

文章编号: 1000-2286(2007)04-0533-06

中华结缕草茎尖的组织培养 和快繁技术研究

杜敏华, 梁子安, 张乃群, 高宛莉

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘要:应用正交设计法研究了植物生长调节剂、硝酸银和活性炭等对中华结缕草 (*Zoysia sinica* Hance) 幼嫩茎尖愈伤组织的诱导、不定芽分化和生根培养的影响。结果表明: 利于中华结缕草愈伤组织诱导的培养基为 MS + 0.15 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 27 g/L 蔗糖 + 5.5 g/L 琼脂, 诱导率为 56.8%; MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L CPPU + 4.0 mg/L AgNO₃ + 29 g/L 蔗糖 + 6.5 g/L 琼脂作分化和增殖培养基效果最好, 分化率为 68.42%, 增殖率为 6.3; 利于生根的培养基为 1/2 MS + 0.4 mg/L IBA + 0.3 mg/L NAA + 1.5 mg/L 活性炭 + 25 g/L 蔗糖 + 7.0 g/L 琼脂, 生根率为 95.1%。移栽基质为蛭石 + 珍珠岩 + 腐叶土 (1:1:1) 效果最好, 成活率 99.5%, 且苗生长健壮。

关键词:中华结缕草; 茎尖; 组织培养; 正交实验; 方差分析
中图分类号: Q943.1 文献标识码: A

Tissue Culture and Rapid Propagation Technique of *Zoysia sinica* Hance Meristem

DU Min-hua, LIANG Zi-an, ZHANG Nai-qun, GAO Wan-li

(College of Biology Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: Using orthogonality design $L_9(3^4)$, the effects of plant growth regulators, AgNO₃ and activated carbon etc on the induction of callus, adventitious buds induction and the adventitious bud rooting with *Zoysia sinica* Hance tender meristem were studied. The results showed that the best medium for callus inducing was MS + 0.15 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 27 g/L sucrose + 5.5 g/L agar, with the induction frequency of 56.8%; the best medium for the adventitious buds induction was MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L CPPU + 3.5 mg/L AgNO₃ + 29 g/L sucrose + 6.5 g/L agar, and differentiation rate is 68.42%, the multiplication rate was 6.3; the rooting and growing was the best on the medium 1/2MS + 0.4 mg/L IBA + 0.3 mg/L NAA + 1.5 mg/L activated carbon + 25 g/L sucrose + 7.0 g/L agar. The rooting rate was 95.1%. Plant material was the best with the vermiculite + perlite + leaf mold (1:1:1), and the survival rate was 99.5%.

Key words: *Zoysia sinica* Hance; meristem; tissue culture; orthogonal design experiments; analysis of variance

收稿日期: 2007-03-03 修回日期: 2007-05-10

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0524050006)

作者简介: 杜敏华 (1964-), 男, 副教授, 主要从事植物组织培养及食品生物技术研究, E-mail: duminhua2@126.com。

中华结缕草 (*Zoysia sinica* Hance) 是国产珍贵的优良草坪植物, 叶片质地较细, 色泽美, 扩展快, 其适宜生境土壤的 pH 值在 7.2 ~ 9.3, 可作为盐碱地及沿海城市建植草坪的优良植物^[1]。然而, 较短的绿色期、较少的品种、常规繁殖系数低下成为其进一步扩大应用范围的限制因子。组织培养是利用现代生物技术改良结缕草属 (*Zoysia*) 植物遗传性状的前提和基础。迄今为止, 关于结缕草属植物结缕草种 (*Z. japonica*) 的组织培养和遗传转化研究已有一些报道^[2,3]。但目前有关中华结缕草再生体系建立方面的研究很少, 仅限于杜雪玲等^[4], 钱永强等^[5]以中华结缕草成熟胚为外植体通过胚性愈伤组织发生进行植株再生的尝试; 韦善君等^[6]以中华结缕草成熟种子为外植体对愈伤组织的初步诱导, 但都处于实验室阶段, 愈伤组织诱导率、丛生芽分化率均偏低^[4-6], 且国内外尚未见以中华结缕草茎尖为外植体建立的离体再生体系的报道。基于此, 本文以中华结缕草的茎尖为试材, 采用正交设计和方差分析的方法, 系统地将影响植株再生体系建立的因素做最优化组合, 建立了中华结缕草组织培养植株高频再生体系, 为进一步应用生物技术改良草坪用中华结缕草提供技术平台。

1 材料与方 法

1.1 取材及培养条件

材料来源: 中华结缕草 (*Zoysia sinica* Hance) 由南阳市园林处提供。

材料处理: 取带 1 ~ 3 个叶片的中华结缕草幼嫩茎尖, 以流水冲洗 26 min, $\varphi = 75\%$ 酒精灭菌 30 s, 1 g/L HgCl₂ 消毒 6 ~ 9 min, 取出后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次, 得无菌材料。

外植体的诱导分化: 取中华结缕草无菌茎尖, 以 MS + 27 g/L 蔗糖 + 5.5 g/L 琼脂为基本培养基, 附加两种不同浓度的激素 6-BA (0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5) mg/L 和 NAA (0.05, 0.15, 0.55, 1.0) mg/L, 共 20 个不同质量浓度水平的组合进行愈伤组织的诱导。暗处理 13 d 后, 每日光照。

诱导芽的分化和增殖: 挑取新鲜、颗粒状的愈伤组织接入附加不同植物生长调节剂的 MS 培养基中, 诱导芽分化和增殖。分化和增殖培养基选用 MS + (0.3 ~ 0.7) mg/L 2,4-D + (1.0 ~ 2.0) mg/L CPPU + (3.0 ~ 4.0) mg/L AgNO₃ + 29 g/L 蔗糖 + 6.5 g/L 琼脂为基本培养基。

再生植株的生根: 将增殖培养所得的 1.3 ~ 2.6 cm 高的不定芽分化增殖苗, 切成单芽, 接种于诱导生根的培养基, 诱导生根的培养基选用 1/2 MS + (0.2 ~ 0.6) mg/L IBA + (0.1 ~ 0.5) mg/L NAA + (0.5 ~ 2.5) mg/L 活性碳 + 25 g/L 蔗糖 + 7.0 g/L 琼脂为基本培养基。

培养条件: 培养基 pH: 5.8 ~ 6.0; 温度: 白天 (26 ± 1) °C, 夜晚 (18 ± 1) °C; 湿度: 65% ~ 70%; 光强: 2 800 lx, 光照时间 13 ~ 15 h/d。

1.2 正交试验设计

1.2.1 不定芽诱导及增殖培养 选择 2,4-D、CPPU 和 AgNO₃ 3 个考察因子, 每个因子取 3 个水平, 选用 L₉(3⁴) 正交表,

考察对中华结缕草不定芽诱导的影响^[7,8], 因子水平安排见表 1。

表 1 中华结缕草不定芽诱导正交试验 L₉(3⁴) 表头设计

Tab.1 The orthogonal test L₉(3⁴) design layout of differentiated adventitious buds of *Zoysia sinica* Hance

水平	因 子		
	2,4-D/mg · L ⁻¹	CPPU /mg · L ⁻¹	AgNO ₃ /mg · L ⁻¹
1	0.3	1.0	3.0
2	0.5	1.5	3.5
3	0.7	2.0	4.0

表 2 中华结缕草不定芽生根诱导正交试验 L₉(3⁴) 表头设计

Tab.2 The orthogonal test L₉(3⁴) design layout of the adventitious bud induction of *Zoysia sinica* Hance

水平	因 子		
	NAA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	活性碳/mg · L ⁻¹
1	0.1	0.2	1.5
2	0.3	0.4	2.5
3	0.5	0.6	3.5

1.2.2 生根培养 根据文献报道^[9,10]及预试验,选择 NAA、IBA 和活性炭因子,每个因子取 3 个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,考察对中华结缕草生根的影响^[11,12],因子水平安排见表 2。

2 结果与分析

2.1 两种激素不同水平组合对中华结缕草茎尖外植体愈伤组织分化的影响

在无菌条件下,经表面灭菌的中华结缕草幼嫩茎尖,接种于上述分化培养基中。接种 8~12 d 后,部分培养基上的茎尖从切口处开始隆起膨大,16~19 d 后,

切口产生少量愈伤组织,并出现绿色小芽点。不同的激素水平组合对愈伤组织的诱导有不同的效果。外源激素 6-BA 0.2~2.0 mg/L 和 NAA 0.05~0.55 mg/L 组合(表 3)对中华结缕草幼嫩茎尖愈伤组织诱导率较高。最佳的组合是 0.25 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA,但 6-BA (> 2.0 mg/L) 和 NAA (> 0.55 mg/L) 浓度较高时对愈伤组织诱导具有抑制作用。

2.2 不定芽诱导及培养系统的建立

挑取新鲜、颗粒状的愈伤组织接入附加不同植物生长调节剂的 MS 培养基中,诱导不定芽的分化。接种 8 d 后,开始有新芽出现,随后大多数培养基中的丛生芽不断增加,且生长健壮,接种 5 周后统计分化率(表 4)。

直观分析表明,3 种因子对丛生芽诱导产生效应的大小依次是:2,4-D > CPPU > AgNO₃, 2,4-D、CPPU、AgNO₃ 的极差均比空列的大,说明各因素间的变异是可靠的。

2,4-D 的质量浓度为 0.5 mg/L 时的平均相对分化率为 18.99,分别是质量浓度为 0.3 mg/L 和 0.7 mg/L 时的 1.93 和 1.39 倍,3 种水平的平均相对分化率的极差为 9.140,表现出明显的差异。CPPU 质量浓度为 1.0 mg/L 时和 AgNO₃ 质量浓度为 3.5 mg/L 时的水平相对分化率最高,分别为 17.73 和 15.59,其 3 种水平的平均相对分化率的极差分别为 6.878 和 2.249(表 5)。

方差分析结果(表 4)表明,2,4-D 和 CPPU 各水平对中华结缕草不定芽增殖诱导的影响均达到显著水平($P < 0.05$),而 AgNO₃ 各水平对中华结缕草不定芽增殖诱导的影响则无显著差异。说明不同浓度的 NAA 和 CPPU 水平对中华结缕草不定芽增殖诱导的影响很大,AgNO₃ 则次之,这与直观分析的结果相一致。

以上分析结合表 4 可知,各因子的最佳组合为 $A_2B_1C_3$,即 0.5 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L CPPU 和 4.0 mg/L AgNO₃。以该组合进行芽分化继代培养,丛生芽分化率为 68.42%,对原接种芽数和新形成的丛生芽数进行统计分析,得此处理单芽均增殖倍数(新形成的丛生芽数/原接种数)为 6.3。丛生芽分化和增殖倍数都明显高于其它组合,说明本实验筛选是成功的。

2.3 不定芽诱导生根试验

待不定芽长至 1.3~2.6 cm 时,转至生根培养基。接种不定芽 7 d 后,开始有根出现,随后,大多数培养基中的不定芽开始生根,在接种 4 周后统计丛生芽生根率(表 6)。

NAA、IBA 和活性炭 3 个水平 9 个质量浓度组合的正交试验的直观结果表明,3 种因子对丛生芽诱导产生效应的大小依次是 NAA > IBA > 活性炭。NAA、IBA、活性炭的极差均比空列的大,说明各因素间的变异是可靠的。

表 3 两种激素不同水平组合对中华结缕草茎尖外植体愈伤组织诱导的影响

Tab.3 Effect of different combinations of the two kinds of hormones on callus tissue of the explant of *Zoysia sinica* Hance's meristem %

NAA /mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹				
	2.5	0.2	0.5	1.0	2.0
0.05	44.0	47.6	54.0	49.0	35.6
0.25	46.5	52.3	56.8	54.0	38.0
0.55	36.0	44.5	45.0	47.5	29.4
1.0	26.0	30.5	32.5	29.5	24.0

注:表中数据诱导率 = 诱导出愈伤的外植体/接种外植体总数 × 100;表中诱导率为各处理外植体培养 40 d 的平均值。

表 4 中华结缕草不定芽诱导试验结果 $L_9(3^4)$ Tab. 4 Differentiated adventitious buds of *Zoysia sinica* Hance in the Orthogonal Test $L_9(3^4)$

处理	因 素				接种数	分化数	分化率 /%
	2,4-D/mg·L ⁻¹	CPPU/mg·L ⁻¹	AgNO ₃ /mg·L ⁻¹	空列			
1	0.3	1.0	3.0	1	80	29	35.71
2	0.3	1.5	3.5	2	81	23	28.48
3	0.3	2.0	4.0	3	94	23	24.46
4	0.5	1.0	3.5	3	80	53	66.32
5	0.5	1.5	4.0	1	79	46	58.29
6	0.5	2.0	3.0	2	86	40	46.30
7	0.7	1.0	4.0	2	87	50	57.56
8	0.7	1.5	3.0	3	84	32	38.06
9	0.7	2.0	3.5	1	93	25	26.93
K_1	29.550	53.197	40.023	40.310			
K_2	56.970	41.610	40.577	44.113			
K_3	40.850	32.563	46.770	42.943			
极差(R)	27.420	20.634	6.747	3.803			
方差(F值)	50.022*	28.177*	3.696				

注: K_i 代表水平*i*的平均值;*为0.05水平显著($F_{0.05}=19.00$)。

方差分析结果

(表6)表明,NAA和IBA各水平对中华结缕草不定芽诱导生根的影响达到显著水平($P < 0.05$),而活性炭各水平对中华结缕草不定芽诱导生根的影响则无显著差异。

说明不同质量浓度的NAA和IBA水平对中华结缕草丛生芽诱根的影响较大,活性炭对丛生芽诱根的影响较小。以上分析结合表6可知,各因子的最佳组合为 $A_2B_2C_1$,即0.3 mg/L NAA、0.4 mg/L IBA和1.5 mg/L 活性炭。以该组合进行根分化继代培养,出根率为95.1%(出根率(%))=出根外植体数/接种外植体数×100%),明显高于其它组合,说明本实验筛选是成功的。

诱导生根后,移栽到基质为蛭石+珍珠岩+腐叶土(1:1:1)的栽培基质中,炼苗2周,然后移栽到土壤中,按常规方法管理,35 d统计移栽成活率,成活率高达99.5%。

3 讨 论

3.1 中华结缕草茎尖离体再生体系的高效性

本实验以中华结缕草的离体茎尖为试材,采用6-BA与NAA, CPPU与2,4-D以及NAA与IBA 3种植物生长调节剂(简称:PGR)组合来研究中华结缕草茎尖愈伤组织诱导、丛生芽分化和不定芽生根的发生情况,建立高效的中华结缕草茎尖离体培养再生体系。如愈伤组织诱导率高于韦善君^[6]等的结果(43.0%),丛生芽分化率高于韦善君,钱永强^[6]等报道的最高分化率(60%)。通过采用正交设计和方差分析对影响中华结缕草茎尖愈伤组织诱导、丛生芽分化和不定芽生根因子的分析,优化了其植株再

表 5 中华结缕草各因子不定芽的平均相对分化率比较

Tab. 5 Average relative differentiation rates of adventitious buds with various *Zoysia sinica* Hance factors

水平代码	2,4-D/mg·L ⁻¹	CPPU/mg·L ⁻¹	AgNO ₃ /mg·L ⁻¹	空列
1	9.85	17.73	13.34	6.69
2	18.99	13.87	13.53	14.704
3	13.617	10.854	15.590	14.314
极差(R)	9.140	6.878	2.249	0.733

生体系,初步找出了愈伤诱导、丛生芽分化和不定芽生根的主要影响因子。同时以中华结缕草离体茎尖作为外植体,具有芽再生频率高、变异性小、易为农杆菌侵染等特点,是良好的遗传转化受体^[13]。

表6 中华结缕草不定芽生根诱导试验结果 L₉(3⁴)

Tab.6 The result of the adventitious bud induction of *Zoysia sinica* Hance in the orthogonal test L₉(3⁴)

处理	因 素				接种数	分化数	分化率 /%
	NAA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	活性炭/mg · L ⁻¹	空列			
1	0.1	0.2	1.5	1	82	52	63.18
2	0.1	0.4	2.5	2	88	61	69.01
3	0.1	0.6	3.5	3	82	27	32.85
4	0.3	0.2	2.5	3	87	62	71.64
5	0.3	0.4	3.5	1	90	79	87.69
6	0.3	0.6	1.5	2	87	59	67.58
7	0.5	0.2	3.5	2	96	40	41.66
8	0.5	0.4	1.5	3	84	50	59.67
9	0.5	0.6	2.5	1	93	20	21.42
K ₁	55.013	58.827	63.477	57.430			
K ₂	75.637	72.123	54.023	59.417			
K ₃	40.917	40.617	54.067	54.720			
极差(R)	34.720	31.506	9.454	4.697			
方差(F值)	54.858*	45.010*	5.335				

注:K_i代表水平i的平均值;*为0.05水平显著(F_{0.05} = 19.00)。

与成熟种子^[5]和成熟胚^[4,5]等外植体培养相比用茎尖进行培养最利于中华结缕草的再生,可能是由于中华结缕草离体茎尖的分生能力强、内源激素水平利于芽分化的缘故。

3.2 不同生长调节剂对中华结缕草离体茎尖再生体系的影响

NAA是一种生长素,在组织培养中通常被用于诱导细胞的分裂和根的分化。本实验中NAA水平以0.3 mg/L质量浓度最利于中华结缕草不定芽根的形成,并且与其它水平的达到显著差异。NAA水平以0.15 mg/L质量浓度最利于中华结缕草愈伤组织诱导分化。

本试验中2,4-D是促进不定芽分化和增殖作用的主要因子,以0.5 mg/L质量浓度最适于不定芽的形成和分化,而且2,4-D与CPPU的质量浓度配比值较低就可产生较好的实验效果,这有利于进一步降低组培成本。但是,2,4-D属中等毒性的植物生长调节剂,有一定的致癌作用及残留效应,因此在植物的组织培养过程中应慎重使用^[14]。

CPPU是苯基脲类细胞分裂素,一种新型植物生长调节剂,具有嘌呤型细胞分裂素更强的细胞分裂活性。具有良好的促进花芽分化、保花、保果、使果实膨大和诱导单性结实及延缓衰老等方面的作用(李英等,2001)^[15]。应用于结缕草植物的组培中还未见相关的报道。本室前阶段试验发现CPPU在刺激细胞分裂,诱导芽的分化等方面比6-BA好。因此,首次应用于结缕草植物植物,丛生效果较好。

3.3 其它试验因子对中华结缕草离体茎尖再生体系的影响

在中华结缕草离体茎尖的组培中发现,不定芽有不同程度的黄化现象,根据资料^[16-18]分析及预试验,在不定芽诱导及增殖阶段使用4.0 mg/L AgNO₃对黄化现象有一定的控制作用。AgNO₃的使用质量浓度一般为1~10 mg/L,质量浓度过高,会产生毒害作用,反而不利于不定芽的再生^[18]。在中华结缕草的生根阶段,部分外植体出现褐变现象,活性炭可抑制褐变的发生,同时有促进生长的作用^[17,19]。在生根阶段加入质量分数1.5 mg/L的活性炭,对根的形成有一定的促进作用。蔗糖除起维持渗透压

和提供碳源的作用外,其浓度对离体培养过程中器官发生的影响已有许多报道^[20],蔗糖有时也能影响中华结缕草丛生芽发生频率。

参考文献:

- [1] 赵昕,李玉霖. 结缕草种子打破休眠的研究[J]. 种子,2002(1):22-27.
- [2] Inokuma C, Sugiura K, Imaizumi N, et al. Transgenic Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) plants regenerated from protoplasts [J]. Plant Cell Rep, 1998,17(3):334-338.
- [3] Chai M L, Kim D H. Agrobacterium-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*) [J]. J Kor Soc Hort Sci, 2000,41(5):455-458.
- [4] 杜雪玲,张振霞,刘萍,等. 中华结缕草组织培养与植株再生[J]. 草业学报,2006,15(4):88-93.
- [5] 钱永强,孙振元,韦善君,等. 中华结缕草成熟胚再生影响因素研究[J]. 核农学报,2005,19(6):436-440.
- [6] 韦善君,孙振元,钱永强,等. 中华结缕草(*Zoysia sinica* Hance)组织培养和再生植株研究[J]. 武汉植物学研究,2004,22(5):455-458.
- [7] 李正平. 月季试管繁殖和移栽中几个因素的研究[J]. 园艺学报,1988,15(2):131-134.
- [8] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京:金盾出版社,2003:116-119.
- [9] Debasis C, Azad M A K, Datta S K. In vitro propagation of rose cultivars[J]. Indian Journal of Plant Physiology,2000,5(2):189-192.
- [10] Rosu A, Skivin R M, Bein A, et al. The development of putative adventitious shoots from a chimeral thornless rose in vitro [J]. Journal of Horticultural Science, 1995,70(6):901-907.
- [11] 张德炎,李喜文,李建民,等. 正交设计法在白三叶组织培养中的应用[J]. 东北师范大学学报:自然科学版,1998(1):40-45.
- [12] 欧光鉴,胡中立. 生物统计[M]. 西安:陕西师范大学出版社,1995:73-89.
- [13] 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.
- [14] 朱惠香,张宗俭,陈虎保. 常用植物生长调节剂应用指南[M]. 北京:化学工业出版社,2002:65-76.
- [15] Li Y(李英), Yu J Q(喻景权), Zhu Z J(朱祝军), et al. Fruit growth, cell division and endogenous level in parthenocarpic fruit formed by CPPU in leucantha:olltha [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报),2001,27(2):167-172.
- [16] 崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,2003:29-28.
- [17] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京:金盾出版社,2003:68-71.
- [18] Debasis C, Azad M A K, Datta S K. In vitro propagation of rose cultivars[J]. Indian Journal of Plant Physiology,2002,5(2):189-192.
- [19] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [20] LIN SH(林盛), CHENG X H(陈幸华). Effect of sucrose on in vitro culture of coconut embryo[J]. Chinese Journal of Tropical Crops(热带作物学报),1999,22(1):20-21.