

## 2,4-D对扁穗牛鞭草幼穗离体培养的影响

徐耀华, 刘琳, 陈菲, 刘晓波, 杨春华  
(四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014)

**摘要:**以雅安扁穗牛鞭草的幼穗为外植体,研究了2,4-D浓度和不同取材部位对愈伤组织诱导的影响以及继代培养时不同浓度的2,4-D对愈伤组织增殖、分化、生根的影响。结果表明:以幼穗下部为外植体接种在MS+2,4-D 7.0 mg/L培养基中,颗粒状愈伤组织的诱导率高达100.00%;MS+2,4-D 1.0 mg/L是幼穗愈伤组织较为适宜的继代增殖培养基,在该培养基上颗粒状胚性愈伤组织的出愈率为89.44%,愈伤组织的绿苗分化率和生根率都可达100%,平均绿芽点数和生根数等均极显著高于其他处理。

**关键词:**扁穗牛鞭草; 幼穗; 2,4-D; 愈伤组织; 继代; 分化

中图分类号:S812

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2013)06-0022-03

### Effect of 2,4-D on plant regeneration from immature inflorescence of *Hemarthia compressa*

XU Yao-hua, LIU Lin, CHEN Fei, LIU Xiao-bo, YANG Chun-hua

(College of Animal Science and Technology, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** In order to develop an efficient and reliable tissue culture system for warm-season forage grass *Hemarthia compressa*, an efficient plant regeneration system via callus induction was established using immature inflorescence as the explants. The frequency of callus induction reached 100.00% in the callus induction medium (MS) with 7 mg/L 2,4-D by taking the lower immature inflorescence. The highest embryonic callus formation reached 89.44% in the subculture medium (MS) with 1 mg/L 2,4-D. The frequency of green plant differentiation and rooting reached 100.00% of the callus after subculture on MS with 1 mg/L 2,4-D, the average number of green buds and roots significantly more than other treatments. The results would be useful for development of transgenic *H. compressa* plants.

**Key words:** *Hemarthia compressa*; immature inflorescence; 2,4-D; callus; subculture; differentiation

扁穗牛鞭草 [*Hemarthia compressa* (L.F.) R. Br.] 是禾本科黍亚科牛鞭草属多年生根状茎草本植物, 主要分布于热带、亚热带地区及北半球的温带湿润地区, 是一种高产优质、适应性广、抗逆性强的暖季型青绿饲草<sup>[1]</sup>。扁穗牛鞭草自然结实率非常低<sup>[2]</sup>, 发芽率也几乎为零, 主要以营养繁殖为主。目前扁穗牛鞭草的育种方式单一, 仅局限于无性系重复选择、栽培驯化等方式。而通过组织培养产生无性系变异或导入优良基因可以加速新品种的选育。

国内外学者普遍认为在禾本科植物组织培养中, 幼穗、成熟胚为最适外植体, 其胚性愈伤组织诱导率和植株再生率高于叶片、茎段、胚轴、花药等其他外植体材料。Vander等<sup>[3]</sup>报道了草地早熟禾成熟种子及幼穗组织培养的结果, 在相同的试验条件下, 采用幼穗作为外植体其再生率高达79%, 而成熟种子的分化率只有3%。赵智燕等<sup>[4]</sup>以高羊茅的幼穗、叶尖、幼茎和幼节为外植体在相同条件下进行愈伤组织的诱导, 结果只有幼穗可以诱导出愈伤组织且诱导率高达94%。Yadav等<sup>[5]</sup>以蒺藜草的种子、茎尖和幼穗为外植体在相同条件下进行组织培养, 发现只有以幼穗可以诱导出高频率的胚性愈伤组织。以黑麦草和海滨雀稗的幼穗为外植体都获得了较高的愈伤组织诱导

率和植株再生率<sup>[6-7]</sup>。

迄今为止, 国内关于扁穗牛鞭草组织培养技术的报道较少, 刘金平等<sup>[8]</sup>以广益扁穗牛鞭草幼茎为外植体建立了扁穗牛鞭草的再生体系, 但主要通过6-BA和NAA使外植体直接分化不定芽形成再生植株, 而不是由愈伤组织分化而成的再生苗。本试验以雅安扁穗牛鞭草的幼穗为外植体, 探讨不同浓度2,4-D、不同取材部位对幼穗愈伤组织诱导的影响, 继代培养时不同2,4-D浓度对愈伤组织增殖及植株再生的影响, 以期建立以雅安扁穗牛鞭草幼穗为外植体经愈伤组织诱导、愈伤组织继代、愈伤组织分化、再生苗生根的组织培养体系, 为利用生物技术选育新品种奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试材料为雅安扁穗牛鞭草 (*H. compressa* cv. Yaan) 幼穗, 来自四川农业大学草学系科研基地。

以MS培养基为基本培养基, 每升添加蔗糖30 g、琼脂5.8 g, 调整pH值为5.8。

#### 1.2 试验方法

**1.2.1 愈伤组织的诱导培养** (1) 不同浓度2,4-D。晴天上午10:00左右, 采集雅安扁穗牛鞭草的幼穗带回实验室, 流水冲洗1 h后用75%酒精表面消毒10 s, 再用加有几滴吐温的0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒8 min、无菌水漂洗4~5次, 最后用无菌滤纸吸去材料表面的水分, 用消毒灭菌的手术刀和镊子剥出幼穗, 切取小穗下部约5 mm的小段接

收稿日期: 2013-01-27

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAD17800)

作者简介: 徐耀华 (1986-), 女, 在读硕士生, E-mail: xuyh24@126.com

通讯作者: 杨春华 (1969-), 女, 博士, 教授, E-mail: ychh@sicau.edu.cn

种于添加有不同浓度 (0、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mg/L) 2,4-D 的 MS 培养基中进行愈伤组织诱导。每个处理接种 10 瓶, 每瓶 3 段, 3 次重复, 在 25(±2)℃ 暗培养 30 d 后统计出愈率, 每 3 d 观察 1 次愈伤组织的出愈和生长状况, 下同。(2) 不同取材部位。将消毒灭菌后的小穗按不同部位(下部小穗: 离穗轴约 10 mm; 中部小穗: 离穗轴 10~20 mm; 上部小穗: 离穗轴 20 mm 以上部分) 切成约 5 mm 的小段, 接种于(1)中筛选出的最适诱导培养基中。

1.2.2 愈伤组织的继代培养 将同一处理且生长状况一致的愈伤组织转入含有不同浓度(1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mg/L) 2,4-D 的继代培养基中, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 4 个愈伤组织, 3 次重复, 25 (±2)℃ 暗培养 20 d 后统计出愈率, 每 3 d 观察 1 次愈伤组织的出愈和生长状况。

1.2.3 愈伤组织的分化培养 将 1.2.2 各处理的愈伤组织转入 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.2 mg/L 培养基中进行分化培养, 每 20 d 更换 1 次培养基, 在 25(±2)℃、2 000~3 000 lx、光照 16 h/d 条件下培养 30 d 后, 统计愈伤组织的绿苗分化率。

1.2.4 再生苗的生根培养 将 1.2.3 各处理分化出的幼苗转接入 1/2MS 培养基中, 培养条件为 28(±2)℃、2 000~3 000 lx、16 h/d。30 d 后统计各处理再生苗的生根情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响 接种 7 d 后, 添加有 2,4-D 处理的幼穗开始膨大并有少许颗粒状愈伤组织长出。继续培养, 外植体表面陆续产生淡黄色、表面湿润的颗粒状愈伤组织。在不含 2,4-D 的培养基中, 幼穗不能形成愈伤组织; 在不同浓度 2,4-D 处理下, 各处理间差异达到极显著水平。随着 2,4-D 浓度升高, 愈伤组织出愈率逐渐上升, 当 2,4-D 浓度达到 7.0 mg/L 时, 愈伤组织出愈率最高, 可达 99.28%, 5.0 mg/L 和 7.0 mg/L 处理的愈伤组织质量最好, 呈乳黄色的颗粒状且生长迅速。当 2,4-D 浓度大于 7.0 mg/L 后, 愈伤组织出愈率又开始极显著下降, 愈伤组织多为浅白色水渍状、生长缓慢(图 1 和图 2, 封二)。综合愈伤组织的出愈率和质量可知, MS+2,4-D 7.0 mg/L 为最适诱导培养基。此外, 在试验中还发现, 在 2,4-D 为 3.0 mg/L 时, 部分外植体的一端上翘, 另一端依附在培养基上, 并不产生愈伤组织。将此外植体转入分化培养基中光照培养 15 d 后, 外植体周围开始有不定芽长

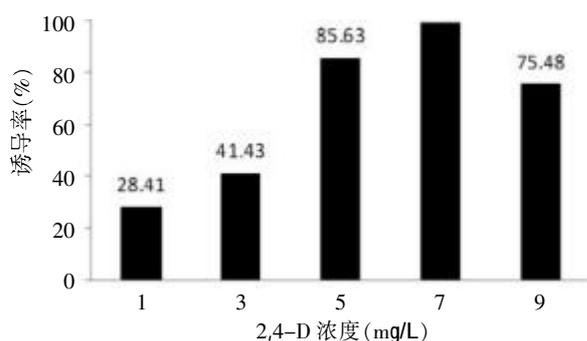


图 1 不同浓度 2,4-D 对幼穗愈伤组织诱导的影响

出, 继续培养可形成完整的再生苗。

2.1.2 不同取材部位对愈伤组织诱导的影响 接种 7 d 后, 取自幼穗中部和下部的的外植体开始膨大, 并逐渐有颗粒状的愈伤组织长出, 继续培养可获得淡黄色致密的颗粒状愈伤组织。但取自幼穗顶部的的外植体无膨大现象, 仅在端口处有白色颗粒状的愈伤组织长出, 靠近穗顶处则有毛状根长出, 继续培养也只有少数可以长出胚性愈伤组织。结果表明: 下部小穗和中部小穗出愈率差异显著, 顶部小穗和中部、下部小穗出愈率都呈极显著差异, 出愈率表现为下部>中部>顶部(图 3); 小穗下部和中部是扁穗牛鞭草幼穗较理想的外植体。

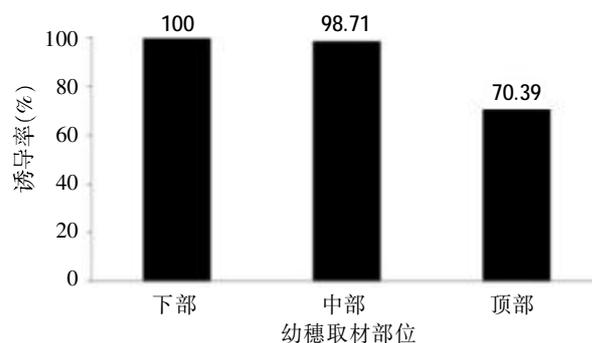


图 3 不同取材部位对幼穗愈伤组织诱导的影响

### 2.2 愈伤组织的增殖

从表 1 可以看出, 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织的继代培养具有极显著的影响; 在含不同浓度 2,4-D 的继代培养基中, 愈伤组织表现出和启动培养阶段相反的发展趋势(表 1 和图 4, 封二), 愈伤组织出愈率随着 2,4-D 浓度的升高而逐渐降低, 在愈伤组织启动培养阶段愈伤组织出愈率最高的 MS+2,4-D7.0 mg/L 的培养基在继代培养中愈伤组织的出愈率仅 26.59%, 而在初代培养中出愈率最低的 MS+2,4-D1.0 mg/L 培养基在继代培养中愈伤组织出愈率却最高, 达 89.44%。因此 MS+2,4-D 1.0 mg/L 是幼穗愈伤组织较为适宜的继代增殖培养基。

表 1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织继代培养的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	出愈率 (%)	愈伤组织生长状态	愈伤组织生长质量
1.0	89.44aA	乳白色或黄色, 颗粒状	+++
3.0	69.76bB	乳白色或黄色, 颗粒状	++
5.0	50.73cC	淡黄色, 颗粒状, 少许瘤状突起	++
7.0	26.59dD	红褐色或褐色, 块状	+
9.0	10.70eE	褐色, 块状	+

注: (1)“+”表示长势差, 生长速度缓慢; “++”表示长势中等, 生长速度较快; “+++”表示长势良好, 且生长速度快。(2)同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著, 大写英文字母不同者表示差异极显著, 表 2、表 3 同。

### 2.3 愈伤组织的分化

接种 5 d 后, 1.0、3.0 mg/L 2,4-D 处理的愈伤组织开始陆续出现绿色芽点, 继续培养 15 d 后开始长出绿苗。而 5 mg/L 2,4-D 处理则在接种 10 d 后才开始长出少量不定芽。

7.0、9.0 mg/L 2,4-D 处理则一直无不定芽出现(封二)。试验结果表明,愈伤组织继代培养过程中 2,4-D 浓度对愈伤组织的绿苗分化具有极显著的影响。绿苗分化和平均绿芽点数随继代时 2,4-D 浓度的升高而逐渐降低(表 2)。

表 2 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织分化的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	接种的愈伤组织数(块)	平均绿芽点(个)	绿苗分化率(%)	生长状况
1.0	38	16.75	100.00aA	不定芽萌发迅速数量多呈簇状
3.0	42	5.34	56.43bB	不定芽萌发较快但数量较少
5.0	37	1.32	37.29cC	不定芽萌发缓慢且数量很少
7.0	31	0	0dD	
9.0	35	0	0dD	

## 2.4 再生苗的生根

本试验结果(表 3)表明,2,4-D 浓度对再生苗的生根率、生根数和生根所需天数有极显著影响,经低浓度 2,4-D 处理所得再生苗在生根率、生根数量和生根所需时间极显著高于高浓度 2,4-D 处理所得再生苗,根的质量也比较好,更利于移栽成活。

表 3 不同浓度 2,4-D 对再生苗生根的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	生根数量 (条)	根出现时间(d)	根的质量
1.0	100.00aA	4.9aA	5	细而长,利于营养和水分的吸收
3.0	82.35bB	3.7bB	16	多细而长,利于营养和水分的吸收
5.0	25.71cC	2.5cC	17	多肥而粗,不利于营养和水分的吸收

## 3 讨论

3.1 大多数禾本科植物必须在含有 2,4-D 的条件下,通过对内源生长素水平的调控和平衡来启动细胞分裂和胚性潜力的诱导,并促进体细胞胚的早期发育<sup>[9]</sup>。高羊茅<sup>[10]</sup>、黑麦草<sup>[6]</sup>、星星草<sup>[10]</sup>、小麦<sup>[11]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>等禾本科植物都在 2,4-D 的单独作用下获得了较高的愈伤组织诱导率。在本试验中,2,4-D 浓度对幼穗的诱导率有极显著的影响。在一定范围内,幼穗的诱导率随 2,4-D 浓度的升高而升高,最高(99.28%)且质量最好的愈伤组织出现在 7.0 mg/L 2,4-D 处理中。赵智燕等<sup>[9]</sup>在高羊茅幼穗的愈伤组织诱导中发现,在一定范围内幼穗的诱导率随 2,4-D 浓度的升高而升高。

继代过程中,2,4-D 浓度对愈伤组织的出愈率、质量及后续的分化和生根也有极显著影响,只有较低浓度的 2,4-D ( $\leq 3.0$  mg/L)才能保持愈伤组织胚胎的发生能力和生根能力。高浓度 2,4-D ( $\geq 7.0$  mg/L)则直接导致愈伤组织褐变死亡进而丧失分化能力。5 mg/L 处理的愈伤组织虽然在继代培养时能长出淡黄色颗粒状愈伤组织,但绿苗分化和生根率都比较低。出现这种情况主要是由于诱导培养时愈伤组织中已经积累了较高浓度的 2,4-D。在继代培养时,过高的激素浓度反而阻碍了愈伤组织细胞的分裂增殖,使诱导率降低,愈伤组织质量下降。继代时

低浓度的 2,4-D 可以使高羊茅幼穗愈伤组织获得较高的胚性愈伤组织出愈率和绿苗分化率<sup>[9]</sup>,与本结果结果一致。李静等<sup>[13]</sup>发现,随着愈伤组织培养阶段 2,4-D 浓度的增加,芥菜愈伤组织的绿苗分化率降低。

3.2 幼穗的不同取材部位对愈伤组织诱导率的影响也极显著,其中以幼穗下部的诱导率最高,达 100%,幼穗中部的诱导率也高达 98.71%,上部小穗的诱导率却低得多,愈伤组织的质量也差,不利于后继培养。这与高振宇等<sup>[14]</sup>的结论一致,可能是因为营养物质、内源激素等在幼穗不同部位的分布不同,也可能由于上部小穗纤维素含量较高导致的。

植物生长素 2,4-D 对扁穗牛鞭草幼穗的愈伤组织诱导、继代和质量都有显著影响,进而影响到后续的愈伤组织分化和再生苗生根。以扁穗牛鞭草中部或下部小穗为外植体,接种于 MS+2,4-D 7.0 mg/L 中进行愈伤组织诱导,在 MS+2,4-D 1.0 mg/L 培养基中进行愈伤组织的继代增殖,再接种于分化和生根培养基,可以获得高频率的植株再生体系。

### 参考文献:

- [1] 王显.牧草栽培学[M]:北京,中国环境科技出版社,2001:287.
- [2] 傅仙桃,杨春华,陈灵鸢,等.广益牛鞭草花粉特性及结实性研究[J].草业学报,2008,17(2):61-67.
- [3] Vander V P, Zeal M A C M, Creemers -Molenaar. Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus culture of Kentucky bluegrass [J]. Plant Cell Report, 1989(7): 644-647.
- [4] 赵智燕,潘俊松,何丽亚,等.两个高羊茅无性系的营养器官组织培养及再生体系的建立[J].草业学报,2009,18(5):168-175.
- [5] Yadav C B, Jha P, Bhat C V. et al. Somatic embryogenesis and regeneration of Cenchrus ciliaris genotypes from immature inflorescence explants[J]. Biologia Plantarum, 2009, 53(4): 603-609.
- [6] 杨爱芳,何春梅,张举仁,等.黑麦草幼穗离体培养基植株再生[J].草业学报,2004,13(5):84-90.
- [7] Isaac N, Maria G, Fredy A. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum(Paspalum vaginatum Swartz)[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant, 2008, 44(6): 480-486.
- [8] 刘金平,张新全.扁穗牛鞭草组织培养体系建立[J].中国草地学报,2007,29(2):50-53.
- [9] 朱至清.植物细胞工程[M].北京:化学工业出版社,2003:28.
- [10] 李晓玲,李克秀,于晓明.星星草和朝鲜碱茅组织培养体系的建立[J].中国草地学报,2010,32(6):90-93.
- [11] 林国梁,李佳春,王兴珍,等.2,4-D 和干燥处理对小麦成熟胚愈伤组织诱导与分化的影响[J].麦类作物学报,2012, 32(5):858-862.
- [12] Huang X Q, Wei Z M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (Zea Mays L.)[J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(11): 793-800.
- [13] 李静,李学强,贾毛毛,等.6-BA、NAA 和 2,4-D 不同对比对芥菜愈伤组织诱导、生长及植株再生的影响[J].植物生理学报, 2012,48(2):141-146.
- [14] 高振宇,黄大牛.影响籼稻幼胚愈伤组织形成与植株再生的若干因素[J].植物生理学通讯,1999,35(2):113-115.