

中华结缕草组织培养与植株再生

杜雪玲¹, 张振霞², 刘萍³, 龚春水³, 符义坤⁴, 杨中艺^{3*}

(1. 安徽淮北煤炭师范学院生物系, 安徽 淮北 235000; 2. 韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041;

3. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275; 4. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以中华结缕草成熟胚为外植体,通过胚性愈伤组织的发生进行植株再生。结果表明,中华结缕草成熟胚在 MS 基本培养基附加 6~7 mg/L 2,4-D 和 0.05 mg/L 6-BA 的出愈能力很强,但初生愈伤组织呈无定型棉絮状,不能再生成株。采用不同的糖类和固化剂以及一定比例的生长素与细胞分裂素的方法,对初生愈伤组织进行继代培养,诱导出致密颗粒状的、具有高度再生能力的胚性愈伤组织,此类胚性愈伤组织在最佳分化培养基 MS+1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L KT+3.00 mg/L 6-BA 上有较高再生频率,生根培养基采用 1/2 MS。

关键词:中华结缕草;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S543.043;Q945.39 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2006)04-0088-06

中华结缕草(*Zoysia sinica*)是禾本科画眉草亚科结缕草属多年生草本植物,具有很好的韧性和耐践踏能力,又具有匍匐生长的特性,扩展能力较强。同时中华结缕草还具有耐贫瘠、耐病虫害、耐修剪等特性,是一种不可多得的草坪用草,在城市开放型草坪和运动型草坪中得到广泛应用。然而,中华结缕草对低温极为敏感,在北方地区的绿期平均每年只有 6 个月左右,这一缺点严重限制了其在北方地区的推广。利用基因工程手段提高中华结缕草的抗寒性是解决这一问题的重要途径,为了实现这一目标,必须研究该草种的组织培养方法,为进行基因工程改造提供受体系统和再生手段。已有研究表明,该草种通过体细胞胚胎发生途径的再生频率较低^[1],而且国内外对中华结缕草组织培养及再生方面的研究很少,因此,本研究旨在建立和优化中华结缕草愈伤组织诱导和植株再生系统,为利用基因工程和体细胞无性系变异改良中华结缕草提供理论和实践依据。

1 材料与方法

中华结缕草的成熟种子由北京克劳沃草坪种子有限公司提供。选取饱满的中华结缕草种子先用 30% 的次氯酸钠溶液浸泡 30 min,然后用无菌水冲洗 4~5 遍,接种到诱导愈伤组织培养基中(表 1),暗培养,培养温度 24~26℃,培养 40 d 后,统计愈伤组织诱导率,愈伤组织诱导率(%)=诱导出愈伤组织外植体数/接种的外植体数×100,选择最佳愈伤组织诱导培养基的配方。将长势良好的愈伤组织分别接于分化培养基上(表 2),培养温度 25~26℃,每日光照 12 h,光强 2 000 lx,培养 30 d 后,统计愈伤组织的分化率,芽的分化率(%)=分化出芽的愈伤组织块数/接种愈伤组织块数×100,选择最佳愈伤组织分化培养基的配方。将胚状体转接于 1/2 MS+1 mg/L NAA(萘乙酸)+1 mg/L MET,温度 20~25℃,光照培养 16 h,光照强度 2 000 lx,30 d 后统计正常成苗植株的生根率,然后移栽于大棚内。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基及 ABA 对结缕草愈伤组织诱导及其分化的影响

成功的组织培养在一定程度上依赖于培养基的选择,本试验比较了 2 种不同的基本培养基对中华结缕草愈伤组织诱导率和分化率的影响,试验结果表明(表 3),MS 基本培养基在不加 ABA 时,诱导率最高,达到 38.89%,CC 基本培养基诱导率为 26.36%;而 MS+ABA 和 CC+ABA 基本培养基上愈伤组织诱导率分别为 23.33%和 12.50%。由此得出结论,MS 培养基优于 CC 培养基,两者差异极显著($P<0.01$),且 ABA 对中华结缕草愈伤组织诱导具有极显著的抑制作用($P<0.01$)。

收稿日期:2004-08-23

基金项目:国家转基因植物研究与产业化专项(J2002-B-006)资助。

作者简介:杜雪玲(1978-),女,河南扶沟人,讲师,硕士。E-mail: xuelingdu@yahoo.com.cn

* 通讯作者。E-mail: adsyzy@zsu.edu.cn

表 1 选择愈伤组织诱导因素的最佳配方

Table 1 The best factors of selective embryogenic callus inducing

序号 No.	影响因素 Factor	培养基(每处理 3 个重复) Medium(3 replications for each treatment)
1	基本培养基(MS,CC) Minimal medium	MS,CC+5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA
2	脱落酸(ABA) Absciscic acid	MS,CC+5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA+2 mg/L ABA
3	不同浓度 BA Different concentration of BA	MS+4 mg/L 2,4-D+6-BA(0.05,0.10,0.20 mg/L)
4	不同浓度 2,4-D Different concentration of 2,4-D	MS+0.05 mg/L 6-BA+2,4-D(0.1,3,5,8 mg/L)
5	不同糖类 Different sugar source	MS+30 g/L(麦芽糖、葡萄糖、蔗糖 Maltose, Glucose, Sucrose)
6	不同的固化剂 Different agar	国产琼脂(广州千湖贸易公司)、日本 Arga 产琼脂粉、Sigma 公司产的植物凝胶 phytigel 为固化剂+5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA+MS China agar, Japan agar, plant coagulating gummy using phytigel as solidifying agent+5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA+MS

表 2 选择愈伤组织分化培养因素的最佳配方

Table 2 The best factors of embryogenic callus differentiation

序号 No.	影响因素 Factor	培养基(每处理 3 个重复) Medium(3 replications for each treatment)
1	基本培养基(MS,CC) Minimal medium	MS,CC+0.5 mg/L NAA+1 mg/L KT
2	脱落酸(ABA) Absciscic acid	MS,CC+0.5 mg/L NAA+1 mg/L KT+2 mg/L ABA
3	不同浓度的萘乙酸(NAA)和激动素(KT) Different concentration of NAA and KT	MS+NAA(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L)+KT(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L)
4	继代时间 Subculture time	选择继代时间分别为 40,60,80,100,120,160,180 和 200 d 的愈伤组织接到附加 1.0 mg/L NAA+3.00 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT+MS Embryogenic callus whose selective subculture time is 40, 60, 80, 100, 120, 160, 180 and 200 d separately, inoculated to minimal medium added with 1.0 mg/L NAA+3.00 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT+MS

表 3 不同基本培养基对结缕草愈伤组织诱导和分化频率的影响

Table 3 Effect of different mediums on callus initiation and differentiation of *Z. siasinica*

培养基 Medium	接种外植体数 No. of explants	出愈外植体数 Initiated callus	分化出芽愈伤数 No. of calli forming buds	出愈率 Initiation rate (%)	分化率 Differentiation frequency of callus (%)
MS	360	176	14	38.89 aA	7.95 bB
CC	258	68	5	26.36 bB	7.35 bB
MS+ABA	357	84	9	23.33 bB	10.71 aA
CC+ABA	233	30	3	12.50 cC	10.00 aA

小写字母不同表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著,相同表示差异不显著;大写字母不同表示在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著,相同表示差异不显著。下同。Different small letters and capital letters represent distinctively at the 0.05 and 0.01 level, respectively; unless, indistinctively. The same below.

但是,在分化培养基中,加 ABA 时,在 MS 和 CC 培养基中,愈伤组织分化率分别为 10.71% 和 10.00%,显著高于不加 ABA 时的分化率。说明虽然 ABA 对出愈率有抑制作用,但在附加 ABA 的培养基中愈伤组织更加致密,颗粒状比较明显,而且可以抑制胚芽和胚根的生长,因而可以提高分化率。这表明 ABA 可以提高愈伤组织的质量,增加愈伤组织的致密度和颗粒状程度。因此,在愈伤组织诱导初期不宜附加 ABA,但结缕草在愈伤诱导继代培养基中则应附加 ABA。

2.2 不同 2,4-D 和不同 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)浓度对愈伤组织诱导的影响

由表 4 可知,附加 6-BA 浓度为 0.05 mg/L 时,2,4-D 浓度在 1~8 mg/L 范围内,愈伤组织诱导率呈上升趋势,在浓度达到 8 mg/L 时,诱导率达到最高,为 41.71%,且在 2~5 mg/L 时诱导率上升较快,从 27.02%升至 38.89%;当 2,4-D 浓度大于 8 mg/L,愈伤组织诱导率开始下降,在 2,4-D 浓度为 10 mg/L 时,愈伤组织诱导率下降到 29.32%。另外,试验中发现不同的 2,4-D 浓度,形成的愈伤组织形态结构也各不相同,根据 Armstrong 等^[2]的标准将愈伤组织分为 3 类:Ⅰ型,结构致密、坚硬、复杂多样、生长缓慢,多通过器官发生途径分化芽和根,产生的胚状体较少,不易长期继代,2,4-D 浓度大于 5 mg/L 时多形成此类;Ⅱ型,结构松散、易碎、呈颗粒状、生长较快,长期继代仍有胚性,能通过胚状体途径再生,2,4-D 浓度为 5 mg/L 时,形成的愈伤组织与此相似;Ⅲ型,结构粘软、水浸状、白色透明或半透明,容易继代培养,但几乎丧失分化能力,为非胚性愈伤组织,2,4-D 浓度在 1,2 mg/L 时,愈伤组织多为该类型。因此,诱导愈伤组织的最佳 2,4-D 浓度为 5 mg/L。

同时,在附加 2,4-D 浓度为 4 mg/L、6-BA 浓度为 0~0.05 mg/L 时,愈伤组织诱导率随着 6-BA 浓度的增加而升高,在浓度为 0.05 mg/L 时达到最高,为 31.88%(表 4),极显著地高于其他处理($P<0.01$)。在 6-BA 浓度为 0.05~0.20 mg/L 时,愈伤组织诱导率呈下降趋势。另外,在 6-BA 浓度为 0 mg/L 时,愈伤组织呈白色,生长较快,毛根状较明显,不易分化。

由此可见,结缕草愈伤组织诱导最佳激素配比为 5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA,此条件下的出愈率最高,可以达到 41.80%。

表 4 不同激素浓度对中华结缕草愈伤组织诱导率的影响

Table 4 Effect of different hormone concentration on callus induction of *Z. siasinica*

激素 Hormone	浓度 Concentration (mg/L)	接种数 No. of explant	出愈数 Initiated callus	出愈率 Initiation rate (%)
2,4-D+(0.05 mg/L 6-BA)	1	256	57	22.36 eE
	2	285	77	27.02 dD
	5	312	121	38.89 bB
	8	232	97	41.71 aA
	10	245	72	29.32 cC
6-BA+(4 mg/L 2,4-D)	0	872	224	25.69 cC
	0.05	224	71	31.88 aA
	0.10	215	58	27.16 bB
	0.20	238	63	26.47 bB

2.3 不同糖分对愈伤组织诱导的影响

糖在植物组织培养中的一般功能是作为碳源和调节培养基的渗透压。试验发现,蔗糖、麦芽糖和葡萄糖的愈伤组织诱导率分别为 29.11%、26.23% 和 20.09%(表 5),相互之间差异极显著($P<0.01$)。在接种后 20 d 左右,分别含有 3 种糖分的培养基上均开始出现白色的愈伤组织。其中麦芽糖上的愈伤组织较大,长势较好;蔗糖上形成的愈伤组织次之;葡萄糖上的愈伤组织较小。30 d 后,麦芽糖上形成的愈伤组织仍然最大,表面较光滑,但出现了不同程度的水泡化,

愈伤组织颜色由白色转变为淡黄色;蔗糖上的愈伤组织颜色鲜亮,半透明状;葡萄糖上形成的愈伤组织长势缓慢,

表 5 不同糖分种类对结缕草愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effect of different sugar sources on callus induction of *Z. siasinica*

糖的种类 Sugar source	外植体数 No. of explant	出愈外植体数 Initiated callus	出愈率 Initiation rate (%)
蔗糖 Sucrose	307	88	29.11 aA
麦芽糖 Maltose	325	84	26.23 bB
葡萄糖 Glucose	320	65	20.09 cC

仍然只有米粒大小,颜色由白到浅褐色,粘质度较大。继代 1 次后,发现葡萄糖上形成的愈伤组织慢慢褐化至黑色,最后死亡;麦芽糖上的愈伤组织生长缓慢,水泡化加重;蔗糖上的长势较好,也有较轻程度的水泡化。由此可见,采用蔗糖作为碳源是比较合适的。

2.4 不同固化剂对愈伤组织诱导的影响

不同固化剂上愈伤组织生长在前期没有明显区别,1 个月后,不同固化剂对愈伤组织的形成产生显著的影响(表 6)。附加植物凝胶 phytagel 的培养基,种子离体培养 15 d 左右就开始从胚轴长出愈伤组织,而且出愈率很高,30 d 左右出愈率达到 20.00% 以上。而国产琼脂诱导愈伤组织在 30 d 左右才开始出现小米粒大小的愈伤组织,50 d 左右愈伤组织诱导率才能达到 20.00% 以上。外植体在日本产 Agar 上经过 1 周培养也开始出现愈伤组织,但生长缓慢。4 周后观察愈伤组织的大小,发现植物凝胶 phytagel 培养基上平均愈伤组织直径达到 0.7 cm,愈伤组织呈淡黄色,表面光滑,结构疏松呈颗粒状。而国产琼脂上则只有米粒大小,大部分变白稍带褐色,水泡化严重。日本产 Agar 上愈伤组织生长缓慢,颗粒较小,颜色黄白色,出现水泡化但程度较轻。40 d 后,国产和日本产 Agar 以及植物凝胶 phytagel 培养基上的愈伤组织出愈率分别为 23.72%,22.00% 和 31.30%,其中在植物凝胶 phytagel 培养基上的出愈率极显著高于其他处理($P < 0.01$)。因此,进口植物凝胶 phytagel 是更好的固化剂。

2.5 不同萘乙酸(NAA)和激动素(KT)浓度对愈伤组织分化的影响

不同 NAA 和 KT 浓度对中华结缕草组培分化率的影响如图 1 所示。在各个不同的 NAA 浓度下,中华结缕草的胚状体分化率都随着 KT 浓度的变化而呈现相同趋势的变化,即在 KT 浓度小于 1.0 mg/L 时,分化率随 KT 浓度升高而增大;在浓度大于 1.0 mg/L 时,分化率随 KT 浓度升高而减小。NAA 浓度对中华结缕草胚状体分化的影响与 KT 相似。在 KT 和 NAA 浓度均为 1.0 mg/L 时,胚状体分化率最高,达到 17.36%,且分化出来的苗较健壮;在 KT 浓度为 2.0 mg/L 时,中华结缕草的愈伤组织均褐化变黑乃至全部死亡,说明了过高的 KT 浓度对结缕草愈伤组织有致死作用。由此可见,适合中华结缕草愈伤组织分化的最佳激素配比为:1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L KT。

表 6 不同固化剂对结缕草愈伤组织诱导的影响

Table 6 Effect of agars from different makers and phytagel on callus induction of *Z. siasinica*

固化剂 种类 Maker of agar	外植 体数 No. of explant	出愈外 植体数 Initiated callus	出愈率 Initiation rate (%)
国产 Made in China	236	56	23.72 bB
日本产 Made in Japan	315	70	22.00 cB
phytagel	230	72	31.30 aA

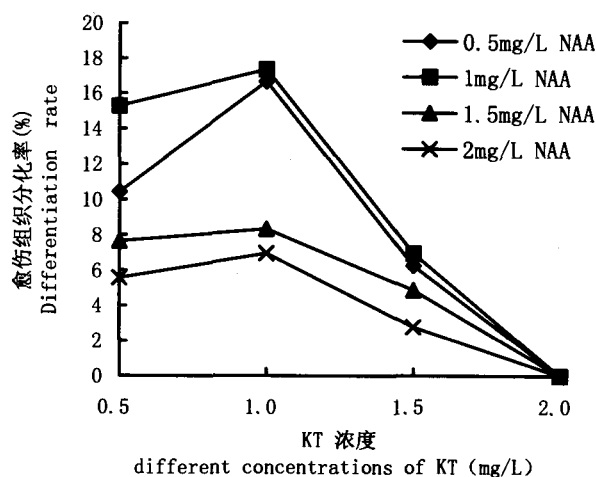


图 1 不同激素浓度对结缕草分化率的影响

Fig.1 Effects of different NAA and KT concentrations on callus differentiation of *Z. siasinica*

2.6 不同继代时间对结缕草愈伤组织分化的影响

在继代时间 40~80 d 范围内,随着继代培养时间的延长,愈伤组织分化率也随之增加。在继代 80 d 时分化率达到最高,为 20.83%,80 d 后,愈伤组织的分化率随继代时间的延长而降低。

2.7 再生植株的生根培养

胚状体发育成小植株最初是从具有胚状结构的胚芽出现开始,紧接着叶和根发育,形成完整的再生植株。在植物离体培养中,促根生长的基本培养基大多数使用低浓度的 MS 培养基,因此,本试验采用了 1/2 MS 基本培养基,以降低无机盐浓度,促进生根。将诱导分化的丛生不定芽切割成具有 2~3 个不定芽的小块,分别接入附加

了 1.0 mg/L NAA 和 1.0 mg/L MET 的 1/2 MS 培养基,不定芽 9 d 开始生根,30 d 生根率达到 95%,幼苗株高达 1~3 cm。

3 讨论

在中华结缕草诱导愈伤组织过程中,由试验结果表明,生长素的作用比细胞分裂素的作用重要,这一点与其他研究结果相同。Bhaskaren 等^[3]指出在禾本科植物的愈伤组织诱导中,2,4-D 是通常起着决定作用的植物生长调节剂。Bai 等^[4]和 Torello 等^[5]均指出了 2,4-D 对愈伤组织诱导的重要性。Linacero 等^[6]和张磊等^[10]证明了过高或过低的 2,4-D 浓度都不利于胚性愈伤组织的形成和分化作用。本研究在证明了 2,4-D 对中华结缕草愈伤组织诱导的重要作用的同时,也发现了过高浓度的 2,4-D 对愈伤组织诱导的抑制作用。诱导结缕草愈伤组织的适宜激素浓度为 5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA,可以获得 38.9%~41.7% 的出愈率,考虑到过高 2,4-D 浓度将降低出愈率,浓度过低则可能降低愈伤组织的质量,建议采用 6~7 mg/L 的 2,4-D 浓度。这一浓度远高于李瑞芬等^[7]单独使用 2,4-D 进行日本结缕草(*Z. japonica*)愈伤组织诱导所得到的 2.0 mg/L 的适宜浓度(出愈率达到最高,为 42.1%)^[7],这可能与研究对象的不同有关。另外,赵永辉等^[8]、张俊卫等^[9]和张磊等^[10]的研究获得了结缕草愈伤组织诱导率分别达 85.0%,57.3%和 64.6%,远高于本研究所获得的出愈率,这可能与研究对象的不同或激素浓度、激素配比不同有关。

一般在禾本科的分化培养中,将愈伤组织置于除去生长素或降低生长素浓度的条件下,就可以诱导芽的生成。Capelle 等^[11]、Ozias-Akins 等^[12]和 Fasolo 等^[13]指出,在分化培养基中添加 TDZ,能促进芽的分化,本试验在结缕草愈伤组织分化培养基中加入 KT 也取得了良好的结果,分化率达到 17.4%。相比之下,李瑞芬等^[7]使用 1/2 MS+0.1 mg/L 2,4-D 培养基所获得的日本结缕草胚性愈伤组织的分化和植株再生率要比本试验高得多(均高于 40%),主要原因,可能是由于本研究在进行愈伤组织诱导时未甄别胚性或非胚性愈伤组织,同时也可能与研究对象的不同有关。另外,本试验过程中,无论在培养初期或后期,中华结缕草愈伤组织均有不同程度水泡化现象,形态呈白色松软,分化能力较低。而且,在分化试验中虽然大多数愈伤都能出现绿点,但是只有少数能最后分化出苗,其他慢慢褐化死亡,这种现象可能和愈伤的生长状况有关,也可能和培养基中糖分浓度低有关。有试验表明随着培养基中糖分浓度的增加,培养基的渗透压也随着升高,会有利于愈伤组织的分化^[14,15]。因此,中华结缕草分化培养基仍有待进一步优化。

无论采用哪种激素配比,在早期培养过程中,中华结缕草愈伤组织的颜色为白色或淡黄色,随着培养时间的延长,愈伤组织的颜色出现了不同程度的褐变。但经过继代培养几代后,颜色有所变浅。这可能与愈伤组织的次生代谢中某些物质的积累,或者是与愈伤组织细胞内酚的含量活性有关,说明了愈伤组织的继代时间对愈伤组织的再生有重要影响。Mcdonnell 等^[16]曾指出禾本科草的愈伤再生率随着继代培养时间的延长而降低,余叔文^[17]也指出,培养时间延长会使愈伤组织在细胞分裂进程中染色体变异的可能性增大,形态发生潜力减弱甚至丧失。本研究则证明了超过 80 d 的继代天数十分不利于中华结缕草愈伤组织的分化。

中华结缕草的愈伤组织诱导、分化和植株再生受多种因素制约,这些因素包括培养基中各种激素种类和浓度、碳源种类、固化剂种类和愈伤组织的继代时间。就本研究的范围内,最适于结缕草的组织培养体系是:以 MS 为基本培养基,使用蔗糖为碳源,phytagel 为固化剂,使用 6~7 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA 的激素浓度进行愈伤组织诱导;愈伤组织继代时间不宜超过 80 d;采用添加了 1.0 mg/L KT+1.0 mg/L NAA 的分化培养基作为愈伤组织分化培养基;使用 1/2 MS 培养基作为诱导生根培养基。

参考文献:

- [1] Asano Y. Somatic embryo genesis and protoplast culture in Japanese lawn grass(*Zoysia japonica*)[J]. Plant Cell Reports, 1989,(8):141-143.
- [2] Armstrong C L, Green C E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline[J]. Planta, 1985, 164:207-214.
- [3] Bhaskaren S, Smith R H. Regeneration in cereal tissue culture: A review[J]. Crop Science, 1990, 30:1328-1338.

- [4] Bai Y, Qu R. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue[J]. Plant Breeding, 2001, 120(2): 239-242.
- [5] Torello W A, Symington A G. Regeneration of perennial Ryegrass callus tissue[J]. Hort Science, 1984, 19: 56-57.
- [6] Linacero R, Vazquez A M. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of rye[J]. Plant Science, 1990, 72: 253-268.
- [7] 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.
- [8] 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, 2002, (4): 299-301.
- [9] 张俊卫, 唐靖, 包满珠. 日本结缕草植株再生体系的研究[J]. 草业学报, 2005, 14(2): 48-51.
- [10] 张磊, 吴殿星, 胡繁荣, 等. 结缕草组织培养及农杆菌介导转化的主要因子优化[J]. 草业学报, 2004, 13(4): 100-105.
- [11] Capelle S C, Mok D W S, Kirchner S C, et al. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-C² isopentenyl [18-14C]adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus*[J]. Plant Physiol, 1983, 73: 796-802.
- [12] Ozias-Akins. Plant regeneration from immature embryos of peanut[J]. Plant Cell Rep., 1989, (6): 217-218.
- [13] Fasolo F, Zimmerman R H, Fordham. Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult., 1989, 16: 75-87.
- [14] 凌定厚, 吉田昌一. 影响水稻体细胞胚胎发生几个因素的研究[J]. 植物学报, 1987, 29: 1-9.
- [15] 颜秋生, 张雪琴, 滕胜, 等. 水稻原生质体培养技术体系的建立[A]. 农业科学集刊(第二集), 农作物原生质培养专辑[C]. 北京: 农业出版社, 1995. 20-26.
- [16] McDonnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass[J]. Crop Science, 1984, 24: 573-578.
- [17] 余叔文. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 37-52.

Tissue culture and plant regeneration of *Zoysia siasinica*

DU Xue-ling¹, ZHANG Zhen-xia², LIU Ping³, GONG Chun-shui³,

FU Yi-kun⁴, YANG Zhong-yi³

(1. Department of Biology, Huaibei Coal Industry Teachers College, Huaibei 235000, China;

2. Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China;

3. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

4. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: A tissue culture system for plant regeneration of *Zoysia siasinica* Hance grass was developed. Using mature seeds as experimental material, explant callus was produced in the dark on MS containing 100 mg/L Linostial+5 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L 6-BA, 30 mg/L sucrose and 3.4 g/L phytagel. The initial callus appeared sponge-like, soft, and irregular, and no plants could be regenerated from it. High regeneration ability embryogenic calluses were induced after subculturing with 2 mg/L ABA. The differentiation frequency of callus subcultured for 80 days was up to 20.83% in MS with 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L KT and 3.00 mg/L 6-BA MS. The rooting medium was 1/2 MS.

Key words: *Zoysia siasinica*; callus tissue culture; regeneration