

马尼拉草茎尖组织培养优化组合筛选

王玉珍¹, 刘永信², 魏春兰¹

(1. 东营职业学院农业工程系, 山东 东营 257091; 2. 东营市第一中学, 山东 东营 257091)

摘 要:以马尼拉草茎尖作为外植体, 在 MS 基本培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 NAA, 通过调节两者浓度配比, 筛选出了对马尼拉草进行离体培养优化组合培养基, 分别是诱导培养基: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 生芽培养基: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 生根培养基: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 5.0 mg/L。

关键词:马尼拉草; 外植体; 茎尖; 诱导组织; 分化培养基; 优化培养基

中图分类号:S688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-4942(2006)01-0013-03

马尼拉草 [*Zoysia matrella* (L.) Merr.] 为禾本科结缕草属, 又称沟叶结缕草, 日本称“小芝 I 型结缕草”或“半细叶结缕草”, 因欧美国国家称之为 Manilagrass, 所以定名为马尼拉草。

马尼拉草是建草坪的优质草, 在结缕草属中属于半细叶类型, 叶的宽度在 2 mm 左右, 介于结缕草与细叶结缕草之间。与我国栽培的细叶结缕草比较, 它略能耐寒, 抗旱能力强, 且耐瘠薄。草层茂密, 略耐践踏, 根状茎基部直立, 具有一定的韧度与弹性。草色翠绿, 病虫害少, 分蘖能力强, 覆盖度好, 观赏价值高, 在深厚肥沃、排水良好的土壤中栽培, 生长迅速, 成坪较快, 草层密集而无丛状馒头形突起, 且具有较强的蔓延侵占与竞争能力, 所以受杂草危害相对减少, 修剪少, 养护费用低, 容易养护管理; 但是马尼拉草花果枝及果穗稀少, 种子成熟后又易于脱落, 很难采收到可供繁殖用的适量种子, 很少用种子繁殖。目前更多的是分株栽植或铺草皮的方法建坪, 但是种草少, 成本高。2003 年我们从美国加州引进优良马尼拉草一盆, 在本地驯化种植, 发现其生长势、耐寒性比较强, 微耐盐碱。为了扩大种植面积, 我们利用组织培养技术对马尼拉草进行离体培养, 通过对培养基添加不同激素处理, 获得了优化组合培养基。

1 材料与方 法

1.1 材 料

用从美国加州引进的马尼拉草盆栽营养体, 取其幼嫩茎尖作为外植体。

1.2 方 法

以马尼拉草茎尖作为外植体, MS 培养基+琼脂 6.5 g/L+蔗糖 30 g/L 作为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA (0~5 mg/L) 和 NAA (0~1 mg/L), 通过调节两者浓度配比, 筛选合适的诱导、增殖、分化、生根培养基。

将带有 5~6 片叶的茎尖剪下, 自来水冲洗干净, 转至超净工作台, 用 75% 酒精漂洗 6 s, 无菌水冲洗 3 遍, 放在 0.1% 氯化汞溶液中消毒 5、8、10、15 min 取出, 用无菌水冲洗 4~6 次, 然后, 用消毒剪剪成若干段, 每段带有 1~2 片叶子, 放于诱导培养基上进行培养, 置于光照 1 000 lx, 温度 (24±3)℃ 下培养。2 周后, 开始诱导出膨大愈伤组织, 4 周后愈伤组织膨大到一定程度时, 将其从茎段上剥离下来, 转入新鲜培养基中, 连续进行继代培养 3 次 (两周 1 次), 选择诱导率高且具有分化潜能的愈伤组织转入生芽培养基, 诱导芽的生成, 然后将诱导的丛生芽块转入继代培养基, 选出优化的生芽培养基, 丛生芽的诱导及继代培养, 每天光照 14~16 h, 光照强度 1 200 lx。4 周后, 切下丛生芽上较壮的单芽, 转入生根培养基, 光照强度增加到 1 800~2 000 lx, 观察生根情况, 统计生根数量, 选出优化生根培养基。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

由于马尼拉草茎尖比较嫩, 在杀菌消毒时时间不要太长, 我们用 0.1% 氯化汞消毒时, 做了不

收稿日期: 2005-11-04

作者简介: 王玉珍 (1966-), 女, 副教授, 主要从事盐碱地草坪绿化研究及教学工作。

同的处理,结果发现处理 10 min 的外植体污染少或基本不污染,处理 5 min 污染率显著增加,处理 15 min 外植体死亡率达 90% 以上。

2.2 愈伤组织的诱导

在 MS 基本培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,观察对愈伤组织诱导的效果。从表 1 中可以看出,4 号组合的诱导率最高,达 91%,其次是 3 号组合,为 73%,而 1 号、2 号和 10 号组合基本未形成愈伤组织。6-BA/NAA 比值影响愈伤组织的形成,比值在 2~6 之间时有利于愈伤组织的产生,高于 6 或小于 2,愈伤组织很难形成;在未添加任何激素的培养基中,形成愈伤组织的概率很小,只有 4.5%。

表 1 不同激素浓度配比的 MS 培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
激素浓度	6-BA	1.0	1.0	2.0	2.0	3.0	3.0	4.0	4.0	5.0	5.0	0
(mg/L)	NAA	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0
6-BA/NAA 比值		2	1	4	2	6	3	8	4	10	5	0
外植体个数		20	20	22	22	21	21	23	23	22	22	22
出现愈伤组织个数		/	/	16	20	14	12	6	9	6	/	1
出愈率(%)		0	0	73	91	67	57	26	39	27	0	4.5

选择最适合诱导的激素配比培养基进行继代培养,观察愈伤组织生长情况,根据邱玲燕等(2005)^[2]对盾叶薯蓣进行组织培养时,增加维生素 C,作为抗氧化剂阻止酚类化合物氧化为醌类,可以防止愈伤组织发生褐变。我们在每一组合中一半添加了 0.2 mg/L 的维生素 C,另一半没有增加维生素 C 作为对照,结果见表 2。

表 2 三次继代培养后愈伤组织生长情况

激素浓度	6-BA	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
(mg/L)	NAA	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5
维生素 C(mg/L)	0	0.2	0	0.2	0	0.2	0	0.2	0	0.2	0	0.2
愈伤组织生长势	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
发生褐变情况	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

++++代表生长势很好,+++代表生长势较好,++代表生长势一般,+代表发生少量褐变,-代表没有发生褐变

通过继代培养,更加证实激素组合 6-BA 2 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的培养基上,愈伤组织生长情况最好,生长速度最快,其次是 6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。在最适合诱导愈伤组织的培养基 6-BA 2.0 mg/L 添加维生素与否,都不会产生褐变,但是在 6-BA 3.0 mg/L 组合中,添加维生素有效地抑制了褐变的产生。

2.3 芽分化培养基的筛选

选择优良愈伤组织切下,转入生芽培养基,以 MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度的激素,观察丛生芽生长情况。从表 3 中可以看出,配置 6-BA (1.0~3.0 mg/L) 和 NAA (0.2~0.6 mg/L) 进行交叉组合,添加到基本培养基中,筛选出最能促进丛生芽产生的激素配比为 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;6-BA/NAA 比值为 10 左右,增大或减少两者比值都会影响丛生芽的生长。

表 3 不同激素浓度的培养基上丛生芽生长情况

培养基编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
激素浓度	6-BA	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0
(mg/L)	NAA	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
6-BA/NAA 比值		5	2.5	1.67	10	5	3.3	15	7.5	5
丛生芽数量		+	-	-	++++	++	++	-	+++	+

++++表示最多,+++较多,++较少,+,无

2.4 生根培养基

将旺盛生长的丛生芽切成单芽转入生根培养基,培养结果(表 4)表明,在 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 的情况下,适当增加 NAA 含量可以促进生根,NAA 含量少于 0.2 mg/L 时,不会产生不定根,NAA 量增加到 5.0 mg/L 时最有利于根的产生,并且形成的根又粗又壮,如果再增加 NAA 含量,反而会减少根的产生。

表 4 丛生芽在不同浓度激素的生根培养基中生根情况

培养基编号		1	2	3	4	5	6	7	8
激素浓度 (mg/L)	6-BA	2.0							
	NAA	0.1	0.2	0.5	1	3.0	5.0	7.0	10
6-BA/NAA 比值		20	10	4	2	0.7	0.4	0.3	0.2
单芽数量		22	22	22	22	22	22	22	22
培养 20 天生 根的单芽	数量	/	/	4	6	6	10	8	5
	占单芽总数的百分比	/	/	18	27	27	46	36	23
培养 30 天后 生根的单芽	数量	/	/	6	7	10	20	14	8
	占单芽总数的百分比	/	/	27	32	46	90	64	36

3 讨论

为了减少愈伤组织发生褐变,本试验在诱导培养基和分化培养基中均加入了维生素 C(0.2 mg/L),取得了良好效果,基本没有褐变发生。在分化培养基上,由于 6-BA 和 NAA 的浓度配比有多种组合,培养丛生芽时,有的组合也出现了不定根,但是生长缓慢。本试验有一些外植体发生了细菌或病毒感染,或许是杀菌时间不够,每天晚上又用紫外线杀菌处理 6 h,有效减少了感染机会,保证了试验的顺利完成。

无籽西瓜华夏1号茎段组培快繁试验

高凤菊,郑现和*,朱金英,张洪勇,王友平

(德州市农业科学研究所,山东 德州 253015)

摘 要:以华夏1号无籽西瓜为试材,研究了不同激素和理化因子对其茎段组培快繁的影响。结果表明,外植体以顶芽较好,继代快繁过程中,以改良MS培养基附加6-BA 0.4 mg/L、IAA 0.2 mg/L,蔗糖40 g/L,琼脂7 g/L较好,调节pH值5.8,培养温度 $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度2 000~2 500 lx,光照时间16 h/d,有利于无籽西瓜试管苗茎段的快速繁殖。

关键词:无籽西瓜;茎段;组培快繁

中图分类号:S651.04⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-4942(2006)01-0015-03

由于无籽西瓜的种子存在“三低”现象,即采种量低、种子发芽率低和成苗率低,因而严重阻碍了无籽西瓜的发展。利用组织培养技术,可以快速获得大量的无性系植株^[1~4]。于2002~2003年我们进行了华夏1号无籽西瓜茎段培养再生植株的试验,以期华夏1号的组培快繁提供理论依据。

1 材料与方法

以华夏1号无籽西瓜为试材,挑选种胚充实、大小一致的种子,选用75~80℃温水浸种6 h,搅拌至30℃左右,捞出用干布擦净种子表面水分及粘质物,然后轻轻嗑一下种脐,嗑时将种面垂直,使其略开一个小口,占种脐长度的1/3左右即可,

勿伤及种仁。然后放入生化培养箱中32~35℃催芽,待种子“露白”后,种植于经1%高锰酸钾消毒的蛭石中,3~4天后,当2片子叶展开转绿时,将带子叶的胚芽切下,即可剪取作为外植体。

在无菌条件下,将带2片子叶的外植体先用75%酒精表面灭菌30 s,无菌水冲洗2次;再放入0.1%氯化汞溶液(加几滴吐温80)中浸泡10 min,期间不断摇晃,然后用无菌水冲洗4次,切去药液接触过的伤口,转入经高温灭菌的初代培养基中,在培养室中进行无菌培养。待植株长至3~4 cm时,切割成茎段进行继代培养。培养室温度 $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度2 000~2 500 lx,光照时间16 h/d。

收稿日期:2005-06-22;修回日期:2005-10-22

基金项目:山东省科技项目——袖珍西瓜新品种选育;德州市科技厅项目——利用生物技术培养西瓜新品种。

作者简介:高凤菊(1969-),女,高级农艺师,主要从事植物组织培养及育种方面的研究工作。*通讯作者

当诱导培养基上6-BA浓度较高达5 mg/L以上时,容易出现玻璃化现象。在培养基中添加少量聚乙烯醇,能够在一定程度上减轻玻璃化现象的发生。

本试验探索出对马尼拉草进行组织培养的一系列优化培养基,分别是诱导培养基:MS培养基+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L;生芽培养基:MS培养基+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;生根培养基:MS培养基+6-BA 2.0 mg/L+NAA 5.0 mg/L。

在生根培养基优化组合过程中,我们只选择了6-BA 2.0 mg/L,只有一种浓度,也许在其它浓度条件下,会有不同浓度的NAA组合,还有待

于进一步研究证实。

参 考 文 献:

- [1] 晁相蓉,宋玲玲,胡孝瑞,等.鸭茅高效丛生芽体系的建立及耐盐植株的再生[J].山东农业科学,2005,1:7-10.
- [2] 邱玲燕,毛益斌,夏振国,等.盾叶薯蓣组织培养技术的优化[J].生物学杂志,2005,4:24-27.
- [3] 范家霖.组织培养在菊花辐射育种中的应用研究[J].河南科学,1996,14(4):455-459.
- [4] 周瑞玲,吴雨龙.菊花的组织培养及移栽技术初探[J].江苏林业科技,2001,4:23-24.
- [5] 李春斌,方宏均,王美林.药用植物菖蒲的组织培养快速繁殖与植株再生研究[J].中草药,2000,31(11):853-855.
- [6] 张维民.植物组织培养实践操作技能培养与提高[J].生物学杂志,2005,5:59-60.