

## 野生细叶结缕草再生体系的建立

张瑜<sup>a</sup>, 杨知建<sup>a\*</sup>, 张志扬<sup>b</sup>, 张志飞<sup>a</sup>

(湖南农业大学 a.农学院; b.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 以适合南方地区夏季种植的采自泰国北部的一种野生的细叶结缕草为供试材料, 以匍匐茎节为外植体建立其再生体系。结果表明: 在MS基本培养基上添加5.0 mg/L 2,4-D和NB培养基上添加0.2 mg/L IAA所产生的愈伤组织最好, 而添加2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA时分化效果最好, 1/2MS+0.5 mg/L NAA培养基最适于生根。

**关键词:** 野生细叶结缕草; 组织培养; 诱导; 分化

中图分类号: Q945

文献标识码: A

### Foundation of regenerative system of wild *Zoysia tenuifolia*

ZHANG Yu<sup>a</sup>, YANG Zhi-jian<sup>a\*</sup>, ZHANG Zhi-yang<sup>b</sup>, ZHANG Zhi-fei<sup>a</sup>

(a.College of Agronomy; b.Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, HNAU, Changsha 410128, China)

**Abstract:** *Zoysia tenuifolia* was a warm-season grass character of which was fine for building lawn. Using a kind of wild thin *Z.tenuifolia* growing in the northern area of Thailand and the crawl stem as experiment material, the regenerative system was founded. The result showed: adding 5.0 mg/L concentration of 2,4-D to the MS basic medium and adding 0.2 mg/L concentration of IAA to the NB basic medium by to the best callus tissue could be induced, while, 2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA was optimal for the differentiation of callus tissue, 1/2MS+0.5 mg/L NAA was the best radication medium.

**Key words:** wild *Zoysia tenuifolia*; tissue culture; inducement; differentiation

细叶结缕草(*Zoysia tenuifolia*)为结缕草属(*Zoysia* spp.)中质地最细、最稠密、生长最慢的草种。虽抗寒性比半细叶结缕草差,但在暖亚热带和热带草坪植物中是栽培较早、应用较多、适应性较强的草种<sup>[1]</sup>。细叶结缕草耐践踏,同时又耐干旱、耐瘠薄、耐低修剪,适应土壤范围广,被广泛用于运动场草坪、观赏草坪、高尔夫球场、水土保持等诸多方面<sup>[2-3]</sup>。

利用组织培养技术改良其限制性状,可大大提高繁殖系数和缩短生长期,在种质资源保存和加速良种化进程等方面具有十分重要的意义<sup>[4-6]</sup>。与冷季型草坪草相比,暖季型草坪草更难诱导胚性愈伤组织并再生植株<sup>[7]</sup>。樊晓莉<sup>[8]</sup>等利用组织培养获得了日本结缕草的绿色期延长株系。卢少云<sup>[9]</sup>等以狗牙根的匍匐茎节作外植体建立再生体系,并从中筛

选出了1株矮化变异体。笔者以野生细叶结缕草为供试材料,以匍匐茎节为外植体建立再生体系,旨在为利用诱变育种和生物技术改良野生草种某些重要坪用性状提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

野生细叶结缕草采自泰国北部。

诱导培养基: MS(NB)+(2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L) 2,4-D+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶+400 mg/L CH;  
MS(NB)+(0.1, 0.2 mg/L) IAA+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶+400 mg/L CH。

分化培养基: MS+(2.0, 5.0 mg/L)2,4-D+(0.3, 0.5, 1.0 mg/L)BA+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶+400 mg/L CH。

生根培养基: MS(1/2MS)+(0, 0.5 mg/L)NAA+(0, 0.5 mg/L)KT+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶+400 mg/L CH。

收稿日期: 2006-12-27

基金项目: 湖南省外国专家局项目(S20044300003)

作者简介: 张瑜(1982-),女,内蒙古巴彦淖尔市人,硕士研究生。\*通讯作者。

## 1.2 方法

草种进行无性繁殖。挑选生长良好、健壮的匍匐茎节,剥去叶片,用自来水冲洗,滤纸吸干水分。将匍匐茎切成带2~3个节的切段,首先用70%乙醇浸泡1 min,再浸于0.1%氯化汞溶液中10 min,用无菌水冲洗5~6次,滤纸吸干水分,将材料放在无菌培养皿上切成长为0.5 cm带1个节的段,接入培养基。培养基在121℃,10.8 N/cm<sup>2</sup>下灭菌20 min。光培养:温度为(25±2)℃,每天光照14 h,光照度为800~1 000 lx;暗培养:在(25±2)℃的暗培养箱中恒温培养。将在生根培养基上生长20~30 d的幼苗进行移栽。移栽前先去掉封口膜,在培养室中炼苗2~3 d,再进行室内移栽。把经过炼苗的幼苗基部的残留琼脂洗净,移栽至小盆内,移栽基质经0.1%高锰酸钾溶液消毒,用蛭石和营养土(泥碳土)以2:3(质量比)混匀配制而成<sup>[7]</sup>,最后移栽至大田。

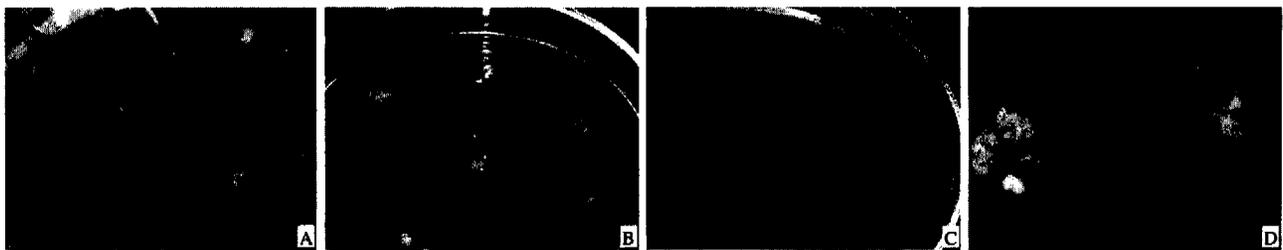
## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导

外植体在接种7~10 d后,茎节处开始膨大,15 d左右开始产生愈伤组织。结果表明,产生的愈伤组织有3种类型:第1种是白色块状的愈伤组织(图1-A),在MS基本培养基上添加5.0 mg/L 2,4-D可以

产生白色坚硬、块状的愈伤组织,其余浓度的2,4-D也可以诱导出愈伤组织,但产生的愈伤组织质量较差。第2种是结构松软的淡黄色或黄白色的非胚性愈伤组织(图1-B),在NB培养基中添加2,4-D所产生的愈伤组织多为此种愈伤组织,分化效果差。第3种是水浸状的愈伤组织(图1-C),在NB培养基上添加0.2 mg/L的IAA所产生的愈伤组织虽可以分化出苗,但愈伤组织较小,所需分化时间较长,不利于组织培养的进行,而在MS培养基上添加IAA,诱导20 d后只有2~3个茎节产生水浸状的愈伤组织。

第1种愈伤组织在分化培养基上可分化出苗,而且分化频率较高,可以继代保存。第2种愈伤组织易于继代,但不能直接分化出苗,即使接种到分化培养基上,愈伤组织仍然无节制的生长。第3种愈伤组织虽可分化出苗,但多为玻璃苗。一般第1种白色块状的愈伤组织大多数是胚性愈伤组织。在试验中3种愈伤组织都很容易褐化,所以要增加继代的频率,减少褐化产生,而且在转继3次以后的愈伤组织上会长出白色绒毛,影响愈伤组织的生长(图1-D),降低分化程度。在野生细叶结缕草愈伤组织诱导过程中,与NB培养基比较,MS培养基是一种较理想的基本培养基,而与IAA比较,2,4-D则为较理想的诱导激素,最佳浓度为5.0 mg/L。



A.白色块状的愈伤组织; B.结构松软的淡黄色或黄白色的非胚性愈伤组织; C.水浸状的愈伤组织; D.诱导愈伤组织出现的白色绒毛

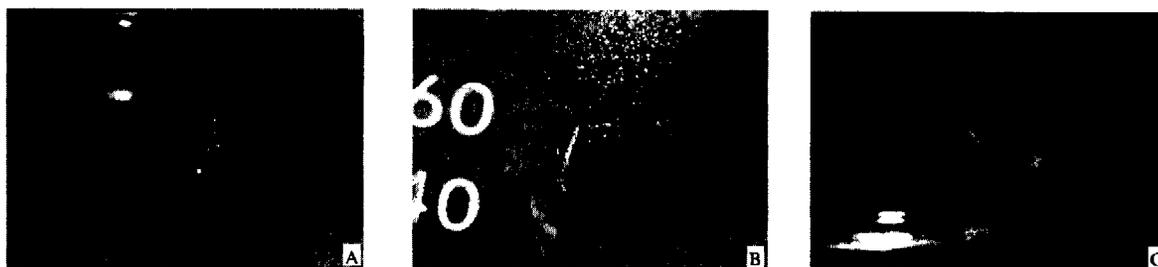
图1 诱导过程中愈伤组织的形态特征

Fig. 1 Form and characteristic of callus tissue in inducement

### 2.2 愈伤组织分化

将继代之后的愈伤组织接到分化培养基上,培养1个星期后发出嫩绿的幼芽(图2-A)。一般每个愈伤组织发出1~2个幼芽,继续培养3个星期后,生长出幼苗(图2-B),但同时也有白色绒毛的产生,影响分化效果(图2-C)。表明诱导的愈伤组织在2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA的MS培养基上分化效果

最好,产生的分化苗生长健壮,长势良好;在2.0 mg/L 2,4-D+(0.3, 0.5) mg/L BA的培养基上,所需分化时间较长,产生的分化苗长势差;5.0 mg/L 2,4-D+BA任意浓度都难以分化出苗,其上愈伤组织无节制的生长。分化过程与诱导过程同样存在愈伤组织褐化的问题,可能与试验材料的内源激素含量或是培养环境有关。



A.愈伤组织分化培养1星期后状态; B.愈伤组织分化培养3个星期后状态; C.分化中产生白色绒毛

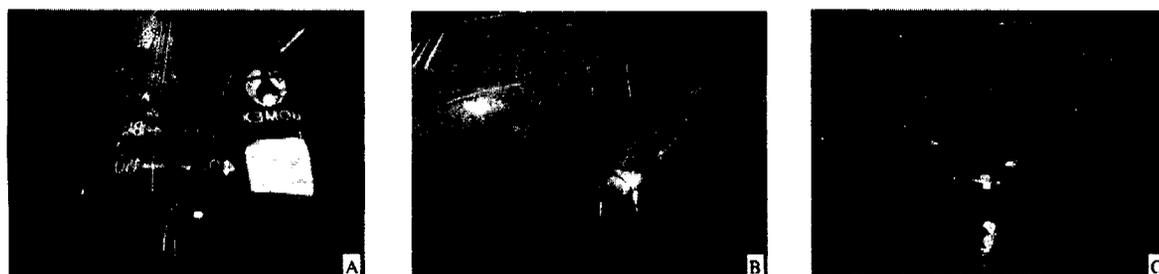
图2 愈伤组织分化过程及分化苗状态

Fig.2 The process of differentiation of callus tissue and state of the shoot

### 2.3 生根及植株移栽

1/2MS+0.5 mg/L NAA培养基在根系生长状况及生根量方面都明显优于其他配比培养基,在此培养基上产生的再生苗长势良好(图3-A),再生根健壮,根系密集(图3-B),移栽到营养土中苗的生长势也很强,幼苗比较健壮(图3-C);其余配比的培养基

中生根较好的是0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT的MS培养基和无激素添加的1/2MS培养基,但其再生苗长势一般,再生根量也少;无激素添加的MS培养基中再生苗也有根的发生,但需时间长,而且根势羸弱,移栽长势差。



A.再生苗的生长; B.再生苗根系; C.移栽苗的生长状态

图3 生根和移栽

Fig.3 Radication and transplant

## 3 讨论

a.禾本科植物愈伤组织诱导,2,4-D通常是起决定作用的植物生长调节物质<sup>[10-11]</sup>。施加外源激素2,4-D可以促进植物细胞生长素含量提高,从而诱导胚性细胞的发生<sup>[12-14]</sup>。本试验结果表明,2.0~5.0 mg/L 2,4-D均可有效诱导愈伤组织,在分化培养基中添加少量BA(0.3~1.0 mg/L)的分化效果更优。虽然2,4-D是诱导禾本科作物愈伤组织不可缺少的激素,但是2,4-D的用量不宜过高<sup>[15-16]</sup>。因为过高对外植体及愈伤组织的伤害较大,而且会抑制愈伤组织的分化<sup>[17]</sup>,所以诱导时采取的浓度不宜过大,以减少组织培养中的无性系变异<sup>[18]</sup>。本试验结果表明,在添加2,4-D的MS培养基中添加IAA,也可有效的诱导出愈伤组织。

b.本试验材料取自田间,自身带菌率极高,使用乙醇和氯化汞灭菌。如果灭菌时间短,消毒就不够彻底,但若时间过长,健康细胞就会脱水、中毒死亡<sup>[19]</sup>。所以下一步考虑使用吐温代替氯化汞或是将材料移入实验室中,但环境的改变是否会影响其原有的优良性状,有待进一步的研究。本试验从田间采集试验材料到再生苗的长成,需要大约70 d,比自然条件下种子萌发到成苗缩短20多天,而且用诱导愈伤组织进行再生培养可以保存其良好的野生性状,也可以在此基础上运用体细胞无性系变异进一步改良其不足。

c.禾本科植物的愈伤组织根据形态主要可分为4种类型:第1种类型生长迅速、结构致密,颗粒小;第2种类型生长迅速、质地疏松;第3种类型生长缓

慢, 结构致密; 第4种类型松软无定型, 呈果冻状或棉絮状<sup>[20-22]</sup>。本试验中以匍匐茎节诱导愈伤, 经10~15 d培养后大多数是白色或黄白色、结构致密的非胚性愈伤组织, 在经过20~30 d的继代培养后有部分成为黄色带绿点、松软、生长较慢的胚性愈伤组织, 所以要保持愈伤组织的胚性, 在继代时必须对愈伤组织进行挑选, 注意观察和精心选择胚性愈伤组织将是试验成功的关键之一。

d. 本试验的供试材料是采自泰国北部的1种野生的细叶结缕草。初步大田试验结果表明, 其生物学特性和形态学特性比常用的细叶结缕草要好, 但它也有不足之处: 种子成熟不整齐, 收集困难, 在自然条件下发芽率很低, 且出苗后幼苗生长缓慢, 其耐寒性虽强于现有湖南地区的所有暖季型草坪草种, 但其在12月初开始褪色, 3月末开始返青, 绿期仍需加长, 而且在长时间没有修剪的草坪上还会有草坑的出现。

#### 参考文献:

- [1] 刘建秀, 贺善安, 陈守良. 华东地区结缕草属植物形态类型及坪用价值[J]. 草地学报, 1997, 15(4): 43-47.
- [2] 王文强, 李志丹, 白昌军. 结缕草属种质资源及其应用研究进展[J]. 草原与草坪, 2006(2): 3-8.
- [3] 李亚, 凌萍萍, 刘建秀, 等. 中国结缕草属植物(*Zoysia* spp.)地上部分形态类型多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(4): 33-39.
- [4] 蒋利媛, 刘伟, 彭信海, 等. 百慕达草的组织培养快速繁殖[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(2): 125-127.
- [5] 江巨鳌, 赵运林, 陈智勇, 等. 高羊茅愈伤组织再生系统的建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, 29(5): 385-387.
- [6] 于晓英, 卢向阳, 龙岳林, 等. 瓜叶菊花梗和花托的愈伤组织诱导与植株再生研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(4): 399-401.
- [7] 柴明良. 草坪草转基因研究进展[J]. 科技通报, 2002, 18(1): 67-72.
- [8] 樊晓莉, 包满珠. 组织培养获得日本结缕草绿色期延长株系[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 467.
- [9] 卢少云, 郭振飞, 陈永传. 狗牙根的组织培养及其矮化变异体研究初报[J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 482-484.
- [10] 王荔. 不同激素浓度及培养基对烟草愈伤组织分化的影响[J]. 云南农业大学学报, 1999, 14(4): 372-373.
- [11] 刘文真, 玄松南, 陈惠哲, 等. 几种作用因子对多年生黑麦草组织培养影响的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 95-101.
- [12] 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.
- [13] Lu S Y, Guo Z F, Chen Y C. Preliminary study on tissue culture of Bermudagrass and its dwarf somaclonal variant [J]. Acta Horde Sin, 2003, 30(4): 482-484. (in Chinese)
- [14] Li L, Qu R. In vitro somatic embryogenesis in turf-type Bermudagrass: Roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryo genesis [J]. Plant Breeding, 2002, 12(1): 155-158.
- [15] 梁一池, 杨华. 植物组织培养技术的研究进展[J]. 福建林学院学报, 2000, 22(1): 93-96.
- [16] 孙在红, 刘荣堂, 梁慧敏, 等. 植物激素在草坪草组织培养及植株再生中的应用与进展[J]. 草原与草坪, 2004(2): 13-16.
- [17] 玄松南, 陈惠哲, 傅亚萍, 等. 两种草坪草愈伤组织的诱导及其分化研究[J]. 浙江农业学报, 1997, 9(6): 295-299.
- [18] 刁现民, 孙净三. 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 45-47.
- [19] 林顺权. 植物细胞工程[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2000: 146-147.
- [20] 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, 20(4): 299-301.
- [21] 柴明良, 钮友民. 若干暖季型草坪草育种和组织培养进展[J]. 科技通报, 1996, 12(3): 162.
- [22] 陈智勇, 易自力, 杨立斗. 草坪草离体再生培养的研究现状及发展前景[J]. 生命科学研究, 2002, 6(4): 21-24.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 罗文翠