

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2014-0407

黄静, 颜海锋, 郑燕. 巨菌草诱导培养基的筛选及优化[J]. 草业科学, 2015, 32(5): 725-730.

HUANG Jing, YAN Hai-feng, ZHENG Yan. Screening and optimization of *Pennisetum* sp. induction medium[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(5): 725-730.

巨菌草诱导培养基的筛选及优化

黄静^{1,2}, 颜海锋^{1,2}, 郑燕^{1,2}

(1. 国家菌草工程技术中心, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 巨菌草(*Pennisetum* sp.) 属单子叶禾本科狼尾草属植物, 可作为动物饲料和多种食用菌的培养基质, 在中国及非洲广泛种植, 然而不耐寒的特性限制了其推广应用。要克服其遗传缺陷, 需借助转基因或体细胞杂交等技术, 因此, 必须建立巨菌草的组织培养体系。本研究以巨菌草幼茎为材料, 研究了巨菌草外植体的消毒方式和 2,4-D、IAA 与 NAA, 细胞分裂素(6-BA 和 KT) 的不同浓度及组合对愈伤组织诱导的影响。结果表明, 用 75% 酒精擦拭剥离后的叶鞘, 再用 2% 的次氯酸钠溶液消毒 10 min 就能达到理想的消毒目的。1.0~4.0 mg·L⁻¹ 的 2,4-D 都可以诱导出愈伤组织, 且各浓度间无显著差异($P>0.05$); 0.2 mg·L⁻¹ IAA 对愈伤组织诱导有较好的促进作用; 不同细胞分裂素对愈伤组织诱导没有明显促进作用。巨菌草愈伤组织诱导的最佳培养基配方是 MS+2,4-D(3.0 mg·L⁻¹) + IAA(0.2 mg·L⁻¹)。

关键词: 巨菌草; 幼茎; 愈伤组织; 诱导培养基

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2015)05-0725-06*

Screening and optimization of *Pennisetum* sp. induction medium

HUANG Jing^{1,2}, YAN Hai-feng^{1,2}, ZHENG Yan^{1,2}

(1. CHINA National Engineering Research Center of Juncao Technology, Fuzhou 350002, China;

2. School of life sciences, Fujian Agriculture and Forestry university, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Pennisetum* sp. is monocotyledon plant and widely planted in China and Africa as it can be used as forage and culture substrates of edible fungi. However, the lack of cold tolerance limits its popularization. Genetic technology or somatic hybridization has potential to improve the cold tolerance or quality of *Pennisetum* sp. which require the establishment of *Pennisetum* sp. tissue culture system. In the present study, the effects of different disinfection ways and different growth hormone such as 2,4-D, IAA, NAA and cytokinins (6-BA and KT) on callus induction were studied using caulicle of *Pennisetum* sp. as explants. The results showed that the ideal disinfection method was soaking in 2% sodium hypochlorite solution for 10 min after wiping stripping leaf sheath with 75% alcohol. All of the medium with the different concentrations of 2,4-D ranged from 1.0 mg·L⁻¹ to 4.0 mg·L⁻¹ can induce callus without significant difference. The medium with 0.2 mg·L⁻¹ IAA can induce more callus. The medium with different cytokinins can not induce more callus. Based on these observation, the optimal callus induction medium of *Pennisetum* sp. was MS + 2,4-D (3.0 mg·L⁻¹) + IAA (0.2 mg·L⁻¹).

* 收稿日期: 2014-09-09 接受日期: 2015-01-19

基金项目: 国家菌草工程技术研究中心开放基金项目(JCJJ13003)

第一作者: 黄静(1988-), 女, 山东泗水人, 在读硕士生, 主要从事草业育种工作。E-mail: hj880866@126.com

通信作者: 郑燕(1981-), 女, 福建莆田人, 副教授, 博士, 主要从事草业育种工作。E-mail: Swallow1318@126.com

Key words: *Pennisetum* sp.; caulicle; callus; induction medium

Corresponding author: ZHENG Yan E-mail: Swallow1318@126.com

巨菌草 (*Pennisetum* sp.) 原产于北非地区, 1983 年引入中国, 是一种单子叶禾本科狼尾草属植物。茎直立, 丛生, 根系非常发达, 植株高大, 一般为 3~5 m, 最高的可达 7.08 m。巨菌草喜温暖湿润条件, 适宜在亚热带、热带和温带生长; 属于 C₄ 植物, 具有很高的光合效率, 抗逆性很强, 产量很高, 达 300~500 t·hm⁻² [1-2]。近几年, 巨菌草在我国南方地区的种植面积逐步扩大, 应用也越来越广泛, 除了作为动物饲料和保持水土的优良品种 [3], 也用作栽培灵芝和平菇、猴头菇等食用菌的培养料 [4]。此外, 还可用作生物能源, 用于生物发电和制造燃料 [5-6]。

然而, 巨菌草不耐寒, 在北方寒冷地区自然难以越冬。我国北方大部分地区通过扦插进行无性繁殖; 也可用种子进行有性繁殖, 但发芽率很低 [7], 如遇冰雪和霜冻天气很容易死亡, 这种特性使其在北方地区的推广严重受到限制, 传统的育种技术无法解决此难题。生物技术如转基因、体细胞杂交等是改良巨菌草耐寒性的有效途径, 但必须首先建立巨菌草的组织培养技术体系及转基因体系。而有关巨菌草组织培养方面的研究在国内外尚没有相关的报道。基于此, 本研究以巨菌草的茎尖分生组织作为外植体, 对巨菌草的愈伤组织诱导进行探索, 以期对巨菌草组织培养体系建立和生物技术遗传改良奠定基础, 同时为巨菌草的组培育苗提供技术支持, 促进在更大范围利用和推广巨菌草。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为巨菌草幼茎, 在福建农林大学国家菌草工程技术中心菌草种植基地种植, 由于巨菌草不断地分蘖, 可随时取到比较幼嫩的茎。

1.2 方法

1.2.1 外植体准备 选取幼嫩且生长良好的巨菌草茎秆, 剥除叶鞘, 用刀切下茎尖部分 [8-9]。

1.2.2 培养基的制备 以 MS+30 mg·L⁻¹ 蔗糖+2.5 mg·L⁻¹ 植物胶+1 mg·L⁻¹ 聚乙烯吡咯烷酮为基本培养基, pH 为 5.8。

1.2.3 外植体的消毒接种 将外植体分别置于

75% 的乙醇中处理 0、30、60 s 和 2% 的次氯酸钠溶液中处理 10、15、20 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 在无菌滤纸上吸干水分, 用手术刀切成 0.1~0.2 cm 厚的小薄片, 接种于 MS 基本培养基上, 每瓶接种 6 块外植体, 每次接种 6 瓶, 3 次重复。然后置于 26~28 °C 的暗培养箱中培养, 7 d 后统计外植体污染率 [10-11]。

1.2.4 愈伤组织诱导

1) 将外植体材料接种含 2,4-D 浓度分别为 0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基中, 观察愈伤组织生长状况, 选取愈伤组织生长最好的浓度为最佳浓度 [12-14]。

2) 在最佳 2,4-D 浓度的基础上, 在 MS 培养基中添加 0.1、0.2、0.3、0.4 mg·L⁻¹ 的 NAA 或 IAA 与 2,4-D 组合, 选择愈伤组织生长最好的浓度组合 [15-16]。

3) 在最佳 2,4-D 和最佳 IAA 或 NAA 的浓度组合上, 在 MS 培养基上添加 0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹ 细胞分裂素 6-BA 或 KT, 选择愈伤组织生长最好的浓度组合。

以上各阶段愈伤组织的诱导均在暗培养箱中培养, 培养温度为 26~28 °C [15], 每个处理接种 6 瓶, 每瓶接种 4~6 块外植体, 3 次重复 (即重复 18 瓶), 接种 20 d 后统计愈伤组织诱导率。

1.3 数据分析

愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织的外植体/接种的外植体总数 × 100%。

以上各处理的 3 次重复数据平均值为结果数据, 运用 Excel 2010 和统计分析软件 DPS 6.0 进行数据的显著性测验和分析。

2 结果

2.1 外植体的消毒方式

该组处理编号为 A1 到 A11, 共 11 种组合, 结果如表 1 所示。

外植体的污染率在 0~28%, 最低的为只用次氯酸钠消毒 10、20 min 和只用乙醇 30、60 s, 污染率都为 0。污染率最高的为用乙醇消毒 30 s 然后再用次氯酸钠消毒 20 min, 污染率为 28%。

表1 不同消毒剂对外植体处理不同时间后的污染情况

Table 1 Contamination rate of explants after disinfecting by different disinfectants with different times

处理编号 Treatment code	75%乙醇处理时间 75% ethanol treatment time/s	2% NaClO 处理时间 2% NaClO treatment time/min	外植体数量 Explants number	染菌块数 Contamination number	污染率 Contamination rate/%
A1	0	10	18	0	0
A2	0	15	18	1	6
A3	0	20	18	0	0
A4	30	10	18	3	17
A5	30	15	18	1	6
A6	30	20	18	5	28
A7	60	10	18	2	11
A8	60	15	18	4	22
A9	60	20	18	4	22
A10	30	0	18	0	0
A11	60	0	18	0	0

注:A1—A11为处理组合编号。

Note:A1—A11 are the numbers of treatments.

2.2 不同浓度 2,4-D 对巨菌草愈伤组织诱导的影响

以 MS 作为基本培养基,分别添加不同浓度的 2,4-D,以不添加 2,4-D 作为对照(CK),共 5 个处理,结果如表 2 所示。

表 2 不同浓度的 2,4-D 对巨菌草愈伤组织诱导的影响

Table 2 Different concentrations of 2,4-D effects on *Pennisetum* sp. callus induction

处理瓶号 Treatment number	基本培养基 Minimal medium	2,4-D/ mg · L ⁻¹	出愈率 Callus rate/%
B1(CK)	MS	0	0b
B2	MS	1.0	56.000±0.023a
B3	MS	2.0	54.000±0.036a
B4	MS	3.0	54.000±0.039a
B5	MS	4.0	51.000±0.017a

注:B1—B5为处理组合编号。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。表4同。

Note: B1—B5 are the numbers of treatments. Different lower case letters indicate significantly difference at 0.05 level. The same in Table 4.

与不加入 2,4-D 的对照相比(表 2),不同浓度的 2,4-D 均能诱导出巨菌草的愈伤组织(图 1)。从 1.0~4.0 mg · L⁻¹ 4 个浓度梯度中,巨菌草的出愈率并没有显著差异,在 51.000%~56.000%。

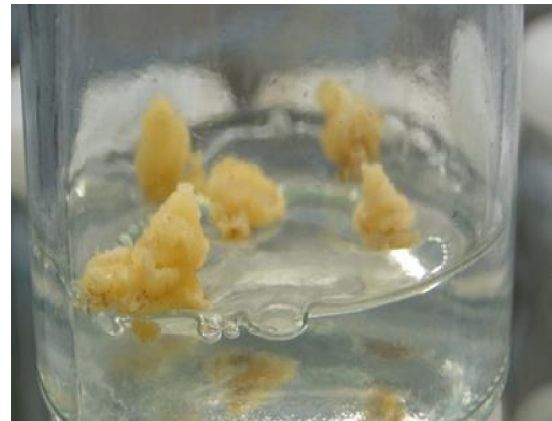


图 1 巨菌草茎尖的愈伤组织

Fig.1 *Pennisetum* sp. stem tip callus

2.3 不同浓度的 IAA、NAA 与 2,4-D 组合对巨菌草愈伤组织诱导的影响

以 MS+3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 作为基本培养基,添加不同浓度的 IAA 和 NAA,以不添加生长素为对照,共 9 个处理(表 3)。

与对照相比,加入 IAA 或 NAA 之后,巨菌草的出愈率均有明显的提高,除 C5 外其余处理与对照间差异均极显著($P<0.01$)(表 3)。出愈率随着 IAA 浓度的增高而呈先升高再降低的趋势,在浓度为 0.2 mg · L⁻¹ 时达到最高水平,此时出愈率为 76%,与其他浓度间差异极显著。而 4 个浓度的 NAA 均能增加出愈率,但无显著差异($P>0.05$),

表3 不同浓度的 IAA、NAA 与 2,4-D 组合对巨菌草愈伤组织诱导的影响

Table 3 Influence of different concentrations combination of IAA, NAA and 2,4-D on *Pennisetum* sp. callus induction

处理编号 Treatment number	2,4-D/ mg · L ⁻¹	IAA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	出愈率 Callus rate/%
C1(CK)	3.0	0	0	46.000±0.032dC
C2	3.0	0.1	0	57.000±0.032bcB
C3	3.0	0.2	0	76.000±0.032aA
C4	3.0	0.3	0	57.000±0.032bcB
C5	3.0	0.4	0	54.000±0.032cBC
C6	3.0	0	0.1	57.000±0.032bcB
C7	3.0	0	0.2	61.000±0.056bB
C8	3.0	0	0.3	59.000±0.064bcB
C9	3.0	0	0.4	59.000±0.032bcB

注: C1—C9 为处理组合编号。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示不同处理间差异极显著($P < 0.01$)。

Note: C1—C9 are the numbers of treatments. Different lower case letters and capital letters indicate significantly difference at 0.05 level and 0.01 level, respectively.

出愈率都在 60% 左右。

2.4 不同浓度细胞分裂素对巨菌草愈伤组织诱导的影响

以 MS+3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D+0.2 mg · L⁻¹ IAA 为基本培养基(记为 D), 添加不同浓度的细胞分裂

素, 6-BA 或 KT, 以不添加细胞分裂素为对照, 共有 7 个处理组合(表 4)。

不加细胞分裂素的对照组出愈率为 68%, 加入细胞分裂素之后, 出愈率为 66.000%~71.000%, 与对照相比差异不显著($P > 0.05$)。

表4 不同浓度细胞分裂素对巨菌草愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of different concentration of cytokinin on *Pennisetum* sp. callus induction

处理编号 Treatment number	基本培养基 Minimal medium	6-BA/ mg · L ⁻¹	KT/ mg · L ⁻¹	出愈率 Callus rate/%
D1(CK)	D	0	0	68.000±0.084a
D2	D	0.5	0	71.000±0.107a
D3	D	1.0	0	70.000±0.145a
D4	D	1.5	0	70.000±0.033a
D5	D	0	0.5	66.000±0.019a
D6	D	0	1.0	68.000±0.038a
D7	D	0	1.5	70.000±0.033a

注: D1—D7 为处理组合编号。

Note: D1—D7 are the numbers of treatments.

3 讨论与结论

在植物组织培养试验中, 外植体消毒是试验的第一步也是很关键的一步, 如果消毒处理效果不好, 将会产生大范围的污染, 导致以后的步骤无法继续进行^[17]。然而, 影响消毒效果的因素很复杂, 所以污染是普遍发生的问题。由于外植体比较幼嫩, 酒精穿透力又很强, 所以用酒精造成的褐化比较严重, 导致外植体活力大大降低^[8]。对外植体用不同的消

毒剂组合及不同时间处理后发现, 只用 2% 次氯酸钠或只用 75% 酒精处理外植体的效果最好, 没有发现污染情况, 但是用 75% 的酒精处理后褐化会非常严重, 导致外植体的生长活力不强。如果用酒精处理后再用次氯酸钠处理染菌率反而增高, 可能是出现交叉污染的状况, 这与谢好和张子雯^[10]对杂交狼尾草(*Pennisetum alopecuroides*)的研究结果一致的。由于本研究中用的外植体都是非常幼嫩的茎, 酒精和次氯酸钠都会在一定程度上损害外植体, 所

以在保证无污染的情况下,消毒剂的处理时间越短越好。鉴于本研究的材料为有很多带绒毛的叶鞘,为了尽量降低污染率,又保持外植体较高的活力,先用75%酒精擦拭剥除较老的叶鞘,然后用2%的次氯酸钠溶液消毒处理10 min,从而达到了理想的消毒效果。

在甘蔗(*Saccharum*)组织培养试验中,2,4-D被认为是外植体脱分化产生愈伤组织的关键因素^[15]。在不含2,4-D的培养基中,甘蔗外植体不能脱分化产生愈伤组织,这与本研究巨菌草愈伤组织的诱导结果是一致的。但是巨菌草诱导愈伤组织对浓度要求不高,2,4-D浓度在1.0~4.0 mg·L⁻¹的范围内都可以诱导出愈伤组织,且各浓度间差异不显著。由于前人对禾本科的组织培养结果都表明3.0 mg·L⁻¹的2,4-D是最佳浓度^[16,18],3.0 mg·L⁻¹的2,4-D也是诱导绒毛狼尾草(*Pennisetum setaceum*)幼穗愈伤组织的最适浓度^[12],此外,本研究中虽然各个浓度2,4-D都能诱导出愈伤组织,且出愈率差异不显著,但从愈伤组织的硬度和颜色看,3.0 mg·L⁻¹浓度下诱导的愈伤组织长势最好,故本研究中采用3.0 mg·L⁻¹为最佳浓度。

生长素NAA和IAA都能促进愈伤组织的诱

导,但是浓度对其的影响差别相对比较大;虽然二者的影响均达到显著水平,但是IAA比NAA的效果更好,且在浓度为0.2 mg·L⁻¹时能发挥最好的效果,诱导率高达76%。在甘蔗组织培养中,细胞分裂素KT和6-BA也能促进愈伤组织的诱导^[15]。对象草(*Pennisetum purpureum*)幼穗的研究表明,KT浓度为0.05 mg·L⁻¹或0.10 mg·L⁻¹时,颗粒状愈伤组织的诱导率较高^[19]。但是在本研究中,这两种细胞分裂素的效果不是很明显,所以在巨菌草的愈伤组织诱导中没有必要加入KT或6-BA。

综上,巨菌草的组织培养体系与其他禾本科植物存在一定差异。巨菌草愈伤组织诱导的最佳培养基配方是MS+2,4-D(3.0 mg·L⁻¹)+IAA(0.2 mg·L⁻¹)。

4 展望

巨菌草愈伤组织诱导是组织培养中关键的一步,愈伤组织诱导的成功对于组织培养或体细胞杂交,甚至转基因在巨菌草上的应用都具有重要的意义。因此,在本研究基础上进一步对其愈伤组织分化成苗的培养基及培养条件进行研究,为推广巨菌草提供更多的技术支持。

参考文献

- [1] 丁铭,白璐,王龙清.巨菌草引进试验及栽培种植技术[J].农村科技,2013(12):60-61.
- [2] 李志文.巨菌草作为能源草的特性研究[J].农业工程技术(新能源产业),2013(6):12-15.
- [3] 郑金英,陈丽凤,林占禧.菌草产业成长及其多功能性探析[J].中国农学通报,2011,27(1):304-308.
- [4] 董晓娜,陈喜蓉,钟剑锋,林芳能,阳记萍.巨菌草栽培灵芝试验初探[J].林业科技,2013,41(1):39-40.
- [5] 林兴生,林占禧,林冬梅,林辉,罗海凌,胡应平,林春梅,朱朝枝.菌草作为生物质燃料的初步研究[J].福建林学院学报,2013,33(1):82-86.
- [6] 邱世海,韦立新,席春燕,刘洁,黄焕耀,章超,江日德.生物质发电厂燃料适用预处理技术应用现状[J].轻工科技,2012(5):102-104.
- [7] 黄国勇.应用菌草技术治理宁夏荒漠化土地的研究与展望[J].防护林科技,2011(2):46-48.
- [8] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996.
- [9] 王凭青,段传人,王伯初,周兴龙,谢伟伟.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.
- [10] 谢好,张子雯.杂交狼尾草离体培养植株再生体系的建立[J].宜春学院学报,2012,34(12):97-99.
- [11] 赵丽君,王雪芳,张金林,王锁民.植物组织培养及其在草类植物中的研究和应用[J].草业科学,2011,28(6):1140-1148.
- [12] 缪珊,范继红.绒毛狼尾草幼穗的愈伤组织诱导与植株再生[J].安徽农业大学学报,2011,38(2):255-258.
- [13] Mythili P K, Satyavathi V, Pavankumar G. Genetic analysis of short term callus culture and morphogenesis in pearl millet, *Pennisetum glaucum* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 50: 171-178.
- [14] Morrish E M, Hanna W W, Vasil I K. The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryogenic cultures of *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. (pearl millet) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 80:

409-416.

- [15] 杨燕妮.甘蔗离体培养的胚性细胞团——诱导与分化研究[D].南宁:广西大学硕士论文,2011.
- [16] 张晓莹,张瀚丽,牟彤,龚束芳.外源激素对紫穗狼尾草愈伤组织诱导及分化的影响[J].草业科学,2012,29(7):1066-1071.
- [17] 朱广廉.植株组织培养中的外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-449.
- [18] 杨燕妮.甘蔗离体培养的胚性细胞团诱导与分化研究[D].广西:广西大学硕士论文,2011:5-36.
- [19] 钟小仙,余建明,顾洪如,张建丽,倪万潮.象草幼穗离体培养植株再生研究[J].草业学报,2007,16(3):43-48.

(责任编辑 武艳培)

2015年4月国内市场主要畜产品与饲料价格分析

2015年4月随着养猪业进入调整和转型期,猪肉价格尤其是东部地区上涨较为明显。与去年同期相比,猪肉、牛肉、鸡肉、玉米和大豆价格分别上涨22.26%、1.94%、3.99%、5.68%和4.83%;羊肉、鸡蛋、豆粕和棉粕价格分别下降6.01%、9.00%、18.34%和16.92%。

一、耗粮型畜产品价格均为西部地区最高,其中猪肉价格小幅度上涨、鸡肉和鸡蛋小幅度下降;食草型畜产品价格小幅度下降

4月份猪肉价格为17.80元·kg⁻¹,环比上涨1.09%;牛肉、羊肉、鸡肉和鸡蛋价格分别为55.33、51.72、15.78和7.72元·kg⁻¹,环比分别下降0.17%、1.41%、2.99%和8.82%;从区域分析,猪肉价格西部分别高于东部和中部2.50%和4.17%。牛肉和鸡蛋价格区域间差异较小,牛肉价格西部分别高于东部和中部3.47%和0.36%,羊肉价格东部分别高于中部和西部2.67%和10.48%,鸡肉价格西部分别高于东部和中部28.23%和29.81%,鸡蛋价格西部分别高于东部和西部3.35%和2.05%。

二、玉米和大豆价格上涨,豆粕和棉粕价格小幅度下降

4月份玉米和大豆价格分别2417.96和4493.10元·t⁻¹,环比分别上涨3.23%和7.65%;从区域分析,玉米和大豆价格均为东部最高,玉米价格东部分别高于中部和西部1.50%和2.67%,大豆价格东部分别高于中部和西部4.78%和1.46%。豆粕和棉粕价格分别为3163.46和2475.10元·t⁻¹,环比分别下降2.07%和1.16%;从区域分析,豆粕价格区域差异较大,西部分别高于东部和中部10.25%和4.71%;棉粕价格东部分别高于中部和西部3.93%和0.61%。

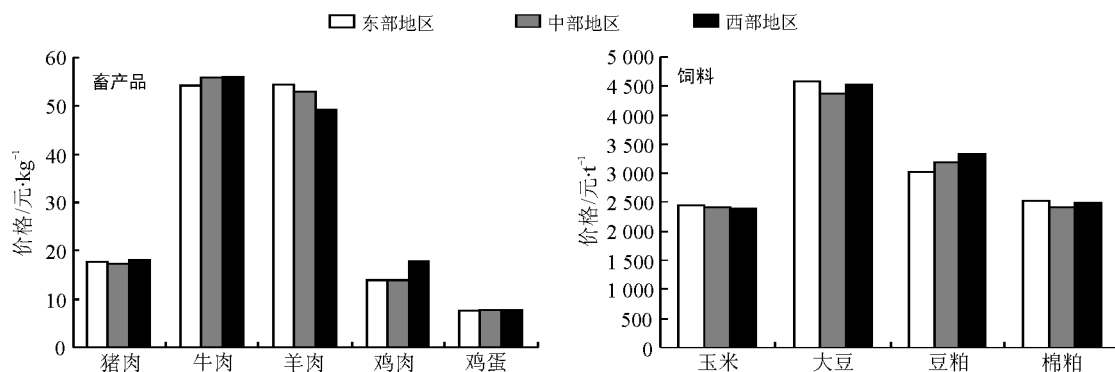


图1 2015年4月国内市场主要畜产品与饲料价格

数据来源:猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉和鸡蛋 <http://pfsnew.agri.gov.cn/>;大豆、大豆和豆粕:<http://www.zhuwang.cc/>,<http://www.pigol.cn/>;棉粕 <http://www.feedtrade.com.cn/>。

(兰州大学草地农业科技学院 王春梅 整理)