

文章编号: 1000-5471(2008)01-0106-05

马蹄金再生体系的构建^①

邱容, 李名扬, 郭余龙, 皮伟, 眭顺照

西南大学园艺园林学院花卉研究所, 重庆 400716

摘要:以马蹄金无菌苗为试材, 子叶为外植体, 研究了不同植物生长调节剂种类的组合及浓度的配比对愈伤组织诱导、分化的影响, 结果表明: 含 2, 4-D、NAA、IAA 和细胞分裂素 6-BA 的诱导培养基对愈伤组织的诱导频率差别不明显, 诱导率均达 80%~100%, 但愈伤的质地却有很大的不同, 以 5.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 和 0.5 mg/L IAA+1.5 mg/L 6-BA 效果较好, 其中 0.5 mg/L IAA+1.5 mg/L 6-BA 可直接诱导出不定芽, 诱导率高达 82.61%; AgNO₃ 对愈伤组织的分化起着重要的作用, 以 0.1 mg/L NAA+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L Ag-NO₃ 分化的效果最好, 分化频率高达 76%; 最佳的生根培养基为 1/2MS+0.5 mg/L IBA, 生根率可达 100%.

关键词: 马蹄金; 子叶; 生长调节剂; 植株再生

中图分类号: Q949.777.1

文献标识码: A

马蹄金(*Dichondra repens* Forst)属旋花科马蹄金属, 是一种较好的观赏性草坪草, 俗称马蹄草、黄胆草等^[1-2], 适于温暖潮湿气候带, 耐阴性较好, 在我国长江以南各省区均有分布, 是除禾本科、豆科、莎草科以外用得较多的草坪草种之一^[2]. 具有无须修剪, 生长速度快, 成坪时间短的优点^[3-6]. 但也存在一些不足, 如在冬季较低温度下, 叶片枯黄; 夏季易感染白绢病和叶斑病; 叶片较嫩, 汁液含量高, 受黏虫侵害十分严重, 易受杂草危害等^[3]. 而马蹄金有性繁殖困难, 严重制约了品种改良工作的进行. 采用组织培养技术, 建立高频再生体系, 为马蹄金诱变育种, 细胞工程操作和基因工程操作打下了基础, 从而促进品种改良, 更好地用于生产. 至今为止, 关于马蹄金组织培养文献报道还很少, 高频再生率也不高^[4-5]. 本实验的目的是对马蹄金的愈伤组织和不定芽的形成进行初步研究, 建立马蹄金稳定、高频的再生体系.

1 材料和方法

1.1 实验材料

马蹄金种子(重庆市望海种子公司提供).

1.2 无菌苗的获取

取适量种子, 用自来水洗净包衣剂, 再用洗洁精洗涤, 流水冲洗 10 min, 转入超净台, 75%酒精消毒 30 s, 0.1%升汞浸泡 9 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 接种于 MS 添加适量 GA₃ 或 AgNO₃ 的培养基中, 置于光照时间 16 h、温度(25±1)℃条件下培养.

1.3 愈伤组织和不定芽的诱导

种子接种 8~10 d 后, 切取子叶分别接种在不同的诱导培养基上, 培养条件同前.

1.4 分化

子叶接种 45 d 后, 取生长状态良好的愈伤组织, 接种在不同的分化培养基上诱导分化. 培养条件同前.

① 收稿日期: 2007-09-07

作者简介: 邱容(1981-), 女, 重庆潼南人, 硕士研究生, 主要从事生物技术与花卉育种方面的研究.

通讯作者: 李名扬, 教授, 博士生导师.

1.5 生根壮苗及移栽

再生小苗接种于不同的生根培养基中, 待长出健壮的根时(一般为 25 d 左右), 打开瓶盖, 炼苗一周; 洗去培养基, 室内再炼苗 1~2 d 后, 移栽至钵钵或土壤中。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对马蹄金种子萌芽的影响

由表 1 可见, 未经过激素处理的种子, 发芽率相当低, 仅为 20%~30%, 且质量不佳; 而经过 GA₃ 或 AgNO₃ 处理过的种子, 发芽率可达 100%, 生长健壮。使用 GA₃ 或 AgNO₃ 促使种子萌芽的最终效果无明显差异。

表 1 不同激素处理对马蹄金种子萌芽的影响

处 理	始萌芽时间/d	无菌苗生长状况	处理种子数量/枚	发芽率/%
GA ₃ (1 mg · L ⁻¹)	1	子叶为深绿色, 健壮且叶面较大	100	100
AgNO ₃ (1 mg · L ⁻¹)	1	子叶为深绿色, 健壮且叶面较大	100	100
未处理	2~3	子叶为浅绿色, 叶面较小	100	25

2.2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响

子叶接种于不同的诱导培养基, 其愈伤组织生长快慢、质地等都存在显著差异。

从表 2 可见, IAA 和 6-BA 的组合, 愈伤组织生长较快, 30 d 左右达到生长高峰期, 质地呈现为绿色, 坚硬, 带有很明显的芽点(肉眼可见); 45d 后在原诱导培养基中, 可直接分化出幼苗, 继代培养可得到健壮的再生苗。由此说明 IAA 对愈伤组织及不定芽的诱导起着十分重要的促进作用^[6-8]。故选择 0.5 mg/L IAA + 1.5 mg/L 6-BA 为子叶的最佳愈伤组织和不定芽的诱导培养基。

表 2 植物生长调节剂对子叶愈伤组织及不定芽诱导的影响

培养基	植物生长调节剂/mg · L ⁻¹				接种数(枚)	出愈率/%	出芽率/%	愈伤质地
	IAA	NAA	2, 4-D	6-BA				
1	0.5			0.5	80	100	33.33	b
2	0.5			1.5	80	100	82.61	a
3	0.2			2.0	80	100	66.67	a
4	0.5			2.0	80	100	41.67	a
5	1.0			0.5	80	40	0.00	c
6	1.0			2.0	80	60	1.53	c
7		0.1		0.5	80	86	0.00	c
8		0.1		2.0	80	98	7.50	b
9		0.1		5.0	80	100	11.25	a
10		0.1		6.0	80	90	0.00	c
11		0.5		0.5	80	100	1.00	b
12		0.5		2.0	80	100	9.00	a
13		1.0		0.5	80	86	0.00	c
14		1.0		2.0	80	92	5.00	c
15			0.1	0.5	80	100	0.00	d
16			0.1	1.0	80	100	0.00	d
17			0.5	0.5	80	95	0.00	d
18			0.5	1.0	80	95	0.00	d
19			1.0	0.5	80	90	0.00	d
20			1.0	1.0	80	95	0.00	d
21				2.0	80	100	11.25	b
22				3.0	80	100	12.50	b
23				5.0	80	100	18.75	b

注: 45 d 后统计的结果; a 代表绿色, 坚硬, 生长迅速, 愈伤体积极大; b 代表淡绿色, 坚硬, 生长缓慢, 愈上体积小; c 代表黄白色, 疏松, 生长缓慢, 愈伤体积极小; d 代表黄色呈水渍状, 疏松, 生长快, 愈伤体积小。

NAA 和 6-BA 的激素组合中, 6-BA 对子叶愈伤组织的诱导有显著影响. 随着 6-BA 浓度升高, 出愈率明显提高, 愈伤组织形成时间缩短, 且质地变得优良, 其中 6-BA 5.0 mg/L 中还有少量的出芽现象; 而随着 NAA 浓度的增加, 对愈伤组织生长不利, 特别是 NAA 浓度达到 1 mg/L 时, 极易出现根先分化现象, 分化率一般为 50%~70%, 在本实验中, NAA 诱导愈伤组织适宜浓度为 0.1~0.5 mg/L.

在 2, 4-D 与 6-BA 的组合中, 不同的浓度组合诱导的愈伤组织质地都不理想, 为黄色呈水渍状, 疏松, 无生长芽点^[8]. 6-BA 单独作用时, 愈伤组织诱导率为 100%, 且诱导过程中也有少量的出芽现象, 但诱导时间较其他组合长, 愈伤组织质地和数量较其他组合差.

综合各项因素考虑, 本实验以 0.5 mg/L IAA + 1.5 mg/L 6-BA 为子叶的最佳愈伤组织和不定芽的诱导培养基; 以 0.1 mg/L NAA + 5.0 mg/L 6-BA 诱导的愈伤组织作为后期研究影响马蹄金分化因素的材料.

2.3 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织分化的影响

将 0.1 mg/L NAA + 5.0 mg/L 6-BA 诱导的愈伤组织接种到不同分化培养基中, 分化情况详见表 3.

单独用 6-BA 时, 分化率为 0; IAA 和 6-BA 同时作用时, 分化率为 12%~18%, 加入 AgNO₃, 分化率略有提高, 为 22%~24%; 当 NAA、6-BA 与 AgNO₃ 同时作用时, 分化率较其他组合明显提高, 实验结果表明, 2~3 mg/L AgNO₃ 为愈伤组织分化的最适浓度. 故选择 0.1 mg/L NAA + 3 mg/L 6-BA + 2 mg/L AgNO₃ 为最佳分化培养基, 分化率可达 76%.

表 3 不同植物生长调节剂对愈伤组织分化的影响

分化培养基	生长调节剂及附加物/mg · L ⁻¹				接种愈伤 /枚	绿苗分化数 /枚	分化率 /%
	IAA	NAA	6-BA	AgNO ₃			
1			1.5		50	0	0
2			3		50	0	0
3	0.5		1.5		50	6	12
	1.0		1.5		50	9	18
4	0.5		1.5	2	50	11	22
5	0.5		1.5	3	50	12	24
6	0.5		1.5	4	50	9	18
7		0.1	2		50	0	0
8		0.1	2	2	50	21	42
9		0.1	2	3	50	37	74
10		0.1	2	4	50	11	22
11		0.1	3		50	0	0
12		0.1	3	2	50	38	76
13		0.1	3	3	50	23	46
14		0.1	3	4	50	9	18

注: 45 d 后统计的结果.

2.4 不同植物生长调节剂的组合对马蹄金生根的影响

激素组合不同, 生根效果也不一样^[8]. 从表 4 中可知, NAA 对根的分化几乎没有促进作用, 此现象与传统观点 NAA 有助于植物生根相矛盾. 1/2MS 和 1/2MS + IAA 中均有生根现象, 但效率不高, 时间较长. IBA 有利于生根, 0.5 mg/L IBA 和 1.0 mg/L IBA 均可促进生根, 生根率都为 100%, 相比之下, 0.5 mg/L IBA 出根时间更早, 萌发的新芽多且苗健壮, 故选择 1/2MS + 0.5 mg/L IBA.

2.5 不同蔗糖浓度对马蹄金生根的影响

不同蔗糖浓度对马蹄金生根的影响并不大, 马蹄金在浓度为 0~50 mg/L 时都可以正常生根, 时间差也较小, 根的质量并无太大差别, 故选择无糖生根培养基较合理(表 5).

表 4 不同植物生长调节剂组合对马蹄金生根的影响

生根培养基	生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			接芽数/枚	出根时间/天	生根率/%
	NAA	IBA	IAA			
1	0.05			50	—	—
2	0.1			50	—	—
3	0.5			50	—	—
4	1.0			50	—	—
5		0.05		50	25	12
6		0.1		50	20	26
7		0.5		50	8	100
8		1.0		50	18	100
9			0.05	50	15	9
10			0.1	50	11	23
11			0.5	50	9	68
12			1.0	50	9	75
13	0	0	0	50	20	10

注: 生根基本培养基为 1/2MS.

表 5 不同蔗糖浓度对马蹄金生根的影响

处理	接种芽数/枚	出根时间/天	生根率/%
C50	50	13	100
C40	50	10	100
C30	50	8	100
C20	50	7	100
C10	50	8	100
C0	50	9	100

注: 生根培养基为 1/2MS+0.5 mg/LIBA.

3 讨 论

3.1 植物生长调节剂对马蹄金子叶愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂是影响植株分化的重要因素, 生长素与细胞分裂素的比例可以调控离体培养中植物的形态建成, 原因在于在植物离体培养过程中, 外植体的内源激素水平不断变化, 而生长素与细胞分裂素等物质又存在极性运输现象, 由此导致了其体内分布的特异性改变, 这一变化与器官发生和愈伤组织的形成密切相关^[8]. 在本实验中, 对子叶愈伤组织的诱导, 激素组合 IAA+6-BA 和 NAA+6-BA 都可以达到较好的效果, 不同的是在这两个组合中, 6-BA 的浓度存在着较大的反差, 前者浓度仅为 1.5 mg/L, 后者高达 5.0 mg/L; 而他们之间的直接出芽率也存在较大的差异, 前者高达 82.61%, 后者仅为 11.25%, 这可能是与 IAA 和 NAA 对子叶的作用机制有关, 或者是与马蹄金的内源激素水平有密切关系, 这需要进一步的实验研究证实.

3.2 AgNO_3 在马蹄金的分化中扮演的重要作用

愈伤组织分化成苗不仅取决于诱导产生的愈伤组织的质地, 更重要的在于分化培养基的成分. 本实验中, 分化培养基中加入 AgNO_3 对愈伤组织分化出芽具有明显地促进作用, 不加, 则分化率很低或不分化, 这可能是由于 AgNO_3 能抑制培养细胞释放乙烯类物质的活性, 促进多胺类物质的合成, 从而促进器官的发生, 在紫花苜蓿的组培中也得到了证实^[9,10], 但是 AgNO_3 具体作用机制还不清楚, 需要有关实验证明, 为以后对 AgNO_3 的应用提供可靠的依据.

参考文献:

- [1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志(64 卷之一) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 8-10.
- [2] 韩烈保, 杨 磊, 邓菊芬. 草坪草种及其品种 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 175-176.

- [3] 邓菊芬, 黄必志. 马蹄金草坪的建植与养护技术 [J]. 草原与草坪, 2000, 1: 41—42.
- [4] 田志宏, 王 涛, 严 寒, 等. 不同外植体对马蹄金愈伤组织诱导及分化的影响 [J]. 草业科学, 2004, 21(5): 71—75.
- [5] 田志宏, 严 寒, 李秋杰, 等. 马蹄金愈伤组织诱导及植株再生研究 [J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(8): 403—407.
- [6] 宋莉英, 高 峰. 苦瓜离体培养过程中内源激素含量的变化 [J]. 植物学通报, 2006, 23(2): 192—196.
- [7] 崔凯荣, 邢更生, 周攻克, 等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. 遗传, 2000, 22(5): 349—354.
- [8] 王玉英, 高新一. 植物组织培养技术手册 [M]. 北京: 金盾出版社, 2006.
- [9] 朱自清. 植物细胞工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 54—90.
- [10] 王友生, 李阳春, 梁慧敏, 等. 紫花苜蓿愈伤组织诱导及植株再生的研究 [J]. 草原与草坪, 2006, 4: 55—58.

Tissue Culture of *Dichondra repens* Forst

QIU Rong, LI Ming-yang, GUO Yu-long,
PI Wei, SUI Shun-zhao

School of Horticulture and Landscape Architecture, Institute of Ornamental Research, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: In this experiment, the cotyledons of *Dichondra repens* Forst were used as the experimental materials in tissue culture, and the effects of different combinations of plant growth regulators at different concentrations on callus induction and differentiation were investigated. The results indicated that the culture media contenting 2,4-D, NAA, IAA or 6-BA had no significant differences in callus induction, the range of induction rate being 80%~100%. However, the quality of calli was quite different, and the best induction media were 5.0 mg/L 6-BA+0.1-mg/L NAA and 0.5 mg/L IAA+1.5 mg/L 6-BA with an induction rate of 82.61%. AgNO_3 was an important factor for callus differentiation, the best differentiation medium was 0.1 mg/L NAA+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L AgNO_3 , the rate of differentiation being 76%; and the best rooting medium was 1/2MS+0.5 mg/L IBA, whose rooting rate was as high as 100%.

Key words: *Dichondra repens* Forst; cotyledon; plant growth regulator; plantlet regeneration

责任编辑 欧 宾