

结缕草种子愈伤组织诱导及植株再生研究

张 琪, 郑丽屏, 蔡 平, 姜 茜

(苏州大学 建筑与城市环境学院, 江苏 苏州 215123)

摘 要:以结缕草成熟种子为外植体,研究了不同的种子处理方法和基本培养基、生长调节剂与壳聚糖的添加量对愈伤组织诱导的影响,以及愈伤组织的继代次数对植株分化的影响。结果表明:剥去外壳、划破种皮的结缕草种子在N6培养基中,2,4-D浓度为4 mg/L,添加4 g/L壳聚糖时,出愈率最高,达到100%,胚性愈伤的发生率也达到最高,为84.4%;用含0.1 mg/L 2,4-D的1/2MS分化培养基,经1次继代的浅黄色稍致密愈伤组织分化率最高,达到81.7%。

关键词:结缕草;胚性愈伤组织;植株再生;壳聚糖

中图分类号:S 688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2010)13—0135—06

结缕草(*Zoysia japonica* Steud.)为禾本科画眉草亚科结缕草属的多年生植物,又称锥子草,分布于我国东北、山东、华中、华东与华南的广大地区,生长在平原、山坡或海滨草地上^[1]。结缕草属植物具有抗高温、耐践踏、抗病虫和耐盐碱、养护成本低等特性,在适宜的土壤和气候条件下能够形成致密、整齐的优质草坪,被广泛应用于温暖潮湿和过渡地带的庭园草坪、操场、运动场和高尔夫球场、机场等使用强度大的地方^[2]。然而,结缕草抗寒性较差,抗旱能力也很弱,不适宜林下和高层建筑群遮荫地建坪;生产的种子数目不多,且具深休眠性,繁殖系数不太高;而且长期无性繁殖易使病毒积累,危害加重,品质下降^[3]。

利用组织培养快速繁殖结缕草,由于不受季节、时间的影响,可大大提高繁殖系数和工作效率,迅速获得大量无病毒优质苗,在种质资源保存和加速良种化进程等方面具有重要的意义^[4]。目前,已有少量关于结缕草组织培养^[5-6]和植株再生^[7-8]的研究,如结缕草种子^[9]、匍匐茎节^[9]和成熟胚的组织培养^[10]。为了优化结缕草的组织培养体系,提高遗传转化效率,该研究探讨了不同的种子处理方法和基本培养基、生长调节剂与壳聚糖的添加量等因素对结缕草成熟种子愈伤组织诱导的影响,以及愈伤组织的继代次数对植株分化的影响。

第一作者简介:张琪(1984),女,回族,湖南邵阳人,在读硕士,现主要从事生物技术方面研究工作。Email: zhangqi@ion.ac.cn。
通讯作者:蔡平(1955),男,博士,教授,现主要从事园艺及园林植物保护方面研究工作。Email: caip@suda.edu.cn。
基金项目:苏州市科技支撑(农业)资助项目(SNG0909)。
收稿日期:2010—03—09

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为结缕草的成熟种子(由苏州市星火绿化物资中心提供)。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基与培养条件 诱导与继代培养基:在基本培养基(MS, N6)中分别添加不同浓度的生长调节物质及壳聚糖(表1)。分化培养基为1/2MS+2,4-D 0.1 mg/L。

表1 诱导与继代培养基成分

代号	培养基成分/(mg·L ⁻¹)				
		2,4-D	6-BA	NAA	壳聚糖
M1	MS	0.5	—	—	—
M2	MS	1	—	—	—
M3	MS	2	—	—	—
M4	MS	3	—	—	—
M5	MS	4	—	—	—
M6	MS	6	—	—	—
M7	MS	4	0.5	—	—
M8	MS	4	0.5	1	—
M9	MS	4	—	—	500
M10	MS	4	—	—	1 000
M11	MS	4	—	—	2 000
M12	MS	4	—	—	4 000
N1	N6	0.5	—	—	—
N2	N6	1	—	—	—
N3	N6	2	—	—	—
N4	N6	3	—	—	—
N5	N6	4	—	—	—
N6	N6	6	—	—	—
N7	N6	4	0.5	—	—
N8	N6	4	0.5	1	—
N9	N6	4	—	—	500
N10	N6	4	—	—	1 000
N11	N6	4	—	—	2 000
N12	N6	4	—	—	4 000

培养基中蔗糖含量均为 3%, 以 8 g/L 琼脂固化, 并调节 pH 5.8。愈伤组织诱导及继代培养为暗培养, 分化培养光照强度为 1 600 lx, 光照时间为 12 h/d, 培养温度均为 25℃。

1.2.2 材料的前处理与消毒 挑选结实饱满的成熟结缕草种子, 以 2 种方式进行前处理。处理 1: 用蒸馏水浸泡 20 min, 以后流水冲洗 20 h, 使用镊子小心剥去种子外壳, 然后经 0.1% 氯化汞中浸泡 3 min, 用无菌水冲洗 8 次, 再用解剖刀在种子中间横切一刀。处理 2: 经 20% NaOH 浸泡 20 min, 然后用流水冲洗 20 h, 经 0.1% 升汞浸泡 10 min, 再用无菌水冲洗 8 次。

1.2.3 愈伤组织的诱导和继代 将处理好的结缕草种子接种于不同浓度添加物的 N6 培养基和 MS 培养基上, 25℃ 暗培养。每处理设 3 个重复。8 周后, 将愈伤组织在原培养基上进行继代, 继代周期为 3 周。

1.2.4 愈伤组织的分化和植株再生 取继代 1 次后和继代 3 次后的愈伤组织分别进行分化。挑选直径约 8 mm 的愈伤组织转移至分化培养基。培养条件为 25℃, 光照和黑暗各为 12 h/d。

1.3 统计方法

愈伤组织诱导率(即出愈率)、各种形态愈伤组织所占比例以及再生植株率统计方法为: 愈伤组织诱导率 = (愈伤组织块数/接种种子数) × 100%; 某形态愈伤组织所占比例 = (某形态愈伤组织块数/愈伤组织总数) × 100%; 分化率 = (产生分化的愈伤组织块数/进行分化的愈伤组织总数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 种子前处理方式对愈伤组织诱导的影响

经处理 1 的结缕草种子, 接种于 MS 培养基 1 周后开始出现愈伤组织, 接种于 N6 培养基 2 周后开始出现愈伤组织。经处理 2 的结缕草种子, 接种于 MS 及 N6 培养基 4 周后才开始出现愈伤组织。由种子切口处长出透明愈伤组织或先长出胚芽后膨大为愈伤组织。愈伤组织最早为透明水渍状, 然后逐渐长大, 颜色改变, 部分成为白色透明内有淡黄色较致密小点的愈伤组织。

于接种后 8 周统计出愈率。由图 1 及图 2 可以看出, 在 MS 及 N6 培养基上各激素浓度组中, 处理 1 的结缕草种子出愈率均大于处理 2 结缕草种子出愈率。由处理 1 结缕草种子诱导出的愈伤组织生长较快, 于接种后 8 周已长成为直径 5~8 mm 的团块状愈伤组织, 愈伤组织形态已经出现分异, 可大致区分为白色较疏松的愈伤组织及在白色疏松状愈伤组织中嵌有淡黄色较致密愈伤组织的类型; 而处理 2 的结缕草种子所诱导愈伤组织生长缓慢, 在接种后 8 周时大部分愈伤组织还都是直径小于 5 mm 的半透明水渍状愈伤组织。处理 2 的结缕草种子始愈时间晚于处理 1 组, 出愈率和生长速度均显

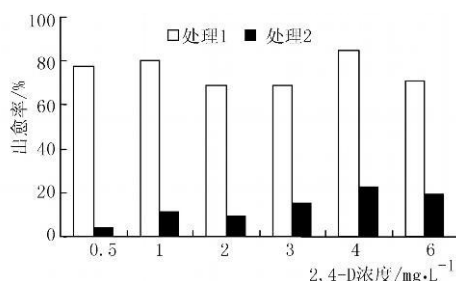


图 1 MS 培养基中不同前处理方式种子出愈率

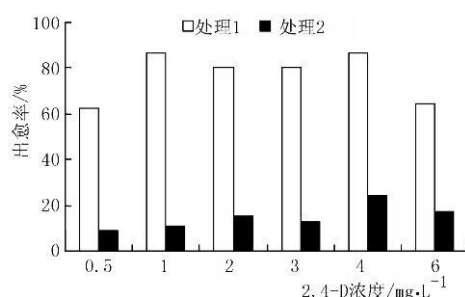


图 2 N6 培养基中不同前处理方式种子出愈率

著低于处理 1 组。2.2 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

2.2.1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响 在 MS 及 N6 培养基上, 结缕草种子出愈率随 2,4-D 浓度变化而产生的变化具有相同的趋势(图 1、2)。激素浓度为 1 mg/L 时出愈率大于浓度为 0.5 mg/L 时, 随后出愈率稍有起伏, 但在激素浓度为 4 mg/L 时出愈率达到最高。在 N6 培养基上, 4 mg/L 组出愈率与 1 mg/L 组出愈率相同, 为 86.7%。而在 MS 培养基上, 4 mg/L 组出愈率大于 1 mg/L 组, 最高为 84.4%。激素浓度大于 1 mg/L 小于 4 mg/L 时, N6 培养基上结缕草种子的出愈率均高于 MS 培养基上的出愈率; 但在低浓度(小于 1 mg/L)和高浓度(大于 4 mg/L)时, N6 培养基上结缕草种子的出愈率低于 MS 培养基上的出愈率。

2.2.2 6-BA 及 NAA 对愈伤组织诱导的影响 选取对结缕草种子有最佳愈伤组织诱导率的 2,4-D 浓度, 添加 6-BA 及 NAA, 进行结缕草种子愈伤组织的复合激素诱导, 结果如图 3 所示。在 MS 培养基上, 添加 6-BA 后结缕草出愈率下降, 添加 6-BA 及 NAA 后结缕草出愈率最低。在 N6 培养基下, 添加 6-BA 及 NAA 后出愈率略大于单独添加 6-BA, 但二者出愈率均小于单用 2,4-D 的出愈率。

2.2.3 壳聚糖对愈伤组织诱导的影响 在含 4 mg/L 2,4-D 的 MS 和 N6 基本培养基中添加不同浓度的壳聚糖(培养基号 M5、M9-12, N5、N9-12), 除添加 1 000 mg/L 壳聚糖的 MS 培养基中结缕草愈伤组织诱导率为 84.4%, 低于对照组(M5)外, 其余各组出愈率均高于对

照组(M5、N5)(如图4所示)。在MS培养基中,壳聚糖浓度为2 000 mg/L时出愈率达到最高,为100%;当壳聚糖浓度上升到4 000 mg/L时,出愈率略有下降,为93.3%。在N6培养基中,出愈率随壳聚糖浓度的增加呈上升趋势,在壳聚糖浓度为2 000 mg/L和4 000 mg/L时出愈率均为100%。壳聚糖对处理2结缕草种子愈伤组

织诱导也有显著促进作用。由图5可知,添加壳聚糖后各组出愈率均比对照组(MS培养基中为22.2%,N6培养基中为24.4%)有显著提高,MS培养基中出愈率在壳聚糖浓度为2 000 mg/L,N6培养基在4 000 mg/L时达到最高,最高出愈率均为46.7%。

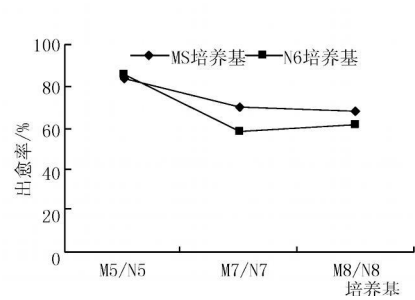


图3 添加6-BA和NAA对结缕草出愈率的影响

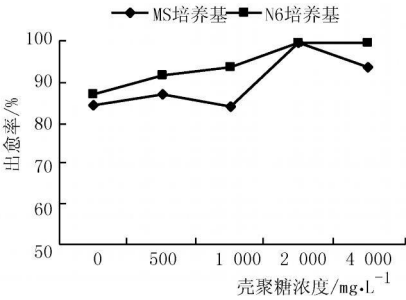


图4 添加壳聚糖对处理1结缕草出愈率影响

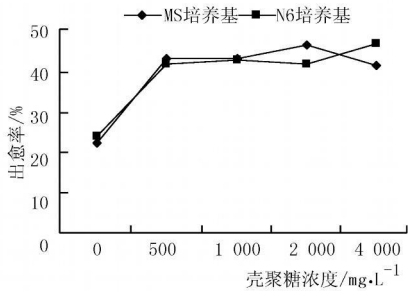


图5 添加壳聚糖对处理2结缕草出愈率影响

2.3 结缕草愈伤组织的继代

在愈伤继代过程中,在诱导培养基中诱导产生的半透明愈伤组织逐渐长大,形态发生改变,转变为白色疏松团块状生长迅速的愈伤组织或淡黄色稍致密组织(图6A、B)。部分白色疏松愈伤组织上出现淡黄色较致密的小点,黄色部分逐渐伸长,形成丛生的淡黄色片状叶形

物,即为分化芽(图6C)。部分愈伤组织逐渐长成为淡黄色稍致密愈伤组织,较为干燥,由较坚硬的淡黄色颗粒松散构成,生长较为缓慢。少部分愈伤组织颜色持续变深,由白色变为淡黄,然后变为深黄直至褐色,即褐化的愈伤组织(图6D),其比例占总愈伤数的3%。

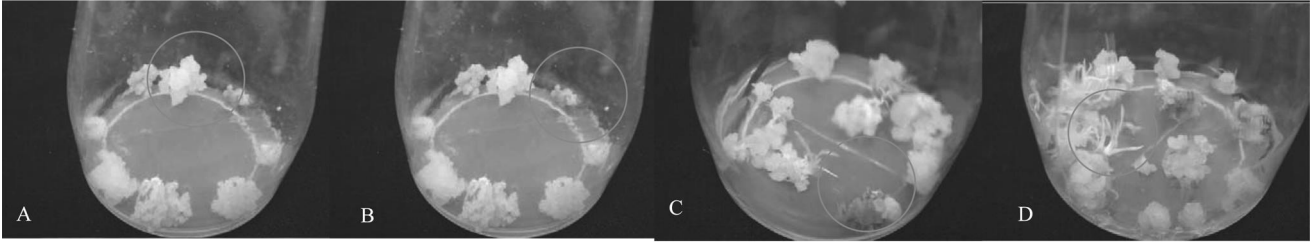


图6 不同形态的愈伤组织
注: A. 白色疏松较大愈伤组织; B. 浅黄致密较小愈伤组织; C. 褐化的愈伤组织; D. 继代培养基上的分化芽。

第1次继代过程中部分白色疏松团块上长出淡黄色致密小点,长出淡黄色分化芽;部分淡黄致密愈伤组织上。第2次和第3次继代过程中均有部分愈伤组织急速膨大,颜色变深为深黄色。在继代过程,培养基中激素浓度的差异对于愈伤组织形态的发生和维持没有显著差异。

N6培养基中的愈伤组织生长慢于MS培养基,愈伤组织呈团块状疯长的情况较少发生,愈伤组织表面也较为干燥。相对应的,出现分化芽的情况也主要发生于MS培养基中,在N6培养基中较少发生(图7)。

相似的情况也出现于添加壳聚糖的培养基中。添加壳聚糖的培养基中愈伤组织个体较小而紧致,生长较

慢,表面较干燥,颜色大多为鲜艳的淡黄色。从图8可以看出,除添加500 mg/L壳聚糖的N6培养基中淡黄色

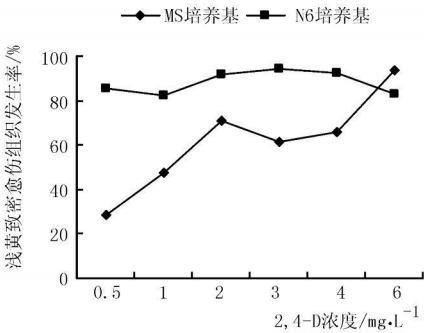


图7 不同基本培养基对愈伤组织形态发生的影响

致密愈伤组织比例(62.2%)比对照组(71.1%)略有下降以外其余各组淡黄色致密愈伤组织比例均有所上升。在 MS 培养基中,添加 2 000 mg/L 壳聚糖的淡黄色致密愈伤组织比例最高,为 83.3%;在 N6 培养基中,添加 4 000 mg/L 壳聚糖的淡黄色致密愈伤组织比例最高,为 84.4%。

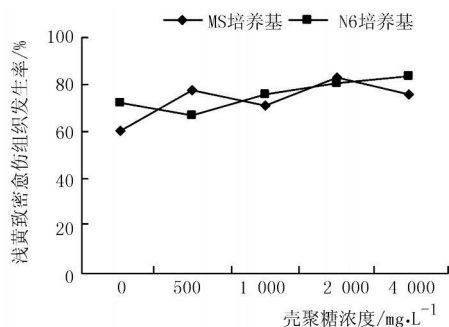


图8 添加壳聚糖对愈伤组织形态发生的影响

2.4 愈伤组织的分化及植株再生

仅继代 1 次的结缕草愈伤组织在分化培养基中,白色疏松状愈伤组织大多无变化,少量愈伤组织长出大量须状穿透愈伤组织的根,并很快出现褐化现象,分化率 0%;浅黄色稍致密愈伤组织 3~7 d 左右出现淡绿色小点,7~15 d 形成绿色小芽,小芽逐渐长大成苗,已长出分化芽的淡黄色愈伤组织上的小芽逐渐变绿长大,最终成苗(图 9),分化率为 81.7%。

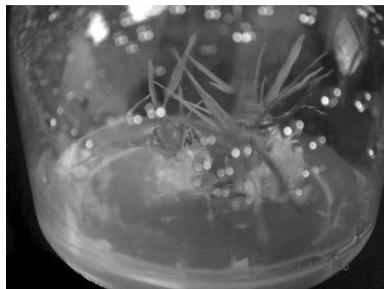


图9 分化成苗的结缕草



图10 褐化的胚性愈伤组织

继代 3 次的结缕草愈伤组织分化率不高,白色疏松愈伤组织和深黄色的轻度褐化愈伤组织均无分化,浅黄致密愈伤组织的分化率仅为 16.2%,其中部分已长出分化芽的愈伤组织经光照后分化芽并未变绿,而是逐渐褐化死亡(图 10)。

3 讨论

3.1 愈伤组织诱导的最佳种子前处理方式

结缕草种子具有深休眠性,在不经任何处理时其发芽率非常低。有报道说,结缕草种子休眠属于混合休眠类型,颖壳的透性障碍及种子内存在发芽抑制物质是导致种子休眠的主要原因。结缕草种子外有革质颖苞紧密包裹外稃和颖果,颖苞外被蜡质,堵塞气孔和颖苞纤维间隙,阻碍水分和空气的进入。在前期研究工作中发现,剥除外壳不能使结缕草达到较高发芽率。而经 NaOH 浸泡处理后颖苞的蜡质脱落,可有效打破结缕草的休眠,该试验结果与赵昕等人的研究结论相同^[1]。

经 NaOH 浸泡进行打破休眠处理的结缕草种子愈伤组织诱导率显著低于剥去种壳横切一刀的结缕草种子,该试验结果与王渭霞等的研究结果一致^[13]。经推测,在结缕草愈伤组织的诱导中,直接迅速吸胀并接触外源激素是促进愈伤组织产生的重要因素。在愈伤组织的诱导中,外源激素的调节起着主要作用。经 NaOH 浸泡打破休眠的结缕草种子通过气孔及颖苞间隙进行吸胀作用,吸胀较为缓慢,颖苞纤维对于外源激素的吸收起到了一定的阻碍作用。除去种壳且划破的结缕草种子直接暴露于外源激素中,可进行迅速的吸胀作用,外源激素作用更为直接迅速。

3.2 胚性愈伤组织的发生及继代中的分化情况

由于淡黄色致密愈伤组织具有很高的分化率,由此可见此类愈伤为胚性愈伤的可能性极大。白色疏松状愈伤无分化,所以白色疏松状愈伤组织可以基本肯定为非胚性愈伤组织。

在诱导和继代过程中,白色疏松状愈伤能够转变为带有淡黄色点块的愈伤组织,并进一步长出分化芽,由此可见非胚性愈伤可以转化为胚性愈伤,具有分化能力。

部分结缕草愈伤组织在继代培养基上能够分化。转移至分化培养基中,小芽逐渐变绿长大,最终成苗。但并非所有具有分化能力的愈伤组织都会在继代培养基上分化。在继代培养基上长出分化芽的大部分为疏松膨大的淡黄色愈伤组织,推测生长迅速的非胚性愈伤组织上部分细胞转化为胚性愈伤组织,非胚性愈伤组织在这里充当了营养支持物的作用,胚性愈伤组织得到充分的营养支持而进行分化。而淡黄色致密愈伤组织则很少出现在继代过程中分化的现象。其具体发生机理仍有待进一步探索。

3.3 结缕草种子愈伤组织诱导的最佳激素条件

2,4-D和NAA 属于植物生长素,6-BA 为细胞分裂素的一种。2,4-D 是愈伤组织诱导中应用最广泛的植物生长调节剂,在多激素复合的愈伤组织诱导中起着主要作用。NAA 被广泛用于生根,6-BA 主要被用于促进细胞分裂、不定芽的分化和试管苗的增殖;二者也常被用于作为愈伤组织诱导,起到辅助作用。但该研究结果表明,在添加最佳浓度2,4-D 的MS 培养基和N6 培养基中分别添加0.5 mg/L 6-BA 和1 mg/L NAA,对结缕草种子的愈伤组织诱导并没有增强的效果,反而使出愈率有下降的趋势。这可能是由于不同植物和不同外植体对于生长调节剂的需求种类及配比有不同的需求所导致的结果。

就愈伤组织发生率来说,在2,4-D(小于0.5 mg/L)和高浓度2,4-D(大于6 mg/L)条件下,在MS 培养基上结缕草愈伤组织的发生率有高于在N6 培养基上的发生率的趋势。但在中等浓度2,4-D的条件下0.5~6 mg/L,结缕草愈伤组织在N6 培养基上的发生率大于在MS 培养基上的发生率。

不同培养基上2,4-D浓度对胚性愈伤组织发生的影响也是不同的。当2,4-D 浓度 ≤ 5 mg/L 时,在N6 培养基上胚性愈伤组织的发生率要大大超过MS 培养基上的发生率;但是当浓度达到6 mg/L 时,胚性愈伤组织在N6 培养基上的发生率要小于在MS 培养基上的发生率。这在一定程度上说明了在高浓度激素条件下,MS 培养基可能较利于胚性愈伤组织的发生,但是在中低浓度激素条件下,N6 培养基对胚性愈伤组织的发生比较有利。

3.4 添加壳聚糖有利于愈伤组织诱导和胚性愈伤发生

壳聚糖学名聚氨基葡萄糖 又称可溶性甲壳质,是甲壳素经脱乙酰基化处理后的产物,是由N-乙酰氨基葡萄糖经 β -1,4 糖苷键连接起来的不分枝的链状高分子化合物。由于壳聚糖具有良好的生物相容性、可生物降解性,无毒副作用且易与多种有机物发生反应,因而应用范围极为广泛^[13]。据报道,壳聚糖对植物氮同化关键酶具有明显的生理调节功能,有利于蛋白质的生物合成与积累,改善植物的营养品质及园艺性状;并能迅速激发植物的防卫反应,启动植物的防御系统,有效地提高植物的抗病性^[14]。用壳聚糖包覆的大豆种子,发芽率有所提高,加水后能迅速地诱导出壳聚糖酶,促进含豌豆素的酚类物质的形成,有利于大豆的快速生长。壳聚糖能显著提高小麦悬浮培养液中过氧化物酶的活性。另外,低壳聚糖能调节植物基因的关闭与开放,促进植物细胞的活化,促进蛋白质的合成,刺激植物快速生长。有报道认为,壳聚糖处理作物后对作物氮同化途径的一些关键酶活性有明显的生理调节作用。但目前的试验

研究主要集中在用壳聚糖处理种子后对提高植物园艺性状的影响及其机理上,尚未有将壳聚糖用于组织培养的报道。在该研究中,添加壳聚糖后结缕草种子愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织发生率均有显著提高,可能是通过增强结缕草种子的代谢活性和细胞的增殖来进行的,表明壳聚糖可能是提高组织培养质量的优质添加剂。

3.5 继代次数影响结缕草愈伤组织分化

试验显示多次继代可能会对导致结缕草愈伤组织分化能力下降。继代仅1 次的愈伤组织分化率高,但是继代3 次的愈伤组织在继代过程中就发现有颜色变深、体积膨大的现象,转移至分化培养基经分化培养后分化率不高,甚至有轻度褐化的愈伤组织在分化培养基上长出分化芽后,分化芽无法长大成苗。淡黄色愈伤组织可以分化出分化芽和分化苗,但深黄色或颜色更深的愈伤组织无法顺利完成分化。愈伤组织的褐化可能与愈伤组织的次生代谢中某些物质的积累有关,或与愈伤组织细胞内酚的含量活性有关。所以,为提高结缕草胚性愈伤组织的分化率,减少继代次数是必要的。

3.6 以结缕草种子为外植体组培的最佳条件

结缕草种子的愈伤组织诱导、分化和植株再生受多种因素制约,组织培养及植株再生比较困难,诱导愈伤组织所需要的时间较长,分化率也不是特别高。就该研究的范围内,最适于结缕草种子的组织培养体系为:采用含4 mg/L 2,4-D添加4 g/L 壳聚糖的N6 培养基进行愈伤组织诱导,进行1~2 次继代,分化培养基含0.1 mg/L 2,4-D的MS 培养基。

参考文献

[1] 王艳. 结缕草研究进展[J]. 中国草地 2003 25(2):45-53.
[2] 董厚德, 宫莉君, 王艳, 等. 中国结缕草生态学及其资源开发与应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 191.
[3] 苟文龙, 张新全, 白史旦, 等. 沟叶结缕草研究进展[J]. 草业科学 2002, 19(3): 62-65.
[4] 张俊卫, 包满珠, 孙振元. 草坪草的遗传转化研究进展[J]. 林业科学 2003 16(1): 87-94.
[5] 李瑞芬, 张敬原, 赵茂林. 结缕草组织培养和植株再生[J]. 园艺学报 2003, 30(3): 355-357.
[6] Al-Khayri J M, Huang F H, Thompson L F, et al. Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus [J]. Crop Sci, 1989, 29 (5): 1324-1325.
[7] 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.
[8] 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.
[9] 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.

转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨光合特性研究

贾香楠¹, 李伟¹, 冷青云¹, 孙立洋¹, 陈晓阳^{1,2}

(1. 北京林业大学 林木育种国家工程实验室 北京 100083; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为探讨转双价基因毛白杨光合特性与规律, 以 4 个转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系和 1 个对照株系 PT-16 的 1 a 生盆栽苗为材料, 采用 Li-6400 光合测定系统对其光合作用指标进行测定, 并分析光合特性与苗木生长的相关性。结果表明: 转基因株系与对照株系的净光合速率—光响应曲线变化趋势相似, 其中 3 个转基因株系 RG-1、RG-3 和 RG-4 在各个光有效辐射下的净光合速率均高于对照; 转基因株系的光补偿点均低于对照, RG-3 和 RG-4 的光饱和点高于对照; 株系间瞬时净光合速率差异显著, 其中 RG-4 最高; 转基因毛白杨株系净光合速率与地径显著相关, 与苗高相关不显著。

关键词: 转双价基因; 毛白杨; 光合特性; 相关性

中图分类号: S 792.117 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0140-04

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.) 是我国特有的优良白杨派乡土树种, 栽培历史悠久、分布广泛, 具有材质

优良、抗性和适应性强等特点, 是我国北方地区常用的建筑、家具用材和造纸工业原料树种^[1]。毛白杨生产中主要为无性繁殖, 但毛白杨插条生根较难、扦插成活率低^[2-6], 很大程度上阻碍了这一优良树种的推广和产业化进程。熊瑾^[7]以转 *rolB* 基因毛白杨进行了温室扦插试验, 发现转基因毛白杨扦插成活率显著高于对照, 达到了 93.3%, 但植株出现了矮化现象。GA20-氧化酶(GA20-oxidase, GA20ox)对植物茎伸长、叶伸展有促进

第一作者简介: 贾香楠(1981-), 女, 内蒙古赤峰人, 在读博士, 研究方向为林木基因工程。Email: jiaxiangnan0616@163.com。

通讯作者: 陈晓阳(1958-), 男, 四川南充人, 教授, 博士生导师, 现主要研究方向为林木基因工程。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271097)。

收稿日期: 2010-03-09

[10] Noh H Y, Choi J S, Ahn B J. Plant regeneration through somatic embryogenesis in zoysiagrasses (*Zoysia* sp.) [J]. J Kor Soc Hort Sci, 1995, 36: 582-587.

[11] 赵昕, 李玉霖. 结缕草种子打破休眠的研究[J]. 种子, 2002(1): 22-27.

[12] 王渭霞, 胡张华, 陈锦涛, 等. 松南结缕草成熟胚愈伤组织的诱导和再

生[J]. 2006 15(3): 132-137.

[13] 柴建萍, 白兴荣, 谢道燕. 壳聚糖——一种极具开发利用价值的活性物质[J]. 云南农业科技, 2005(1): 26-27.

[14] 陈惠萍, 徐朗莱. 壳聚糖调节植物生长发育及诱发植物抗病性研究进展[J]. 云南植物研究, 2005 27(6): 613-619.

Callus Induction and Plant Regeneration from Seeds of *Zoysia japonica*

ZHANG Qi, ZHENG Li-ping, CAI Ping, JIANG Qian

(College of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract: With mature *Zoysia japonica* weeds explant, studied the influence of different treatment of weeds, basic medium and the addition of growth regulator and chitosan to the induction of callus and the effect of subculturing times on the plantlet regeneration. Compared on the frequency and the forms of callus, the best method to induce callus was in N6 medium, under dark condition and with the combination of 2, 4-D (4 mg/L) and chitosan (4 g/L). Under such condition, the induction frequency of callus was 100%, while the percentage of embryogenic callus was 84.4%. Regenerated plantlets with regeneration frequency 81.7% were obtained after transferring embryogenic callus to the 1/2MS medium with 2, 4-D 0.1 mg/L.

Key words: *Zoysia japonica*; embryogenic callus; regenerated plantlet; chitosan