愈伤组织分化芽的关键。高浓度的细胞分裂素与低浓度的生长素配比适宜诱导芽的分化。将肯塔基草地早熟禾的胚性愈伤组织接入含有不同 NAA 和 6 - BA 浓度配比的 SH 培养基,诱导芽的分化。表 4 的结果表明,低浓度的 NAA 配合高浓度的 6 - BA 可以提高愈伤组织的分化率。

### 2.3 再生苗的生根、移栽

将诱导分化的肯塔基草地早熟禾 3 叶期幼芽转移到含有不同浓度 NAA 的诱导生根培养基 1/2 MS 上,每 15d 继代一次,30d 后统计结果如图 3 所示。当 NAA 浓度为 1.0mg/L 时,生根率达到 74.9%,诱导出的根健壮、数量多,不同浓度间诱导效果差异显著 ( $P < 0.05$ )。

选择生长健壮、根量多的组培苗进行移栽,移栽成活率达到 97%。

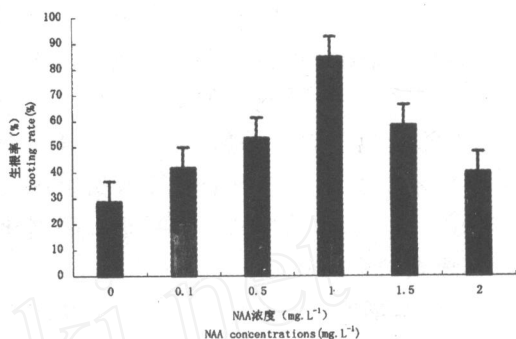


图 3 不同 NAA 浓度对幼苗生根的影响

Fig.3 The effect of different NAA concentrations on rooting frequency

## 3 讨论

早熟禾是一种重要的牧草和草坪草,具有无融合生殖特性,进行组织培养比较困难,关于早熟禾组织培养的报道也比较少。禾本科植物和豆科植物相比,进行组织培养要困难的多<sup>[8]</sup>。植物组织培养过程中常加入植物

表 4 不同 NAA 和 6 - BA 浓度对比对愈伤组织分化的影响

Table 4 The effect of different combination of NAA and 6 - BA on callus differentiation

培养基序号	植物激素(mg/ L)		接种愈伤组织数(个)	诱导出的总芽数(个)	平均分化芽数 SD(个)
	NAA	6 - BA			
C <sub>3</sub>	0.3	2	59	283	4.8 ±0.44a
C <sub>6</sub>	0.4	3	52	236	4.5 ±0.44ab
C <sub>2</sub>	0.5	2	35	152	4.3 ±0.89b
C <sub>4</sub>	0.2	1	48	158	3.3 ±0.36c
C <sub>5</sub>	0.4	1	45	117	2.6 ±0.62d
C <sub>7</sub>	0	2	40	92	2.3 ±0.66d
C <sub>1</sub>	0	0	42	12	0.3 ±0.20e
C <sub>8</sub>	0.5	0	37	7	0.2 ±0.20e

生长素诱导愈伤组织。2,4 - D 作为一种常用植物生长素,在愈伤组织诱导中发挥着非常重要的作用。本实验中,单独使用 2,4 -

D,肯塔基草地早熟禾愈伤组织诱导率低下。这与马忠华等人报道的实验结果相差甚大<sup>[3]</sup>,可能由于不同基因型的原因。2,4 - D

配合低浓度的 6-BA 可以显著提高肯塔基草地早熟禾愈伤组织的诱导率和质量。Vander Valk 等人(1989)的研究报道也表明在培养基中添加 BA 可以提高草地早熟禾的愈伤组织诱导率<sup>[9]</sup>。这可能是草地早熟禾中含有内源细胞分裂素的原因<sup>[10]</sup>。有研究表明,早熟禾幼穗比成熟种子诱导愈伤组织效果要好<sup>[9,11]</sup>,但是,幼穗的获取受季节限制比较大,成熟种子就避免了这一缺点。

肯塔基草地早熟禾愈伤组织的分化实验表明,不同培养基诱导分化的效果差异明显,SH 培养基比较适合于愈伤组织的分化。这可能由于 SH 培养基含 N 量高于 MS 培养基的缘故。本实验表明,0.1mg/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。NAA 和 BA 配合使用没有单独使用 2,4-D 诱导分化效果好。肯塔基草地早熟禾分化芽的诱导生根相对容易些,含有 1.0mg/L 2,4-D 的 1/2MS 培养基,20d 左右就诱导分化芽产生大量毛状根。组培苗的移栽也比较成功,成活率达到 97%,可用作肯塔基草地早熟禾转基因育种研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Bsshaw E C. Apomictic grasses [A]. Fehr W R. Principles of cultivar development [C]. New York: Macmillan Publishing, 1987. 2:40-82.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] Ma Zh - H(马忠华), Zhang Y - F(张云芳), Xu Ch - X(徐传祥), et al. Tissue culture and genetic transformation of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via microprojectile bombardment [J]. Journal of Fudan University (Natural Science) (复旦学报自然版), 1999, 38(5):540-544.
- [ 4 ] McDonnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky Bluegrass [J]. Crop Science, 1984, 24:573-577.
- [ 5 ] Zhu G - F(朱根发), Yu Y - J(余毓君). Studies of tissue culture condition and differentiation ability of *Poa pratensis* L [J]. Journal of Huazhong Agriculture University (华中农业大学学报), 1994, 13(2):199-203.
- [ 6 ] KeShangqiang, Chiwon W L. Plant regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via coleoptile tissue culture [J]. Plant Cell Report, 1996, (15):882-887.
- [ 7 ] Kirsten Annette Nielsen, Eise Larsen, Elisabeth Knudsen. Regeneration of protoplast derived green plants of Kentucky bluegrass (*Poa Pratensis* L.) [J]. Plant Cell Report, 1993, (12):537-540.
- [ 8 ] Xu Z - Q(徐子勤). Transgenic researches of important cereal species [J]. Biological Advances (生物工程进展), 2001, 21(1):59-74.
- [ 9 ] van der Valk P, Zaal M A C M, Creemers - Molenaar J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass) [J]. Plant Cell Reports, 1989, 7:644-647.
- [ 10 ] Bhaskaran S, Smith R H. Regeneration in cereal tissue culture: A review [J]. Crop Sci., 1990, 30:1328-1336.
- [ 11 ] McDonnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky Bluegrass [J]. Crop Sci., 1984, 24:573-577.