

# 假俭草体细胞抗寒突变体的 获得及其 SRAP 分子鉴定

袁学军<sup>1,2</sup>, 王志勇<sup>1,3</sup>, 郑轶琦<sup>1</sup>, 刘建秀<sup>1\*</sup>, 余建明<sup>1</sup>

(1. 江苏省中科院植物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 琼州学院生物科学与技术学院,  
海南 三亚 572000; 3. 海南大学农学院, 海南 儋州 571737)

**摘要:**假俭草抗寒性差是限制其广泛应用的主要因素之一。本研究目标是以优良假俭草选系 E-126 为材料, 经低温诱导和筛选获得体细胞抗寒突变体。结果表明, 假俭草种子诱导的愈伤组织在继代培养的过程中, 经 0℃ 的低温条件下培养 26 d, 获得了 2 块存活的愈伤组织, 该愈伤组织经过继代增殖后, 进行分化、生根和移栽, 获得株系 1 和株系 2。苗期外部形态观察结果表明, 假俭草低温诱导的株系 1、株系 2 和对照在叶色、叶毛、叶长和叶宽上均没有显著性差异。半致死温度分析结果表明, 株系 1、株系 2 以及对照叶片半致死温度(LT<sub>50</sub>)分别为-6.646, -6.546 和-5.351℃, 处理与对照之间差异显著, 且都低于对照, 但株系 1 和株系 2 之间无显著性差异。SRAP 的结果表明, 假俭草低温诱导的株系 1 和株系 2 在 110, 230 以及 240 bp 处均存在相同特征带, 表明假俭草体细胞突变体植株的变异稳定且在分子水平与对照存在差异, 但株系 1 和株系 2 无差异。因此, 株系 1 和株系 2 可作为同一体细胞抗寒突变体株系加以利用。

**关键词:**假俭草; 低温诱导; 体细胞变异; 形态特征; 半致死温度; SRAP

**中图分类号:** S543<sup>+</sup>.903.4; Q945.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2011)06-0237-08

\* 假俭草(*Eremochloa ophiuroides*)是禾本科蜈蚣草属多年生草本植物, 也是蜈蚣草属中唯一可用作草坪草的物种<sup>[1,2]</sup>。它具有强壮的匍匐茎, 蔓延力强而迅速, 茎秆斜伸, 其叶形优美, 植株低矮, 养护水平低, 耐贫瘠, 病虫害少, 可广泛地用于庭院草坪、休憩草坪以及水土保持草坪建设中<sup>[3,4]</sup>。然而, 假俭草的抗寒性与狗牙根和结缕草等相比较弱, 因此, 限制了其在亚热带北部及温带地区的广泛应用<sup>[5-8]</sup>。筛选抗寒性强的优良假俭草品种对扩大其应用范围具有重要作用。

关于假俭草种质资源(品系)抗寒性鉴定研究, 宣继萍等<sup>[9]</sup>采用电导法, 以 2 份美国引进品种‘Common’和‘TifBlair’为对照, 对 38 份中国假俭草种源的抗寒性进行了初步鉴定, 结果表明, 中国假俭草种质资源种内抗寒性的差异较大, 其 LT<sub>50</sub> 为-13~-4℃。Johnson<sup>[10]</sup>对 7 个假俭草品系进行了一系列模拟低温处理后, 在温室中进行生长恢复试验, 结果表明, 不同的假俭草品系其茎尖死亡率存在明显差异, 匍匐茎的 LT<sub>50</sub> 为-7~-6℃, 这个变化范围远远低于中国假俭草种质资源, 可能是由于美国假俭草品种亲缘关系较近, 遗传背景狭窄的缘故<sup>[2]</sup>。除此之外, 假俭草的抗寒性差异在其外部形态特征上也有所体现, 即其红茎比黄(绿)茎更耐寒<sup>[11]</sup>。

抗寒性改良可采用系统选育、杂交育种等手段, 然而, 这些手段不仅周期长, 工作量大, 而且由于育种材料自身变异的限制, 改良幅度有限<sup>[12]</sup>。随着生物技术的发展, 体细胞无性系变异和筛选技术日趋成熟, 可以设置特定的低温进行体细胞诱变筛选, 提高抗寒品种选育的效率。开展植物体细胞变异筛选的基础条件之一, 是建立高效的再生体系。到目前为止, 国内外关于假俭草再生体系建立研究的报道比较少。Krans 和 Blanche<sup>[13]</sup>以成熟种子和幼穗为材料, 研究了假俭草的愈伤组织诱导和植株再生条件; Ma 等<sup>[14]</sup>和张芳等<sup>[15]</sup>分别报道了以假俭草种子为材料进行再生体系的建立。作者已采用 E-126 种子为外植体建立了高效再生体系。

关于植物体细胞抗寒突变体诱导、筛选及其遗传稳定性的研究已有报道: Lazar 等<sup>[16]</sup>在没有选择压的前提下获得了更抗寒的冬小麦体细胞无性系变异体, 增强的抗寒性能稳定遗传给后代; Edward 等<sup>[17]</sup>利用液氮, 而 Gali-

\* 收稿日期: 2010-10-19; 改回日期: 2010-12-16

基金项目: 江苏省科技支撑项目(BE2008403)和江苏省科技厅平台项目(BM2009905)资助。

作者简介: 袁学军(1967-), 男, 山东济宁人, 副教授, 博士。E-mail: yuanxuej@163.com

\* 通讯作者。E-mail: turfunit@yahoo.com.cn

ba 和 Sutka<sup>[18]</sup>利用低温选择小麦(*Triticum aestivum*)愈伤组织获得抗寒变异植株,其抗寒性能通过有性杂交途径遗传给子代。对于抗寒突变体的遗传稳定性鉴定,除生理特征鉴定外,通过分子标记的方法可以更加精确进行分析,目前分子标记技术主要有随机扩增的多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、微卫星片段扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等。其中 RAPD 方法简单、成本低,但重复性较差、检测位点不多;SSR 多为共显性、重复性好,但位点较少、特异性强、引物开发成本高;AFLP 谱带多,精确度高,但分析程序复杂、成本高<sup>[19]</sup>。一种新型的基于 PCR 技术的标记——相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)可以弥补上述各项技术的不足之处,并已在马铃薯(*Solanum tuberosum*)、水稻(*Oryza sativa*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、花椰菜(*Brassica oleracea*)、油菜(*Brassica campestris*)、大蒜(*Allium sativum*)、棉花(*Gossypium*)、辣椒(*Capsicum*)、野牛草(*Buchloe dactyloides*)等<sup>[20]</sup>植物中使用。到目前为止,本实验室已经成功地建立了对于假俭草 SRAP 优化反应体系,可以直接用于抗寒突变体的鉴定。

因此,本研究的目标是: i) 在已有工作基础上,以国产优良假俭草 E-126 种子为外植体,在 0℃ 低温条件下筛选出存活愈伤,并获得再生植株; ii) 对体细胞抗寒突变体和对照苗期的外部形态特征进行初步观测分析; iii) 利用半致死温度法对体细胞抗寒突变体和对照的抗寒性进行鉴定; iv) 利用 SRAP 标记对获得的假俭草体细胞抗寒突变体和对照进行分子鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

假俭草优良选系 E-126, 该选系来源于江苏省中国科学院植物研究所草坪草种质资源基地。根据对 165 份种源连续 3 年的动态评价, 该选系具有最高的综合坪用价值。

### 1.2 方法

**1.2.1 体细胞抗寒突变体的筛选** 愈伤组织的诱导和培养: 选择 2006 年收获的饱满种子, 用 5% 的 NaOH 溶液浸泡 15 min, 流水冲洗 40 min, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 75% 乙醇处理 50 s, 最后再用无菌水冲洗 4~5 次。将灭菌种子接种于愈伤组织诱导培养基(MS+2,4-D 1.0 mg/L+甘露醇 30 g/L+50 mL/L 椰子汁+0.75% 琼脂)上。在温度(25±1)℃、光照 12 h/d 和光照强度 50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)条件下培养 28 d, 继代培养 1 次, 选择黄色颗粒状愈伤组织继代培养 2 次, 继代培养基和愈伤组织诱导培养基相同。

120 块愈伤用于低温筛选。培养 15 d 的愈伤组织在 0℃ 的条件下培养 26 d, 然后将其转接至新的培养基上, 在(25±1)℃ 的条件下培养 24 d, 观察愈伤组织存活情况。存活愈伤组织在继代培养基上继代 2 次。对照愈伤组织除不经过低温培养外, 其他过程完全相同。

植株再生和移栽: 将处理和对照愈伤组织接种在芽分化培养基(MS+KT 2.0 mg/L+50 mL/L 椰子汁)上, 培养 28 d, 分化的芽转至芽生长培养基(MS+BAP 2.0 mg/L+NAA 0.8 mg/L+50 mL/L 椰子汁)上培养 28 d, 并且在此培养基上进行继代培养 1 次; 选择 3~4 cm 长的试管苗, 转接到生根培养基(MS+NAA 0.6 mg/L+50 mL/L 椰子汁)培养 21 d。分化和生根阶段光强 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。生根无菌苗移栽到直径 6 cm、加有灭菌园土的塑料营养钵中, 在温室中进行培养。温室的温度为(25±1)℃, 相对湿度为 80%~85%, 光照为自然光。2 周后苗移栽到土盆中培养在自然光照条件下。

**1.2.2 体细胞抗寒突变体植株外部形态指标的观察和测量** 测量假俭草幼苗基部的第 1 片成熟叶的长度和宽度, 总共测量 10 株, 并目察其叶色(分为蓝绿、深绿、绿、浅绿、黄绿)和叶毛(分为无、微、有、多、密)。

**1.2.3 体细胞突变体的抗寒性鉴定** 一半致死温度(LT<sub>50</sub>) 2007 年 8 月 5 日生根无菌苗移栽入盆, 10 月 5 日将盆移入不加热的温室, 该温室屋顶为玻璃, 墙壁为砖墙。于 2007 年 10 月 10 日、11 月 10 日和 12 月 10 日分别进行半致死温度测定。每次每个处理温度设置 3 个重复, 每个重复 1 g 叶片。参照朱根海和朱培仁<sup>[21]</sup>的方法, 取假俭草植株的叶片, 自来水冲洗后用去离子水冲洗 3 次, 再用吸水纸吸干表面水分, 剪成长度 1~2 cm, 置于大试管中, 放入低温循环仪(美国 PolyScience 公司出品的 9610 型)进行模拟低温处理。温度的设置为: 0, -4, -8, -12 和 -16℃。每一个温度下处理 1.5 h 后取出, 每 2 个温度之间的降温时间为 1 h, 取出后加入 20 mL 去离子水, 静

置,过夜。在 DOS-307 型电导仪上测定其冰冻电导率,然后置沸水浴中 15 min,冷却至室温后测定其煮沸电导率,按下式计算其相对电导率:相对电导率(%)=冰冻电导率/煮沸电导率 $\times$ 100。朱根海和朱培仁<sup>[21]</sup>研究指出,低温胁迫下细胞电解质透出率与温度之间的关系呈 S 型曲线,与 logistic 方程  $Y=K/(1+ae^{-bx})$  具有较好的拟合度,求该方程的二阶导数,并令其等于 0,即可获得曲线的拐点  $X=\ln(1/a)/b$ ,即为半致死温度(LT<sub>50</sub>)。

**1.2.4 体细胞抗寒突变体的 SRAP 分子鉴定** 基因组 DNA 的提取和检测:以假俭草叶片为材料,采用 SDS<sup>[22]</sup>微量法提取基因组 DNA,并用 0.8% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量完整性。采用琼脂糖凝胶电泳,取 5  $\mu$ L DNA 溶液,再加入 2  $\mu$ L 0.25% 溴酚蓝,对照为已知浓度的 DNA 样品,上样于 0.8% 的琼脂糖凝胶,在 1 $\times$ TAE(配方)的电泳缓冲液中进行水平板电泳(DYY-5 型电泳仪,DYCP-34A 电泳槽),电泳电压为 100 V,时间 90 min 左右,电泳结束后,用溴化乙锭(EB)(0.05%)染色,染色后在自动凝胶图像分析仪(上海培清科技有限公司 JS-380)观测分析并照相,根据检测的结果稀释 DNA,最后确定 DNA 浓度为 50 ng/ $\mu$ L,用于本试验的研究。

PCR 反应条件:制备总体积为 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系,每管中还含有 2  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer 和 50 ng 模板 DNA,从 64 对引物中筛选出的最佳引物为 Me5'-TGAGTCCAAACCGGGTA-3' 和 Em15'-GACTGCG-TACGAATTCAA-3' 组合(SRAP 引物购自上海博亚生物技术有限公司)。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,37 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存,扩增反应在 TC-412 PCR(英国 TECHNE 公司)仪上进行。取 10  $\mu$ L 扩增产物,用 10.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶分离(DYY-8B 型电泳仪,JY-SCZ6 电泳槽),银染检测。DNA 指纹图谱根据 Visual Basic 6.0 软件并结合人工目测进行构建。

### 1.3 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 假俭草体细胞抗寒突变体的获得

**2.1.1 愈伤组织诱导和继代培养** 表面灭菌的假俭草种子接种在愈伤组织诱导培养基上培养 28 d(图 1a),转接到相同的培养基上继续培养。诱导出的 3 种颜色的愈伤组织:白色、浅黄色和黄色,选择黄色颗粒状愈伤组织,在继代培养基上继代(图 1b)。

**2.1.2 体细胞低温筛选** 培养 15 d 的愈伤组织在 0 $^{\circ}$ C 的条件下培养 26 d,然后将愈伤组织转接到新的继代培养基上,在(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的条件下培养 28 d,有 2 块愈伤组织存活(表 1、图 1c)。存活的愈伤组织分别继代培

养 2 次。而未进行低温处理的假俭草愈伤组织成活率为 100%。

**2.1.3 芽的分化和生长** 存活增殖的愈伤组织转接到分化培养基上培养 28 d(图 1d),然后转接到芽生长培养基上培养 28 d,在芽生长培养基上再继代培养 1 次(图 1e)。

**2.1.4 试管苗生根** 当试管苗高度达到 3~4 cm 时,将其转接到生根培养基上,5~7 d 后根开始形成,培养 21 d 时根的数量、长度和直径分别为 6~7 条,0.9 cm 和 1.8 mm(图 1f)。

**2.1.5 试管苗移栽** 生根的试管苗移栽到直径 6 cm、园土灭菌的塑料营养钵中,在温室中进行培养。2 周后苗移栽到装有园土的土盆中(图 1g)。

### 2.2 假俭草体细胞抗寒突变体植株苗期外部形态指标的观察和测量

假俭草体细胞抗寒突变体和对照植株苗期外部形态指标的观察和测量的结果显示,假俭草低温诱导的株系 1、株系 2 和对照苗期在叶色、叶毛、叶长和叶宽上均没有显著性差异,表明抗寒突变体在叶片形态上与对照没有变化。也就是说,低温诱导未对假俭草苗期形态产生明显的影响。

### 2.3 假俭草低温下体细胞突变体的抗寒性鉴定

根据供试材料在不同温度处理下的电解质外渗率所求得的 Logistic 方程,其拟合度及半致死温度见表 2。供试材料模拟 Logistic 方程的拟合度均达到极显著水平,说明试验结果有效。

表 1 低温对假俭草愈伤组织存活的影响

Table 1 The influence of low temperature on the survival of calluses

温度 Temperature ( $^{\circ}$ C)	接种数 Inoculation number	存活数 Survival number	平均存活率 Average survival rate (%)
0	120	2	1.7
25	120	120	100.0

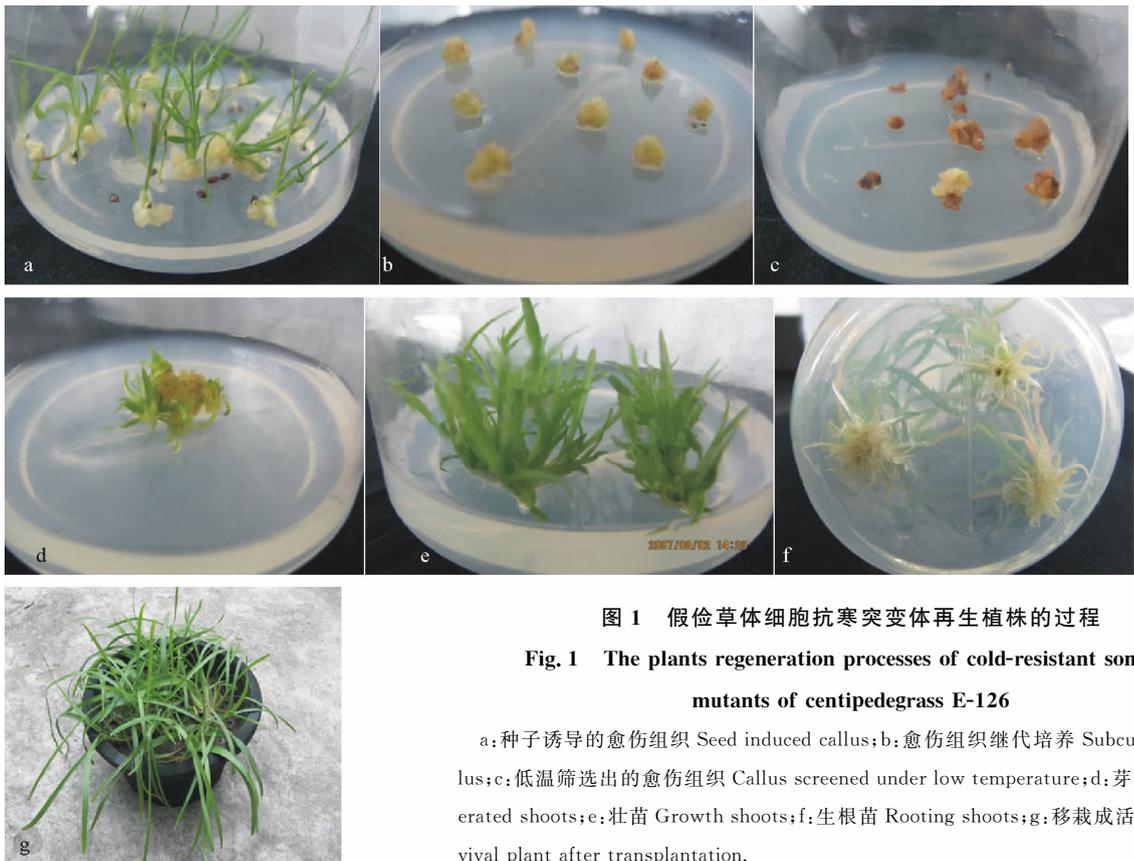


图 1 假俭草体细胞抗寒突变体再生植株的过程

Fig. 1 The plants regeneration processes of cold-resistant somatic mutants of centipedegrass E-126

a: 种子诱导的愈伤组织 Seed induced callus; b: 愈伤组织继代培养 Subculture of callus; c: 低温筛选出的愈伤组织 Callus screened under low temperature; d: 芽分化 Regenerated shoots; e: 壮苗 Growth shoots; f: 生根苗 Rooting shoots; g: 移栽成活的植株 Survival plant after transplantation.

表 2 假俭草体细胞突变体和对照电导率的 Logistic 方程参数及半致死温度

Table 2 Parameters of Logistic equations of conductivity and  $LT_{50}$  of somatic mutants and control of centipedegrass

月-日 Month-day	材料 Material	$a$	$b$	$k$	半致死温度 ( $LT_{50}$ ) Semi-lethal temperature ( $^{\circ}C$ )	拟合度 $R^2$ Degree of fitting $R^2$
10-25	株系 1 Strain 1	24.675 6	0.491 1	93.092 9	-6.527 8	0.997 6**
	株系 2 Strain 2	25.390 4	0.504 5	93.030 0	-6.411 1	0.997 5**
	对照 CK	12.615 9	0.481 3	92.927 9	-5.266 9	0.986 5**
11-25	株系 1 Strain 1	11.677 5	0.381 8	95.263 1	-6.437 1	0.993 5**
	株系 2 Strain 2	12.219 2	0.375 9	96.177 6	-6.658 7	0.994 9**
	对照 CK	11.610 2	0.476 3	93.421 2	-5.147 8	0.984 1**
12-25	株系 1 Strain 1	17.068 5	0.443 2	95.259 1	-6.401 7	0.994 1**
	株系 2 Strain 2	16.525 7	0.427 1	95.613 9	-6.568 9	0.993 4**
	对照 CK	39.528 1	0.652 1	93.275 9	-5.638 7	0.999 2**

注: \*\* 表示拟合度达极显著 ( $P < 0.01$ )。

Note: \*\* mean significance at  $P < 0.01$ .

采用 SPSS 13.0 软件对株系 1、株系 2 和对照叶片半致死温度进行多重比较, 结果(表 3)表明, 株系 1 和株系 2 及对照半致死温度分别为  $-6.646$ ,  $-6.546$  和  $-5.351^{\circ}C$ , 其中处理和对照之间达到显著性差异, 但是株系 1 和株系 2 之间无显著性差异, 表明株系 1 和株系 2 的抗寒性是一致的, 且都显著高于对照。

#### 2.4 假俭草抗寒体细胞突变体 SRAP 分子鉴定

假俭草低温诱导的株系 1、株系 2 和对照在约 120, 260 和 290 bp 处均有相同的条带(图 2), 在 110, 230 和 240 bp 处株系 1 和株系 2 均有相同的条带, 而对照则无以上条带, 表明抗寒突变体与对照存在差异, 株系 1 和株

系 2 SRAP-PCR 反应体系扩增结果完全相同,表明这 2 个株系在分子水平上没有区别,可作为同一株系利用。

### 3 结论与讨论

体细胞突变体筛选是利用植物组织培养过程中出现的变异,或由物理、化学因素诱发变异,给予一定的选择压力,可望筛选出符合育种目标的无性系。与传统的育种方法相比,体细胞突变体筛选具有突出的优点,一是高效,在离体培养过程中进行选择,可以省去大量的田间工作,节约人力和土地,又不受生长季节限制,选择效率高。二是定向培育,由于可在培养过程中给予培养材料一定的选择压力,如盐类、病菌毒素、除草剂等,使非目标变异体在再培养过程中被淘汰,而符合人们要求的变异体得以保留和表现,起到定向培育作用。当前在植物上,体细胞突变体筛选技术研究主要应用于抗病、抗盐、抗除草剂、抗低温、抗高温等逆境胁迫的突变体筛选。

体细胞突变法已在农作物如水稻、玉米 (*Zea mays*) 等的育种上成功地应用,并已获得了抗逆、可遗传的新品系<sup>[23]</sup>。在地被植物和草坪草育种上也有应用,如 Smith 和 Quesenberry<sup>[24]</sup> 利用体细胞无性系变异的方法获得了红三叶 (*Trifolium pratense*) 的新种质资源,其再生能力显著提高;Croughan 等<sup>[25]</sup> 获得了狗牙根 (*Cynodon dactylon*) 的新种质 Brazos-R3,对秋季黏虫 (*Spodoptera frugiperda*) 具有显著抗性。目前,很多草坪草的再生体系已经建立起来,例如结缕草 (*Zoysia japonica*)<sup>[26]</sup>、早熟禾 (*Poa trivialis*)<sup>[27]</sup>、狗牙根<sup>[28]</sup>、黑麦草 (*Lolium sp.*)<sup>[29]</sup>、雀稗 (*Paspalum sp.*)<sup>[30]</sup>,但是与其相关的体细胞无性系变异的研究报道较少。而到目前为止,关于假俭草再生体系建立研究的很少<sup>[31,32]</sup>,更未见到有关假俭草体细胞抗寒突变体的筛选报道。本研究在作者已经建立的假俭草高效再生体系基础上,在国内外首次成功地获得了假俭草体细胞抗寒突变体,这为假俭草抗寒性改良提供了很好的育种材料。

在组织培养过程中,以往的研究都以  $-3^{\circ}\text{C}$  作为胁迫条件,曾在烟草 (*Nicotiana sanderae*)、辣椒、胡萝卜 (*Daucus carota*)<sup>[33]</sup> 等作物上得到耐冷愈伤组织系,但都未能分化出再生植株。而 Jin 等<sup>[34]</sup> 认为水稻低温体细胞筛选,以  $15^{\circ}\text{C}$  最为有效。暖季型草坪草最适的生长温度范围为  $25\sim 35^{\circ}\text{C}$ ,低于  $15^{\circ}\text{C}$  就停止生长。在本试验中,假俭草在  $0^{\circ}\text{C}$  低温下进行体细胞筛选并获得再生植株,这说明  $0^{\circ}\text{C}$  的低温处理对假俭草抗寒体细胞筛选是有效的。

本研究所用材料为假俭草优良选系 E-126,该选系是作者在对 165 份种源连续 3 年的动态评价基础上筛选出来的综合坪用价值最高的种源。本研究目的只是希望提高 E-126 的抗寒性,同时不改变其坪用性状。通过对假俭草体细胞抗寒突变体和对照苗期外部性状观测分析,可以看出,低温筛选并未对假俭草外部性状产生显著的影响。当然,由于时间限制,本研究只对苗期性状进行了观测分析,今后尚需对假俭草体细胞抗寒突变体和对照其他性状进行观测评价。

在本试验中,低温筛选出的株系 1、2 和对照的半致死温度 ( $\text{LT}_{50}$ ) 分别为  $-6.482$ ,  $-6.535$  和  $-5.207^{\circ}\text{C}$ ,并

表 3 假俭草体细胞突变体和对照叶片半致死温度  $\text{LT}_{50}$

Table 3 Statistical analysis on the  $\text{LT}_{50}$  of somatic mutants and control of centipedegrass E-126

材料	半致死温度
Material	Semi-lethal temperature ( $\text{LT}_{50}$ )
株系 1 Strain 1	$-6.646 \pm 0.065$ b
株系 2 Strain 2	$-6.546 \pm 0.125$ b
对照 CK	$-5.351 \pm 0.256$ a

注:不同小写字母表示差异达  $P < 0.05$  水平。

Note: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

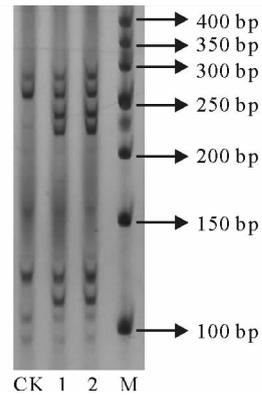


图 2 假俭草体细胞抗寒突变体和对照 SRAP-PCR 反应体系扩增结果

Fig. 2 Amplification results of SRAP-PCR reaction system for cold-resistant somatic mutants and CK of centipedegrass

CK:对照 Control;1:株系 1 Strain 1;2:株系 2 Strain 2;M:标准 DNA mark(50 bp, Promega).

且处理和对照之间差异显著。但是本实验所得到叶片的  $LT_{50}$  不能作为假俭草种质抗寒性的绝对指标, 而只是用来作为判别种质间抗寒性相对差别的依据。

SRAP 是一种新型的基于 PCR 技术的标记—相关序列扩增多态性, 具有方法简单、成本低、重复性好、检测位点多、精确度高等特点<sup>[35]</sup>。本研究中利用 SRAP—PCR 技术成功地对假俭草抗寒体细胞突变体和对照进行了编辑, 并证实株系 1 和株系 2 是相同的。

总之, 本研究以国产优良假俭草 E-126 种子为外植体, 将获得黄色颗粒状愈伤组织在 0℃ 低温条件下处理, 筛选出 2 块耐寒愈伤组织, 此愈伤组织经分化、生根再生出 2 个株系。2 个株系其苗期外部形态相同且与对照没有显著性差异。通过  $LT_{50}$  抗寒性鉴定显示, 对照和筛选株系  $LT_{50}$  存在显著性差异, 但是, 株系 1 和株系 2 无差异。筛选株系和对照 SRAP 的带型亦明显不同, 但是, 株系 1 和株系 2 的条带完全相同。由此可见, 通过低温体细胞筛选获得的植株苗期外部性状与对照没有显著差异, 但其抗寒性高于对照, 且在分子水平上也表达出稳定的差异性, 但 2 个株系无论在外形性状、抗寒性以及 SRAP 指纹图谱均无差异, 因此, 株系 1 和株系 2 可合并成一个株系。

### 参考文献:

- [1] Bouton J H. Plant breeding characteristics relating to improvement of centipedegrass[J]. Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings, 1983, 42: 53-58.
- [2] Hanna W W. Centipede grass diversity and vulnerability[J]. Crop Science, 1995, 35: 332-334.
- [3] Beard J B. Turfgrass Science and Culture[M]. Inc. Englewood Cliffs, N J; Prentice Hall, 1973: 151-183.
- [4] Hanson A A, Juska F V, Burton G W. Species and varieties[J]. Turfgrass Science, 1969, 14: 370-409.
- [5] Cardona C A, Duncan R R, Lindstrom O. Low temperature tolerance assessment in *Paspalum*[J]. Crop Science, 1997, 37: 1283-1291.
- [6] Fry J D, Lang N S, Clifton G P, et al. Freezing tolerance and carbohydrate content of low-temperature-acclimated and nonacclimated centipedegrass[J]. Crop Science, 1993, 33: 1051-1055.
- [7] Fry J D, Lang N S, Clifton R G P. Freezing resistance and carbohydrate composition of 'Floratum' St[J]. Augustinegrass. HortScience, 1991, 26: 1537-1539.
- [8] Plilley H W, Watson C E, Krans J V, et al. Differential thermal analysis of St[J]. Augustynegrass HortScience, 1995, 30: 1388-1389.
- [9] 宣继萍, 郭海林, 刘建秀, 等. 中国假俭草种质资源抗寒性初步鉴定[J]. 草业学报, 2003, 12(6): 110-114.
- [10] Johnson W J. Cold tolerance evaluation of several centipedegrass selections[J]. Agronomy Journal, 1977, 69: 100-103.
- [11] Horn G C. Turfgrass variety comparisons[J]. Florida Turfgrass Management Conference Proceeding, 1967, 15: 91-92.
- [12] Qi C H, Han L B. Progress on the application of transgenic technology on turfgrass breeding[J]. Grassland of China, 2002, 24: 47-54.
- [13] Krans J V, Blanche F C B. Tissue culture of centipedegrass viewed from the egg[A]. In: Proceedings of the 5th International turfgrass Research Conference[C]. INRA Publication, 1985: 159-164.
- [14] Ma S J, Zeng F H, Lan H T, et al. Tissue culture and plantlet regeneration of common centipede grass[J]. Plant Physiology Communication, 2004, 40: 62.
- [15] 张芳, 王舟, 宗俊勤, 等. 农杆菌介导的假俭草遗传转化体系的建立[J]. 草业学报, 2011, 20(2): 184-192.
- [16] Lazar M D, Chen T H, Gnsta H H, et al. Somaclonal variation for freezing tolerance in a population derived from Norstar winter[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 75: 480-484.
- [17] Edward J K, Jaded A Q, Kutty K K, et al. Regeneration of freezing-tolerant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from cryoselected callus[J]. Plant Physiology, 1990, 94: 1756-1762.
- [18] Caliba G, Sutka J. Frost resistance somaclones derived from *Triticum aestivum* L. winter wheat calli[J]. Plant Breed, 1989, 102: 101-104.
- [19] 张婧源, 彭燕, 罗燕, 等. 不同产地白三叶种质遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 草业学报, 2010, 19(5): 130-138.

- [20] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 280-288.
- [21] 朱根海, 朱培仁. 小麦抗冻性的季节变化及温度对脱锻炼的效应[J]. *南京农学院学报*, 1984, 7(2): 9-16.
- [22] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 1349.
- [23] Brar D S, Jain S M. Somaclonal: mechanism and applications in crop improvement[A]. In: Jain S M, Brar D S, Ahloowalia B S. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*[M]. Nether-land; Kluwer Academic Publishers, 1998: 15-38.
- [24] Smith R R, Quesenberry K H. Registration of NE WRC red clover germplasm[J]. *Crop Science*, 1995, 35: 295.
- [25] Croughan S S, Quisenberry S S, Eichhorn M M, *et al.* Registration of Brazos R3 bermudagrass germ-plasm[J]. *Crop Science*, 1994, 34: 542.
- [26] Noh H Y, Choi J S, Ahn B J. Plant regeneration through somatic embryogenesis in zoysiagrasses (*Zoysia* spp.)[J]. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 1995, 36(4): 582-587.
- [27] Griffin J D, Dibble M S. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(11): 722-724.
- [28] Ahn B J, Huang F H, King J W. Plant regeneration through somatic embryogenesis in common bermudagrass tissue culture[J]. *Crop Science*, 1985, 25(6): 1107-1109.
- [29] Won S H, Lee B Hy. Plant Regeneration from seed-derived callus in perennial ryegrass[J]. *Journal of Korean Grass Science*, 2000, 20: 19-24.
- [30] Cardona C A, Duncan R R. Callus induction and high efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Paspalum*[J]. *Crop Science*, 1997, 37(4): 1297-1303.
- [31] 马生健, 曾富华, 蓝海婷, 等. 假俭草的组织培养与植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(1): 62.
- [32] Yoshikazu S, Tomonori N, Daisuke Y, *et al.* Induction of callus from seed and regeneration from the induced callus of warm season turfgrass[J]. *Plant Cell Physiology Supplement*, 2004, 45: 728-728.
- [33] Takeuchi M, Tetuo N, Huruya P. *Plant Tissue Culture Technology*[M]. Asakura Publishing Co, Lid, 1984: 105-106.
- [34] Jin Y Z, Du L, Wang J Y. Sifting a technology of bearing cold mutant from rice somatic cell[J]. *Crop Variety Resources*, 1999, 2: 27-29.
- [35] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.

### Acquisition and identification of cold-resistant somatic mutants of centipedegrass

YUAN Xue-jun<sup>1,2</sup>, WANG Zhi-yong<sup>1,3</sup>, ZHENG Yi-qi<sup>1</sup>, LIU Jian-xiu<sup>1</sup>, SHE Jian-ming<sup>1</sup>

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province & Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China;

2. College of Life Science, Qiongzhou University, Sanya 572000, China; 3. College of

Agronomy, Hainan University, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** Weak cold-resistance of centipedegrass is one of the major factors limiting its wide application. This study aimed to obtain cold-resistant somatic mutants from the seed of eminent Chinese native centipedegrass selection E-126 by induction and screening at low temperature. The callus induced by seeds of centipedegrass was cultivated at 0°C for 26 d during the process of subculture and two pieces of survival callus tissues were obtained. Strain 1 and strain 2 were obtained after survival callus subculture proliferation, differentiation, rhizogenesis and transplantation. No significant differences were found in leaf color, lamellar hair, leaf length and leaf width between strains 1 and 2 and the control.  $LT_{50}$  of strains 1 and 2 were  $-6.646$  and  $-6.546$  °C, respectively, which was significantly lower than that of control plants ( $-5.351$  °C) and there was no significant difference between the  $LT_{50}$  of strains 1 and 2. The results of sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers demonstrated that there were identical characteristic bands at 110, 230 and 240 bp of centipedegrass strains 1 and 2 obtained through low temperature induction. However, no characteristic bands at 110, 230 and 240 bp were found in control plants, indicating that the somatic mutants of centipedegrass were genetically stable compared with that of control plants at a molecular level. Strains 1 and 2 could be utilized as identical strains.

**Key words:** centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides*); low temperature screening; somatic mutant; morphological characteristic;  $LT_{50}$ ; SRAP