

结缕草再生体系的研究

宗俊勤, 刘建秀^①, 宣继萍

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要:以结缕草品种‘Zenith’(*Zoysia japonica* ‘Zenith’)的种子为外植体,在附加 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA或 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的MS培养基上培养,愈伤组织诱导率较高,分别达到100%和92%。在添加了 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D或 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的MS培养基上继代培养可诱导出胚性愈伤组织,诱导率分别为3.26%和14.52%。胚性愈伤组织在含 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的1/2 MS分化培养基上的分化率和生根率都达到100%。

关键词:结缕草;胚性愈伤组织;植株再生

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2007)01-0066-03

Preliminary study on plant regeneration system of *Zoysia japonica* ‘Zenith’ ZONG Jun-qin, LIU Jian-xiu^①, XUAN Ji-ping (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(1): 66-68

Abstract: Mature seeds of *Zoysia japonica* ‘Zenith’ were used as initial explants for callus induction. The calli were induced at relatively higher percentage of 92% and 100% respectively in MS medium containing $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D or $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D and $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA. The embryogenic callus were induced at the MS medium containing $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D or $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D and $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA with induced rates of 3.26% and 14.52% respectively. The rates of shoot regeneration and rooting both reached 100% at the medium of 1/2 MS containing $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D.

Key words: *Zoysia japonica* ‘Zenith’; embryogenic callus; plant regeneration

结缕草(*Zoysia japonica* Steud.)具有发达的根茎,能形成结构良好、极富弹性的草坪,还具有耐热、耐旱、耐盐碱及耐修剪等优良特性,是建立草坪和人工放牧地及庭院绿化、水土保持的优良草种。然而,结缕草对低温极为敏感,当环境温度低于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时即进入休眠,在北方地区每年的枯黄期达5~6个月,在长江中下游地区,其枯萎期也有3~4个月,这一缺点严重限制了结缕草在绿地建设中的应用^[1]。传统育种技术在结缕草改良中已发挥了极大的作用,但其周期长、见效慢、目的性不够明确。利用转基因技术,有针对性地将目的基因导入品种的组织或原生质体中,获得转基因植株以提高抗逆性,已成为结缕草遗传改良的研究热点之一^[2]。

作者以结缕草品种‘Zenith’的种子为外植体,建立其愈伤组织诱导及植株再生的方法,以获得‘Zenith’的再生植株,从而为进一步开展结缕草品种的基因改良创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料

以结缕草品种‘Zenith’(*Zoysia japonica* ‘Zenith’)的商品种子为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 无菌幼苗的获得 取结缕草成熟种子,以清水浸泡2 d后再用30% NaOH处理40~80 min,流水冲洗1 h^[3],以破除种子的休眠。取已破除休眠的种子,5.25% NaClO浸泡消毒10 min,用无菌水冲洗后,3% H_2O_2 处理6 min,再用无菌水冲洗干净

收稿日期: 2005-12-13

基金项目: 江苏省科学技术厅基础设施项目(BM2002802)和国家科学技术部“863”项目(2002AA241061)

作者简介: 宗俊勤(1980-),男,江苏盐城人,硕士,主要从事暖季型草坪草种质资源的研究。

^① 通讯作者 E-mail: turfunit@yahoo.com.cn

后,均匀接种于装有 MS 基本培养基的培养皿中,密封后置于无菌培养室中培养,培养温度约 24 ℃,相对湿度 70%~80%,全天暗培养。

1.2.2 愈伤组织的诱导 取已获得的无菌幼苗,接种于含有不同浓度 2,4-D 及 6-BA 的 MS 培养基上,密封后置于无菌培养室中进行全天暗培养,温度 24 ℃,相对湿度 70%~80%。每处理 3 个重复。愈伤组织诱导率 = (形成愈伤组织的种子数/接种种子数) × 100%。

1.2.3 愈伤组织的继代及显微观察 将在上述各培养基上形成的愈伤组织接种于含 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 的 MS 培养基上继代培养,每 3 周继代 1 次,并用 Olympus CK2 型倒置显微镜对每次继代后的愈伤组织结构进行观察,计算胚性愈伤组织的百分率。胚性愈伤组织百分率 = (胚性愈伤组织数/接种愈伤组织数) × 100%。

1.2.4 愈伤组织的分化 将诱导出的胚性愈伤组织转接至含 0.01 mg · L⁻¹ 2,4-D 的 MS 或 1/2 MS

分化培养基上,置于 24 ℃、每天光照 10 h 的条件下分化培养。

1.2.5 分化苗的移栽 将分化的试管苗移至不含激素的 1/2MS 培养基上壮苗,2 周后打开瓶盖,置于室内环境下练苗 2~3 d,最后移栽至以沙为基质的花盆内生长,并统计试管苗的成活率。

2 结果和分析

2.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基中添加不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 对结缕草愈伤组织的诱导效果不同(表 1),其中以添加 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 或仅添加 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基诱导效果最好,愈伤组织的诱导率分别达到 100% 和 92%,且愈伤组织的增殖速度较快,培养 1 周后幼苗周围均出现明显的愈伤组织。

表 1 培养基中不同浓度激素对结缕草愈伤组织及胚性愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different concentrations of phytohormones in medium on induction rates of callus and embryogenic callus of *Zoysia japonica* 'Zenith'

激素浓度/mg · L ⁻¹ Conc. of phytohormone		外植体数 Number of explant	愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus	胚性愈伤组织数 Number of embryogenic callus	胚性愈伤组织诱导率/% Induction rate of embryogenic callus
2,4-D	6-BA					
0.5	0.0	85	22	25.89	0	0.00
1.0	0.0	90	45	50.00	0	0.00
1.5	0.0	89	68	76.40	0	0.00
2.0	0.0	100	92	92.00	3	3.26
0.5	0.1	78	32	41.03	0	0.00
1.0	0.1	62	62	100.00	9	14.52
1.5	0.1	83	38	45.78	0	0.00
2.0	0.1	69	45	65.22	3	6.67

2.2 愈伤组织的继代培养及胚性愈伤组织的形成

将生长 3 周的愈伤组织进行继代培养,发现部分愈伤组织由原来的白色松软状态转变为淡黄色致密状态,形成了胚性愈伤组织,但转变后的愈伤组织生长速度有所减缓。由表 1 可看出,胚性愈伤组织诱导率较低,最高仅达 14.52%,因此,还需要进一步调整继代培养基的配比。通过倒置显微镜观察 2 种不同状态的愈伤组织,发现白色松软愈伤组织的细胞内充满水泡,没有分化能力(图 1-a);而淡黄色致密的胚性愈伤组织中已经出现正常细胞,具有较强的分化能力(图 1-b)。诱导出的胚性愈伤组织

在黑暗条件下继代培养 3 次后,仍然具有较高的分化能力。

2.3 不同培养基对愈伤组织分化及丛生苗生根的影响

将经过 3 次继代的胚性愈伤组织分别接种于含 0.01 mg · L⁻¹ 2,4-D 的 MS 或 1/2 MS 分化培养基上,发现大部分接种在含有 0.01 mg · L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基上的愈伤组织逐渐转变为褐色并失去分化能力,分化率仅为 28.57%;而接种在含有 0.01 mg · L⁻¹ 2,4-D 的 1/2 MS 培养基上的愈伤组织表面逐渐产生若干淡绿色芽点,分化率达 100% (表

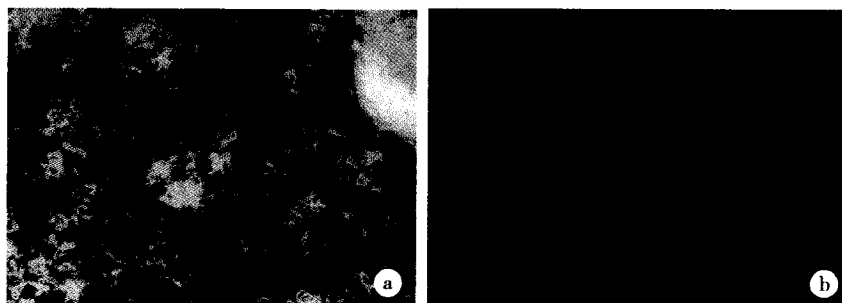


图1 倒置显微镜下结缕草的胚性愈伤组织(a)和非胚性愈伤组织(b)的细胞形态

Fig. 1 Cellular morphological feature of embryogenic callus (a) and non-embryogenic callus (b) of *Zoysia japonica* 'Zenith' under inverted microscope

2), 15~20 d后长出丛生状幼芽, 约30 d即可成苗, 生根率达100% (表2)。

表2 不同培养基对结缕草愈伤组织分化和丛生芽生根的影响
Table 2 Effect of different media on callus differentiation and cluster bud rooting of *Zoysia japonica* 'Zenith'

培养基 ¹⁾ Medium ¹⁾	愈伤组织数 Number of callus	分化数 Number of differentiation callus	分化率/% Differentiation rate	生根数 Number of rooting	生根率/% Rate of rooting
MS	7	2	28.57	0	0
1/2MS	8	8	100.00	8	100

¹⁾ 添加0.01 mg·L⁻¹ 2,4-D Adding 0.01 mg·L⁻¹ 2,4-D

2.4 再生植株的移栽

成苗后将幼苗移至1/2 MS培养基上壮苗, 2周后打开瓶盖进行室内练苗, 然后移栽至以沙为基质的花盆内, 置于温室内培养, 成活率达95%以上。

3 讨 论

前人的研究表明, 2,4-D是诱导愈伤组织最有效的植物激素, 最佳浓度为1~2 mg·L⁻¹。添加高浓度2,4-D不仅能降低诱导率, 而且使植株再生率明显降低^[4]; 而低浓度2,4-D虽然在一定程度上可抑制愈伤组织的形成, 却能改善愈伤组织的结构, 提高胚性愈伤组织的诱导率, 有利于植株再生^[5]。从上述实验结果可看出, 2个诱导效果最好的培养基中, 2,4-D的浓度分别为1.0和2.0 mg·L⁻¹, 与前人的研究结论相符。另外, 当2,4-D浓度为1.0 mg·L⁻¹时, 添加0.1 mg·L⁻¹ 6-BA可促进结缕草愈伤组织的诱导, 诱导率可达100%。

结缕草组织培养的关键因素之一是获得高度胚性的愈伤组织, 通过添加1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.1 mg·L⁻¹ 6-BA, 促进了致密颗粒状胚性愈伤组织的发生。利用倒置显微镜对愈伤组织形态进行观察, 可尽早去除无效愈伤组织, 显著提高工作效率。直接利用继代增殖的愈伤组织进行遗传转化实验, 可大幅度减少基因改良的工作量, 缩短培养周期。

李瑞芬等在对结缕草的组织培养研究中发现, 添加0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D有利于幼苗的分化, 若采用1/2 MS培养基, 则有利于生根培养, 最终分化率达48.1%^[6]。而在本实验中, 附加了0.01 mg·L⁻¹ 2,4-D的1/2 MS培养基分化效果最好, 且分化苗均能够正常生根, 并获得再生植株。由于本实验中所获得的胚性愈伤组织数量较少, 因此, 如何提高结缕草组织培养过程中胚性愈伤组织的诱导率, 还有待于进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 赵永辉, 王尊生, 曾晓非. 结缕草的组织培养[J]. 沈阳师范学院学报(自然科学版), 2002, 20(4): 299-301.
- [2] 郭振飞, 卢少云. 基因工程在草坪草育种上的应用[J]. 草地学报, 2002, 10(3): 184, 189.
- [3] 宗俊勤, 刘建秀. 快速打破结缕草种子休眠方法的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(2): 32-34.
- [4] Al-Khayri J M, Huang F H, Thompson L F, et al. Plant regeneration of zoysiagrass from embryo driven callus[J]. Crop Science, 1989, 29: 1324-1325.
- [5] Asano Y. Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*) [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8(3): 141-143.
- [6] 李瑞芬, 张敬原, 赵茂林. 结缕草愈伤组织诱导及植株再生[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 355-357.