

文章编号: 1673-5021(2006)04-0065-03

## 早熟禾品种耐寒变异植株无性系的建立

姜长阳<sup>1</sup>, 李建国<sup>2</sup>, 霍 旺<sup>1</sup>, 邹翠霞<sup>1</sup>, 高 英<sup>1</sup>

(1. 辽宁师范大学生命科学学院 辽宁 大连 116029; 2. 大连高新技术产业园区城市建设管理局, 辽宁 大连 116022)

**摘要:**对草地早熟禾的小矮人品种耐寒变异植株无性系的建立进行了研究,并成功地诱导出小矮人嫩叶的愈伤组织,分化出丛生不定芽。诱导愈伤组织的理想培养基是 MS+BA 0.1mg/L+2,4-D 1mg/L;由愈伤组织分化出苗的理想培养基是 1/2 MS+BA 0.1mg/L +2,4-D 0.1mg/L;试管苗极易移栽成活,耐寒变异性状保持不变。

**关键词:**草坪植物;小矮人;愈伤组织;组织培养;无性系

**中图分类号:**Q943.1;S688.4 **文献标识码:**A

小矮人(*Poa pratensis*)属禾本科早熟禾属多年生草本植物——草地早熟禾中的一个品种<sup>[1,2]</sup>,因具有抗寒、抗盐碱、覆盖性和保绿性好等特点,已被广泛应用于城市草坪绿化、果园草坪以及运动场的种植等。虽然小矮人是一种比较理想的草坪植物,但在栽培中也存在不少问题,比如不耐高温、需水量大、冬季枯萎时间较长等。1998年冬季,我们发现了1株明显延长保绿时间的变异植株,于是我们利用组织培养技术,对这种具有有利变异性的植株进行了无性系建立的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及灭菌

将从田间采集的小矮人变异植株的嫩叶放入250ml磨口广口瓶中,自来水冲洗20min左右,再用0.05%安利溶液洗涤10min,将广口瓶移至超净工作台上,注入70%乙醇振荡灭菌约10s后倒出,用无菌水漂洗2次后,向广口瓶内注入约40ml 0.1%HgCl<sub>2</sub>溶液,灭菌1min,再注入等体积无菌水,振荡灭菌8min后,将灭菌液倒出,用无菌水振荡洗涤4次,即可获得无菌材料。

### 1.2 培养条件

基本培养基为MS和1/2MS,附加不同浓度6-BA、NAA或2,4-D三种激素,MS上蔗糖加30g/L,1/2MS加蔗糖15g/L,培养基的胍力强度180g/cm<sup>2</sup>[3]。培养温度保持20~24℃,光照2000~4000lux,10~12h/d。培养基的pH5.8~6.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

将灭菌后的嫩叶切成0.2~0.4cm的块状,接

种到附加不同浓度BA、NAA、2,4-D的MS培养基上,60d观察统计。由表1可见,在BA达到或超过0.4mg/L时基本不能诱导出愈伤组织;在BA 0.1mg/L、NAA和2,4-D的浓度为1~2mg/L时,可以诱导形成愈伤组织,并且愈伤组织的诱导率与NAA和2,4-D的浓度有正相关的趋势。进一步培养观察表明,虽然在BA 0.1mg/L+NAA 1~2mg/L或2,4-D 1~2mg/L的激素浓度范围内,都可以诱导形成愈伤组织,但从愈伤组织的外观上看,以MS+BA 0.1mg/L+NAA 1mg/L为宜。在该培养基上诱导的愈伤组织,呈绿色的颗粒状,继代培养6代,愈伤组织的生长速度及长势均保持不变。这说明MS+BA 0.1mg/L+NAA 1mg/L是诱导小矮人嫩叶愈伤组织的理想培养基。

### 2.2 愈伤组织的分化和继代培养

将上述诱导的浅黄色颗粒状愈伤组织接到以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的BA、NAA和2,4-D的不同分化培养基中进行分化培养。伴随着颗粒状愈伤组织的缓慢生长,25d左右在愈伤组织的上部出现绿色的芽点,50d可分化出大量的绿色的丛生不定芽。由表2可见,愈伤组织在1/2MS+BA 0.1mg/L+NAA 0.1mg/L培养基上的分化率为100%,即该培养基是诱导小矮人变异植株叶片愈伤组织分化的理想培养基。

收稿日期:2006-01-27;修回日期:2006-05-11

基金项目:辽宁师范大学教学改革项目(20050101123)

作者简介:姜长阳(1954-),男,辽宁大连人,副教授,1978年毕业于辽宁师范大学生物教育专业,从事现代生物技术研究,发表论文34篇,出版专著5部。

表1 不同激素对早熟禾愈伤组织诱导的影响

Table 1 Callus induction of *Poa pratensis* with various concentrations hormone

激素 Hormones (mg/L)			接种外植体数 Number of explants	诱导愈伤 组织数 Number of producing callus	诱导率(%) Rate of induction
6-BA	NAA	2,4-D			
0.1	1.0	0	20	8	40
0.1	1.5	0	20	9	45
0.1	2.0	0	20	10	70
0.1	0	1.0	20	12	60
0.1	0	1.5	20	13	65
0.1	0	2.0	20	15	75
0.4	1.0	0	20	0	0
0.4	1.5	0	20	0	0
0.4	2.0	0	20	0	0
0.4	0	1.0	20	0	0
0.4	0	1.5	20	0	0
0.4	0	2.0	20	1	5
0.8	1.0	0	20	0	0
0.8	1.5	0	20	0	0
0.8	2.0	0	20	0	0
0.8	0	1.0	20	0	0
0.8	0	1.5	20	0	0
0.8	0	2.0	20	0	0

表2 不同激素对愈伤组织芽分化的影响

Table 2 Effect of different concentrations of hormones on shoot differentiation from callus

激素 Hormones (mg/L)			接种愈伤 组织颗粒数 Number of callus	分化芽数 Number of producing shoots	分化率 (%) Frequency
6-BA	NAA	2,4-D			
0	0.1	0	40	3	7.5
0	0	0.1	40	16	40.0
0.1	0.1	0	40	40	100.0
0.1	0	0.1	40	0	0
0	0.2	0	40	0	0
0	0	0.2	40	0	0
0.2	0.1	0	40	30	75.0
0.2	0	0.1	40	5	12.5
0.8	0	0	40	0	0
0.8	1	0	40	0	0
0.8	2	0	40	0	0
1.0	0	0	40	0	0
1.0	1	0	40	0	0
1.0	2	0	40	0	0

将在上述培养基上诱导分化的丛生不定芽分成小块接种到 1/2 MS+NAA 0.1mg/L 培养基上,进行壮苗培养,接种 20d 可以长成健壮的丛生不定芽。

### 2.3 试管苗生根

将分化培养的健壮丛生不定芽从基部剪下,使之成为独立的无根不定苗,接种到 1/2 MS+IAA

0.2mg/L 培养基上进行生根培养。接种 7~10d 可见形成根原基,20d 左右可以生长为具有 4~6 条长 0.5~1 cm 根、生长旺盛的生根试管苗。

### 2.4 移栽

打开上述具有生根试管苗培养瓶瓶塞,于光照度约 5000lux、温度为 20℃左右的条件下炼苗 3~4d 后,将试管苗从培养基中取出,洗去基部的培养基移栽到上面铺着一层约 5cm 厚的干净河沙,下面为肥沃园土的温室苗床或花盆中。移栽成活率接近 100%,极易移栽成活。

### 2.5 田间观察

将在温室中移栽成活的试管苗小批量地移植到草坪上。通过连续 3 年的观察证明,小矮人变异植株嫩叶愈伤组织试管苗长势与实生苗基本一致。但试管苗除了具有冬季枯萎晚 10 d 左右、春天返青早约 7 d 的性状外,还具有长势整齐、生长期叶色浓绿等有利性状。观察还表明,由愈伤组织分化形成的试管苗根系相当于实生苗的 2 倍左右。

2001~2003 年的 12 月上旬(即将枯萎的时候),对试管苗和实生苗绿色茎叶进行可溶性糖分析表明:试管苗可溶性糖含量是实生苗的 2.04 倍。试管苗可溶性糖含量的提高,有利于耐寒和保绿。2003 年秋季,以露地栽培的变异植株试管苗的嫩叶为材料,进行了愈伤组织的诱导、试管苗培养和移栽试验。虽然 2004 年 8 月才将试管苗移栽到露地上,但当年这样的试管苗仍然具有冬季枯萎时间晚、春季返青时间早、长势整齐、保绿时间长的特点。

## 3 讨论

早熟禾及草坪植物组织培养已多有报道<sup>[4~9]</sup>,但迄今为止,未见城市绿化主要草坪植物优良变异植株叶片愈伤组织的诱导及无性系建立的报道,也未见草地早熟禾的品种——小矮人的组织培养及无性系建立的报道。本研究不仅获得了具有 100% 分化率的叶片愈伤组织,而且由愈伤组织所建立的无性系植株优良性状保持不变。由此证明:通过叶片愈伤组织的诱导途径能为草坪植物优良变异植株繁殖和推广提供一条可行的途径。这条途径不仅大大提高了繁殖速度,而且具有成本低、易于批量生产和管理、培养出的试管苗在种植中所具有的主要的经济性状保持不变等特点。同时,由于该研究是利用非分生组织——叶片为材料进行愈伤组织诱导的,由此也证明,草坪植物——小矮人的非分生组织细

胞也具有全能性。

所获得的小矮人试管苗冬季枯萎晚、春季返青早,长势整齐、高温季节叶色浓绿,有利于观赏和保绿。就繁殖速度而言,由于愈伤组织具有100%的分化率,加之生根试管苗极易移栽成活,所以,这种方法的繁殖速度可以满足生产上的需要。

正是由于该研究所获得的愈伤组织具有100%的分化率,因此,这种方法所获得的愈伤组织也可作为利用农杆菌转基因研究的材料。

#### 参考文献(References):

- [1] 师尚礼. 草坪草种子生产技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2004. 29—32.  
Shi Shangli. Turfgrass seed production technology[M]. Beijing:Chemical Industry Press, 2004. 29—32.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物科属检索表[M]. 北京:科学出版社, 1979. 469.  
Institute of Botany, the Chinese Academy of Science. Query tables for the families and Genera of advanced plant in China[M]. Beijing: Science Press, 1979. 469.
- [3] 姜长阳, 宁淑香, 于淼, 王宇, 宋立秀. 蕨菜愈伤组织高效再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 343—345.  
Jiang Changyang, Ning Shuxiang, Yu Miao, Wang Yu, Song Lixiu. A high efficient regeneration system from callus of *Pteridium apuilingense*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(3): 343—345.
- [4] 朱根发, 余毓君. 草地早熟禾的组织培养条件和分化能力的研

- 究[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(2): 199—203.  
Zhu Genfa, Yu Yujun. Researches on conditions of tissue culture and differentiating capability of kentucky bluegrass *Poa pratensis* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1994, 13(2): 199—203.
- [5] 邵宏波. 禾本科植物的组织培养研究及其应用[J]. 广西植物, 1992, 12(1): 41—58.  
Shao Hongbo. Researches and applications on tissue culture of family gramineae[J]. *Guihai*, 1992, 12(1): 41—58.
- [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.  
Li Ruifen, Zhang Jingyuan, Zhao Maolin. Embryogenic callus induction and plant regeneration of *Zoysia japonica* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(3): 355—357.
- [7] 柴明良, 钮友民, 郭达初. 结缕草试管增殖与筛选[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(3): 205.  
Cai Mingliang, Niu Youmin, Guo Dachu, Hu Shuliang, Dong Lingshan. In vitro clonal multiplication and screening of *Zoysia japonica* [J]. *Plant Physiol Commun*, 1995, 31(3): 205.
- [8] 姜长阳, 刘丹梅, 宁淑香, 白亚秋. 利比亚皇后草茎段无性系的建立[J]. 中国草地, 2003, 25(2): 25—29.  
Jiang Changyang, Liu Danmei, Ning Shuxiang, Bai Yaqui. Establishment of the asexual system of *Phyla nodiflora* [J]. *Grassland of China*. 2003, 25(2): 25—29.
- [9] 信金娜, 韩烈保, 刘君, 罗莉, 李雪. 草地早熟禾愈伤组织诱导及植株再生[J]. 中国草地, 2004, 26(4): 46—50.  
Xin Jinna, Han Liebao, Liu Jun, Luo Li, Li Xue. Studies callus induction and plant regeneration system of *Poa pratensis* [J]. *Grassland of China*, 2004, 26(4): 46—50.

## The Clone Establishment of Cold Resistant Variation Plant of *Poa pratensis* Cultivars

JIANG Chang-yang<sup>1</sup>, LI Jian-guo<sup>2</sup>, HUO Wang<sup>1</sup>, ZOU Cui-xia<sup>1</sup>, GAO Ying<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;

2. Dalian High-tech Industrial Zone City Construction Management Bureau, Dalian 116022, China)

**Abstract:** The clone of cold resistant lawn plant—*Poa pratensis* was successfully established by inducing the callus and developing uncertain buds from its leaf. The best medium for callus induction was MS+BA 0.1mg/L+2,4-D 1 mg/L; medium consisting of 1/2 MS+BA 0.1 mg/L +2,4-D 0.1 mg/L was the best differentiation one for buds. Plantlets in tube were of the cold resistant character and with best rooting effect.

**Key words:** Lawn plant; *Poa pratensis*; Callus; Culture of tissue; Clone

【责任编辑 胡卉芳】