

## 绒毛狼尾草幼穗的愈伤组织诱导与植株再生

缪 珊, 范继红

(北京农业职业学院, 北京 102442)

**摘 要:** 以绒毛狼尾草幼嫩花穗为材料, 研究了培养基种类和 2,4-D 对愈伤组织诱导以及 6-BA 对分化的影响。结果表明, MS 较  $N_6$  培养基适合绒毛狼尾草的组织培养。在附加  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 的 MS 培养基中愈伤组织诱导率最高, 达到 100%。分化培养基以附加  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基为最佳, 分化率为 44.0%。在 1/2MS 培养基中附加  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 和  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  活性炭进行生根培养, 根系生长健壮, 生根率达 100%。

**关键词:** 绒毛狼尾草; 幼穗; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S688.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)02-0255-04

### Callus induction and plant regeneration from young spike of *Pennisetum setaceum*

MIAO Shan, FAN Ji-hong

(Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442)

**Abstract:** The effects of media types and concentration of 2,4-D on callus-induction with young spike of *Pennisetum setaceum*, and some concentrations of 6-BA on callus differentiation were studied. The result shows MS is the optimal medium on callus-induction. The callus induction rate reached its maximum of 100% at MS media with  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, in the differentiation media with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA, the optimum differentiation rate was achieved at 44.0%, and in the 1/2 MS media plus  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA and  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  activated charcoal, root generation rate reached 100%.

**Key words:** *Pennisetum setaceum*, young spike, tissue culture, plant regeneration

绒毛狼尾草(*Pennisetum setaceum* (Forssk.) Chiov.)为禾本科狼尾草属多年生植物,原产于北非。茎直立,株高 120~170 cm。绒毛狼尾草喜光,耐高温,耐寒性强,不耐荫蔽,对土壤适应性强,可生长于各种黏土、砂土、酸性或弱碱性的土壤<sup>[1]</sup>。绒毛狼尾草具有较强的耐旱、耐瘠薄能力,而且生长健壮,养护管护简单、具有景观效果自然质朴等特性,因此很受园艺学家和园林设计师的青睐,应用数量有逐年迅速增加的趋势<sup>[2]</sup>。我国目前对绒毛狼尾草已经在资源引进和配置应用方面开展了一些工作,如武菊英<sup>[3]</sup>评价了包括绒毛狼尾草在内的 5 种狼尾草属植物在北京地区的适应性、观赏性和它们的主要繁殖方法。绒毛狼尾草分蘖能力较强,在生产上主要采用分株繁殖。而有关组织培养方面的研究在国内尚未见相关的报道。基于此,作者以绒

毛狼尾草的幼嫩花序做为外植体,对绒毛狼尾草的愈伤组织诱导和植株再生进行了探索,可为绒毛狼尾草生物技术育种和组培育苗提供技术平台。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

试验材料为 1~2.5 cm 长的花穗,由北京农林科学院北京草业与环境研究发展中心提供。

#### 1.2 培养基

**1.2.1 愈伤组织诱导培养基** 以  $\text{MS}+30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖 +7% 琼脂和  $\text{N}_6+50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖+10%琼脂作为基本培养基, pH5.8。添加不同浓度的 2,4-D, 配方如下:

$A_0$ : MS;  $A_1$ :  $\text{MS}+1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D;  $A_2$ :  $\text{MS}+3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D;  $A_3$ :  $\text{MS}+5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D;  $B_0$ :  $\text{N}_6$ ;  $B_1$ :  $\text{N}_6+1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D;  $B_2$ :  $\text{N}_6+3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D;

收稿日期: 2010-11-05

基金项目: 北京农业职业学院院级科研基金项目(XY-QN-09-18)资助。

作者简介: 缪珊, 女, 讲师。E-mail: miaoshanhan@sohu.com

B<sub>3</sub>: N<sub>6</sub>+5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D。

**1.2.2 分化培养基** C<sub>0</sub>: MS; C<sub>1</sub>: MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA; C<sub>2</sub>: MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA; C<sub>3</sub>: MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA; C<sub>4</sub>: MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA。

**1.2.3 生根培养基** D<sub>1</sub>: 1/2MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.3 mg·L<sup>-1</sup> 活性炭; D<sub>2</sub>: 1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA+0.3 mg·L<sup>-1</sup> 活性炭。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 外植体处理** 试验于 2010 年 6 月至 9 月进行。选取以孕育花穗的植株, 剪取植株上半部, 去掉叶片后, 保留 5 cm 左右包含幼穗的茎鞘切段, 用自来水冲洗后, 放入加了适量洗洁精的溶液中, 不断震荡清洗 15 min, 然后用自来水冲洗干净, 在无菌条件下用 70% 酒精浸渍 1 min, 无菌水冲洗 2 遍, 再放入 0.1% 升汞溶液中处理 10 min, 最后用无菌水冲洗 6 次。在无菌操作台上, 将叶鞘剥去, 取出花穗, 切成 2~3 mm 的小段。

**1.3.2 愈伤组织诱导** 在无菌操作台上, 将已切好的花穗小段接种于愈伤组织诱导培养基上。每瓶接种 2~3 个外植体。愈伤组织的诱导在 25℃±1℃ 黑暗条件下进行, 每隔 1 周观察和记录愈伤组织的生

长情况。愈伤组织的诱导率(%)=(愈伤组织数/接种外植体总数)×100%。

**1.3.3 分化培养** 选择胚性较好(外观呈淡黄色, 质地较紧密)的愈伤组织接种到分化培养基上进行分化培养。观察愈伤组织的分化情况并统计出现的芽点数。培养条件: 16 h 光照, 8 h 暗照, 光强度 1 500~2 000 lx, 温度为 25℃±1℃。40 d 后统计出苗率, 出苗率=(出苗的愈伤数/愈伤总数)×100%。

**1.3.4 生根培养** 将分化出的无根小苗转入生根培养基中诱导生根。每个组合 10 个重复。培养条件: 16 h 光照, 8 h 暗照, 光强度 1 500~2 000 lx, 温度为 25℃±1℃。20 d 后统计出根情况。最后将形成的完整植株移栽入花盆。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对花穗愈伤组织诱导的影响

接种后 5 d, 即可观察到培养基中部分花穗开始膨大, 出现乳白色至淡黄色愈伤组织(图 1)。10 d 以后, 在诱导出的愈伤组织上可以观察到绿色的芽点, 随后分化出绿色的小芽(图 2 和图 3)。25 d 后统计愈伤组织的数量和诱导率, 结果见表 1。

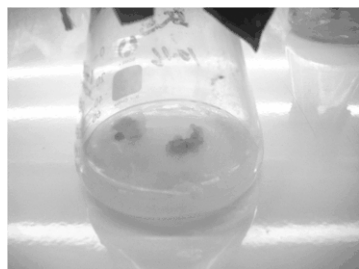


图 1 接种 5 d 后花穗上形成愈伤组织  
Figure 1 Callus induced from young spike after inoculation for 5 days



图 2 接种 10 d 后愈伤组织上出现绿色芽点  
Figure 2 Green shoot-buds induced on callus after inoculation for 10 days

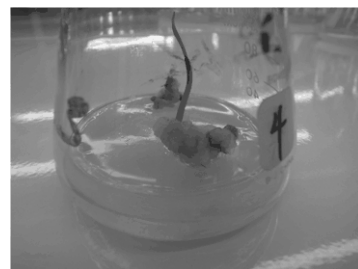


图 3 愈伤组织上出现绿色的小芽  
Figure 3 Green shoot formation from callus

表 1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effects of different concentrations of 2,4-D on callus induction

培养基 Medium	外植体数/个 Number of explants	愈伤组织/块 Callus number	诱导率/% Percentage of callus
A <sub>0</sub>	35	0	0
A <sub>1</sub>	34	17	50
A <sub>2</sub>	35	35	100
A <sub>3</sub>	30	21	70
B <sub>0</sub>	35	0	0
B <sub>1</sub>	30	15	50
B <sub>2</sub>	30	29	96.7
B <sub>3</sub>	30	20	66.7



从表 1 可以看出, 2,4-D 对花穗愈伤组织的诱导至关重要。A<sub>0</sub>~A<sub>2</sub> 培养基随着 2,4-D 浓度从 0 到 3 mg·L<sup>-1</sup> 的逐步增加, 愈伤组织的诱导率也从 0 上升到 100%, 但当 2,4-D 浓度提高到 5 mg·L<sup>-1</sup> 时 (A<sub>3</sub> 培养基), 愈伤组织的诱导率反而下降为 70%。以 N<sub>6</sub> 为基本培养基的愈伤组织诱导情况也基本一样, 当 2,4-D 浓度达到 3 mg·L<sup>-1</sup> 时 (B<sub>2</sub> 培养基), 愈伤组织诱导率达到最高值为 96.7%, 随后随着 2,4-D 浓度的进一步提高, 愈伤组织诱导率呈下降趋势。因此, 2,4-D 浓度为 3 mg·L<sup>-1</sup> 时有利于绒毛狼尾草花穗愈伤组织的诱导。

N<sub>6</sub> 培养基主要应用在水稻等禾本科植物的组织培养<sup>[4-5]</sup>, 从本试验的结果可以看出, 绒毛狼尾草幼嫩花穗在添加了 2,4-D 的 MS 和 N<sub>6</sub> 两种基本培养基上都能诱导出愈伤组织, 且 MS 培养基上的诱导率稍微高一些。这与孙敬三<sup>[6]</sup>的研究结果相同。

## 2.2 不同浓度 6-BA 对不定芽分化的影响

将诱导培养基上产生的愈伤组织接种到分化培养基中。25 d 后统计不定芽分化情况。

表 2 不同培养基对不定芽分化的影响

Table 2 The effects of different media on callus differentiations

培养基 Medium	愈伤组织/块 Callus number	出苗的愈伤数/块 Number of Germinated explants	出苗率/% Germination rate
C <sub>0</sub>	25	0	0
C <sub>1</sub>	30	8	26.6
C <sub>2</sub>	24	8	33.3
C <sub>3</sub>	25	11	44.0
C <sub>4</sub>	25	10	40.0

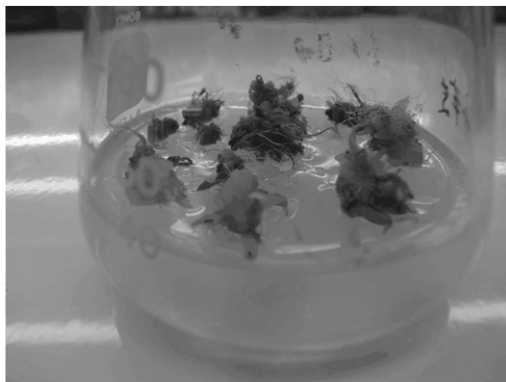


图 4 在不添加激素的 MS 培养基上死亡的愈伤组织  
Figure 4 Dead shoots on MS media without hormone

从表 2 可以看出, 在不添加激素的 C<sub>0</sub> 培养基上培养的愈伤组织, 即使在愈伤组织诱导阶段已分化出小芽了, 但随着培养时间的延长, 小芽也逐渐枯

萎死亡 (图 4)。当 6-BA 的浓度从 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 升至 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, 不定芽的分化率也随之增加, 达到 44.0%。当 6-BA 浓度进一步增加到 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 时, 分化率却略有下降。因此, 6-BA 浓度过高将抑制愈伤组织的不定芽分化。本试验结果表明, MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 有利于不定芽的分化。

## 2.3 不定芽生根及再生植株的移栽

将分化培养基上产生的 2~3 cm 长的不定芽剪切下来接种到生根培养基中, 1 周后即可观察到小芽基部开始产生不定根。25 d 后 D<sub>1</sub> 培养基中每个不定芽基部均产生 4~5 条健壮的不定根, 长度 4 cm 左右, 生根率达到 100%。D<sub>2</sub> 培养基的生根率略低些, 为 75%, 且根系较细弱, 长 2~3 cm。30 d 后打开瓶盖进行室内炼苗, 3~4 d 后移栽至盛有营养土 (草炭: 蛭石=2:1) 的小花盆中, 放入温室中栽培, 成活率达 95% 以上。

## 3 小结与讨论

花穗作为外殖体进行组织培养, 在很多禾本科植物上都进行过研究<sup>[7-10]</sup>, 取得了一定的进展。前人的研究表明, 2,4-D 是诱导愈伤组织较为有效的植物激素, 最佳浓度因不同的植物种类而有差异<sup>[11-14]</sup>。本试验采用绒毛狼尾草的花穗作为外殖体, 在 MS+3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 的培养基上进行培养, 诱导率达到了 100%, 这与前人的研究结果相一致。但是愈伤组织转入分化培养基后, 不定芽的分化率和成苗率相对较低, 最高的为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 培养基, 成苗率为 44.0%, 而且每个愈伤组织上形成的不定芽个数较少, 一般 3~5 个。这与愈伤组织的质量有很大关系。杨爱芳等<sup>[8-9]</sup>研究表明, 花穗的发育阶段、不同部位都能对愈伤组织的质量产生很大的影响, 于小花分化前的幼穗, 产生的愈伤组织质量越好, 产生的不定芽数量较多且健壮。在本试验中, 长度 < 1 cm 的花穗, 形成的愈伤组织质量越高, 分化能力越强, 能形成较多的丛生芽。而在较老的花穗上 (> 2 cm) 形成的愈伤组织质量较差, 容易产生不定根和毛状结构, 但不分化或只产生少量不定芽。因此采用花穗作为外殖体时, 尽量选取 1 cm 以下小花还未完全发育的花穗。另一方面, 培养基成分也很大程度影响愈伤组织的形成和分化<sup>[15]</sup>。张艺等<sup>[16]</sup>的研究结果表明, 单独使用 2,4-D 或其它植物生长调节剂时, 形成的愈伤组织胚性不高, 难于再生, 而添加了 KT、ABA 等激素, 则可以有效提高愈伤组织的胚性, 从而提高植株的再生能力。因此, 在下一步的研究中, 可以适当调节诱导与分化培养基

的激素种类,找到更适合绒毛狼尾草花穗培养的培养基组合。

### 参考文献:

- [1] Grounds R. The plantfinder's guide to ornamental grasses[M]. David & Charles Publishers, Brunel House, Newton Abbot, Devon, UK 1998:123.
- [2] 武菊英. 观赏草及其在园林景观中的应用[M]. 中国林业出版社, 2008: 104.
- [3] 武菊英, 滕文军, 袁小环, 等. 几种狼尾草属观赏植物在北京地区的生长特性[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(6): 661-666.
- [4] 钟理, 杨春燕. 组织培养技术在草坪草育种上的应用[J]. 农技服务, 2010, 27(10): 1349-1351.
- [5] 邱运亮, 段鹏慧. 植物组织培养快繁技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [6] 孙敬三, 朱至清. 冰草幼穗培养再生植株[J]. 植物学通报, 1985, 3(6): 47-48.
- [7] 王淑强, 王善敏, 刘玉红. 新麦草幼穗组织培养及再生植株的研究[J]. 草地学报, 1997, 5(3): 201-204.
- [8] 杨爱芳, 何春梅, 王贤丽, 等. 黑麦草幼穗离体培养及植株再生[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 84-90.
- [9] 周扑华, 何立珍. 荻幼穗愈伤组织诱导及无性系的建立[J]. 湖南农学院学报, 1992, 18(3): 569-573.
- [10] 苏学辉, 何奕昆, 邱时学. 三种禾本科牧草的幼穗培养及体细胞胚胎发生[J]. 四川师范学院学报: 自然科学版, 1993, 14(4): 346-348.
- [11] 冯霞, 孙振元, 韩蕾, 等. 多年生黑麦草愈伤组织诱导和植株再生[J]. 草业科学, 2004, 21(10): 23-28.
- [12] 路晓玉, 李希政, 周红昕, 等. 羊草的愈伤组织诱导[J]. 北京农业, 2009, 5(下): 18-20.
- [13] 王慧, 许瑾, 周小梅, 等. 几种草坪草组织培养和植株再生的研究[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2009, 32(3): 463-467.
- [14] 王凭青, 段传人, 王伯初, 等. 杂交狼尾草不同外植体材料组织培养实验[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2005, 28(6): 118-120.
- [15] 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, 105(2): 20-23.
- [16] 张艺, 李达旭, 张杰, 等. 披碱草组织培养体系的建立[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(1): 205-208.