

结缕草愈伤组织诱导及植株再生

李瑞芬 张敬原 赵茂林

(北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 以日本结缕草种子为外植体, 2 份材料在附加 2,4-D 2.0 mg/L 水平的 MS 培养基上愈伤组织诱导率较高; 在含不同水平 2,4-D 的培养基中添加 6-BA 对非胚性愈伤组织转变成胚性愈伤组织起重要作用, 其中 2,4-D 2.0 mg/L 配合 6-BA 0.1mg/L 的 MS 培养基诱导出的胚性愈伤组织比例较高; 胚性愈伤组织在 2,4-D 为 0.1mg/L 的分化培养基上分化率和生根率最高, 为 46.8% ~ 48.1%。

关键词: 结缕草; 胚性愈伤; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0355-03

1 目的、材料与方法

日本结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.) 是一种草坪草和牧草兼用型多年生草种^[1]。该草种通过体细胞胚胎发生途径再生频率较低^[2]。本研究旨在建立和优化结缕草愈伤组织诱导和植株再生系统, 为通过基因工程和体细胞无性系变异改良结缕草提供理论依据和技术平台。

结缕草种子由中国农业科学院畜牧研究所李敏研究员提供。1 号材料采自山东胶州丘陵阳坡, 2 号材料采自山东胶州平原平地。选取饱满的结缕草种子, 去除颖壳, 70% 乙醇灭菌 1 ~ 2 min, 10% NaClO (含 1% 吐温 20) 灭菌 20 ~ 30 min, 无菌水冲洗 3 次, 接种于 4 种诱导培养基 (表 1)。1 个月统计愈伤组织诱导率, 并转入 3 种继代培养基 (表 1), 之后选择淡黄色松脆型愈伤组织置于分化培养基 (表 2)。将分化出茎、叶和根的再生苗转入新的 1/2 MS 培养基进行壮苗培养, 1 个月后将再生苗转移到田间, 重复 2 ~ 3 次。各接种材料数目一般大于 30, 继代培养以诱导培养筛选出的材料为接种数目。基本培养基为 MS, 蔗糖 30 g/L, pH 5.8。愈伤组织诱导和继代培养在 26℃ 黑暗条件下进行, 分化、生根和壮苗培养条件均为 26℃、光照 24 h/d。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

日本结缕草种子接种于诱导培养基 1 个月后 (见插页 3 图版, 1), 1 号、2 号材料在 2,4-D 为 0.5 ~ 4.0 mg/L 的范围内均诱导出愈伤组织。随着 2,4-D 浓度增加至 2.0 mg/L 时, 愈伤出现频率最高; 当 2,4-D 浓度升到 4.0 mg/L 时, 愈伤组织出现频率不呈增加趋势, 反而下降 (表 1)。大部分愈伤组织呈白色, 较松软, 没有分化能力。

将 1 号和 2 号材料诱导出的愈伤组织分成 3 块, 置于 3 种不同的继代培养基上。低浓度的 2,4-D 配合低浓度的 6-BA 或高浓度的 2,4-D 配合高浓度的 6-BA, 都不利于胚性愈伤组织的产生。2,4-D 2.0 mg/L 诱导的初代愈伤组织, 在 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L 的继代培养基上, 胚性愈伤组织诱导频率均较高 (表 1, 插页 3 图版, 2)。前人的研究结果也表明, 低浓度 6-BA 有助于草坪型狗牙根 (*Cynodon*) 和野牛草 [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] 胚性愈伤组织结构的形成和再生频率的提高^[3,4]。

收稿日期: 2002-09-20; 修回日期: 2002-11-21

基金项目: 国家 '863' 项目 (2001AA244051); 北京市青年骨干专项基金项目

表 1 结缕草愈伤组织诱导和继代培养

Table 1 Callus induction and subculture of *Z. japonica* Steud.

外植体 Explant	愈伤诱导 Callus induced				继代培养 Subculture (mg/L)					
	2,4-D (mg/L)	接种数 Number of explants	愈伤数 Number of calli	频率 Frequency (%)	2,4-D 1.0 + 6-BA 0.01		2,4-D 2.0 + 6-BA 0.1		2,4-D 3.0 + 6-BA 0.5	
					胚性愈伤数 Embryogenic calli number	频率 Frequency (%)	胚性愈伤数 Embryogenic calli number	频率 Frequency (%)	胚性愈伤数 Embryogenic calli number	频率 Frequency (%)
1	0.5	85	12	14.1	0	0	2	16.7	1	8.3
	1.0	111	38	34.2	5	13.2	10	26.3	6	15.8
	2.0	83	41	42.1	9	22.0	15	35.7	6	14.6
	4.0	56	8	14.3	0	0	1	12.5	1	12.5
2	0.5	85	11	12.9	0	0	1	9.1	1	9.1
	1.0	140	24	17.1	4	16.7	5	20.1	3	12.5
	2.0	186	58	31.2	12	20.7	19	32.8	8	13.8
	4.0	93	14	15.1	1	7.1	2	14.3	1	7.1

2.2 愈伤组织的分化和植株再生

将 1 号、2 号材料挑选出的胚性愈伤组织, 直径小于 5 mm 的直接置于 4 种分化培养基上, 直径大于 5 mm 的分割后分别置于分化培养基 $F_A \sim F_D$ 上。在 F_B 上, 两份材料的分化率最高 (46.8% ~ 48.1%), 且所有苗都分化出根。 F_C 上分化茎叶的频率为 31.7% ~ 32.1%, 但大部分苗都不生根 (见插图 3 图版, 4)。 F_A 上分化出茎叶的频率 24.6% ~ 25.0%, 部分苗分化出根 (见插图 3 图版, 3)。分化率最低的培养基是 F_D 。可见, 适当低浓度的 2,4-D, 有利于苗的分化, 当结合减半的 MS 基本培养基时, 同时有利于生根培养。两份不同采集地材料在愈伤组织诱导率和植株分化率上差异不明显, 表明这两份材料在基因型组成上差异不大。

4 种分化培养基分化出的苗在形态上有些差异。 F_C 上平均分化苗数最高为每愈伤 10 株丛, 分化出的苗偏高; F_A 上的每愈伤平均分化苗数偏低, 为 6 株丛/愈伤, 分化苗大部分也偏高; F_B 和 F_D 上分化出的苗偏矮, 叶片较宽, 二者每愈伤平均分化苗数均为 9。总的来看, F_B 分化培养基的分化效果较好 (见插图 3 图版, 5)。4 种分化培养基上有的再生苗偏高且呈直立生长, 分蘖相对较少, 叶色为黄绿; 矮苗呈莲座状生长, 分蘖相对较多, 叶色偏绿。

将分化出茎叶而未生根的株丛转移至不附加任何激素的 1/2 MS 培养基上进行生根培养, 2 周后全部长出根 (见插图 3 图版, 6)。壮苗培养 1 个月后转移到田间, 成活率在 80% 以上。

参考文献:

- Engelke M C. Widely used for centuries, zoysiagrass is a time-tested reservoir of genetic diversity. *Diversity*, 2000, 16 (1, 2): 48 ~ 49
- Asano Y. Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*). *Plant Cell Reports*, 1989, 8: 141 ~ 143
- Chaudhury A, Qu R D. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 60: 113 ~ 120
- Fei S Z, Read P E, Riordan T P. Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalograss by silver nitrate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 60: 197 ~ 203

表 2 结缕草愈伤组织的分化培养

Table 2 Regeneration of calli of *Z. japonica* Steud.

材料 Material	培养基 Medium (mg/L)	愈伤数 No. of calli	分化率 Frequency (%)	
			茎叶 Shoot	根 Root
1	F_A (1/2 MS)	65	24.6	23.1
	F_B (1/2 MS + 2,4-D 0.1)	47	46.8	46.8
	F_C (MS + IBA 0.2 + 6-BA 1.0)	53	32.1	0
	F_D (MS + IBA 0.1 + KT 0.5)	65	17.9	12.3
2	F_A (1/2 MS)	60	25.0	21.7
	F_B (1/2 MS + 2,4-D 0.1)	79	48.1	48.1
	F_C (MS + IBA 0.2 + 6-BA 1.0)	60	31.7	1.7
	F_D (MS + IBA 0.1 + KT 0.5)	72	16.7	12.5

Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration of *Zoysia japonica*

Li Ruifen, Zhang Jingyuan, and Zhao Maolin

(Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing 100089, China)

Abstract: Mature caryopses of two materials of *Zoysia japonica* Steud. collected in different habitats were used as initial explants for callus induction. MS containing 2.0 mg/L 2,4-D induced calli at the relatively higher percentage of 31.2% – 42.1%. Inclusion of 6-BA in callus induction medium with various levels of 2,4-D made an important role for non-embryogenic calli changing into embryogenic calli. The embryogenic calli of higher percentage were induced by a combination of 2.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L 6-BA. The rates of shoot regeneration and rooting were different in different regeneration medium. The rates of shoot regeneration and rooting were 46.8% – 48.1% at the level of 0.1 mg/L 2,4-D.

Key words: *Zoysia japonica* Steud.; Embryogenic callus; Tissue culture; Plant regeneration

芍药切花贮藏后水分与膜脂过氧化化的研究

臧彦卿 刘 燕 (北京林业大学园林学院, 北京 100083)

Studies on Water and Membrane Lipid Peroxidation of Cut Peony Flowers after Storage

Zang Yanqing and Liu Yan (College of Landscape Architecture, Beijing Forest University, Beijing 100083, China)

关键词: 芍药; 丙二醛 (MDA); 超氧化物歧化酶 (SOD); 过氧化氢酶 (CAT)

中图分类号: S 682 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0357-01

试材为芍药‘莲台’品种 (*Paeonia lactiflora* ‘Liantai’), 采自山东菏泽, 在花蕾萼片疏松、外层花瓣显现真正花色时采样, 用水洗去叶片和花蕾上的分泌物, 采后 40 h 火车运到实验室。在水中剪裁成花枝长 35 cm, 留 2~3 片复叶, 基部在 15 cm 深水中浸 2 h 复水, 1 000 倍的百菌清浸泡 1 min, 晾干, 普通白纸包裹后封入聚乙烯塑料袋中, 于 0~2℃ 干藏。定期取样测定花瓣各项指标, 均测 3 次重复。定期取 5 枝花在蒸馏水中瓶插 (室内散射光, 温度 25℃ ± 3℃, 相对湿度 40%~60%), 每天称花枝和 (水+瓶) 质量, 计算吸水量和失水量, 记录瓶插寿命和开花率。

如表 1 所示, 贮藏 30 d 后开花率明显降低, 贮藏到 100 d 时, 所有花成为僵蕾。随干藏时间的延长, 花枝鲜样质量逐渐减小, 瓶插吸水量和失水量呈下降趋势, 且失水量高于吸水量。贮藏初期花瓣膜脂过氧化程度较轻, 贮藏 30 d 后膜透性和 MDA 含量都急剧上升, 到 65 d 时分别是贮藏前的 1.9 倍和 1.6 倍。在贮藏期间 SOD 活性呈下降趋势, 30 d 后下降加速。贮藏初期 CAT 活性略有升高, 而后迅速下降。以上结果表明, ‘莲台’芍药切花在贮藏过程中, 初期失水造成的水分胁迫可以由较高的保护酶活性而得到缓解, 开花率与贮藏前相似; 随着贮藏时间的延长, 水分胁迫加重, 保护酶活性下降, 膜结构遭到破坏, 寿命缩短, 开花率降低。

表 1 芍药切花瓶插寿命及生理生化指标

Table 1 Vase life, physiological and biochemical indexes of cut peony flowers

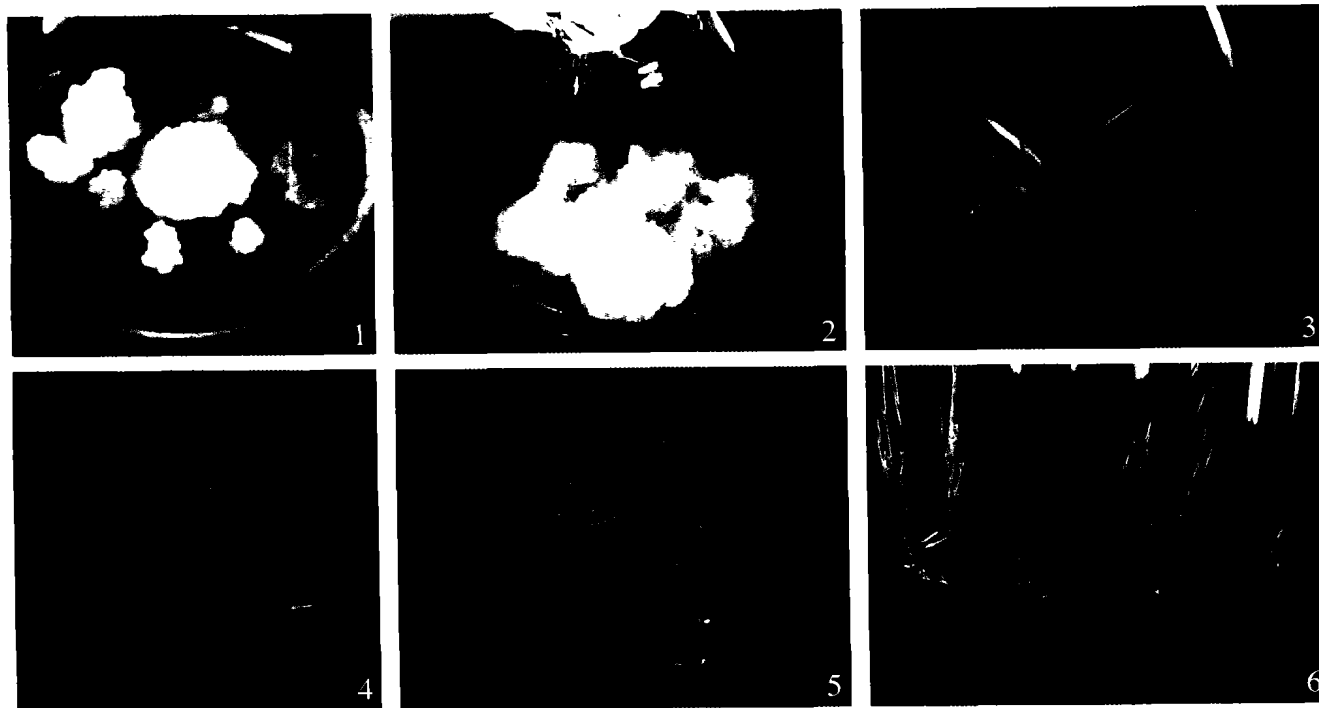
贮藏天数 Storage days (d)	开花率 Blooming rate (%)	瓶插寿命 Life (d)	吸水量 Water uptake (mg·d ⁻¹ ·g ⁻¹ FM)	失水量 Water loss (mg·d ⁻¹ ·g ⁻¹ FM)	相对电导率 Electric conductivity (%)	MDA (nmol·g ⁻¹ FM)	SOD (U·g ⁻¹ FM)	CAT (mg·g ⁻¹ FM)
0	100	3.8 ± 0.4	390 ± 50	391 ± 45	18.2 ± 1.5	2.86 ± 0.21	670.3 ± 10.2	2.21 ± 0.14
30	100	3.0 ± 0.4	258 ± 40	302 ± 37	24.1 ± 1.8	2.92 ± 0.15	642.4 ± 13.5	2.43 ± 0.11
65	60	3.0 ± 0.5	116 ± 32	247 ± 32	34.2 ± 2.0	4.47 ± 0.25	604.5 ± 11.1	1.84 ± 0.15
100	0	0	100 ± 25	230 ± 21	50.3 ± 1.0	5.51 ± 0.24	593.3 ± 9.5	1.33 ± 0.10

收稿日期: 2003-01-05; 修回日期: 2003-04-08

基金项目: 北京林业大学研究生院研究生培养基金资助项目

李瑞芬等：结缕草愈伤组织诱导及植株再生

Li Ruifen, et al. Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration of *Zoysia japonica*



图版说明：1. 日本结缕草种子诱导出愈伤组织；2. 非胚性愈伤组织继代培养后转变为胚性愈伤组织；3. FA分化培养基分化出茎叶；4. Fc分化培养基分化出茎叶；5. FB分化培养基分化出茎叶；6. 分化苗的生根培养。

Explanation of plates: 1. Calli induced from seeds of Zoysiagrass; 2. Non-embryogenic calli of Zoysiagrass changed into embryogenic calli in subculture; 3. Shoots regenerated in regeneration medium FA; 4. Shoots regenerated in regeneration medium Fc; 5. Shoots regenerated in regeneration medium FB; 6. Regenerated in rooting medium.

小果型无籽西瓜新品种‘雪峰小玉红’（见375页文）

