

兰引3号结缕草组织培养研究

宋俊芳¹, 金芳², 孙吉雄¹, 郭奇梅¹, 于永明³

(1. 甘肃农业大学 草业学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学 农学院, 甘肃 兰州 730070;

3. 甘肃省小陇山林业实验局, 甘肃 天水 741020)

摘要: 以兰引3号结缕草茎段为外植体, 采用正交试验方法, 研究了植物激素 GA₃, IBA 和 6-BA 对兰引3号结缕草匍匐茎带芽茎段发芽, 生根和生长的影响, 结果表明: MS+GA₃ 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 是促进兰引3号结缕草试管苗茎段发芽, 生根及生长的最优组合培养基, MS+GA₃ 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 是适宜兰引3号结缕草试管苗茎段发芽, 生根和生长的较优组合培养基。

关键词: 兰引3号结缕草; 组织培养; 植物激素; 茎段

中图分类号: S 543.035 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5500(2007)05-0029-03

结缕草 (*Zoysia japonica*) 又称锥子草、日本结缕草, 是禾本科 (Gramineae) 结缕草属 (*Zoysia*) 多年生暖季型草坪草, 适合我国南方种植, 适应范围广, 具有一定的抗碱性, 韧性和弹性, 耐磨、耐践踏, 以结缕草铺建草坪在我国已有 2000 余年的历史, 广泛用于建设运动场草坪和固土护坡草坪^[1-2]。兰引3号结缕草 (*Z. japonica* cv. Lanyin No. 3) 1994 年 1 月 1 日由全国牧草品种审定委员会审定通过^[3], 适宜长江以南种植, 植株低矮、抗性强、成坪快、返青早、质地好、颜色绿、观赏性好、管理成本低、结种量大、种子发芽率高等特点, 在我国具有广阔的推广和应用前景^[4]。

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^[5-6], 有关组织培养和遗传转化方面的报道较少^[7-8]。由于结缕草具有兼性繁殖、雌蕊先熟和种间杂交可育等生物学特性, 导致天然种间杂种的普遍存在和丰富的遗传变异, 形态种的确定非常困难^[9-10], 这给育种工作造成一定的困难。生物技术的发展和应用, 为结缕草种质资源研究和基因转化提供了有力的手段。

以兰引3号结缕草带芽茎段为外植体, 分析了不

同植物激素对诱导生芽, 生根及生长的影响。旨在优化结缕草的植株再生体系, 为结缕草的遗传转化和无性系变异研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

盆栽兰引3号结缕草匍匐茎带芽茎段, 植物生长调节剂 GA₃, IBA 和 6-BA 均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 外植体选取 选取长势强壮的结缕草带芽匍匐茎段, 剪成 1 cm, 将茎段置于烧杯, 用自来水冲洗 1 h, 在超净工作台上用 1 mL/L 升汞消毒 4 min, 再用无菌水冲洗 5~6 次, 然后将这些茎段作为外植体接种于培养基中。

1.2.2 试验设计 试验采用 3 因素 3 水平正交试验, 正交表选用 L₉(3⁴)^[11]。共 9 个处理 (表 1), 每个处理接 10 瓶, 3 次重复。茎段接种后, 观察蘖芽萌动情况, 30 d 后测量蘖芽增殖的数量, 蘖芽的高度及生根情况, 用 DPS 软件对正交试验结果进行方差分析, 各处理间用 SSR 检验。

1.2.3 培养基, 培养条件 培养基以 MS 为基本培养基, 附加不同的激素配比。培养基均加蔗糖 20 g/L, 琼脂 5.0 g/L, pH 5.8。置高压灭菌锅, 在 121~126 °C 条件下灭菌 20 min。培养温度为 (25±2) °C, 光照强度为 3 000 lx, 光照时间为 10~12 h/d。

收稿日期: 2006-12-14

基金项目: 甘肃省扶贫项目(0070730)资助

作者简介: 宋俊芳(1977-), 女, 甘肃秦安人, 在读硕士。金芳为通讯作者。

表 1 不同激素组合正交设计
Table 1 Orthogonal design of different plant hormone combination

处理	激素		
	GA ₃	IBA	6-BA
1	0	0	0
2	0	0.1	1.0
3	0	0.2	2.0
4	0.5	0	1.0
5	0.5	0.1	2.0
6	0.5	0.2	0
7	1.0	0	2.0
8	1.0	0.1	0
9	1.0	0.2	1.0

2 结果与分析

2.1 GA₃对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的影响

GA₃对兰引3号结缕草试管苗茎段的平均芽数、平均苗高、平均根数及平均根长有显著影响(表2)。0.5 mg/L GA₃对平均根长无明显的作用,而对平均芽数、平均苗高及平均根数有显著的影响。1.0 mg/L GA₃对平均芽数无明显的作用,但对平均芽数、平均苗高及平均根数有显著的影响,并且1.0 mg/L GA₃对平均苗高、平均根数及平均根长的影响与0.5 mg/L GA₃无明显差异。综合GA₃对试管苗的作用,认为增加0.5 mg/L GA₃是兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的最适宜浓度。

表 2 GA₃对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的影响

Table 2 Effect of GA₃ on shooting, rooting and growing of tube plantlets of *Zoysia japonica* cv Lanyin No. 3

GA ₃ 浓度 /mg · L ⁻¹	平均芽 数/个	平均苗 高/cm	平均根 数/个	平均根 长/cm
0	8.75 ^b	0.50 ^b	3.50 ^b	0.94 ^b
0.50	11.50 ^a	0.96 ^a	5.50 ^a	1.66 ^{ab}
1.00	8.50 ^b	1.12 ^a	5.75 ^a	2.74 ^a

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同

2.2 IBA对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的影响

IBA对兰引3号结缕草试管苗茎段平均芽数、平均苗高、平均根数及平均根长有显著影响(表3)。0.1 mg/L IBA对平均芽数、平均苗高、平均根数及平均根

长的影响显著高于不加IBA的水平处理,并且其对平均芽数,平均根数及平均根长的影响显著高于0.2 mg/L IBA的水平处理。0.2 mg/L IBA对平均芽数及平均根长的影响与不加IBA水平处理没有明显差异,说明0.2 mg/L IBA对试管苗的发芽与根的伸长具有一定的抑制作用。综合IBA对试管苗的作用,认为增加0.1 mg/L IBA是兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的最适宜浓度。

表 3 IBA对兰引3号试管苗茎段发芽,生根及生长的影响

Table 3 Effect of IBA on shooting, rooting and growing of tube plantlets of *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3

IBA浓度 /mg · L ⁻¹	平均芽 数/个	平均苗 高/cm	平均根 数/个	平均根 长/cm
0	8.25 ^b	0.62 ^b	2.5 ^c	0.92 ^b
0.1	11.75 ^a	0.94 ^a	7.3 ^a	3.03 ^a
0.2	8.75 ^b	1.02 ^a	5.0 ^b	1.39 ^b

2.3 6-BA对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的影响

6-BA对兰引3号结缕草试管苗茎段的平均根数及平均根长无明显的作用,而对平均芽数有显著的影响(表4)。1.0 mg/L 6-BA对平均芽数的影响显著高于不加6-BA及2.0 mg/L 6-BA的水平处理,但对平均根数及平均根长的影响明显差于不加6-BA的处理水平。2.0 mg/L 6-BA对平均芽数的影响与不加6-BA的水平处理无明显差异,对平均根数及平均根长的影响明显差于不加6-BA的水平处理。综合6-BA对试管苗的作用,认为1.0 mg/L 6-BA有利于兰引3号结缕草试管苗茎段芽的增殖,但不利于试管苗生根及根的伸长,并且高浓度的6-BA对试管苗的生长表现出了一定的抑制作用。

表 4 6-BA对兰引3号试管苗茎段发芽,生根及生长的影响

Table 4 Effect of 6-BA on shooting, rooting and growing of tube plantlets of *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3

6-BA浓度 /mg · L ⁻¹	平均芽 数/个	平均苗 高/cm	平均根 数/个	平均根 长/cm
0	8.50 ^b	0.96 ^a	7.80 ^a	3.57 ^a
1.00	14.00 ^a	0.79 ^a	2.50 ^c	1.26 ^b
2.00	6.30 ^b	0.83 ^a	4.50 ^b	0.51 ^b

综合以上分析得出,在MS培养基上附加GA₃ 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L的激素配比是促进兰引3号结缕草试管苗茎段发芽,生根及生长的最优组合。

2.4 不同激素组合对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽、生根及生长的影响

带芽茎段接种到含有不同浓度的 GA₃, IBA 和 6-BA 的 MS 培养基上, 6~8 d 腋芽部位开始逐渐膨大, 15~20 d 腋芽萌发, 30 d 新生芽伸长至 1~4 cm, 芽的数量也增多至 1~7 个不等, 发芽率达 100%。同时带芽茎段在 3~4 d 长出白嫩的细根, 生根率均达到 100%。

表5 不同激素组合对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽、生根及生长的影响

Table 5 Effect of different plant hormone combinations on shooting, rooting and growing of tube plantlets of *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3

处理号	平均芽数/个	平均苗高/cm	平均根数/个	平均根长/cm
1	9.00 ^{cd}	0.20 ^f	2.25 ^d	0.60 ^c
2	10.50 ^c	0.66 ^{de}	3.75 ^{cd}	1.47 ^{bc}
3	6.75 ^{cde}	0.64 ^e	4.50 ^{cd}	0.75 ^{bc}
4	11.25 ^{bc}	0.66 ^{de}	2.25 ^d	1.75 ^{bc}
5	7.50 ^{cde}	0.84 ^{cde}	6.00 ^{bc}	0.38 ^c
6	15.75 ^{ab}	1.37 ^a	9.00 ^{ab}	2.86 ^b
7	4.50 ^{de}	1.00 ^{bcd}	3.00 ^{cd}	0.41 ^c
8	17.25 ^a	1.30 ^{ab}	12.00 ^a	7.25 ^a
9	3.75 ^e	1.04 ^{abc}	1.50 ^d	0.56 ^c

从表5可以看出,不同植物激素对兰引3号结缕草试管苗茎段发芽、生根及生长有显著的影响。处理8对平均芽数的影响与处理6之间无明显差异,却显著高于其他处理。处理6对平均苗高的影响与处理8、处理9之间无明显差异,却显著高于其他处理。处理8对平均根数的影响显著高于其他处理,达到显著水平。处理8对平均根长的影响显著高于其他处理,达到显著水平。综合各处理对兰引3号结缕草试管苗的作用,认为处理8(GA₃ 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+6-BA 0 mg/L)是兰引3号结缕草试管苗茎段发芽、生根及生长的较优组合。平均芽数为 17.25 个,平均苗高为 1.3 cm,平均根数为 12 个,平均根长为 7.25 个。

2.5 无菌苗移栽

将已生根、生长旺盛的组织培养苗打开瓶塞,往瓶里浇少许水,炼苗 2~3 d,剪至 3 cm 高,栽入腐叶土:园土:沙=4:5:1 比例混合的花盆中,按时浇水,45 d 后统计成活率。结果显示 100% 成活,生长旺盛。

3 结论

以兰引3号结缕草带芽茎段为外植体,通过直接分蘖,无需经过愈伤组织阶段或胚状体阶段,可获得大

量无菌苗,是一种快速有效的试管苗增殖途径,此方法对建立同属其他植物再生体系也有借鉴意义。

植物激素是影响组培快繁的重要因素,试验通过对激素的筛选表明:GA₃ 和 IBA 有利于促进兰引3号结缕草试管苗茎段发芽、生根及生长,最优组合培养基为 MS+GA₃ 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L,较优组合培养基为 MS+GA₃ 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L,培养 30 d 后其平均芽数为 17.25 个,平均苗高为 1.3 cm,平均根数为 12 个,平均根长为 7.25 个。

试验表明,GA₃ 和 IBA 有利于芽的增生,根的分化及试管苗的生长,但 0.2 mg/L IBA 对试管苗的发芽与根的伸长具有一定抑制作用。6-BA 有利于兰引3号结缕草试管苗茎段芽的增殖,但不利于试管苗生根及根的伸长,并且高浓度的 6-BA 对试管苗的生长表现出了一定抑制作用,但试验中 2.0 mg/L 6-BA 的平均根数高于 1.0 mg/L 6-BA 的水平处理,这可能与激素间的相互作用有关,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄复瑞,刘祖祺. 现代草坪建植与管理技术[M]. 北京: 中国农业出版社,1998:56-59.
- [2] 孙本信,尹公,张绵. 草坪植物种植技术[M]. 北京: 中国林业出版社,2001:7-10.
- [3] 赵鸣. 兰引3号结缕草坪用性状的适应性研究[J]. 草原与草坪,2000(3):34-36.
- [4] Al-Khayri J M, Huang F H, Thompson L F, et al. Plant regeneration of zoysia grass from embryo-derived callus [J]. Crop Sci, 1989, 29(5):1324-1325.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [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] 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.
- [9] Hongkue H Y, Do Y. Studies on interspecific hybridization in Korean awn grasses (*Zoysia* spp.) [J]. J Kor Soci Hort Sci, 1985, 26(2):169-178.
- [10] Forbes I J. Chromosome number and hybrids in *Zoysia* [J]. J Agron, 1952, 44:147-151.
- [11] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000:382.

- [10] 赵聚宝,徐祝龄,钟兆站,等. 中国北方旱地农田水分平衡[M]. 北京:中国农业出版社,1999:82-83.
- [11] 高涵,吴伟,刘秀萍,等. 水分胁迫下几种冷季型草坪草抗旱机理研究[J]. 水土保持研究,2006,13(3):126-128.
- [12] 任云宇,何军,刘艺杉. 水分处理对草坪草地下植物量的影响[J]. 草业科学,2005(8):79-83.
- [13] 何军,胡自治,刘自学,等. 灌溉与草坪草地下植物量关系的研究[J]. 草原与草坪,2005(1):46-49.
- [14] 邱亦维,韩烈保. 灌溉对草坪草生长发育的影响[J]. 草原与草坪,2002(2):19-21.

Effect of irrigation on morphological characteristics of *Bromus inermis* in semiarid agro-pastoral transitional zone of North China

WANG Hu¹, LI Xiang-lin¹, WAN Li-qiang², WANG Guo-liang², HE Feng²

(*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China*)

Abstract: The effect of irrigation on morphological characteristics of *Bromus inermis* in semiarid agro-pastoral transitional zone of North China was studied. The results showed that the effect of irrigation on the plant height, leaf area, stem numbers, aboveground biomass and underground biomass was different. In the growth season, plant height of W1 was lowest and W3 was highest, that of W4 was higher than W2. The dynamics of leaf area was similar with the plant height, at the end of the growth season the order of leaf area was $W4 > W3 > W2 > W1$. The order of stem numbers at the end of the growth season was $W1 > W2 > W3 > W4$, and the order of aboveground biomass was $W2 > W4 > W3 > W1$. The order of underground biomass was similar with the stem numbers, and that was $W2 > W1 > W3 > W4$.

Key words: irrigation; semiarid agro-pastoral transitional zone of North China; *Bromus inermis*; morphological characteristics

(上接 31 页)

Study on tissue culture of *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3

SONG Jun-fang¹, JIN Fang², SUN Ji-xiong¹, GUO Qi-mei¹, YU Yong-ming³

(1. *College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;*

2. *Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;*

3. *Xiaolunshan Forest Experiment Bureau, Tianshui 741020, China*)

Abstract: The effect of plant hormones (GA_3 , IBA and 6-BA) on shooting, rooting and growing of *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3 were studied using the stem as the explant with the orthogonal experiment design. The result showed that the most effective medium for shooting, rooting and growing of tube plantlets of *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3 was $MS + GA_3 1.0 \text{ mg/L} + IBA 0.1 \text{ mg/L}$ and followed by $MS + GA_3 0.5 \text{ mg/L} + IBA 0.1 \text{ mg/L}$.

Key words: *Zoysia japonica* cv. Lanyin No. 3; tissue culture; plant hormone; stem