

五节芒离体再生与多倍体诱导技术体系的建立

周玥玥¹, 陈智勇¹, 黄丽芳², 邓果特¹, 蒋建雄¹, 易自力^{1*}

(1.湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.中国科学院 亚热带农业生态研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要:以五节芒(*Miscanthus floridulus*)幼穗为外植体,建立了五节芒的离体再生体系:幼穗的最佳愈伤诱导培养基为 MS+4.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA,最佳分化培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA,最佳生根培养基为 MS+1.0 mg/L IAA+0.1 mg/L IBA+1.0 mg/L CCC。比较不同浓度秋水仙碱溶液对五节芒愈伤组织诱变的效果,结果显示,以 1 000 mg/L 秋水仙碱处理愈伤组织 72 h,诱导率可达 12.48%,形态特征、DNA 含量和染色体核型分析表明,诱导获得的再生植株为五节芒四倍体。

关键词:五节芒;离体再生;秋水仙碱;多倍体

中图分类号:Q943;Q949.94 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2012)05-0487-04

Establishment of an *in vitro* system for regeneration and polyploid induction of *Miscanthus floridulus*

ZHOU Yue-yue¹, CHEN Zhi-yong¹, HUANG Li-fang², DENG Guo-te¹, JIANG Jian-xiong¹, YI Zi-li^{1*}

(1.College of Bioscience & Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Institute of Subtropical Agriculture, The Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: The immature inflorescence of *Miscanthus floridulus* were used as explants to establish the regeneration system *in vitro*. The results indicate that the best medium for callus induction was MS medium with 4.0 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L 6-BA, for bud differentiation was MS medium with 2.0 mg/L 6-BA and for plantlets rooting was MS medium with 1.0 mg/L IAA, 0.1 mg/L IBA and 1.0 mg/L CCC. The effects of different concentrations of colchicine on polyploid induction were investigated *in vitro*. The results indicate that the induction rate of polyploidy in the treatment with 1 000 mg/L colchicine solution for 72 h reached 12.48%. The morphological characteristic, nuclear DNA contents and chromosome karyotype of the regenerated plantlets showed the induced plantlets were tetraploid.

Key words: *Miscanthus floridulus*; regeneration *in vitro*; colchicine; polyploid

五节芒(*Miscanthus floridulus*)系芒属(*Miscanthus* Andresson)多年生高大草本植物,广泛分布于安徽、湖北、贵州、福建、江苏、广东、广西、江西、湖南等省份。五节芒属C₄植物,生长快,茎秆粗壮,根系发达,分蘖数多,生物质量大,其生物质可作造纸原料、造板材料、动物饲料和蘑菇栽培基质^[1-2]。五节芒抗逆性、覆盖性和金属离子吸附性强,还是

很好的荒地和矿区生态修复植物^[3-4]。特别是五节芒具燃烧值高、灰分含量低和生态适应性强等优点,被认为是颇具开发潜力的新型能源植物^[5-6]。

通过染色体加倍技术,人工创造多倍体,是获得高生物质产量五节芒新品种的有效途径,而多倍体的诱导又依赖于离体再生技术体系的建立。何立珍等^[7]利用秋水仙碱对南荻进行多倍体诱导,并获

收稿日期:2012-03-18

基金项目:“十二·五”农村领域国家科技计划项目(2011AA100209-3)

作者简介:周玥玥(1987—),女,苗族,湖南吉首人,硕士,主要从事细胞遗传学研究, zhouyueyue99@163.com; *通信作者, yizili889@163.com

得了南荻四倍体。Petersen 等^[8-9]用含有秋水仙碱的培养基间断性培养不同基因型芒的胚性愈伤组织,获得了芒四倍体。对五节芒的再生体系的建立以及多倍体诱导,仅有胡恒康等^[10]以五节芒种子为外植体,通过丛生芽增殖进行快速繁殖的报道。笔者以五节芒幼穗为外植体,建立其愈伤组织途径的高频离体再生体系和多倍体诱导技术体系,旨在为五节芒的遗传改良和种质创新提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

五节芒野生二倍体材料,采自湖南郴州,种植于湖南农业大学芒属植物资源圃内。经检测,该材料核型公式为 $2n=2x=38=30m+8sm$,按 Stebbins 核型标准分类属于 2B 型。

1.2 方法

于五节芒孕穗期剪取处于颖花原基形成期的幼穗,将带有苞叶的幼穗用 0.1% 的 $HgCl_2$ 表面消毒灭菌 15 min 后,用无菌水清洗 5~6 次,在超净工作台上将幼穗剥出,切成 0.5 cm 小段置于诱导培养基上。

培养温度为 $(25\pm 1)^\circ C$,愈伤组织诱导阶段为暗培养,待愈伤组织在分化培养基上诱导出绿色芽点后,再转入光照培养,每天光照 12 h,光照度为 2 000 lx。

1.2.1 再生体系的建立

愈伤组织诱导及继代培养基为 $MS+2,4-D+6-BA$,设置 2,4-D 质量浓度分别为 2.0、4.0、6.0 mg/L; 6-BA 质量浓度分别为 0、0.1、0.2 mg/L。

愈伤组织分化培养基为 $MS+6-BA$,设置 6-BA 质量浓度分别为 0、1.0、2.0、4.0 mg/L。

再生苗生根培养基为 $MS+CCC+IAA+IBA$,CCC 质量浓度为 1.0 mg/L; 设置 IAA 质量浓度分别为 0、0.5、1.0 mg/L; IBA 质量浓度分别为 0、0.1、0.2 mg/L。

1.2.2 多倍体诱导与鉴定

将进入分化状态的愈伤组织分别用质量浓度为 500、1 000、1 500 和 2 000 mg/L 的秋水仙碱溶

液作 24、48 和 72 h 的浸染处理后,用无菌水反复冲洗并及时转入分化培养基中使其恢复生长,再接入生根培养基使其生根成苗。

取经秋水仙碱处理后的再生苗成熟叶片,参照文献^[11]的方法制片,观察气孔保卫细胞的大小,用目镜测微尺随机测量 50 个保卫细胞的长径、短径,计算平均值,统计气孔密度(100 倍镜下 15 个视野中的气孔的平均数),并拍照记录。

取已生根且高于 5 cm 再生苗的嫩叶 20 mg,将其切碎后过滤,用 0.5 mL 细胞核提取液浸泡 5 min,加入 0.5 mL PI 染液染色 20 min,利用 EpicsXL 流式细胞仪(Beckman Coulter Company)测定 DNA 的相对含量,初步确定染色体倍性。

对经细胞流式仪检测的、DNA 相对含量已加倍的再生苗,在幼苗根长至 1 cm 左右时,切取 4~6 mm 根尖,采用文献^[12]建立的芒属植物染色体核型分析方法,对根尖进行染色体制片,在显微镜下统计有丝分裂中期的染色体数。染色体数为 76 条的记为四倍体。

试验数据采用 LSD 法进行分析。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂及浓度对五节芒愈伤组织诱导的影响

当 2,4-D 质量浓度为 2.0 mg/L 时,五节芒愈伤组织出愈率较低,为 32.55%。随着 2,4-D 质量浓度的升高,出愈率有较大的提高,当 2,4-D 质量浓度为 4.0 mg/L 时,出愈率达到 85.98%。但随着 2,4-D 质量浓度继续升高,其出愈率随之下降,为 59.85%。在已添加 2,4-D 的培养基中加入一定量的 6-BA,有助于提高幼穗的出愈率。当培养基中 2,4-D 质量浓度为 4.0 mg/L、6-BA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,幼穗的出愈率达到 95.65%,但当 6-BA 质量浓度提高到 0.2 mg/L 时,出愈率却降低至 90.37%。可见,培养基中 2,4-D 质量浓度为 4.0 mg/L、6-BA 质量浓度为 0.1 mg/L 是诱导五节芒愈伤组织最适合的浓度配比。五节芒的愈伤组织有淡黄、黄褐、褐 3 种

颜色, 淡黄色愈伤组织结构致密, 色泽鲜艳, 呈颗粒状, 增殖能力强, 经继代培养, 可以产生大量致密的胚性愈伤组织(封二图 1-1)。

2.2 6-BA 质量浓度对五节芒愈伤组织分化的影响

继代培养 2~3 次后, 将生长状态良好的愈伤组织转至添加不同质量浓度 6-BA 的 MS 分化培养基上培养。当不加 6-BA 时, 其愈伤组织分化率为 25.93%, 当在培养基中添加 2 mg/L 6-BA 时, 分化率提高至 64.12%。可见, MS+2 mg/L 6-BA 为五节芒胚性愈伤组织分化的较适培养基。愈伤组织在 7 d 左右就能出现绿芽点, 尔后逐渐发育成丛芽(封二图 1-2)。

2.3 植物生长调节剂及配比对再生苗生根的影响

将经上述培养过程得到的无根苗转入生根培养基进行培养, 结果(表 1)显示, 随着 IAA 质量浓度的升高, 再生苗生根率也随之增高, IAA 最适宜的质量浓度是 1.0 mg/L, 当 IBA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 生根率略高; 因此, 最适宜的生根培养基是 MS+ 1.0 mg/L IAA + 0.1 mg/L IBA + 1.0 mg/L CCC。在此培养基中, 28 °C、20 d 后再生苗基部长出新根, 获得完整植株。

表 1 植物生长调节剂浓度配比下的五节芒再生苗生根率
Table 1 The root rate of the regenerated plantlets of *Miscanthus floridulus* on the different concentrations of plant growth regulator

生长调节剂质量浓度/(mg·L ⁻¹)			生根率/%
IAA	IBA	CCC	
0	0	1.0	(15.00±3.74)g
0.5	0	1.0	(56.37±1.67)d
1.0	0	1.0	(84.50±1.39)b
0	0.1	1.0	(25.08±3.36)f
0.5	0.1	1.0	(73.65±2.83)c
1.0	0.1	1.0	(91.80±0.66)a
0	0.2	1.0	(32.00±4.28)e
0.5	0.2	1.0	(81.15±3.99)b
1.0	0.2	1.0	(90.60±1.19)a

2.4 秋水仙碱对二倍体五节芒染色体加倍的影响

与对照相比, 用秋水仙碱处理后的愈伤组织分化成苗的时间延长, 生长缓慢, 且有部分愈伤组织逐渐

褐化死亡。用较低含量的秋水仙碱(500~1 500 mg/L)处理愈伤组织时, 随着处理时间的延长, 多倍体的诱导率逐步增高。秋水仙碱的诱导浓度与诱导时间存在着明显的互补作用, 从表 2 的结果可以看出, 带芽点的胚性愈伤组织浸泡在 1 000 mg/L 秋水仙碱 72 h 时, 其多倍体诱导率最高, 可达 12.48%。而 500 mg/L 秋水仙碱处理 72 h, 出现了 1 株嵌合体。

表 2 秋水仙碱浓度及不同时间处理下五节芒多倍体的诱导率

Table 2 The rate of the polyploidy induction of *Miscanthus floridulus* on the different concentrations and process-time of colchicine

质量浓度/(mg·L ⁻¹)	时间/h	处理数/个	诱导率/%	嵌合体数/株
0	0	50	0	0
500	24	48	(4.17±3.61)d	0
500	48	47	(6.39±0.24)bcd	0
500	72	48	(10.42±3.61)ab	1
1 000	24	45	(6.67±0)bcd	0
1 000	48	40	(7.51±0.32)bcd	0
1 000	72	56	(12.48±2.88)a	0
1 500	24	49	(8.09±3.18)abcd	0
1 500	48	56	(8.97±3.22)abc	0
1 500	72	48	(10.42±3.61)ab	0
2 000	24	75	(9.33±2.31)ab	0
2 000	48	38	(10.47±4.27)ab	0
2 000	72	68	(4.41±0.11)cd	0

2.5 五节芒多倍体的鉴定结果

通过流式细胞仪检测再生植株叶片 DNA 含量, 结果其 DNA 相对含量的最大峰值约为对照二倍体 DNA 含量的 2 倍(封二图 2)。进一步通过染色体制片技术对 DNA 含量加倍的植株进行染色体数目及倍性分析, 证实该植株染色体为 $2n=4x=76(x=19)$ (封二图 3), 其核型分析表明, 该植株为四倍体。

经秋水仙碱处理获得的四倍体植株, 在外观上与正常二倍体植株有较大的差别, 表现为苗基部明显膨大, 苗生根以后叶片较厚且宽, 颜色较深, 节间较短, 茎与根都较粗(封二图 4)。观察二倍体与四倍体的气孔保卫细胞, 并比较保卫细胞的大小与气孔密度(表 3), 四倍体叶下表皮气孔保卫细胞长为

(36.25±3.37) μm, 比二倍体的增大 78.75%, 保卫细胞宽平均(8.63±1.23) μm, 比二倍体的增大 53.56%, 且四倍体的气孔密度明显比二倍体小(封二图 5)。

表 3 五节芒四倍体与二倍体叶片气孔保卫细胞的大小和密度

Table 3 The size and density in leaf stoma guard cell of the tetraploid and diploid of *Miscanthus floridulus*

材料	气孔保卫细胞			气孔密度	
	观察数/个	细胞长径/μm	细胞短径/μm	观察视野数/个	气孔数/个
二倍体	50	20.28±1.17	5.62±0.83	15	148.07±7.92
四倍体	50	36.25±3.38	8.63±1.24	15	68.47±3.74

参考文献:

- [1] 刘叶高. 五节芒栽培杏鲍菇等三种珍稀食用菌试验研究[J]. 现代园艺, 2006(7): 4-5.
- [2] 萧运峰, 高洁, 王锐. 五节芒的生产性状及饲用价值的研究[J]. 四川草原, 1997(1): 20-24.
- [3] 张崇邦, 王江, 柯世省, 等. 五节芒定居对尾矿砂重金属形态、微生物群落功能及多样性的影响[J]. 植物生态学报, 2009, 33(4): 629-637.
- [4] 王永昌, 杨仁斌, 龚道新, 等. 人工生态系统恢复砷污染土壤的应用研究[J]. 湖南农业科学, 2007(3): 95-97.
- [5] 解新明, 周峰, 赵燕慧. 多年生能源禾草的产能和生态效益[J]. 生态学报, 2008, 28(5): 2329-2342.
- [6] 刘明稀, 蒋建雄, 易自力. 细胞工程技术在芒属能源作物上的应用[J]. 草业学报, 2011, 20(4): 261-269.
- [7] 何立珍, 周朴华, 刘选明. 南荻同源四倍体的研究[J]. 遗传学报, 1997, 24(6): 544-549.
- [8] Petersen K K, Hagberg P, Kristiansen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2003, 73: 137-146.
- [9] Petersen K K, Hagberg P, Kristiansen K. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*[J]. Plant Breeding, 2002, 121: 445-450.
- [10] 胡恒康, 江香梅, 黄坚钦, 等. 五节芒的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(11): 1109.
- [11] 王光耀, 刘俊梅, 张仪, 等. 菜豆四个不同抗热性品种的气孔特性[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(3): 267-270.
- [12] 杜凤, 蒋建雄, 卢玉飞, 等. 芒属植物核型分析技术体系的建立[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(10): 1878-1880.

责任编辑: 罗慧敏