

大穗结缕草愈伤组织诱导及植株再生研究

马龙雪,赵丽萍

(滨州学院 生命科学系,山东 滨州 256603)

摘要:为获得大穗结缕草离体繁殖的最佳条件,以大穗结缕草不同器官作为外植体,MS为基本培养基,研究了不同消毒方法对外植体除菌效果的影响,不同外植体以及不同激素组合对愈伤组织诱导及分化的影响。结果表明:在光强1 500~2 000 lx,16 h光照/8 h黑暗,(23±2)℃培养条件下,大穗结缕草外植体,经70%酒精浸泡45 s,0.1% HgCl₂浸泡8 min,污染率低,易于愈伤组织的诱导。以种子胚作为外植体最有利于愈伤组织的培养,愈伤组织诱导的最佳培养基是MS+2,4-D(2.0 mg·L⁻¹)+6-BA(0.2 mg·L⁻¹)+TDZ(1.0 mg·L⁻¹)。

关键词:大穗结缕草;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)09-0015-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0015

结缕草属(*Zoysia*)是禾本科画眉草亚科多年生草本植物。我国的结缕草属植物资源现知有5个种和1个变种,分别为:结缕草、沟叶结缕草、细叶结缕草、大穗结缕草、中华结缕草、长花结缕草(拟变种),大都分布在我国东部北起辽宁南至广西等地沿海的狭长区域^[1]。在组织培养方面,AL-Khayri等^[2]采用日本结缕草成熟胚作为外植体诱导愈伤组织并获得再生植株。柴明良^[3]以结缕草、沟叶结缕草和中华结缕草为试材,以匍匐茎或种子为外植体,通过愈伤组织分化再生植株途径筛选出速生无性系。樊晓莉等^[4]通过组织培养获得了日本结缕草绿色期延长株系。在结缕草属中,大穗结缕草的相关报道相对较少,且主要集中在分布及应用方面。Kitamura等^[5]学者报道韩国有大穗结缕草的分布,对其形态进行了描述,并与该属其它种进行了比较。国内,董令善^[6]指出大穗结缕草主要分布在沿海滩涂,为沿海原生植物群落,主要分布于我国的山东省和辽宁省。大穗结缕草具地下茎、匍匐茎和地上茎,特别是地下5 cm上下的地下茎十分发达,盘根错节,形成了厚实的土草结块,同时叶片坚韧,富有弹性,非常耐践踏,是优良的草坪草资源,尤其是建植运动场

草坪和城市开放型草坪的首选草种,也是山地丘陵水土保持、公路护坡的先锋植物;更为重要的是大穗结缕草原生海岸带,抗盐性特别强,属于典型的盐生植物,是现在盐碱地区城市草坪绿化的优良草种选择。但是在实际应用过程中发现,大穗结缕草的种子具有深度休眠性^[7-9],种子外面有颖壳包被,发芽率低,极大地限制了大穗结缕草在草坪绿化中的应用,因此,有必要在大穗结缕草快速繁殖方面开展相关研究。本研究对大穗结缕草不同器官愈伤组织诱导及植株再生的条件进行优化,以期为今后进行借助生物工程技术实现大穗结缕草遗传性状的改良提供前提和基础,对同属的其它植物的再生体系建立研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

大穗结缕草种子及幼苗,种子采集于山东无棣汪子岛,并室内培养幼苗。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 MS培养基,在光强1 500~2 000 lx,16 h光照/8 h黑暗,(23±2)℃条件下进行培养。

1.2.2 两种外植体消毒方法的比较 取大穗结缕草种子和3月份大穗结缕草叶片为外植体,选择两种常见消毒方法消毒处理,方法1:70%酒精浸泡1 min→无菌水冲洗3次→10%NaClO浸泡20 min→无菌水冲洗3次;方法2:70%酒精浸泡45 s→无菌水冲洗3次→0.1% HgCl₂浸泡8 min→无菌水冲洗3次,消毒处理后,接种至MS+2,4-D(2.0 mg·L⁻¹)+6-BA(0.2 mg·L⁻¹)培养基。

收稿日期:2016-07-29

基金项目:国家大学生创新训练资助项目(201410449004);山东省自然科学基金资助项目(2010ZRA16022);滨州学院科研基金资助项目(BZXyl1001)

第一作者简介:马龙雪(1994-),男,山东省章丘市人,在读学士,从事生物技术研究。E-mail:1078722027@qq.com。

通讯作者:赵丽萍(1979-),女,山东省广饶县人,硕士,副教授,从事植物资源开发利用研究。E-mail:zhaoliping_bz@163.com。

进行污染观察统计,每 3 d 观察并统计污染情况,共统计 5 次。

1.2.3 外植体的选择 取大穗结缕草叶片、花和种子,经消毒处理后,接种至 MS+2,4-D($2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+6-BA($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基。30 d 后,观察愈伤组织生长状态,统计愈伤组织诱导率。

1.2.4 愈伤组织的诱导 外植体消毒后,接种于添加了不同浓度 2,4-D(1.0 、 2.0 、 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、TDZ(0.5 、 1.0 、 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、6-BA(0.1 、 0.2 、 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MS 培养基中,30 d 后,观察记录愈伤组织诱导率和生长状态。筛选出诱导愈伤组织的最适 2,4-D、TDZ 和 6-BA 浓度。及时处理已污染外植体,并及时添补新的外植体。

表 1 两种外植体消毒方法对大穗结缕草种子、叶片的消毒效果比较

Table 1 Comparison on two kinds of disinfection methods for the disinfection of the seeds and leaves of *Zoysia macrostachya*

时间 Time	方法 1 Method 1		方法 2 Method 2	
	种子污染数量	叶片污染数量	种子污染数量	叶片污染数量
	Number of seed contaminated	Number of blade contaminated	Number of seed contaminated	Number of blade contaminated
第 3 天	2	0	0	0
第 6 天	3	2	2	0
第 9 天	5	3	3	2
第 12 天	6	4	4	3
第 15 天	6	5	4	3

2.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可看出,不同种类、不同季节的外植体材料对试验效果影响很大,取材时间和材料的选择是组织培养的关键技术之一。试验表明,以 3、4 月份大穗结缕草叶片为外植体,3 d 后叶片伤口变为褐色,5 d 后叶片整体变为黄色或者干枯。可能原因是叶片纤维化程度大,不仅自身细胞水

2 结果与分析

2.1 外植体消毒方法的比较

从表 1 可看出,外植体发生污染的时间有早晚之分,并且污染程度也存在差异。其中方法 1 处理的外植体(包括种子和叶片)污染发生较早,且污染外植体数目较多。两种方法处理后,均是外植体种子比外植体叶片污染发生早,污染程度大,可能的原因是种子胚处绒毛比较密集,附带的细菌等过多,导致消毒液对其消毒不彻底。将 2 种方法中未经污染的大穗结缕草种子,在培养 20 d 后,长成嫩绿的小苗,并伴有白色的短根出现,继续培养后,小苗进一步生长并分蘖,小根增多且长度增加。

分含量少,而且从外界(即培养基)获取水分的能力弱,导致细胞脱分化困难,不适于愈伤组织的发生。5 月份大穗结缕草叶片虽然也生长愈伤组织,但是数量较少;花器官和种子胚较易于愈伤组织的生长,并且外植体干枯数目较少,愈伤组织状态较均匀,长势较好。但是结合外植体污染数目,初步认定大穗结缕草种子胚最为理想。

表 2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different explants on callus induction

外植体类型 Explant types	外植体干枯数 Number of explants dried	愈伤组织发生数 Number of callus induced	愈伤生长状态 Callus growth state	外植体污染数/% The number of explants contaminated
3、4 月份大穗结缕草叶片 Blade of <i>Z. macrostachya</i> in March and April	30	0	无	20
5 月份大穗结缕草叶片 Leaves of <i>Z. macrostachya</i> in May	10	20	黄绿色→绿色,小团状	20
5 月份大穗结缕草花器官 Flower organs of <i>Z. macrostachya</i> in May	0	30	黄白色→黄绿色,小团状,均匀	20
种子胚 Seed embryo	0	40	黄白色→黄绿色,小团状,均匀	20

2.3 激素对愈伤组织诱导的影响

由表 3 可知,在所设计的 24 种愈伤组织诱导培养基中,MS 培养基单独添加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D(2 号培养基)时愈伤组织的诱导率达到 40%,且愈伤组织生长状态最好。同时,在培养基中单独添加 1.0 mg·L⁻¹ TDZ(8 号培养基)或 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA(5 号培养基)对提高愈伤组织的诱导率也表现出明显的促进作用。因此,初步

确定大穗结缕草愈伤组织诱导的理想 2,4-D、TDZ 和 6-BA 浓度分别为 2.0、1.0 和 0.2 mg·L⁻¹。综合以上结果,初步确定大穗结缕草愈伤组织诱导的理想培养基为 MS+2,4-D2.0 mg·L⁻¹+6-BA0.2 mg·L⁻¹+TDZ1.0 mg·L⁻¹(16 号培养基);分化不定芽的最佳培养基是 MS+6-BA(0.2 mg·L⁻¹)(5 号培养基)。

表 3 不同种类和浓度的激素对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different kinds and concentrations of hormones on callus induced

编号 No.	2,4-D 浓度/ (mg·L ⁻¹) 2,4-D concentration	6-BA 浓度/ (mg·L ⁻¹) 6-BA concentration	TDZ 浓度/ (mg·L ⁻¹) TDZ concentration	接种数目 Number of vaccination	愈伤发生数 Number ofcallus inducted	出愈率/% Rate of callus inducted	愈伤组织生长状态 Callus growth state
1	1.0	0	0	20	4	20	浅绿色,团状,小颗粒较少
2	2.0	0	0	20	8	40	浅绿色,团状,小颗粒较多
3	3.0	0	0	20	2	10	浅黄色,团状,小颗粒较少
4	0	0.1	0	20	2	10	浅绿色,团状,分化出不定芽
5	0	0.2	0	20	6	30	浅黄色,团状,分化出不定芽
6	0	0.3	0	20	2	10	浅黄色,团状,分化出不定芽
7	0	0	0.5	20	4	20	浅黄色,团状,小颗粒较少
8	0	0	1.0	20	6	30	浅黄色,团状,小颗粒较多
9	0	0	1.5	20	2	10	浅黄色,团状,小颗粒较少
10	2.0	0	0.5	20	3	15	浅绿色,团状,小颗粒少
11	2.0	0	1.0	20	2	10	浅绿色,团状,小颗粒不明显
12	2.0	0	1.5	20	0	0	无
13	1.0	0	1.0	20	4	20	浅绿色,团状,小颗粒少
14	3.0	0	1.0	20	0	0	无
15	2.0	0.1	1.0	20	6	30	绿色,团状,小颗粒较多
16	2.0	0.2	1.0	20	10	50	绿色,团状,颗粒大而且多
17	2.0	0.3	0.5	20	4	20	绿色,团状,小颗粒多
18	1.0	0.2	1.5	20	6	30	绿色,团状,小颗粒多
19	3.0	0.2	1.0	20	4	20	绿色,团状,小颗粒较少
20	0	0.1	1.0	20	6	30	绿色,团状,小颗粒较少
21	0	0.2	1.0	20	10	40	绿色,团状,颗粒大而且多
22	0	0.3	1.0	20	6	30	绿色,团状,小颗粒多
23	0	0.2	0.5	20	8	40	绿色,团状,小颗粒多
24	0	0.2	1.5	20	6	30	绿色,团状,小颗粒较少

3 结论与讨论

3.1 大穗结缕草组织培养中外植体及消毒方法的选择

试验结果表明,不同消毒方法处理大穗结缕

草不同的外植体,消毒效果不同,大穗结缕草种子胚虽然比较适合用来诱导愈伤组织,但消毒效果较差。为了减少种子胚的污染,在消毒处理之前用流动的自来水充分冲洗种子,在消毒处理过程

中,不断进行搅拌,可以改善消毒效果。同时在接种前及时对接用解剖刀进行消毒处理,从而减少了外植体的污染。其中,获取种子胚时,不对种子进行切割处理,只是进行挤碎处理,有效地降低了种子胚的污染率。本试验选择不同来源和不同时期的大穗结缕草器官叶片、种子胚等外植体进行了愈伤组织诱导研究,结果表明种子胚诱导率最高,其次是花器官,而叶片诱导率很低。所以初步确定,以胚、花序为外植体诱导愈伤组织较以叶片为外植体容易。

另一方面,3、4 月份大穗结缕草叶片纤维化严重,含水量极低,5 月份大穗结缕草叶片质地较嫩,柔软且含水量相对较高,同时试验结果表明前者诱导率为 0,后者为 20%,所以,同种植物不同时期的状态对愈伤组织的诱导影响很大。

在愈伤组织的诱导中,不同外植体或同一外植体的不同部位、不同发育时期的差异,本质上可能都是细胞生理生化状态不同的结果。因此,外植体的选择在大穗结缕草愈伤组织诱导及植株再生研究中处于关键环节。

3.2 大穗结缕草组织培养中培养基激素浓度的选择

实践理论证明,生长素含量与细胞分裂素含量之比值对愈伤组织的生长影响很大,比值适中,有利于维持愈伤组织的生长^[10]。在组织培养中,细化各种激素的浓度梯度,同时参考生长素与细胞分裂素的比值,则可以更进一步地确定出愈伤组织诱导、继代、分化的最适激素的最适比例组

合,从而达到建立大穗结缕草高频再生体系的目的。试验结果证明,以大穗结缕草种子胚为外植体,愈伤组织的诱导的最佳培养基是 $MS + 2,4-D 2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} + 6-BA 0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1} + TDZ 1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$;愈伤组织分化不定芽的最佳培养基是 $MS + 6-BA 0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志: 第 10 卷, 第 1 册[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 125-131.
- [2] AL-Kharyi J M, Huang F H, Thompson L F, et al. In vitro plant regeneration of zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.)[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1987, 233: 3.
- [3] 柴明良, 郭达初, 钮友民, 等. 三种结缕草试管繁殖研究[J]. 科技通报, 1993, 9(6): 411-414.
- [4] 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(3): 467.
- [5] Kitamura F. Studies on the horticultural classification and development of Japanese lawn grasses[J]. Blu. Kemigawa Arboretum, 1970(3): 1-60.
- [6] 董令善, 田有风. 胶州市结缕草资源及其开发利用的探讨[J]. 中国草地, 1992(1): 6-8.
- [7] 赵丽萍, 石东里, 刘俊华. 大穗结缕草幼苗耐盐生理机制及耐盐能力研究[J]. 西北植物学报, 2009(7): 1421-1425.
- [8] 石东里, 赵丽萍, 姚志刚. 大穗结缕草萌发期耐盐能力试验[J]. 湖北农业科学, 2007(5): 782-783, 844.
- [9] 石东里, 赵丽萍, 姚志刚. 大穗结缕草种子打破休眠的处理技术研究[J]. 安徽农业科学, 2007(35): 11384-11385.
- [10] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 7-14.

Study on Callus Induction and Plant Regeneration of *Zoysia macrostachya* Franchet. Sav

MA Long-xue, ZHAO Li-ping

(Department of Life Science, Binzhou University, Binzhou, Shandong 256603)

Abstract: In order to identify the best conditions on rapid propagation of *Zoysia macrostachya*, together with MS as basic medium, different methods of disinfection of explants were studied, the effect of the different types explants (seeds, leaves of *Z. macrostachya* as explants) and different hormone combinations on induction and differentiation of callus was researched. The results showed that in the condition of light intensity was $1\ 500 \sim 2\ 000 \text{ lx}$ for 16 h light / 8 h dark, $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, disinfected with being immersed in 70% alcohol for 45 s, being washed with aseptical water 3 times, being immersed in 0.1% HgCl_2 for 8 min, being washed with aseptical water 3 times, seed embryo are easy to callus growth with low contamination rate. Using seed embryo as explant, the best induction medium were $MS + 2,4-D (2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}) + 6-BA (0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1}) + TDZ (1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1})$.

Keywords: *Zoysia macrostachya*; callus; plant regeneration