

松南结缕草成熟胚愈伤组织的诱导和再生

王渭霞¹, 胡张华², 陈锦清², 玄松南^{1*}

(1. 中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省农业科学院, 浙江 杭州 310021)

摘要:松南结缕草成熟种子经灭菌和打破休眠后, 接种于含有不同浓度 2,4-D 的 MS 和 N6 培养基上进行愈伤组织诱导。结果表明, 结缕草种子的休眠主要在于破除种壳。2,4-D 浓度在 2~5 mg/L 对愈伤组织诱导率无明显影响。基本培养基 MS 和 N6 诱导效果相近, 初生愈伤组织为白色、半透明, 质地松软、水浸状。继代培养基中添加一定浓度的甘露醇、麦芽糖和 ABA 以及延长继代时间有助于愈伤组织的胚性化。基本培养基 MS 更适于结缕草初生愈伤组织致密胚性化。胚性愈伤组织在 MS 添加 0.1 mg/L 2,4-D 培养基上即可分化出大量具有根和茎叶的再生植株。

关键词:松南结缕草; 组织培养; 再生; 成熟胚

中图分类号:S543; Q945.39 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2006)03-0132-06

松南结缕草(*Zoysia japonica* cv. Songnan)属于暖季型多年生结缕草属植物。其形态特征介于日本结缕草(*Z. japonica*)与沟叶结缕草(马尼拉草)(*Z. matrella*)之间, 在园艺学上可归类为中型结缕草^[1]。松南结缕草对环境的适应性强, 抗旱和抗热性较好, 抗虫害能力强, 且具有良好的弹性, 是建植足球场、高尔夫球场等运动场的优良草坪植物。随着结缕草的广泛应用, 迫切需要培育新型的满足不同需求的特色草种, 如优质抗逆的、绿色期延长、五彩的、耐践踏的以及环保型草坪草新种^[2]。遗传转化技术的发展使不同物种的基因交流和基因定向转移成为现实, 为实现作物品种的改良开辟了广阔的天地。而建立高效的组织培养再生体系是成功应用此技术的先决条件。近年来, 国内外已有研究从结缕草幼穗、幼胚、茎尖和成熟胚中诱导出胚性愈伤组织并分化成植株的报道^[1,3~8], 并利用基因枪、PEG 介导以及农杆菌介导的转化法实现了结缕草胚性愈伤组织的遗传转化^[10~13], 但由于其胚性愈伤诱导率偏低导致再生困难, 使得转化效率非常低, 这极大地限制了结缕草的遗传改良。本研究通过对比不同诱导培养基以及继代培养基的改进, 使胚性愈伤组织的诱导率显著增高, 并建立了高效的再生体系, 为实现高效的结缕草遗传转化奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

松南结缕草种子由本实验室 2003 年收集提供。

1.2 方法

1.2.1 成熟种子的发芽实验 分别用不同浓度的 NaOH 溶液浸泡结缕草种子 5, 10, 20 和 30 min 后, 清洗 5 次, 在 27℃ 光照培养箱内进行发芽实验, 每天光照 8 h。对照不经任何处理。每个处理接种 200 粒种子。

1.2.2 成熟胚愈伤组织的诱导 种子先经 30% NaOH 溶液处理 20 min 以打破休眠。用 70% 酒精浸泡 1.5 min、0.1% 升汞灭菌 10 min、无菌水清洗 5 次, 经横切或不切后接种到不同的诱导培养基上。或无菌水浸泡过夜, 次日剥去颖壳, 接种到诱导培养基上, 28℃ 暗培养。诱导培养基为基本培养基 MS 或 N6 附加 2,4-D 2~8 mg/L, 6-BA 0.1 mg/L, 脯氨酸 500 mg/L, 谷氨酰胺 300 mg/L, 水解酪蛋白 500 mg/L。

1.2.3 愈伤组织的继代 50~70 d 后将初生的愈伤组织从母体上切下, 转继到不同的继代培养基上(表 1)。以后每隔 50 d 左右继代 1 次。所有培养基附加脯氨酸 500 mg/L, 谷氨酰胺 300 mg/L, 水解酪蛋白 500 mg/L, 2,4-D 2 mg/L, 6-BA 0.1 mg/L, 28℃ 暗培养。

1.2.4 胚性愈伤组织的植株再生 选择淡黄色、坚硬的胚性愈伤组织转继到不同的分化培养基上。其中 1 步分

收稿日期: 2004-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270942)资助。

作者简介: 王渭霞(1974-), 女, 甘肃渭源人, 助理研究员, 硕士。E-mail: weixwang74@sohu.com

* 通讯作者。

表 1 不同的愈伤组织继代培养基

Table 1 Medium for callus subculture

继代培养基 Medium	蔗糖浓度 Concentration of sucrose (g/L)	麦芽糖浓度 Concentration of maltose (g/L)	甘露醇浓度 Concentration of mannitol (g/L)	ABA 浓度 Concentration of ABA (mg/L)
N6D1	30			
N6D2	30	10		
N6D3	30		10	
N6D4	30	5	5	2
MSD1	30			
MSD2	30	10		
MSD3	30	10		
MSD4	30	5	5	2

化直接将胚性愈伤组织接种到分化培养基上,2 步分化将胚性愈伤组织在预分化培养基上黑暗培养 10 d 后,转继到分化培养基 4 上。

分化培养基 1:MS+2,4-D 0.1 mg/L,蔗糖 30 g/L;分化培养基 2:MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,蔗糖 30 g/L;分化培养基 3:MS+IBA 0.1 mg/L+KT 0.5 mg/L,蔗糖 30 g/L;分化培养基 4:N6+KT 1 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L,蔗糖 30 g/L;预分化培养基:N6+KT 1 mg/L+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L,蔗糖 45 g/L;生根培养基:1/2 MS,蔗糖 15 g/L。培养条件为 10 h 光照、25℃与黑暗、21℃交替,光照强度 3 000~4 000 lx。

2 结果

2.1 不同处理对种子发芽率的影响

5%~20%的 NaOH 溶液和 10~30 min 处理时间的范围内,结缕草种子的发芽率随着处理浓度和时间的增加而有所提高。30%与 20% NaOH 处理效果在提高结缕草发芽率上无明显差异(表 2)。

表 2 松南结缕草种子不同浓度 NaOH 处理和 3 个处理时间与第 10 和 25 天发芽率的关系

Table 2 Germination rate of *Z. japonica* seed in 10th and 25th day using different NaOH concentration and 3 treating periods

NaOH 浓度 NaOH concentration (%)	处理时间 Treating periods (min)	第 10 天发芽率 Germination rate in 10th day (%)	第 25 天发芽率 Germination rate in 25th day (%)
5	10	4.0	18.8
	20	4.3	17.6
	30	15.0	23.3
10	10	13.8	35.0
	20	22.2	38.8
	30	35.0	40.5
20	10	23.4	55.8
	20	25.3	62.7
	30	23.0	78.6
30	10	12.0	64.2
	20	25.0	70.1
	30	20.0	78.8
对照 CK	0	5.0	8.7

2.2 成熟种子愈伤组织诱导

成熟种子经灭菌后直接接种到诱导培养基上,在黑暗条件下 1 个月未见种子的萌动和出芽。种子经去壳或横切后将带胚的一半接种到诱导培养基上(含 2,4-D 2~5 mg/L)12 d 开始萌动,15~20 d 形成可见的愈伤组织,30~35 d 为愈伤形成的高峰期,50 d 左右愈伤组织长至 3 mm 左右,即可继代。愈伤组织的诱导率达 95% 左右。

2.3 不同诱导培养基的诱导效果

基本培养基 N6 或 MS 附加 2,5 mg/L 2,4-D 时,在黑暗条件下 12 d 开始萌动,15~20 d 形成可见愈伤组织,30~35 d 时达到高峰,成熟胚愈伤组织的诱导率为 90% 左右。而当 2,4-D 浓度达到 8 mg/L 时,出愈时间推迟到 45 d 左右,诱导率在 66.75% 左右(表 3)。2 种不同基本培养基 N6 和 MS 对愈伤组织的诱导率相近,诱导出的愈伤组织状态也相近,大部分表面为白色、质地松软、水浸状(图 1A)。

表 3 不同浓度的 2,4-D 对松南结缕草成熟胚愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different concentration of 2,4-D on callus induction of *Z. japonica* cv. songnan mature embryos

2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D (mg/L)	萌动时间 Time begin to germinate (d)	出愈时间 Time begin to form callus (d)	发芽种子数 No. of germinated seed	愈伤数 No. of callus induced	出愈率 Frequency of callus induction (%)
2	12	15~20	386	372	96.50
5	12	20~25	389	362	93.25
8	20	45~50	365	244	66.75

注:表 3 只列出以 MS 为基本培养基的实验数据,以 N6 为基本培养基的实验数据与之无显著差异,未列出。各处理接种结缕草成熟种子 400 粒,愈伤组织数统计包括已有器官形成的组织。

Note: Basal medium is MS. No data significant difference was obtained in N6 medium compared with MS (Data not shown). 400 *Z. japonica* mature seeds were inoculated in each treatment, organ-like structure was included in callus statistic.

2.4 不同继代培养基对愈伤状态的影响

当愈伤组织长至 3~5 mm 时,切除种子部分,转移到 8 种不同的继代培养基上。基本培养基 MS 较 N6 更适合于结缕草胚性愈伤组织的诱导和维持。在培养基中添加一定浓度的麦芽糖和甘露醇以及 ABA 有助于改善愈伤组织状态,促进愈伤组织的胚性化,使胚性愈伤组织的诱导率提高到 40% 左右(表 4)。结缕草胚性愈伤表现为淡黄色颗粒,质地坚硬(图 1B)。

表 4 不同继代培养基对胚性愈伤组织发生的影响

Table 4 Effect of different subculture medium on embryogenic callus induction

继代培养基名称 Subculture medium	初生愈伤组织数 No. of primary callus	胚性愈伤组织数 No. of embryogenic callus	胚性愈伤组织诱导率 Induction frequency of embryogenic callus (%)
N6D1	300	6	2.0
N6D2	300	45	15.0
N6D3	300	53	17.6
N6D4	300	82	27.3
MSD1	300	9	3.0
MSD2	300	65	21.6
MSD3	300	63	21.0
MSD4	300	127	42.3

2.5 愈伤组织的分化和再生

胚性愈伤组织在分化培养基 1 和 2 上,7 d 后出现绿点(图 1C),1 个月后丛生芽长至 1 cm,分化茎叶的频率为 45.2%~56.1%,分化出苗较矮,叶片宽,叶色绿,分蘖多。其中分化培养基 2 上的分化苗有根(图 1D),当苗长到 5 cm 左右即可直接移栽。分化培养基 3 上分化出茎叶的频率为 23.3%,大部分分化苗无根。胚性愈伤组织经预分化培养后接种到分化培养基 4 上,12 d 后可见绿点出现,1 个月后芽长至 1 cm,未见有根生长,再生苗偏高呈直立生长,分蘖相对少,叶色淡。转至生根培养基 10 d 后有根长出(图 1E)。选择白色、棉花样的在 MSD1 继代培养基上继代的非胚性愈伤组织,将其转接在分化培养基 1 上,10 d 后部分愈伤组织出现绿点,1 个月在绿点组织表面可见白色毛状组织但不见绿苗(图 1F),部分愈伤组织未出现绿点并逐步褐化死亡。表明非胚性愈伤组织没有分化能力,但部分可以出现绿点的非胚性愈伤组织可以经过继代转化为胚性愈伤组织。

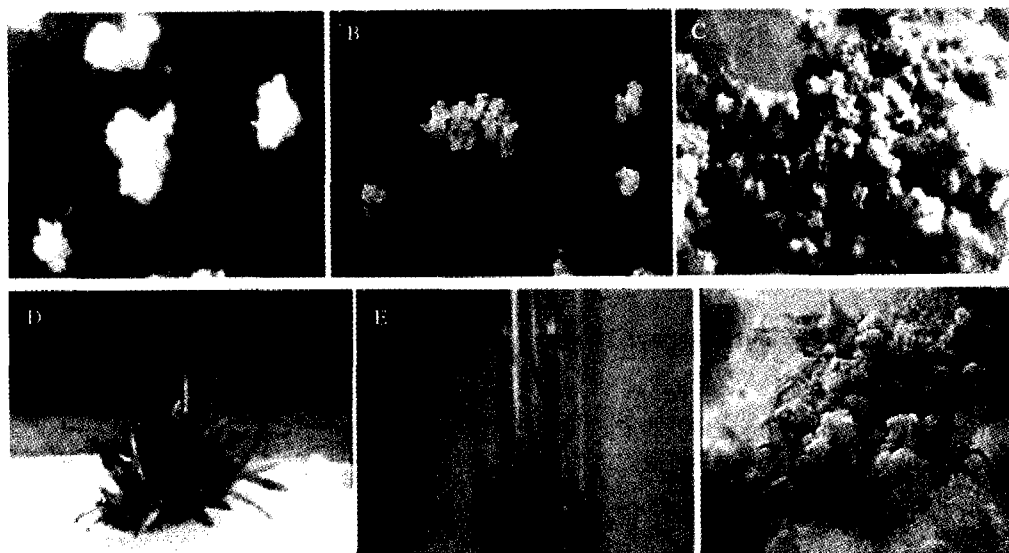


图 1 松南结缕草成熟胚愈伤组织诱导和再生过程

Fig. 1 Plant regeneration steps of songnan *Z. japonica* mature embryo

A: 松南结缕草种子诱导出的非胚性愈伤 Non-embryogenic callus from seeds of songnan *Z. japonica*; B: 松南结缕草的胚性愈伤 Embryogenic callus of songnan *Z. japonica*; C: 胚性愈伤在分化培养基 1 上 Shoots regenerated in regeneration medium 1 in rooting medium; D: 非胚性愈伤在分化培养基 1 上 Non-embryogenic callus in regeneration medium 1; E: 分化培养基 1 上分化的簇生苗 Shoots regenerated in regeneration medium 1; F: 分化培养基 4 上分化苗的生根培养 Embryogenic callus in regeneration medium 4

3 讨论

松南结缕草和其他结缕草种子一样因为坚硬的颖壳而不能顺利出芽,通过高浓度的 NaOH 处理可以破除其休眠,提高发芽率,但经处理的种子在愈伤组织诱导培养基上不能发芽和诱导出愈伤组织。而经去壳的种子或种子横切后接种即可发芽并能高频率的诱导愈伤组织。推测诱导愈伤组织的培养条件如黑暗、密闭等对种子的发芽具有抑制作用。结缕草初生愈伤组织大部分表现为松软无定型,呈水浸状,这种愈伤一般难以分化再生成植株。胡张华等^[14]在以百慕大(*Cynodon dactylon*)成熟胚为外植体进行组织培养和再生体系的研究中也发现同样的现象。延长初次以及后期继代时间可以促进愈伤组织的胚性化,此时培养基几乎耗尽,在水分和养分亏缺的条件下,也易于区分和切割这一部分愈伤组织。这可能是水分亏缺造成的脱水条件诱导了 ABA 的形成从而有利于胚性愈伤的发生。未经继代改造的非胚性愈伤组织直接转接到分化培养基上,其中部分表现为褐化死亡,部分会出现绿点但无绿苗,表明这一部分愈伤组织具有一定的分化能力,如果对其愈伤组织进行继代改造,可以转化为胚性愈伤组织,从而提高其再生分化频率。这也同时验证了初生愈伤组织经继代改造后胚性愈伤组织诱导率提高的现象。继代培养基中添加一定浓度的甘露醇和麦芽糖以及 ABA 可以抑制非胚性愈伤组织的生长,有助于愈伤组织的胚性化。培养基中添加甘露醇、麦芽糖和蔗糖等碳源,不仅为外植体生长提供所需的能量来源,

并具有调节渗透压潜势的效果。已有研究表明高渗条件对禾本科植物胚性愈伤组织的发生具有促进作用^[15],这与胚发育过程中 ABA 含量逐渐增加以及早期胚发育需要高渗条件相似^[16]。同时 2 种以上的糖类混合使用对结缕草胚性愈伤组织的诱导和维持是有利的。松南结缕草在以 MS 为基本培养基的继代培养基上继代的愈伤组织水分少,易于颗粒化,胚性愈伤组织诱导率高。这一结果与同期张俊卫等^[17]以日本结缕草为外植体的研究结果一致。与高羊茅(*Festuca elata*)等其他草种相比,结缕草胚性愈伤组织易于分化,在基本培养基 MS 上附加 0.1 mg/L 2,4-D 即可获得大量再生绿苗。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 胡繁荣. 草坪草遗传转化进展与研究热点[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 867-875.
- [3] Al Khayri J, Huang F H, Thompson L F, *et al.* Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus[J]. Crop Science, 1989, 29: 1324-1325.
- [4] Hu S L, Chai M L. In vitro clonal propagation of three *Zoysia* species[J]. International Turfgrass Society, 1993, 7: 812-815.
- [5] Inokuma C, Sugiura K, Cho C, *et al.* Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 737-741.
- [6] Kim J B, Park S J, Kim D H. Callus induction and plant regeneration from stolon in *Zoysia* grass[J]. Korean Turfgrass Science, 1997, 11: 311-320.
- [7] Chai M L, Lee J M, Kim D H. High efficiency of plant regeneration from seed-derived callus of *Zoysia* grass cv. Zenith[J]. Korean Turfgrass Science, 1998, 12(4): 195-202.
- [8] Noh H Y, Park G H, Choi J S, *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zoysia* grasses(*Zoysia* spp.)[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant, 1992, 28: 3.
- [9] Yoo Y K, Kim K S. Effects of plant growth regulators on callus formation and organogenesis from the shoot tip cultures of five turfgrass species[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1991, 32(2): 237-246.
- [10] Inokuma C, Sugiura K, Imaizumi N, *et al.* Transgenic Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud) plants regenerated from protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 334-338.
- [11] Ahn B J, Lee E A. Particle bombardment-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*) [A]. Annual Meeting of Korean Society of Plant Tissue Culture and Joint Workshop for Plant Biotechnology Between Korean and Israel [C]. Korean: Seoul National University Press, 1998, 35.
- [12] Chai M L, Kim D H. Agrobacterium-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*) [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 2000, 41(5): 455-458.
- [13] Toyama K, Bae C H, Kang J G, *et al.* Production of herbicide-tolerant *Zoysia* grass by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Molecules and Cells, 2003, 16(1): 19-27.
- [14] 胡张华, 陈火庆, 吴关庭, 等. 百慕大成熟胚的组织培养及植株再生[J]. 草业学报, 2003, 12(1): 85-89.
- [15] 颜秋生, 张雪琴, 滕胜, 等. 水稻原生质体培养系统的建立[A]. 农业科学集刊(第二集), 农作物原生质体培养专辑[C]. 北京: 农业出版社, 1995, 20-26.
- [16] 贾士荣, 罗美中, 林云. 黄瓜胚性细胞悬浮细胞培养及其原生质体的植株再生[J]. 植物学报, 1988, 30: 463-467.
- [17] 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.

Embryogenic callus induction and plant regeneration from mature seed of *Zoysia japonica* cv. SongnanWANG Wei-xia¹, HU Zhang-hua², CHEN Jin-qing², XUAN Song-nan¹

(1. China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 2. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Callus induction was induced by inoculating sterilized, mature *Zoysia japonica* cv. Songnan seeds with broken dormancy on solidified MS and N6 media containing different concentrations of 2,4-D. The results showed that the main reason for dormancy of *Z. japonica* seed was the hull. There were no significant effects of concentrations of 2,4-D between 2—5 mg/L or of basal medium MS and N6 on callus induction frequency and appearance. The appearance of primary callus was white, translucent, and sticky and was accompanied by a high water content. Subculturing onto a medium supplemented with mannitol, maltose, or ABA and with prolonged subculture time promoted embryogenic callus induction. For embryogenic callus induction and maintenance, basal medium MS was better than N6. Shoots were regenerated from embryogenic callus in MS medium containing 0.1 mg/L 2,4-D.

Key words: *Zoysia japonica* cv. Songnan; tissue culture; regeneration; mature embryo