

文章编号: 1001-1498(2005)05-0541-05

# 沟叶结缕草的组织培养和无性系的建立

李国平<sup>1,2</sup>, 杨鹭生<sup>2</sup>, 胡文英<sup>2</sup>, 黄群策<sup>1\*</sup>

(1. 郑州大学离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

**摘要:**通过研究不同基本培养基及植物生长调节组合对沟叶结缕草丛生芽诱导、增殖和愈伤组织诱导、分化的影响, 建立起沟叶结缕草试管无性系。以地下匍匐根状茎的顶芽为外植体, 在 MS + 6-BA 2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 培养基上诱导丛生芽形成, 以 MS + KT 3 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 作为继代增殖培养基, 建立起丛生芽苗不定芽发生丛生芽苗速生试管无性系; 以丛生芽苗基部为外植体, 以 MS + 2,4-D 4 mg · L<sup>-1</sup> 作为愈伤组织诱导培养基, 以 MS 基本培养基作为愈伤组织分化培养基, 建立起丛生苗愈伤组织愈伤组织分化丛生苗试管无性系。试管无性系室外移栽成活率达 95% 以上。沟叶结缕草试管无性系的建立为细胞工程育种和基因转化的研究奠定了基础。

**关键词:** 沟叶结缕草; 组织培养; 无性系; 愈伤组织; 分化

**中图分类号:** Q943.1 S688.4 **文献标识码:** A

## Tissue Culture of *Zoysia matrella* and the Establishment of Asexual System

LI Guo-ping<sup>1,2</sup>, YANG Lu-sheng<sup>2</sup>, HU Wen-ying<sup>2</sup>, HUANG Qun-ce<sup>1\*</sup>

(1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China;

2. Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

**Abstract:** The paper dealt with the studies on the tissue culture and the establishment of asexual system of *Zoysia matrella*. Two kinds of asexual system were established successfully based on careful studies on the methods and major factors for induction, differentiation and propagation of tufted shoots and calli. One asexual system was maintained through tufted shoots regeneration, using top buds of rhizome of *Zoysia matrella* as explants, MS + 6-BA 2mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> as the effective medium for adventitious shoot induction and MS + KT 3mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> as the suitable subculture medium for adventitious shoot propagation. Another asexual system was maintained through callus induction and differentiation, using the base of tufted shoots as explants, MS + 2,4-D 4 mg · L<sup>-1</sup> as the optimum medium for callus induction and MS basic medium as the effective medium for differentiation in callus. And the plantlets got acclimatized well, with the survival rate up to 95%. Establishment of asexual system laid a solid foundation for further studies on breeding by means of somaclonal variation and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.

**Key word:** *Zoysia matrella*; tissue culture; asexual system; callus; differentiation

沟叶结缕草 (*Zoysia matrella* (L.) Merr.) 是禾本科 (*Gramineae*) 结缕草属 (*Zoysia* Willd.) 的多年生草本植物, 原产于台湾、广东、海南等地, 生于海岸沙地上<sup>[1]</sup>。沟叶结缕草是一种比较优良的暖季型草坪草,

收稿日期: 2004-11-23

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目“离子束应用技术研究”(2001BA302B)

作者简介: 李国平(1966—), 男, 福建莆田人, 副教授, 博士生 (E-mail: plgp@sina.com)。

\*: 通讯作者

其叶细、色绿、绿期长、草层密集而无丛状草丘突起,具有较强的耐旱性、耐盐碱性、耐荫性、对土壤要求不严等特性,被认为是一种高质量的草坪草,适于景点绿化、休憩广场和高级运动场的草坪建植,已成为我国南方大部分地区的主要草坪栽培种<sup>[2]</sup>。但沟叶结缕草也存在一些突出的缺陷,如成坪速度慢、叶量少、易感锈病、抗寒性较差、季节变换时易变黄等,这些性状在一定程度上都可以通过遗传育种的手段得到改良。利用植物组织和细胞培养技术与体细胞突变体筛选技术相结合的方法是植物育种途径之一,已经在很多作物上获得抗病、耐盐、耐重金属等多种类型的突变体<sup>[3,4]</sup>;采用基因工程技术,可将抗逆功能基因导入特定品种的愈伤组织或原生质体,获得改良的转基因植物。无论是采用细胞工程或是基因工程方法培育作物新品种,首先必需建立高频、稳定的植物再生系统<sup>[5-7]</sup>。目前国内结缕草属开发应用研究大都以采收种子及传统繁育为主<sup>[8,9]</sup>,有关组织培养和遗传转化方面的报道较少<sup>[7,10]</sup>,且大都涉及结缕草(*Z. japonica* Steud)<sup>[11-13]</sup>。本研究旨在建立用于基因转化和体细胞突变体筛选的高频再生体系,为开展沟叶结缕草的遗传育种工程研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

沟叶结缕草(*Zoysia matrella* (L.) Merr)的地下匍匐根状茎,取自莆田学院校园内草坪。植物生长调节剂 2,4-D、NAA、6-BA、KT、LH均为分析纯。

### 1.2 培养基

除本文 2.2.2 项实验研究不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响外,其它项实验中基本培养基均为 MS,按实验设计需要添加植物生长调节物质。培养基均附加蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂  $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 值调至 5.8。所有培养基均在  $121^\circ\text{C}$ 、 $1.1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  高温高压灭菌 20 min。

### 1.3 培养条件

培养温度 ( $25 \pm 2$ )。除愈伤组织的诱导阶段进行暗培养外,其它培养过程均在光照下进行,光照  $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,光照度  $1500 \sim 2000 \text{ lx}$ 。

### 1.4 外植体选取与处理

丛生芽的诱导:选取校园中长势强壮的沟叶结缕草地下匍匐根状茎顶芽 1 cm 左右,将顶芽置于烧杯里,用肥皂水浸洗 5 min,然后放在自来水下冲洗 3 h;在无菌室里用 75% 乙醇浸渍 30 s,无菌水冲洗

一遍,再用 0.1% 氯化汞处理 10 min,用无菌水冲洗 5~6 次后在无菌操作台上切取顶端长约 0.5 cm 的小段作为外植体。把这些外植体接种于诱导丛生芽培养基中(见表 1)。

表 1 不同植物生长调节剂组合对丛生芽形成的影响

序号	植物生长调节剂 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )		外植 体数	形成丛生芽 的外植体数	诱导率 / %	繁殖 系数
	6-BA	NAA				
1	0.5	0.1	45	14	31	3
2	1.0	0.1	45	20	44	5
3	2.0	0.1	45	25	56	8
4	0.5	0.5	45	0	0	0
5	1.0	0.5	45	9	20	2
6	2.0	0.5	45	12	27	3

愈伤组织的诱导:诱导愈伤组织时以继代增殖的丛生苗基部作为外植体。在无菌操作下,剪去丛生苗上部的叶片,然后将带有分生组织的基部切割成块,大小约为  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ ,分别接种于诱导愈伤组织培养基中(见表 3、表 4)。先放在 25 下进行暗培养 12 d 后,再转到光照条件下培养。

### 1.5 愈伤组织的细胞组织学观察

取愈伤组织用卡诺液固定 2~12 h,在  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸 60 下水解 10 min,卡宝品红染色压片, Olympus BX51 型显微镜观察照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 丛生芽的诱导与增殖

#### 2.1.1 植物生长调节剂组合对丛生芽形成的影响

以 MS 为基本培养基,加入不同浓度的 6-BA、NAA,植物生长调节剂组合见表 1。沟叶结缕草地下匍匐茎顶芽在培养基上启动较慢,培养 80 d 后始见丛生芽形成(图 1)。从表 1 可以看出,不同植物生长调节剂组合对丛生芽诱导率及繁殖系数(在一定的时间内平均每个外植体形成的不定芽数)影响较大,4 号培养基中 6-BA 与 NAA 的比值为 1,不能诱导丛生芽形成,3 号培养基中 6-BA 与 NAA 的比值为 20,其诱导率为 56%,繁殖系数为 8,可见,6-BA 与 NAA 的比值越大,丛生芽的诱导能力越高。

2.1.2 6-BA 和 KT 对丛生芽增殖的影响 将 2.1.1 项实验中形成的丛生芽,接种于附加不同浓度 6-BA 和 KT 的 MS 培养基中,每瓶接一丛,40 d 后观察 6-BA 和 KT 对丛生芽增殖的影响。如表 2 所示,6-BA 或 KT 浓度越高,丛生芽的增殖系数越高,但其浓度

以  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为宜,当浓度为  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,外植体增殖形成的丛生芽苗过于密集、矮小,不适宜作为下一代的继代培养材料;从丛生芽苗形成的速度及丛生芽苗质量看,KT 优于 6-BA。

将在  $\text{MS} + \text{KT } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上形成的芽苗丛切成小丛后转接于相同培养基上,丛生芽苗分蘖快,35 d 后可形成直径约为 3 cm 的密集丛生苗(图 2)。几年来,笔者以  $\text{MS} + \text{KT } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作为继代培养基,其分蘖生长速度稳定,从而建立起丛生芽苗不定芽发生丛生芽苗速生试管无性系。

表 2 6-BA 和 KT 对丛生芽增殖的影响

植物生长调节剂 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )		接种芽数	每丛增殖芽数	丛生芽苗生长情况
6-BA	KT			
3	0	6	65	芽苗草绿、稍弱、分蘖慢
5	0	6	88	芽苗黄绿、矮小、分蘖较快
0	3	6	72	芽苗墨绿、强壮、分蘖快
0	5	6	94	芽苗绿、矮小、分蘖较快

注:基本培养基为  $\text{MS} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.2 愈伤组织的诱导与继代培养

2.2.1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响 取在  $\text{MS} + \text{KT } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基中继代增殖的丛生苗基部作为外植体,接种于附加不同浓度 2,4-D 的培养基中,实验重复 3 次。从表 3 可以看出,2,4-D 为  $1.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时均能诱导出愈伤组织,其中  $2.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的愈伤组织诱导效果好,诱导率可达 100%。2,4-D 为  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,出愈较快,出愈量大,生长较迅速,培养至第 45 d,愈伤组织直径可达 1.5 cm,愈伤组织为乳白色,表面干燥,愈伤质量与  $2,4\text{-D } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的并无差异。所以,  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  适宜用于愈伤组织的诱导(见图 3)。

表 3 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	接种外植体数	始出愈时间 / d	出愈个数	诱导率 / %
0.5	45	-	0	0
1.0	45	45	38	84
2.0	45	30	45	100
4.0	45	23	45	100

2.2.2 基本培养基对愈伤组织诱导的影响 取在  $\text{MS} + \text{KT } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基中继代增殖的丛生苗基部作为外植体,接种于附加有  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 的 MS、White、 $\text{N}_6$ 、Nitsch 培养基上,

实验重复 3 次。愈伤组织的诱导结果见表 4。在 White 和 Nitsch 培养基上不能诱导出愈伤组织。在 MS 和  $\text{N}_6$  培养基上愈伤组织的诱导结果均较好。但  $\text{N}_6$  培养基上诱导产生的愈伤组织质地松软,表面湿润,生长速度较快,从以往实验推测,此类愈伤组织的分化能力较低,所以,  $\text{N}_6$  培养基不适合作为愈伤组织诱导的基本培养基。

表 4 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

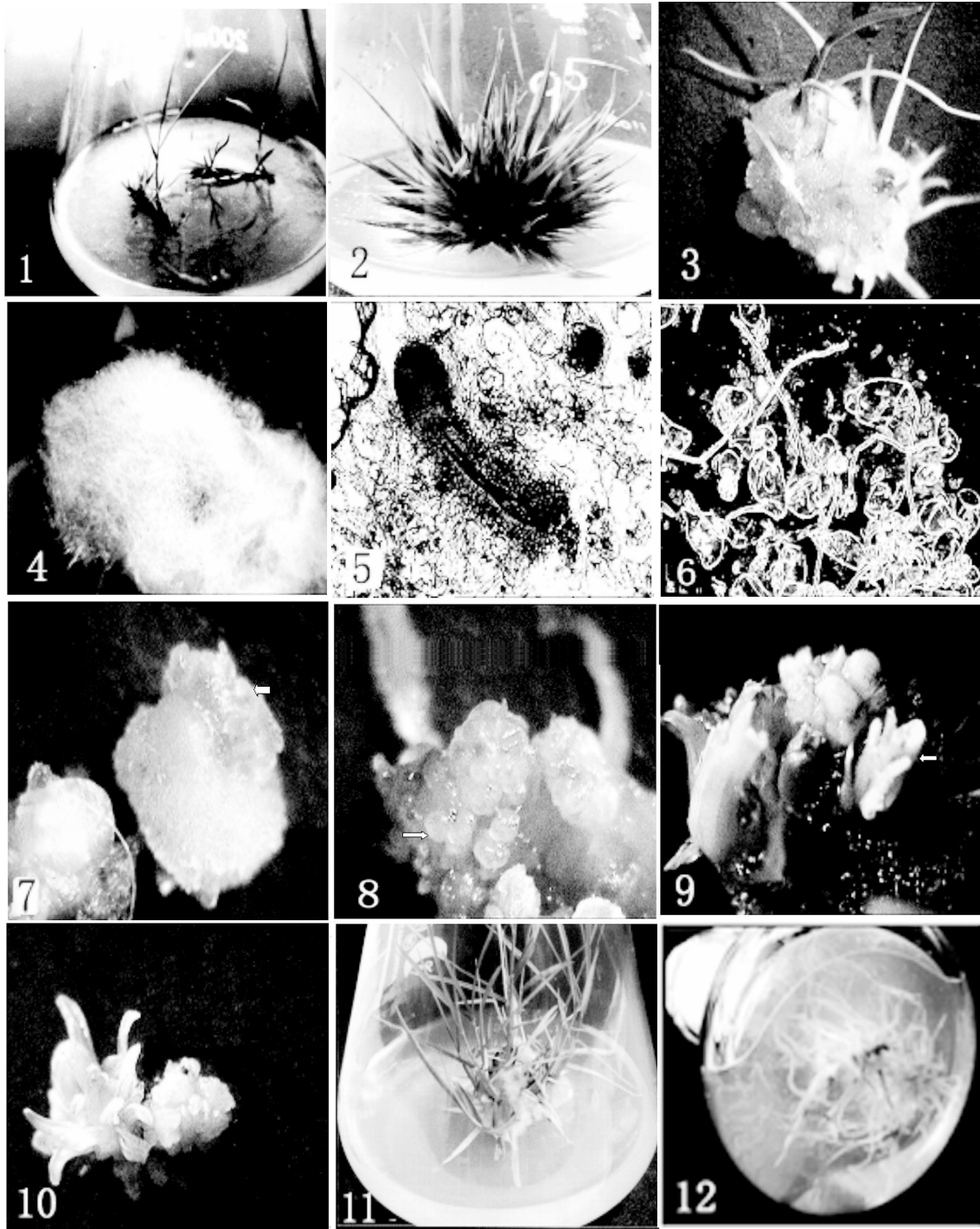
基本培养基 <sup>[14]</sup>	接种外植体数	诱导率 / %	愈伤生长状况
MS	45	100	乳白色、致密、干燥
White	45	0	-
$\text{N}_6$	45	100	黄白色、松软、湿润
Nitsch	45	0	-

2.2.3 愈伤组织的继代培养 将在  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上诱导出来的、生长良好的愈伤组织转接相同培养基和  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{LH } 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基中,暗培养 12 d 后,再转到光照条件下培养,结果发现愈伤组织在继代培养基中均可生长膨大,附加有 LH 的培养基中愈伤组织生长更快,30 d 后,其直径大小可约达 2.2 cm。但是,愈伤组织经在上述两种培养基上继代培养 35 d 后,愈伤表面逐渐产生大量白色毛状物,最终愈伤组织被白色短毛覆盖(图 4)。对继代培养 40 d 的愈伤组织进行细胞组织学观察表明,愈伤组织上已有不定根分化(图 5),且有大量细胞分化成类根毛细胞(图 6)。

## 2.3 愈伤组织的分化

在  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上诱导出来的愈伤组织切割成小块后转接到 MS 基本培养基上,进行光照培养。25 d 后,白色的愈伤组织部分转绿(图 7),表面产生绿色瘤状突起,瘤状突起逐步发育成绿苗(图 8~10),继续培养,整块愈伤组织转绿,并逐渐长成密集丛生苗(图 11),绿苗分化率 87%。值得一提的是,经继代培养后表面覆盖有毛状物的愈伤组织在 MS 基本培养基上也可分化出绿苗;将愈伤组织转接至  $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上,愈伤组织也可分化,分化结果并不比在 MS 基本培养基中的好。

切割已分化的绿苗基部作为外植体,接至新鲜  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上,诱导形成的愈伤组织在 MS 基本培养基上可再分化出绿苗。几年来,我们一直维持着这个丛生苗愈伤组织愈伤



图版 沟叶结缕草的组织培养和无性系的建立

- |   |                      |
|---|----------------------|
| 图 1 地下匍茎顶芽诱导形成丛生芽                                   | 图 2 丛生芽苗无性系          |
| 图 3 MS + 2,4-D 4.0 mg · L <sup>-1</sup> 培养基上形成的愈伤组织 | 图 4 继代培养基上形成的愈伤组织    |
| 图 5 继代愈伤组织上有不定根分化(显微照片)                             | 图 6 继代愈伤组织细胞形态(显微照片) |
| 图 7 愈伤组织转绿  | 图 8 愈伤组织分化出瘤状突起      |
| 图 9 愈伤组织上瘤状突起分化成小苗                                  | 图 10 愈伤组织上丛生苗形成      |
| 图 11 愈伤组织分化成无根绿苗                                    | 图 12 绿苗生根            |

组织分化 丛生苗试管无性系,发现愈伤组织诱导率和分化率较稳定,无甚变化。

#### 2.4 生根培养与移栽

把上述实验形成的试管丛生苗切割成小丛后转入生根培养基  $1/2 MS + NAA 1 mg \cdot L^{-1}$  中进行光照培养,一周后幼苗生出大量须根(图 12),生根率达 100%。成苗后,打开瓶口炼苗 5 d,取出小苗,洗净琼脂,移栽至经 0.1% 高锰酸钾溶液消毒过的栽培基质(珍珠岩 蛭石 =1:1)中,先在室内培养 3~4 d,然后再移至户外培养,成活率可达 95% 以上。

### 3 结论与讨论

组织培养技术是生物技术的主要组成部分和基础,只有建立起成熟的高频再生无性系,才能进行细胞工程育种和基因转化的研究<sup>[5,6,14]</sup>。禾本科草坪草的高频再生体系的建立是比较困难的<sup>[5,7,15,16]</sup>。通过本研究,建立起两个沟叶结缕草试管无性系保持系统:第一,以  $MS + KT 3 mg \cdot L^{-1} + NAA 0.1 mg \cdot L^{-1}$  作为继代增殖培养基,建立起丛生芽苗不定芽发生 丛生芽苗速生试管无性系;第二,以  $MS + 2,4-D 4 mg \cdot L^{-1}$  作为愈伤组织诱导培养基,以  $MS$  基本培养基作为愈伤组织分化培养基,建立起丛生苗 愈伤组织 愈伤组织分化 丛生苗试管无性系。第一个无性系是通过不定芽的分蘖而增殖,约 35 d 可继代一次,第二个无性系是通过愈伤组织分化而增殖,从诱导愈伤组织形成至再生植株约需 75 d。第一个无性系不仅继代时间短、增殖系数高,而且芽苗健壮,连续继代保持不衰,是比较理想的无性系;第二个无性系中愈伤组织的诱导率和分化率较高,但其缺点是愈伤组织形成的时间偏长,且愈伤组织继代培养后趋于分化不定根,不适宜连续继代培养。赵永辉等<sup>[17]</sup>报道,从结缕草(*Z. japonica* Steud.)种胚诱导获得的愈伤组织可以进行连续继代培养并保持生长分化能力。本项研究结果与之不同,究其原因可能是物种差异、外殖体来源不同或培养条件不同等因素所致。愈伤组织的继代培养问题有待进一步研究。

在沟叶结缕草的组织培养中,有两点值得一提,一是愈伤组织的诱导过程中,要进行一定时间的暗培养,这样有利于愈伤组织的形成,而愈伤组织的分化则需在光照条件下,暗培养不利于愈伤分化;二是

2,4-D 是诱导沟叶结缕草胚性愈伤组织所必需的因素,2,4-D 诱导的愈伤组织在  $MS$  基本培养基上可完成很好的分化。我们初步认为,这种愈伤组织已经在生理上决定了体细胞胚胎发生方向,愈伤组织的分化可能通过体细胞胚胎发生途径,但有关沟叶结缕草体细胞胚胎发生的详细过程还有待进一步研究。

本研究建立起的两个沟叶结缕草试管无性系可作为研究植物离体培养中器官发生调控机制的一个良好实验体系;同时,沟叶结缕草试管无性系的建立为细胞工程育种和基因转化的研究奠定了基础。

#### 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] 苟文龙,张全新,白史且,等. 沟叶结缕草研究进展 [J]. 草业科学,2002,19(3):62~65
- [3] 李周岐,寇世强,徐养福. 林木组织培养中的体细胞无性系变异 [J]. 西北林学院学报,2004,19(4):77~81
- [4] 赵成章. 再生植物体细胞无性系变异与作物改良 [J]. 生物工程进展,1993,13(4):32~36
- [5] 张俊卫,包满珠,孙振元. 草坪草的遗传转化研究进展 [J]. 林业科学研究,2003,16(1):87~94
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 李亚,刘建秀,向其伯. 结缕草属种质资源研究进展 [J]. 草业学报,2002,11(2):7~14
- [9] 钱永强,孙振元,李云,等. 中华结缕草种子解除休眠方法研究 [J]. 林业科学研究,2004,17(1):54~59
- [10] 郭海林,刘建秀. 结缕草属植物育种进展概述 [J]. 草业学报,2004,13(3):106~112
- [11] 王艳. 结缕草研究进展 [J]. 中国草地,2003,25(2):45~53
- [12] 胡繁荣. 结缕草组织培养及转化因子的初步研究 [J]. 河北农业大学学报,2004,27(2):21~24
- [13] 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
- [14] 林顺权. 植物细胞工程 [M]. 厦门:厦门大学出版社,2000:146~147
- [15] 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
- [16] 柴明良,钮友民. 若干暖季型草坪草育种和组织培养研究进展 [J]. 科技通报,1996,12(3):162~167
- [17] 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