

柳枝稷的组织培养技术研究

孟敏, 李华军, 徐开杰, 奚亚军^{*} (西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 [目的]探索柳枝稷的不同组培条件,优化其诱导和分化培养基。[方法]以柳枝稷幼穗为外植体进行组织培养获得组培苗,建立相应的植株再生系统。[结果]愈伤组织诱导培养基为MS+5.00 mg/L 2,4-D+0.15 mg/L 6-BA+3.00%蔗糖+0.75%琼脂;继代与增殖培养基为MS+4.00 mg/L 2,4-D+3.00%蔗糖+0.75%琼脂;分化培养基为MS+0.2 mg/L KT+3.00%蔗糖+0.75%琼脂;生根培养基为1/2MS+0.80%蔗糖+0.70%琼脂。愈伤组织诱导和继代培养阶段培养温度为24℃,在分化和生根培养阶段培养温度为28℃。幼穗外植体的出愈率达95%,愈伤组织增殖率在800%~1 000%以上,分化率达80%以上,生根率在98%以上。经炼苗后,获得的组培苗的移栽成活率达95%以上。[结论]采用优化激素搭配的培养基可得到高效的诱导率、分化率和生根率。

关键词 柳枝稷;幼穗;愈伤组织诱导;组织培养

中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)04-01477-02

Brief Report on Tissue Culture of *Panicum virgatum*

MENG Min et al (Agronomy College, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract [Objective] The study aimed to explore different tissue culture conditions of *Panicum virgatum* and optimize its induction and differentiation medium. [Method] With the young spike of *P. virgatum* as explant, the tissue cultured seedlings were obtained and the corresponding plant regeneration system was established. [Result] The medium for inducing callus was MS+5.00 mg/L 2,4-D+0.15 mg/L 6-BA+3.00% sucrose+0.75% agar, that for subculture and proliferation was MS+4.00 mg/L 2,4-D+3.00% sucrose+0.75% agar, that for differentiation was MS+0.20 mg/L KT+3.00% sucrose+0.75% agar and that for rooting was 1/2MS+0.80% sucrose+0.70% agar. The culture temperature at the stage of the callus induction and subculture was 24℃ and that at the culture stage of the differentiation and rooting was 28℃. The callus induction rate of the explant of young spike was 95%, the proliferation rate of callus was above 800%~1 000%, the differentiation rate was above 80% and the rooting rate was above 98%. The transplanting survival rate of obtained tissue cultured seedlings was above 95% after training seedling. [Conclusion] The high-effective induction rate, differentiation rate and rooting rate could be obtained by using the medium with optimizing hormone combination.

Key words *Panicum virgatum*; Young spike; Callus induction; Tissue culture

柳枝稷属于禾本科黍属多年生植物,是在北美洲广泛种植的优良牧草。株高110~120 cm,叶长30~80 cm,叶宽0.8~1.3 cm,根系发达,叶片表皮呈灰绿色,被绒毛,分蘖能力强,喜丛生,耐旱性强。柳枝稷具有适应性广、防风固沙能力强、耐瘠薄等优点,是沙漠绿化、草原植被的理想植物。同时,柳枝稷可合成燃料乙醇、甲醇、沼气、氢气等,由于其能源产出率高,在乙醇生产过程中易降解,被美国政府确定为替代玉米生产燃料乙醇的首选生物能源植物,并投入了大量的人力物力进行研究开发^[1]。其中,采用转基因技术增强柳枝稷的抗逆性,提高光合效率,增加生物学产量,降低木质素含量和提高乙醇产率等方面已成为目前的研究热点。

我国在20世纪90年代已从美国引入高产柳枝稷品种作为水土保持和防风固沙植物及在荒漠化土壤种植的优良抗逆性牧草,并展示出良好的应用前景。然而,由于对柳枝稷的遗传转化研究起步较晚且组织培养较为困难,20世纪90年代末,国外曾有使用悬浮系对柳枝稷组织培养的报道^[2],但迄今国际上仅有个别转基因成功的报道,目前柳枝稷转基因研究尚处于体系建立的探索阶段^[3]。根据现阶段植物转基因技术的发展现状,研究并创建较为高效的植物组织培养体系是遗传转化体系建立的基础和前提。因此,开展柳枝稷组培体系的研究十分必要。目前,国内同属其他种植物的组织培养已有报道^[4],但柳枝稷的组织培养和快速繁殖的报道迄今未见,因此,笔者以柳枝稷为外植体,对其进行

组织培养研究。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为柳枝稷[Switchgrass(*Panicum virgatum*, Linn)]幼穗。

1.2 方法

1.2.1 培养基配比。愈伤组织诱导培养基为:MS+5.00 mg/L 2,4-D+0.15 mg/L 6-BA+3.00%蔗糖+0.75%琼脂,pH值5.8;继代与增殖培养基为:MS+4.00 mg/L 2,4-D+3.00%蔗糖+0.75%琼脂,pH值5.8;分化培养基为:MS+0.20 mg/L KT+3.00%蔗糖+0.75%琼脂,pH值5.8;生根培养基为:1/2MS+0.80%蔗糖+0.70%琼脂。

1.2.2 培养条件。愈伤组织诱导和继代培养阶段培养温度为24℃;在分化和生根培养阶段培养温度为28℃,光照培养时间为16 h/d,光照强度为10 000 lx。

2 组织培养过程中生长与分化情况

2.1 外植体的灭菌 在柳枝稷生长至有4~5个茎节高时,人工剥取1 cm左右的幼穗,70%的酒精表面消毒1 min,再用体积浓度20%的NaClO溶液灭菌8~10 min,无菌水冲洗3~4次。

2.2 愈伤组织的诱导 将幼穗切成长度为2 mm左右的小段,接种到愈伤组织诱导培养基中,24℃暗培养42~56 d。培养7 d开始有愈伤组织生成,14 d时统计出愈率达到95%左右。

2.3 愈伤组织的继代与增殖 挑取胚性愈伤组织转接至继代与增殖培养基中进行增殖培养,15 d左右继代1次,共继代3次,愈伤组织增殖率均在800%~1 000%(图1)。

基金项目 国家自然科学基金(30871571);西北农林科技大学青年学术骨干支持计划(01140306)。

作者简介 孟敏(1978-),女,吉林松原人,硕士研究生,研究方向:植物基因工程。*通讯作者,博士,博士生导师,副教授,E-mail:xiyajun11@126.com。

收稿日期 2008-12-01



图1 愈伤组织的继代培养

Fig.1 Callus subculture

2.4 愈伤组织分化成苗 挑取经过继代培养的胚性愈伤组织至分化培养基中,28℃、光照时间24 h/d、光照强度10 000 lx条件下进行分化培养。培养15 d左右开始有再生苗生成,45 d时统计分化率达到80%以上(图2)。



图2 愈伤组织的分化培养

Fig.2 Differentiation culture of callus

2.5 再生苗的生根培养 当再生苗生长至1~2 cm高时,切下幼苗转入生根培养基中。28℃光照条件下,8 d开始出现白色凸起,逐渐长成新根,每苗生根数大约是5~8个,生根率在98%以上。

2.6 炼苗移栽 分化苗在生根培养基上培养21~28 d至幼

苗高度为5 cm以上,根长2~3 cm,移栽至腐叶土40%、园土40%、沙20%配制的栽培土中,表面加入粉碎后的小石子以防止水分蒸发,温室培养。或打开培养基的盖子,室温下炼苗7 d后取出,移栽至湿润、肥沃、排水良好的砂壤土中。成活率均可达95%以上。

3 结论

以柳枝稷幼穗为外植体,愈伤组织诱导培养基为MS+5.00 mg/L 2,4-D+0.15 mg/L 6-BA+3.00%蔗糖+0.75%琼脂,pH值5.8时,14 d出愈率达95%左右;继代与增殖培养基为MS+4.00 mg/L 2,4-D+3.00%蔗糖+0.75%琼脂,pH值5.8时,愈伤组织增殖率在800%~1 000%;分化培养基为MS+0.20 mg/L KT+3.00%蔗糖+0.75%琼脂,pH值5.8时,45 d分化率达80%以上;生根培养基为1/2MS+0.80%蔗糖+0.70%琼脂时,生根率98%以上。分化得苗移栽后如管理适当,成活率可达95%以上。

参考文献

(上接第1470页)

参考文献

- [1] SCHOMBUG D, SALZMANN M. Enzyme handbook (4) [M]. Berlin: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1991:1-5.
- [2] 杨先芹, 孙丹, 杨文博, 等. 地衣芽孢杆菌NK-27菌株β-甘露聚糖酶的产酶条件及粗酶性质[J]. 南开大学学报:自然科学, 2002, 35(2): 117-120.
- [3] TANG C M, WATERMAN L D, SMITH M H, et al. The cel 4 gene of *Agaricus bisporus* encodes a β-mannanase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2298-2303.
- [4] XU B Z, SELLOS D, JANSON J C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β-mannanase gene[J]. Eur J Biochem, 2002, 269:1753-176.
- [5] 张清霞, 王英, 张力群, 等. 甘露寡糖和金针菇发酵液提取物诱导甜瓜抗白粉病反应研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(1): 87-91.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:9-42.
- [7] HOLT J G, KRIEG N R. Bergey's manual of systematic Bacteriology[M]. 9th ed Baltimore London: Williams & Wilkins Co, 1994:353-376.
- [8] SAMBROK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002:87-103.
- [9] 游春平, 肖爱萍, 李湘明, 等. 稻瘟病菌拮抗微生物的筛选及鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(4): 519-521.
- [10] 王雅平, 刘伊强, 潘乃燧, 等. 抗菌蛋白产生菌TG26的筛选及其培养条件[J]. 植物学报, 1993, 35(3): 222-228.
- [11] 赵铭钦, 邱立友, 刘伟城, 等. 烤烟发酵增香菌株的鉴定和初步应用研究[J]. 黑龙江烟草, 1999(3): 17-20.
- [12] 董桂清, 余钧池, 罗永贞, 等. β-甘露聚糖酶产生菌的筛选和酶学性质研究[J]. 广西轻工业, 2007, 23(4): 20-21.
- [13] ZHANG T, QU L Y, ZHU Q. Preliminary identification of a marine bacterial strain HZBN43[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 34-36.