

野生结缕草成熟胚愈伤组织诱导及再生体系的研究

马彩云, 王栋, 马金萍, 马春晖

(塔里木大学动物科学学院 新疆兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:以野生结缕草(*Zoysia japonica*)的成熟胚为外植体,通过胚性愈伤组织诱导进行植株再生。试验结果表明,不同的预处理方法对愈伤组织的诱导有较大的影响,经研钵研磨去除种子颖壳,30% NaOH 浸泡 1 min,流水冲洗 30 min 处理的成熟胚在 MS+2,4-D(3 mg/L)+6-BA(0.1 mg/L)为最佳,愈伤组织诱导率达 82.67%。将愈伤组织在 2,4-D(2 mg/L)和 6-BA(0.2~0.5 mg/L)的继代培养基中继代 1~2 次,可明显改善愈伤组织状态,增加胚性愈伤数。筛选继代后的胚性愈伤组织置于分化培养基 MS+KT(1 mg/L)+NAA(0.1 mg/L)中,分化率达 86%。分化后的簇状植株移栽成活率达 100%。

关键词:野生结缕草;成熟胚;再生植株

中图分类号:S580.33

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2010)09-0104-05

*¹ 结缕草(*Zoysia japonica*)为禾本科画眉草亚科结缕草族结缕草属的多年生草本植物,是享誉世界的暖季型草坪草,因具有抗旱、耐热、耐盐碱、耐践踏、耐啃食、抗病、节水、低维护、适应性广的特性作为草坪草而深受欢迎。试验以野生结缕草为材料,拟探讨多个可能影响野生结缕草组织培养的因素,建立稳定的植株再生体系,为下一步的外源基因转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 野生结缕草,采自山东莒县。外植体为成熟的种子。

1.2 方法

1.2.1 种子预处理方法 将未处理的种子放入 70%的酒精中,振荡 30 s,将漂浮在酒精上的种子捞出弃除,再将沉淀下来的捞出晾干备用,选取饱满的草籽进行预处理,处理方法 4 种:1)不进行处理直接进行灭菌(T1);2)去除种子颖及稃划破种皮(T2);3)去除种子颖及稃划破种皮,质量分数 30% NaOH 浸泡 1 min,流水冲洗 30 min(T3);4)去除种子颖及稃划破种皮,用体积分数 50%硫酸在 30 °C 条件下水浴 1 min,流水冲洗 30 min(T4)。

1.2.2 培养基 愈伤组织诱导培养基:MS 培养基不同质量浓度的 2,4-D、6-BA 和 NAA;继代培养

基:MS 培养基附加不同质量浓度 2,4-D 和 6-BA;分化培养基:MS 培养基附加不同质量浓度 KT 和 NAA;生根培养基:1/2MS 培养基添加不同质量浓度的 NAA。

1.2.3 成熟胚愈伤组织的诱导 预处理后的种子用无菌水冲洗 1 次,用体积分数 75%酒精浸泡 1 min,无菌水冲洗 3 次,0.1% 升汞消毒分为 4、6、8 和 10 min 4 个时间梯度,无菌水冲洗 4 次。接种于不同的诱导培养基上,25 °C 暗培养 30 d。

试验设计:采用 5 因素 4 水平 L₁₆(4⁵)正交试验设计,用 MS 培养基将 2,4-D、6-BA、NAA、灭菌时间、预处理方法作为因素,每个因素设 4 个水平,即:2,4-D 设为 1、2、3 和 4 mg/L 4 个水平;6-BA 设为 0、0.1、0.2 和 0.4 mg/L 4 个水平;NAA 设为 0、0.05、0.10 和 0.20 mg/L 4 个水平;灭菌时间设为 4、6、8 和 10 min 4 个水平;预处理方法设为 T1、T2、T3 和 T4 共 4 个水平(表 1)。数据采用 SPSS 15.0 进行统计分析,数据为百分数时,先经反正弦转化后,再进行分析 and 比较。

收稿日期:2009-11-29

基金项目:教育部重点项目——新疆沙冬青抗冻蛋白基因的克隆及转基因结缕草抗寒性的研究(206170)

作者简介:马彩云(1983-),男(回族),新疆昌吉人,在读硕士生。E-mail:macaiyyn007@126.com

通信作者:马春晖

表1 试验组合及结果分析

编号	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	灭菌时间 (min)	预处理 方法
1	1	0	0	4	T1
2	1	0.1	0.05	6	T2
3	1	0.2	0.10	8	T3
4	1	0.4	0.20	10	T4
5	2	0	0.05	8	T4
6	2	0.1	0	10	T3
7	2	0.2	0.20	4	T2
8	2	0.4	0.10	6	T1
9	3	0	0.10	10	T2
10	3	0.1	0.20	8	T1
11	3	0.2	0	6	T4
12	3	0.4	0.05	4	T3
13	4	0	0.20	6	T3
14	4	0.1	0.10	4	T4
15	4	0.2	0.05	10	T1
16	4	0.4	0	8	T2
K1	45.987	48.116	50.254	49.296	39.750
K2	49.326	50.089	48.549	48.565	45.775
K3	50.144	48.278	47.954	48.096	59.761
K4	49.540	48.513	48.239	49.096	49.710
R	4.157	1.973	2.300	1.200	20.011

1.2.4 愈伤组织的继代 经过 30 d 的暗培养后,诱导出的愈伤组织转接到添加 2,4-D 2 mg/L 和不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基上,继代 1~2 次,继代间隔为 25 d。培养条件为(25±2)℃暗培养。

1.2.5 愈伤组织的分化及再生 将结构致密的淡黄色胚性愈伤组织接种于添加不同浓度 KT 和 NAA 组合的 MS 分化培养基上进行分化,分化条

件为(25±2)℃下 16 h 光照培养,光照强度为 3 000~4 000 lx。

1.2.6 分化苗的生根与移栽 将分化出的小苗转接到添加不同配比 NAA 的 1/2MS 培养基上,生根后进行移栽。

2 结果与分析

2.1 不同处理对愈伤组织诱导的影响 从表 1 可以看出,影响愈伤组织出愈率的因素主次顺序是:预处理方法>2,4-D>NAA>6-BA>灭菌时间,各因素的最优水平为 2,4-D(3 mg/L),6-BA(0.1 mg/L),NAA(0 mg/L),灭菌时间(4 min),预处理方法(T3)。

用 SPSS 11.5 统计得出预处理方法、2,4-D、NAA 和 6-BA 4 个因素水平之间差异极显著(表 2)。在预处理方法中 T3 与 T1、T2 和 T4 差异极显著($P<0.01$),且 T3 处理的出愈率最高,可达到 74.5%,明显高于其他 3 个水平。2,4-D 浓度 2、3 和 4 mg/L 与 1 mg/L 处理间差异极显著,前三者之间差异不明显。在培养基中添加少剂量的 6-BA(0.1 mg/L)可以增加愈伤组织出愈率。灭菌时间的长短和 NAA(0 mg/L)的添加对愈伤组织的出愈率几乎没有任何影响。初步推断 T3+2,4-D(2、3 和 4 mg/L)+6-BA(0.1 mg/L)的组合出愈率较高。

2.2 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响 设置 3 个组合:Ⅰ. 2,4-D (2 mg/L)+6-BA (0.1 mg/L)+灭菌时间(4 min)+预处理方法(T3);Ⅱ. 2,4-D (3 mg/L)+6-BA(0.1 mg/L)+灭菌时间(4 min)+预处理方法(T3);Ⅲ. 2,4-D (4 mg/L)+6-BA(0.1 mg/L)+灭菌时间(4 min)+

表2 试验组合的方差分析

变异来源	SS	F	MS	F	Sig.
2,4-D	210.694	3	70.231	30.625**	2.13×10^{-12}
6-BA	49.488	3	16.496	7.193**	3.1×10^{-4}
NAA	63.945	3	21.315	9.294**	3.46×10^{-5}
灭菌时间	16.887	3	5.629	2.455	0.071
预处理方法	4 240.315	3	1 413.438	616.340**	4.85×10^{-17}
误差	146.770	64	2.293		
总变异	4 728.099	79			

注:**表示差异极显著($P<0.01$)。

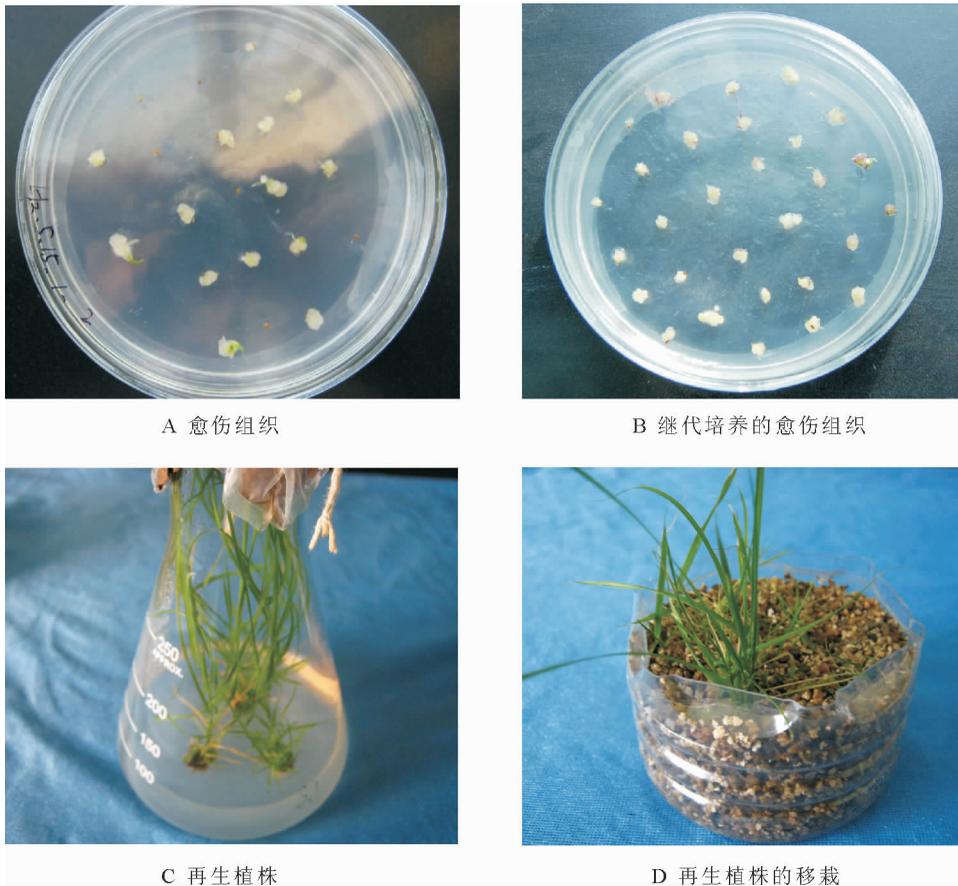


图 1 野生结缕草成熟胚愈伤组织诱导及再生体系

预处理方法(T3)。

将野生结缕草成熟胚接种到 MS 培养基上,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 黑暗条件下第 7 天开始形成无色透明的愈伤组织,22 d 左右达到出愈高峰。试验发现,2,4-D 质量浓度在 $1 \sim 4 \text{ mg/L}$ 内与其他因素在不同的组合下均能形成愈伤组织,诱导率均在 40% 以上(如图 1-1 所示);在后期的 3 个组合中(表 3),2,4-D 浓度在 $2 \sim 4 \text{ mg/L}$ 内时较其他各处理最有利于愈伤组织诱导,诱导率均在 74% 以

上。其中 2,4-D(3 mg/L) + 6-BA(0.1 mg/L) + 灭菌时间(4 min) + 预处理方法(T3)的 MS 培养基上所形成的愈伤组织呈淡黄色、颗粒性明显,出愈数和胚性愈伤数也明显较高。

2.3 2,4-D 和 6-BA 对愈伤组织继代的影响

经过 30 d 的暗培养,所形成的愈伤组织大多数为白色透明状,质地较软。把这种愈伤组织转接到继代培养基上,经过 1~2 次(25 d 为 1 次)的继

表 3 不同组合对愈伤组织诱导的影响

组合	接种数	出愈数(个)	愈伤组织诱导率(%)	胚性愈伤数	愈伤状态
I	150	112	74.67	6	透明,愈伤小,颗粒性弱
II	150	124	82.67	18	淡黄色,颗粒性明显
III	150	113	75.33	11	淡黄色,愈伤湿润,松散

代培养,大部分愈伤组织都能转化为淡黄色、颗粒性明显、结构致密的愈伤组织(图 1-B),将这种愈伤组织转接到分化培养基上很容易分化成苗,可明显的缩短分化时间。6-BA 质量浓度在 0.2 mg/L 时有利于愈伤组织状态的转化,过高和过低都不利于愈伤组织状态的转化(表 4)。

2.4 KT 和 NAA 对胚性愈伤组织分化的影响 选择淡黄色结构较致密的愈伤组织置于 MS 附加不同质量浓度 KT 和 NAA 的培养基上。愈伤组织在含有适宜浓度 KT 和 NAA 的培养基上

多数能分化出绿色小苗。但以 MS + KT (1 mg/L) + NAA (0.1 mg/L) 配比最为合适,分化率达 86% (表 5)。

表 4 不同质量浓度 6-BA 对胚性愈伤组织发生率的影响

2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	愈伤组 织数	胚性愈 伤数	胚性组织 发生率(%)
2	0.1	150	46	30.67
2	0.2	150	67	44.67
2	0.5	150	57	38.00
2	1.0	150	51	34.00

表 5 不同浓度 KT 和 NAA 对胚性愈伤组织分化的影响

培养基编号	KT(mg/L)	NAA(mg/L)	接种愈伤数	分化的愈伤数	分化率(%)	愈伤状态
1	1	0.05	102	57	55.88	簇状,无褐化
2	1	0.10	100	86	86.00	簇状,无褐化
3	1	0.20	100	69	69.00	簇状,无褐化
4	2	0.05	101	52	51.49	簇状,少量褐化
5	2	0.10	103	63	61.17	簇状,无褐化
6	2	0.20	100	57	57.00	簇状,少量褐化
7	3	0.05	101	46	45.54	簇状,部分褐化
8	3	0.10	104	51	49.04	簇状,部分褐化
9	3	0.20	102	50	49.02	簇状,部分褐化

2.5 分化苗的生根与移栽 分化成簇状的植株,将其移栽至添加 NAA 的 1/2MS 培养基中。经过 25 d 后,移栽至 1/2MS + NAA (0.1 mg/L) 培养基中的苗平均高度可达到 2.9 cm,根量较多,且根平均长度可达到 1.7 cm (图 1-C)。30 d 后,打开瓶盖,加入 100 mL 自来水,放在阴凉处浸泡 8 h,然后移栽至经高压灭菌的沙质土壤中(图 1-D),移栽成活率达 100%。

3 讨论

大量试验结果表明,2,4-D 是结缕草属植物诱导愈伤组织不可缺少的植物激素^[1],并且对 2,4-D 具有较强的耐受性^[2-9],本试验也得到了相同结果,2,4-D 质量浓度为 1.0~4.0 mg/L,均可诱导出愈伤组织,培养基中添加 3 mg/L 2,4-D 时愈伤组织诱导率最高,达到 82.67%,且愈伤组织状态最佳。李双艳等^[10]在结缕草愈伤组织诱导的营养因素优化中得出:培养基类型、酶水解酪蛋

白相对于糖浓度和糖类型对胚性愈伤组织的形成具有显著作用。作为外源激素,6-BA 有改善细胞内源生长素和细胞分裂素二者间比例,促进愈伤组织诱导,提高分化率的作用。添加少剂量的 6-BA 能提高愈伤组织的诱导率^[11],本试验在前期诱导中添加少剂量的 6-BA 即提高了愈伤组织诱导率,也利于愈伤组织的生长和继代,在诱导培养基中添加 0.1 mg/L 的 6-BA 能显著改善愈伤组织状态,在后期的继代培养中能显著提高胚性愈伤组织的诱导率,在分化培养中也能使分化率达到 86%。NAA 的添加没有能增加愈伤组织出愈率,反而使愈伤组织出愈率下降,造成这一结果的原因还有待于进一步研究。

在结缕草的组织培养中,前期的预处理方法对各类激素功效的发挥具有一定作用。各类激素的作用具有相对的专一性,激素间的相互组合更能发挥出其功效。所以将预处理方法与各种激素

组合更好的结合在一起才能从中找到更加高效的再生植株方法。

参考文献

- [1] Bai Y, Qu R. Factors influencing tissue responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue[J]. *Plant Breeding*, 2001,120(2):239-242.
- [2] 贺杰, 校现周, 李瑞芬. 结缕草成熟胚愈伤组织诱导及再生体系的研究[J]. *山西农业大学学报*, 2005(3):211-213.
- [3] 齐春辉, 韩烈保, 黄麟, 等. 几种因素对日本结缕草愈伤组织诱导与生长影响的研究[J]. *四川草原*, 2005(4):1-4.
- [4] 王渭霞, 胡张华, 陈锦清, 等. 松南结缕草成熟胚愈伤组织的诱导和再生[J]. *草业学报*, 2006,15(3):132-137.
- [5] 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.
- [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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 李晓红, 宗俊勤, 余建明, 等. 结缕草离体培养植株再生体系优化研究[J]. *草业科学*, 2009,26(4):110-116.
- [10] 李双艳, 韦善君, 阿里穆斯. 结缕草愈伤组织诱导的营养因素优化[J]. *畜牧与饲料科学*, 2009,30(2):40-41.
- [11] 朱晓花, 孙吉雄, 梁慧敏, 等. 低温预处理与植物生长调节剂对结缕草愈伤组织诱导的影响[J]. *草业科学*, 2009,26(4):121-126.

Study on induction of callus from mature embryo and plant regeneration of *Zoysia japonica*

MA Cai-yun, WANG Dong, MA Jin-ping, MA Chun-hui

(College of Animal Science, Tarim University;

Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology,

Xinjiang Production and Construction Group, Xingjiang Alar 843300, China)

Abstract: The embryo of *Zoysia japonica* was used as explant to induce the embryogenic callus and then regenerate the plant. The result showed that the pretreatment method remarkably affect embryogenic callus induction and the ratio of embryogenic callus induction was 82.67% by removing hull, 30% NaOH soaking for 1 min, then rinsing 30 min with tap water. The basal MS media was supplemented with 3 mg/L of 2,4-D and 0.1 mg/L of 6-BA. The quality and quantity of embryogenic calli were obviously improved and increased respectively by 1 to 2 rounds re-culture on the basal MS media supplemented with 2 mg/L of 2,4-D and 6-BA (0.2 and 0.5 mg/L). Embryogenic Calli were inoculated on the basal MS media supplemented with 1 mg/L of KT and 0.1 mg/L of NAA and the ratio reached 86%. The rooted plantlet clusters could be easily transplanted and the survival rate was 100%.

Key words: *Zoysia japonica*; mature embryo; plant regeneration