羊草愈伤组织状态的调控*

张 莹[1,2],李晓峰[2],刘公社[2],陈耀锋[1]
(1 西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100;2 中国科学院植物研究所 光合作用与环境分子生理学重点实验室,北京 100093)

[摘 要] 以 8 种基因型的羊草幼穗为材料,研究了与愈伤组织诱导、状态调控、分化等过程相关的因素。结果表明,羊草愈伤组织的诱导率在不同基因型羊草幼穗之间存在较大差异,使用 N6-MS 培养基交替继代,培养基中添加 2.0 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L ABA、100 mg/L 水解酪蛋白(CH)、300～500 mg/L 谷氨酰胺(Gln)和 500 mg/L脯氨酸(Pro),可有效改善羊草愈伤组织的生长状态,使其保持良好的胚性并提高分化率。

[关键词] 羊草;愈伤组织;状态调控;分化率
[中图分类号] S543+.9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)05-0111-04

Regulation of callus status of Leymus chinensis

ZHANG Ying[1,2], LI Xiao-feng[2], LIU Gong-she[2], CHEN Yao-feng[1]
(1 College of Agronomy, Northwest A &F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, CAS, Beijing 100093, China)

Abstract: With eight genotypes of *Leymus Chinensis* as the subject, induction, regulation and differentiation of callus were investigated in this experiment. The results showed that the different genotypes of *Leymus Chinensis* differed significantly in the induction rate, the growth states of callus were improved effectively, embryogenic status was better and the differentiation rate was increased when using N6-MS medium by turns, with 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L ABA, and supplying 100 mg/L CH, 300 - 500 mg/L Gln and 500 mg/L Pro in subculture.

Key words: *Leymus chinensis*; callus; regulation; differentiation rate

羊草(*Leymus chinensis*)为禾本科赖草属多年生根茎型禾草,在我国东北及内蒙古东部地区广泛分布,具有产量高、抗逆性强、动物适口性好、营养丰富等优点,是一种重要的牧草资源[1]。近年来,随着植物基因工程技术的迅速发展,利用转基因技术培育和改良羊草品种逐渐替代传统的育种方法,已成为一种便捷、实用的良种培育新途径。在对羊草组织培养及农杆菌介导的转化体系研究中发现,羊草幼穗愈伤组织较叶片和成熟胚愈伤组织容易诱导,植株再生能力强[2],适宜作为转化受体。而制约羊草转化率的根本原因在于受体愈伤组织的状态,淡黄色、颗粒状、生长旺盛的胚性愈伤组织转化效率较高,但羊草的愈伤组织多为柔软、粘稠,甚至水渍状,且幼穗材料来源受季节限制,获得的愈伤组织需要长期保存,而继代次数过多其胚性容易丧失[3]。因此,在转化前应先调整羊草愈伤组织的状态,以保证获得较高的转化率。关于植物愈伤组织状态的调控,前人已从培养基成分、培养方法等方面进行了研究[4-13],但主要集中在水稻、小麦等模式作物上,对禾本科牧草和草坪草的相关报道较少。本研究以不

* [收稿日期] 2006-04-05
[基金项目] 国家"十五"科技攻关重点项目(2001BA707B02);中国科学院知识创新重大项目(KSCX1-08-03)
[作者简介] 张 莹(1982 -),女,陕西西安人,在读硕士,主要从事农业生物技术研究。
[通讯作者] 刘公社(1958 -),男,陕西咸阳人,中国科学院植物研究所首席研究员,博士生导师,主要从事生物资源分子评价与基因资源研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

同基因型羊草幼穗为材料诱导愈伤组织,并尝试通过不同的方法改善愈伤组织生长状态,提高分化率,以期为羊草高效转化体系的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取中国科学院植物研究所试验田栽培的8种基因型羊草幼穗吉生一号、栽培一号、栽培二号、栽培三号、栽培四号、栽培五号、野生四号和野生七号。于2005-05上旬抽穗期采集,穗长4～6 cm。

1.2 愈伤组织的诱导和继代

将包裹在叶鞘中的羊草幼穗置于超净工作台上,用体积分数70%酒精消毒1 min,无菌水冲洗3次,再用2%NaClO消毒10 min,无菌水冲洗5次。然后剥去叶鞘,在无菌滤纸上将幼穗切成4～6 mm的小段,接种到诱导培养基上,每皿接种20个,3周后统计愈伤组织诱导率。将新长出的愈伤组织转接到继代培养基上,每3周继代1次。

诱导和继代培养基为:MS+2.0 mg/L 2,4-D+3.0% Su + 0.75% Ag,pH 5.8。培养箱温度26 ℃恒温,暗培养。

1.3 愈伤组织状态的调控

以继代3次的栽培一号幼穗愈伤组织为材料,采用以下方法调整其生长状态,观察愈伤组织颜色、形态、硬度的变化,然后将其转接到分化培养基上,1个月后统计分化率(分化率/%=分化芽的愈伤组织数/最后1次继代愈伤组织总数×100%),作为评价指标。分化培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT+3.0% Su+0.75% Ag,pH 5.8。培养室温度22～26 ℃,光照时间12 h,光照强度1 500～2 000 lx。

1.3.1 培养基交替继代调控 将在MS培养基上继代2次的愈伤组织转到N6培养基上,以N6-MS培养基交替方式继代,并以MS-MS和N6-N6继代方式为对照,继代3次后观察羊草愈伤组织状态,并统计其分化率。

1.3.2 激素调控 以含2.0 mg/L 2,4-D的MS培养基为对照,改变2,4-D质量浓度(1.0,3.0,4.0 mg/L),并添加1.0,2.0 mg/L ABA,继代2次后观察羊草愈伤组织状态,并统计其分化率。

1.3.3 培养基添加物的调控 以不含任何添加物的继代培养基为对照,分别添加100,300,500 mg/L水解酪蛋白(CH)、谷氨酰胺(Gln)及脯氨酸(Pro),继代2次后观察羊草愈伤组织状态,统计分化率。

1.4 统计分析

采用SPSS FOR WINDOWS(Version 10.0)软件中单因子变异数,以及可用于成对比较的TUKEY法对试验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 基因型对羊草幼穗愈伤组织诱导率及状态的影响

羊草幼穗在接种后1～2周逐渐形成可见的愈伤组织。刚长出的愈伤组织生长很缓慢,呈白色,甚至半透明的水渍状,且非常粘稠。不同基因型羊草幼穗的愈伤组织状态相似,但愈伤组织诱导率不同。

表1 基因型对羊草幼穗愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effect of genotype on the callus induction rate of *Leymus chinensis* young spikes

基因型 Genotype	外植体数 Number of explants	诱导愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate
吉生一号 Gisheng-1	200	73	36.5 d
栽培一号 Zaipei-1	200	179	89.5 a
栽培二号 Zaipei-2	200	106	53.0 cd
栽培三号 Zaipei-3	200	182	91.0 a
栽培四号 Zaipei-4	200	161	80.5 ab
栽培五号 Zaipei-5	200	137	68.5 bc
野生四号 Yesheng-4	200	95	47.5 d
野生七号 Yesheng-7	200	133	66.5 bc

注:小写字母相同者表示差异不显著,小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Same small letters show no significant difference at the 0.05 level; different small letters show significant difference at the 0.05 level.

由表1可见,栽培三号的愈伤组织诱导率最高,达到91.0%,而野生四号仅有47.5%。统计分析结果表明,不同基因型羊草幼穗愈伤组织诱导率差异较大。继代1～2次的羊草愈伤组织生长速度加快,结构变得致密,水渍状况减轻,颜色加深变黄,但仍然呈柔软状态,只有栽培一号、栽培四号有少数愈伤组织在核心处有颗粒状出现。这种状态的愈伤组织在进行农杆菌侵染后呈碎屑状,不易成活,抗性愈伤率极低,不适于直接作为转化的受体。因此,选择愈伤组织诱导率较高且生长较旺盛的栽培一号愈伤组织为材料,进行状态调控试验。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　培养基交替继代对羊草愈伤组织状态的影响

有研究表明,N6-MS 培养基交替继代方式有利于水稻愈伤组织胚性的保持,并使植株再生能力的下降有所减慢[4-5]。本试验采用 N6-MS 培养基交替处理后发现,交替继代 3 次后羊草愈伤组织颜色呈乳黄色,结构变得致密,并有明显颗粒状;N6-N6 继代的愈伤组织状态与 N6-MS 继代类似,但生长较缓慢且容易褐变;而 MS-MS 继代的愈伤组织颜色较浅,结构较疏松,有些略感粘稠状,但生长速度较快。这可能是由于在 N6-MS 交替继代时,MS 培养基有利于愈伤组织的增殖,而 N6 培养基有利于愈伤组织形成致密的结构[4]。由表 2 可知,N6-MS 交替继代的愈伤组织分化率高于其他两种方式,MS-MS 继代与 N6-MS 交替继代的羊草愈伤组织分化率差异显著。而 MS-MS 继代的愈伤组织由于增殖量大,即使分化率较低,得到的分化芽数与 N6-MS 继代的愈伤组织无明显差异。因此,在试验中若需要保持一定数量的愈伤组织,则以 MS-MS 方式继代较快。

2.3　2,4-D 与 ABA 对羊草愈伤组织状态的影响

对栽培一号愈伤组织进行 2,4-D 与 ABA 不同质量浓度处理发现,继代培养时,2,4-D 质量浓度对愈伤组织的状态基本无影响,但是当 2,4-D 质量浓度大于 3.0 mg/L 时,愈伤组织的生长随 2,4-D 质量浓度的增加而受到抑制;添加 ABA 的愈伤组织状态则明显变得致密,呈淡黄色,有致密颗粒状出现,但较高质量浓度的 ABA 导致愈伤组织褐变增加。由表 3 可以看出,继代培养时 2,4-D 质量浓度越高,愈伤组织的分化率越低。愈伤组织分化前在 2,4-D 质量浓度为 2.0 mg/L 的培养基上继代培养 1～2 次,然后再转移到分化培养基上,以及添加 1.0 mg/L ABA,可显著提高愈伤组织分化率。

表 2　培养基交替继代对羊草愈伤组织分化的影响

Table 2　Effect of subculture by alternate culture media on the differentiation of *Leymus chinensis* callus

继代方式 Subculture methods	愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织分化数 Number of differentiation	分化率/ % Differentiation rate
MS-MS	300	44	14.67 b
N6-N6	300	58	19.33 ab
N6-MS	300	64	21.33 a

表 3　2,4-D 与 ABA 质量浓度对羊草愈伤组织分化的影响

Table 3　Effect of 2,4-D and ABA concentration on the differentiation of *Leymus chinensis* callus

2,4-D/ (mg·L^{-1})	ABA/ (mg·L^{-1})	愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织分化数 Number of differentiation	分化率/ % Differentiation rate
1.0	0	160	31	19.38 b
2.0	0	160	28	17.5 bc
2.0	1.0	156	57	36.54 a
2.0	2.0	149	33	22.15 b
3.0	0	140	6	4.29 d
4.0	0	139	7	5.04 cd

2.4　培养基中添加物对羊草愈伤组织状态的影响

培养基中添加 CH、Gln 与 Pro 对羊草愈伤组织的生长状态有一定影响(表 4)。

表 4　培养基中添加物对羊草愈伤组织分化的影响

Table 4　Effect of media accession on the differentiation of *Leymus chinensis* callus

添加物 Media accession	质量浓度/ (mg·L^{-1}) Concentration	分化率/ % Differentiation rate	添加物 Media accession	质量浓度/ (mg·L^{-1}) Concentration	分化率/ % Differentiation rate
	0	17.50 a	谷氨酰胺	300	18.87 a
水解酪蛋白	100	22.64 a	Gln	500	18.13 a
CH	300	21.25 a		0	17.50 b
	500	12.50 a	脯氨酸	100	16.25 b
谷氨酰胺	0	17.50 a	Pro	300	16.88 b
Gln	100	18.75 a		500	29.11 a

由表 4 可见,添加 CH 和 Gln 愈伤组织颜色呈鲜亮的淡黄色,生长速度加快;CH 添加量在 100～300 mg/L 时,愈伤组织的分化率较对照明显提高;Gln 添加量在 300～500 mg/L 时愈伤组织生长状态较好,但 Gln 对分化率影响不显著;添加 500 mg/L Pro 时愈伤组织分化率显著增加($P < 0.05$)。

3　讨　论

植物愈伤组织状态调控的影响因素主要有以下几个方面。(1) 氮源调控。主要通过无机态氮 NH_4^+/NO_3^- 比率以及适量添加有机态氮来调控。高铵态氮的 MS 培养基能刺激愈伤组织的胚胎发生

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和胚性细胞的增殖,高硝态氮的N6培养基有利于形成致密的结构,保持愈伤组织的胚性,不因胚性细胞过度增殖而丧失胚性[4-5],即用N6-MS交替继代方式,既可以使愈伤组织增殖又能保持其胚性,该方法在水稻中已得到验证,在羊草中的应用也得到了较理想的效果;添加Gln和CH有机氮源,可以有效改善愈伤组织的状态[6],使其生长加速,并保持新鲜状态。(2)激素调控。激素是愈伤组织再生植株的关键因素,也是比较难掌握的因素。高质量浓度2,4-D对愈伤组织胚性保持不利,较低质量浓度2,4-D虽能适当保持愈伤组织的分化能力,但不利于愈伤组织的生长[3-4];低质量浓度ABA对保持愈伤组织的致密、稳定、结节状结构,提高愈伤组织的胚性具有重要作用,对活力高和生长旺盛的松软状愈伤组织,添加0.5～1.0 mg/L ABA可以明显促进其向胚性状态发展,但ABA质量浓度过高不利于愈伤组织的胚性调整,且容易产生褐变[7-9]。在羊草愈伤组织的继代过程中,使用低质量浓度2,4-D(1.0,2.0 mg/L)并配合低质量浓度的ABA(1.0 mg/L),可使愈伤组织保持良好的胚性状态并获得较高的分化率。(3)渗透调控。提高培养基中蔗糖和琼脂用量,适量添加Pro和ABA,采用干燥处理等方法的目的都是要创造一个高渗条件,使愈伤组织在一定时间内处于脱水状态,刺激细胞分裂和阻止DNA合成,抑制细胞生长,从而促使细胞分化,提高植株再生率[4-5,7-13]。在愈伤组织继代过程中采用这种方法调节,不但可以增加愈伤组织的保存寿命,还可以在转化过程中得到较高的抗性愈伤率,对提高外源基因转化率有重要意义[10]。(4)温度调控。分化前将愈伤组织进行适当的低温预处理,可以提高愈伤组织的再生频率[10];李双成等[5]研究证明,高温处理也有类似的效果。此外,还有通过分化-脱分化处理[4],在培养基中添加KCl[6]、$AgNO_3$[5]、DMSO[5,10]等方法来改善愈伤组织的状态,提高植株再生率。这些方法是否都能够在羊草中起作用,还有待进一步研究。

由于禾本科植物自身的特点,使得许多牧草和草坪草的组织培养及再生体系极不完善,因此禾本科牧草与草坪草的转基因研究,大多处于遗传转化体系的建立和完善阶段,转化率很低[14]。本研究对羊草组织培养体系的进一步完善,对利用基因工程改良羊草具有重要的推进作用,同时也为其他禾本科牧草和草坪草组织培养系统、以及遗传转化系统的完善提供了参考。

[参考文献]

[1] 刘公社,齐冬梅.羊草生物学研究进展[J].草业学报,2004,13(5):6-11.

[2] 刘公社,汪恩华,刘 杰,等.羊草幼穗离体培养诱导植株再生的研究[J].草地学报,2002,10(3):198-202.

[3] 曲同宝,王丕武,关淑艳,等.羊草组织培养及再生系统的建立[J].草业学报,2004,13(5):91-94.

[4] 朱根发,余毓君.水稻愈伤组织状态的调控[J].华中农业大学学报,1995,14(3):213-219.

[5] 李双成,王世全,尹福强,等.籼稻成熟胚愈伤组织培养影响因素研究[J].四川农业大学学报,2004,22(4):296-300.

[6] 李卫东,葛会波,周春江,等.草莓花药愈伤组织类型与状态调控研究[J].河北农业大学学报,2004,27(2):59-63.

[7] 余如刚,李阳春,夏 阳,等.影响禾本科草坪草愈伤组织分化频率的因素[J].草原与草坪,2004(2):20-23.

[8] 郎明林,陈荣敏,赵建军,等.影响小麦幼穗组培效应的几个因素探讨[J].植物生理学通讯,2001,37(5):393-395.

[9] 于晓红,朱 祯,付志明,等.提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J].植物生理学报,1999,25(4):388-394.

[10] 叶松青,储成才,曹守云,等.提高水稻转化效率几个主要因素的研究[J].遗传学报,2001,28(10):933-938.

[11] 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.

[12] 郭向云,尹 钧,余桂荣,等.VB1和干燥处理对小麦幼胚愈伤组织培养的影响[J].华北农学报,2003,18(4):19-22.

[13] 王海波,魏景芳,葛亚新,等.小麦愈伤组织状态调控与原生质体培养[J].中国农业科学,1996,29(6):8-14.

[14] 张振霞,杨中艺,储成才.禾本科牧草与草坪草转基因研究进展[J].草业学报,2004,13(6):92-98.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net