DOI: 10. 11686/cyxb2025434
http://cyxb. magtech. com. cn
任慈, 王艺华, 马龙龙, 等. 日本结缕草‘Zenith’胚性愈伤组织诱导与继代体系优化. 草业学报, 2026, 35(10): 156－166.
REN Ci, WANG Yi-hua, MA Long-long, *et al*. Optimization of an embryonic callus induction and subculture system for *Zoysia japonica* cv. ‘Zenith’. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(10): 156－166.

日本结缕草‘Zenith’胚性愈伤组织诱导与继代体系优化

任慈[1], 王艺华[1], 马龙龙[1], 刘翠玲[1], 李洁仪[1], 刘超[1], 何亮亮[1], 陈曙[1,2,3*]
(1. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广州 510642; 2. 广东省草业工程技术研究中心, 广东 广州 510642; 3. 华南农业大学中山创新中心, 广东 中山 528478)

摘要: 为解决日本结缕草组织培养中存在的胚性愈伤组织诱导率低及继代褐化严重等技术瓶颈, 本研究以其种播品种‘Zenith’的成熟种子为外植体, 旨在建立一套高效、稳定的植株再生体系。研究以 Murashige & Skoog(MS)培养基辅以 2 mg·L^{-1} 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 0.2 mg·L^{-1} 6-苄氨基嘌呤(6-BA)作为基础诱导培养基(IM), 通过 3 轮递进式的单因素试验筛选关键调控因子。第 1 轮初筛发现, 5 mg·L^{-1} 维生素 B1(VB_1)和 25 mg·L^{-1} α-酮戊二酸具有促进效应, 但胚性愈伤诱导率最高仅为 6.74%。第 2 轮筛选明确了 2 mg·L^{-1}麦草畏(dicamba)是核心调控激素, 可将胚性愈伤诱导率显著提升至 19.65%。第 3 轮在“IM＋2 mg·L^{-1}麦草畏”的基础上进行优化, 证实额外添加 25mg·L^{-1}的 α-酮戊二酸可使胚性愈伤的诱导效率再提升 62.38%。针对继代培养难题, 在培养基中添加 0.05 mg·L^{-1}脱落酸(ABA)可有效抑制愈伤组织的早熟分化; 抗褐化筛选则表明, 4 g·L^{-1}聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、0.5～1.0 g·L^{-1}活性炭(AC)以及 0.001～0.005 g·L^{-1}硝酸银($AgNO_3$)均能显著降低愈伤褐化率, 其中 PVP 的效果最佳。本研究最终建立了一套完整的日本结缕草高效再生体系, 为基因编辑、遗传转化等分子育种工作提供了稳定的受体系统, 同时为其他暖季型草坪草的再生体系构建提供了重要的理论与技术参考。

关键词: 结缕草; 组织培养; 愈伤组织; 再生体系

Optimization of an embryonic callus induction and subculture system for *Zoysia japonica* cv. ‘Zenith’

REN Ci[1], WANG Yi-hua[1], MA Long-long[1], LIU Cui-ling[1], LI Jie-yi[1], LIU Chao[1], HE Liang-liang[1], CHEN Shu[1,2,3*]
1. *College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, *China*; 2. *Guangdong Engineering Research Center for Grassland Science, Guangzhou* 510642, *China*; 3. *South China Agricultural University Zhongshan Innovation Center, Zhongshan* 528478, *China*

Abstract: There are several technical bottlenecks in *Zoysia japonica* tissue culture, including the low induction rate of embryogenic callus and severe browning during subculture. This study aimed to address these problems to establish an efficient and stable plant regeneration system for *Z. japonica*. Mature seeds of the seed-propagated cultivar ‘Zenith’ were used as explants. These explants were cultured on basal induction medium (IM) consisting of Murashige & Skoog medium supplemented with 2 mg·L^{-1} 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.2 mg·L^{-1} 6-

收稿日期: 2025-10-21; 改回日期: 2025-12-15
基金项目: 国家自然科学基金(31601990), 广东省基础与应用基础研究基金(2025A1515010836, 2023A1515140005)和广州市科技计划项目(2024E04J1233)资助。
作者简介: 任慈(2001－), 女, 河南郑州人, 在读硕士。E-mail: 20232036004@scau. edu. cn
*通信作者 Corresponding author. E-mail: shuchen@scau. edu. cn

benzylaminopurine. Key regulatory factors were screened through three successive rounds of single-factor experiments. The first round of screening revealed a promoting effect of 5 mg·L^{-1} vitamin B1 and 25 mg·L^{-1} α-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction, although the maximum embryogenic callus induction rate was only 6.74%. The second round of screening identified dicamba (2 mg·L^{-1}) as a core hormonal regulator that significantly increased the embryogenic callus induction rate to 19.65%. In the third round of screening, the addition of 25 mg·L^{-1} α-ketoglutaric acid to IM+2 mg·L^{-1} dicamba further increased the embryogenic callus induction efficiency by 62.38%. The addition of 0.05 mg·L^{-1} abscisic acid to the medium effectively inhibited premature differentiation of callus during subculturing. Browning was significantly suppressed by the addition of 4 g·L^{-1} polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.5−1.0 g·L^{-1} activated carbon, or 0.001−0.005 g·L^{-1} silver nitrate, with PVP demonstrating the strongest inhibitory effect. In summary, a complete, efficient regeneration system was established for *Z. japonica*. This system provides a reliable source of recipient materials for molecular breeding applications such as gene editing and genetic transformation. The findings of this study provide a valuable theoretical and technical reference for developing regeneration systems for other warm-season turf grasses.

Key words: *Zoysia* grass; tissue culture; callus; regeneration system

日本结缕草(*Zoysia japonica*)是禾本科结缕草属暖季型优质草坪草,兼具优异的生态功能与经济价值:其发达的地下根茎层可强效固土护坡、遏制水土流失,且具有低养护需求、抗旱、耐盐碱、抗病虫害、耐贫瘠及耐践踏等核心特性[1],在我国华北、华东、东北等地区的城市绿地、运动草坪及盐碱地生态修复中广泛应用,亦是全球暖季型草坪草遗传改良的核心研究对象之一。然而,日本结缕草存在种子休眠性强、自然繁殖效率低的生物学特性,传统杂交育种周期长、定向改良难度大,难以满足当前草坪业对抗逆性强、景观品质优的新品种需求[2-3]。因此,建立高效、稳定的组织培养与植株再生体系,是开展日本结缕草基因编辑、转基因等分子育种技术的前提,对其遗传改良及新品种培育具有重要的理论与实践意义。

结缕草属植物的组织培养研究已积累一定基础,但不同物种、基因型间的培养效率差异显著,核心技术瓶颈尚未突破。在近缘种研究中,马龙雪等[2]以大穗结缕草(*Zoysia macrostachya*)的胚和花序为外植体成功诱导愈伤组织,但未涉及胚性愈伤分化效率;杜敏华等[4]针对中华结缕草(*Zoysia sinica*)建立高频再生体系,发现茎尖外植体的分化能力优于成熟胚,但其激素配比对日本结缕草的适用性未明确;Inokuma 等[5]以日本结缕草匍匐茎茎节为外植体构建悬浮培养体系,虽实现单细胞增殖,但操作复杂且易出现分化异常;Dhandapani 等[6]通过沟叶结缕草(*Zoysia matrella*)未成熟花序诱导再生植株,却受限于外植体取材季节(仅花期可获取)。针对日本结缕草本身,赵俊侠等[7]明确 2 mg·L^{-1} 2,4-二氯苯氧乙酸(2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是愈伤诱导的关键激素浓度,且 Murashige & Skoog 培养基(MS)在分化阶段远优于营养肉汤(nutrient broth,NB)培养基(MS 上 60%～70% 愈伤可生成胚性愈伤并再生植株,NB 培养基愈伤则全部硬化并伴有毛状根,无法再生),暗培养(分化率 55%、植株再生率 47%)显著优于光培养(分化率 10%、再生率 7%),但研究未涉及微量元素、抗氧化剂等调控因子的协同作用;朱晓花[8]针对青岛结缕草(*Zoysia japonica* cv. 'Qingdao',QJ)、兰引Ⅲ号结缕草(*Zoysia japonica* cv. 'Lanyin Ⅲ',YJ)、马尼拉结缕草(*Zoysia matrella* cv. 'Jurong',BJ)3 个结缕草属近缘种开展系统研究,发现茎基是最优外植体,其出愈率(QJ 83%、YJ 81%、BJ 79%)显著优于茎尖(最高 63%)、根尖(最高 23%);进一步通过 5 ℃低温预处理 7 d 可提升胚性愈伤诱导率(YJ 达 37.87%),20 Gy ^{60}Co-γ 辐照处理结合低温处理模式(radiation→low temperature treat,FS→DT)可将 YJ、BJ 胚性愈伤率分别提升至 88.89%、83.33%,但该体系对不同基因型的适配性差异显著;张俊卫等[9]以 ND 培养基(N_6大量元素+B_5有机成分)为基础,筛选出 ND+3.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.2 mg·L^{-1} α-萘乙酸(α-naphthalene acetic acid,NAA)+500 mg·L^{-1} L-脯氨酸的最优诱导组合,胚性愈伤率达 57.3%,进一步添加 5 μmol·L^{-1} Cu^{2+}可提升分化率至 21.6%,但该体系对'Zenith'等广泛栽培的日本结缕草主流品种适配性不足;贺杰[3]以山东胶州日本结缕草成熟胚为外植体,优化得出 MS+3.0 mg·L^{-1} 2,4-D+4.0 mg·

L^{-1}维生素B_1(vitamin B_1, VB_1)+500 mg·L^{-1}脯氨酸的诱导体系,愈伤诱导率达43.20%,添加0.3 mg·L^{-1}脱落酸(abscisic acid, ABA)可将胚性愈伤率提升至28.4%,但愈伤继代褐化率仍超40%,严重制约后续分化效率。樊晓莉[10]通过优化基本培养基[I:N_6大量元素+MS其他营养+500 mg·L^{-1}水解酪蛋白(casein acids hydrolysate, CH)],结合2.0~3.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.01~0.02 mg·L^{-1} 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA),可分化愈伤诱导率达23.91%,继代阶段添加0.5 mg·L^{-1}激动素(kinetin, KT)可实现愈伤组织17个月长期保存并保持分化能力,且明确再生途径包含器官发生与体细胞胚胎发生,但关键调控因子(如α-酮戊二酸、麦草畏)对胚性愈伤形成的作用机制尚未阐明。总体而言,当前日本结缕草再生体系研究存在3大核心局限:一是基因型依赖显著,朱晓花[8]的近缘种体系、张俊卫等[9]的ND培养基体系均仅适用于特定品种,对主流栽培品种缺乏针对性优化;二是胚性愈伤诱导率不稳定,虽张俊卫等[9]报道最优体系达57.3%,但针对日本结缕草广泛品种的平均胚性愈伤诱导率仍不足30%,难以满足遗传转化对受体材料的规模化需求;三是继代褐化与分化障碍突出,贺杰[3]研究中愈伤继代褐化率超40%,赵俊侠等[7]、樊晓莉[10]未明确不同类型愈伤(颗粒状/水渍状)的分化能力差异,制约再生效率的稳定性。

基于上述研究空白,本研究以日本结缕草'Zenith'等栽培品种的成熟种子为外植体(易获取、不受季节限制),以2 mg·L^{-1} 2,4-D+0.2 mg·L^{-1} 6-BA为基础培养基,通过单因素试验系统探究噻苯隆(thidiazuron, TDZ)、NAA、KT等激素及VB_1、$CuSO_4$·$5H_2O$、α-酮戊二酸、麦草畏等添加物对胚性愈伤诱导的调控效应;进一步在最优激素配比基础上,优化$CuSO_4$·$5H_2O$、α-酮戊二酸、VB_1的浓度组合以提升胚性愈伤诱导率;同时针对继代褐化问题,筛选交联聚乙烯吡咯烷酮(crosslinked polyvinylpyrrolidone, PVPP)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)、活性炭(activated carbon, AC)等吸附剂/抗氧化剂的最优浓度;最终明确不同类型愈伤的分化能力,建立稳定、高效的日本结缕草植株再生体系。本研究结果旨在解决日本结缕草组织培养中的基因型依赖、胚性愈伤率低及褐化等核心问题,为其遗传改良(如抗逆基因转化)及优质品种培育提供技术支撑,同时丰富暖季型草坪草组织培养的理论与方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为6份日本结缕草种子,试验于2020年10月在华南农业大学草类植物生物技术实验室启动,2021年12月完成。其中,种播品种'Zenith'种子购自美国帕滕种子公司(Patten Seed Company,美国);青岛结缕草2份材料(编号YN-037、YN-082)分别由北京布莱特草业有限公司和江苏百绿园林集团有限公司提供;3份种质资源(编号YN-022、YN-040、YN-010)为课题组自主收集保存,采集地依次为山东省泰安市新泰市、广东省广州市天河区和辽宁省大连市旅顺口区。

1.2 外植体处理与消毒

选取饱满的结缕草种子,置于50 mL离心管中,于4 ℃条件下冷层积处理3 d。37 ℃、100 r·min^{-1}条件下30%NaOH溶液处理30 min,用无菌水反复漂洗5次;将种子转入SW-CJ-1D超净工作台(苏州智净净化设备有限公司),用2.5%的次氯酸钠(NaClO)溶液振荡消毒25 min,无菌水冲洗5次;消毒后的种子均匀铺在无菌滤纸上晾干备用。

1.3 愈伤组织诱导培养基的优化

1.3.1 基础培养基及添加物 初筛本研究以Murashige & Skoog(MS)培养基为基础,辅以30 g·L^{-1}蔗糖、1.15 g·L^{-1}脯氨酸(proline, Pro)和0.5 g·L^{-1}水解酪蛋白,调节pH至5.8后加入8 g·L^{-1}琼脂(agar),构成愈伤组织诱导的基础培养基(basal induction medium, IM)。在此基础上,固定添加2 mg·L^{-1} 2,4-D和0.2 mg·L^{-1} 6-BA作为核心激素组合。

为筛选促进胚性愈伤组织诱导的有效添加物,设计了两组单因素试验,均以不含任何额外添加物的IM培养基为对照(CK),每个处理接种5皿,每皿均匀铺展58粒消毒后的种子。

第1轮试验在IM培养基中分别添加不同浓度的噻苯隆(TDZ:0、1.0、1.5 mg·L^{-1}, T_1~T_3)、维生素B1(VB_1:

1、5、25 mg·L^{-1}，T_4～T_6）、维生素 B2（VB_2：0.1、1.0、10.0 mg·L^{-1}，T_7～T_9）、五水硫酸铜（$CuSO_4·5H_2O$：5、10、20 mg·L^{-1}，T_{10}～T_{12}）、α-酮戊二酸（25、50、100 mg·L^{-1}、T_{13}～T_{15}）和海南椰汁（5%、15%、30%，T_{16}～T_{18}）。

第 2 轮试验在 IM 培养基中调整蔗糖与水解酪蛋白的比例（40∶0.5、30∶1、40∶1 mg·L^{-1}，T_{19}～T_{21}），添加不同浓度的 α-萘乙酸（NAA：0.5、1.0、1.5 mg·L^{-1}，T_{22}～T_{24}）、激动素（KT：0.001、0.005、0.100 mg·L^{-1}，T_{25}～T_{27}）、葡萄糖（2.5、5.0、10.0 g·L^{-1}，T_{28}～T_{30}）、精胺（0.1、1.0、10.0 mg·L^{-1}，T_{31}～T_{33}）和麦草畏（dicamba：0.5、1.0、2.0、4.0 mg·L^{-1}，T_{34}～T_{37}）。

1.3.2　胚性愈伤诱导培养基的优化　　根据初筛结果，麦草畏在促进胚性愈伤形成方面效果最为显著。为进一步提升诱导效率，以 IM＋2 mg·L^{-1}麦草畏为优化基础培养基，在此之上分别设计了添加不同浓度梯度 $CuSO_4·5H_2O$（5、10、20、40 mg·L^{-1}，L_1～L_4）、α-酮戊二酸（25、50、100、200 mg·L^{-1}，L_5～L_8）和 VB_1（1、5、25、50 mg·L^{-1}，L_9～L_{12}）的单因素优化试验，旨在确定关键高效添加物的最佳浓度。每个处理设置 5 皿重复，每皿接种 58 粒种子。所有诱导培养均在（25±2）℃的黑暗条件下进行，定期观察并记录愈伤组织的诱导率和形态。

1.4　愈伤组织继代与抗褐化培养

将诱导出的胚性愈伤组织转接到继代培养基（MS＋30 g·L^{-1}蔗糖＋0.5 g·L^{-1} CH＋1.15 g·L^{-1} Pro＋2 mg·L^{-1} 2,4-D＋0.2 mg·L^{-1} 6-BA，pH 5.8）上，每 20～25 d 继代一次。为解决继代过程中的早熟分化问题，在继代培养基中添加了不同浓度（0、0.01、0.05、0.10、0.20 mg·L^{-1}）的脱落酸（ABA）进行试验。为抑制愈伤组织褐化，在继代培养基中分别添加不同浓度梯度的 6 种抗氧化剂或吸附剂进行筛选，包括柠檬酸（citric acid，CA：0、0.1、0.5、1.0、2.0 g·L^{-1}）、抗坏血酸（vitamin C，VC：0、0.01、0.10、0.20、0.40 g·L^{-1}）、硝酸银（$AgNO_3$：0、0.001、0.005、0.010、0.020 g·L^{-1}）、活性炭（AC：0、0.5、1.0、2.0、4.0 g·L^{-1}）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP：0、0.5、1.0、2.0、4.0 g·L^{-1}）和交联聚乙烯吡咯烷酮（PVPP：0、2、4、8、16 g·L^{-1}）。每个处理设置 5 皿重复，每皿接种 12 颗愈伤组织。

1.5　植株分化与生根培养

将生长状态良好、结构致密的胚性愈伤组织接种于分化培养基（callus differentiation medium，FH，配方见表 1），每个处理设置 5 皿重复，每皿接种 25～30 块愈伤。分化培养完成后，将长成的完整幼苗转入生根培养基（rooting medium，SG，配方见表 1）中进行壮苗生根。分化及生根阶段的培养条件为：光照/黑暗周期 16 h/8 h，光照强度为 7000 lx（100～140 μmol·m^{-2}·s^{-1}），白天温度（25±2）℃。

表 1　日本结缕草‘Zenith’愈伤分化与生根培养基配方

Table 1　Formulations of callus differentiation and rooting medium for *Z. japonica* cv. ‘Zenith’

项目 Item	Murashige & Skoog (MS, g·L^{-1})	蔗糖 Sucrose (g·L^{-1})	脯氨酸 Proline (g·L^{-1})	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D, mg·L^{-1})	6-苄氨基嘌呤 6-benzylaminopurine (6-BA, mg·L^{-1})	α-萘乙酸 α-naphthalene acetic acid (NAA, mg·L^{-1})	琼脂 Agar (g·L^{-1})	pH
FH	4.43	30	1.15	0	2	0.1	7	5.8
SG	4.43	30	1.15	0	0	1.0	7	5.8

注：FH：愈伤分化培养基；SG：植株生根培养基。

Note：FH：Callus differentiation medium；SG：Rooting medium.

1.6　组培苗炼苗与移栽

待组培苗根系发达、株高长至 3～4 cm 时，在培养瓶内进行为期 5 d 的开盖炼苗，期间保持温室空气湿度在 70%～85%。炼苗结束后，取出植株，用清水洗净根部残留的培养基，移栽至经高压蒸汽灭菌的复合基质（草炭土∶蛭石∶珍珠岩＝2∶1∶1，volume/volume/volume，体积/体积/体积，v/v/v）中。移栽初期进行适当遮荫并保持基质湿润，7 d 后逐步转入正常管理。

1.7 数据统计与分析

采用 Excel 2019 进行数据整理，利用 SPSS 26.0 软件进行方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较，$P<0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 供试种质的发芽与愈伤诱导能力筛选

对 6 份日本结缕草种质进行初步评估，结果表明，不同种质间的发芽率与愈伤诱导率差异明显(表 2)。其中，YN-022、YN-037、YN-010 三份种质无法发芽，YN-040 发芽率仅为 1%。YN-082 和‘Zenith’品种表现较好，发芽率分别为 24.00% 和 85.33%，愈伤诱导率分别为 17.0% 和 79.6%。‘Zenith’品种在两项指标上均表现出绝对优势，因此被选为后续试验的供试材料。

表 2 日本结缕草不同种质的种子发芽率及愈伤诱导率比较

Table 2 Comparison of germination rate and callus induction rate among different *Z. japonica* germplasms

种子来源 Source of seeds	供试种子数 Number of tested seeds	发芽种子数 Germinated seeds	产生愈伤的种子数 Seeds of producing callus	发芽率 Germination rate (%)	愈伤诱导率 Callus induction rate (%)
YN-022	300	0	0	0	0
YN-040	300	3	1	1.00	0.33
YN-037	300	0	0	0	0
YN-010	300	0	0	0	0
YN-082	300	72	51	24.00	17.00
Zenith	300	256	239	85.33	79.60

2.2 不同类型愈伤组织的分化能力鉴定

为明确理想的愈伤组织类型，对诱导过程中产生的 4 种典型愈伤组织(图 1)进行分化能力测试。结果表明，各类愈伤的分化潜力差异巨大：第 1 类愈伤呈深褐色，已褐化死亡，分化率为 0%；第 2 类愈伤呈白色水渍状，分化能力微弱，分化率仅为 13.33%；第 3 类愈伤已部分分化，再生率虽高达 94.67%，但并非从胚性愈伤发育而来，不适合用作试验受体；第 4 类愈伤为淡黄色、结构致密、呈颗粒状的胚性愈伤，分化率高达 82.67%，是进行植株再生的理想材料。

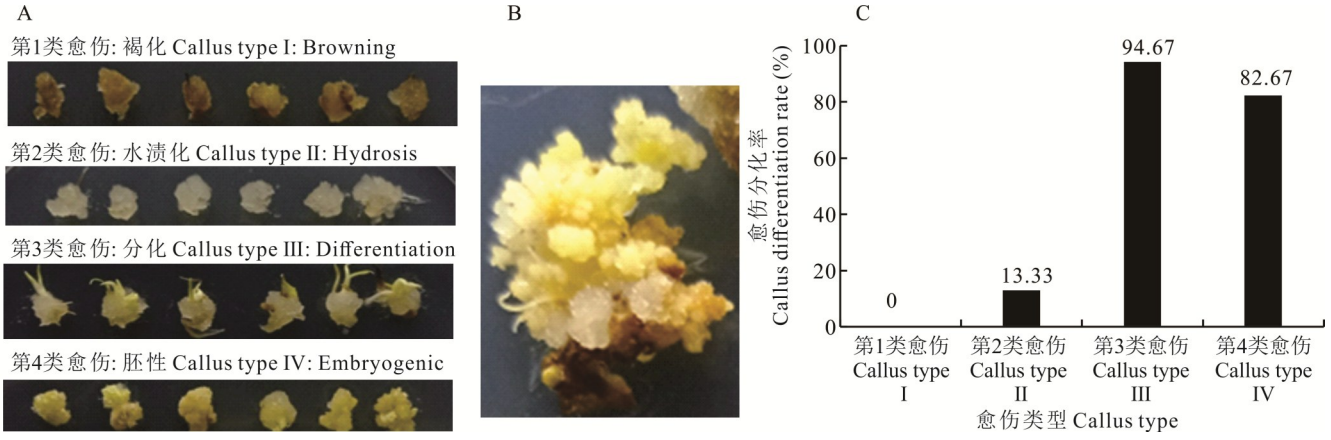


图 1 日本结缕草‘Zenith’4 种类型愈伤组织的分化率比较

Fig. 1 Comparison of callus differentiation rates in four types of *Z. japonica* cv. ‘Zenith’

A：4 类结缕草愈伤组织；B：结缕草胚性愈伤局部细节。A: Four types of *Z. japonica* callus; B: Partial details of embryogenic callus in *Z. japonica*.

2.3 胚性愈伤组织诱导条件的筛选与优化

2.3.1 诱导培养基添加物的初步筛选 为筛选促进胚性愈伤形成的有效添加物，在基础培养基(IM)上进行了两轮单因素试验。第 1 轮试验测试了添加不同浓度 TDZ(T_1～T_3)、VB_1(T_4～T_6)、VB_2(T_7～T_9)、$CuSO_4·5H_2O$(T_{10}～T_{12})、α-酮戊二酸(T_{13}～T_{15})、海南椰汁(T_{16}～T_{18})对愈伤组织诱导的影响。结果表明，多种添加物均能促进种子发芽、愈伤诱导和增殖，但在提升第 4 类胚性愈伤的比率方面效果有限。其中，T_5 处理(添加 5 $mg·L^{-1}$ VB_1)的第 4 类愈伤诱导率最高，达到 6.74%，相比对照组(CK)提高了 3.2 倍，但诱导水平仍偏低，需进一步优化(图 2)。

第 2 轮试验测试了不同的蔗糖与水解酪蛋白比例(T_{19}～T_{21})、NAA(T_{22}～T_{24})、KT(T_{25}～T_{27})、葡萄糖(T_{28}～T_{30})、精胺(T_{31}～T_{33})和麦草畏(T_{34}～T_{37})对愈伤组织诱导的影响,旨在探索更高效的添加物。结果表明,添加麦草畏对第 4 类胚性愈伤的诱导有极显著的促进作用。尤其在 T_{36}处理(2 mg·L^{-1}麦草畏)下,第 4 类胚性愈伤的诱导率达到了 19.65%。此外,T_{35}(1 mg·L^{-1}麦草畏)和 T_{37}(4 mg·L^{-1} 麦草畏)处理的胚性愈伤诱导率也分别达到了 18.22% 和 15.59%,显著优于其他所有处理。这表明,麦草畏是诱导日本结缕草胚性愈伤的关键高效添加物(图 3)。

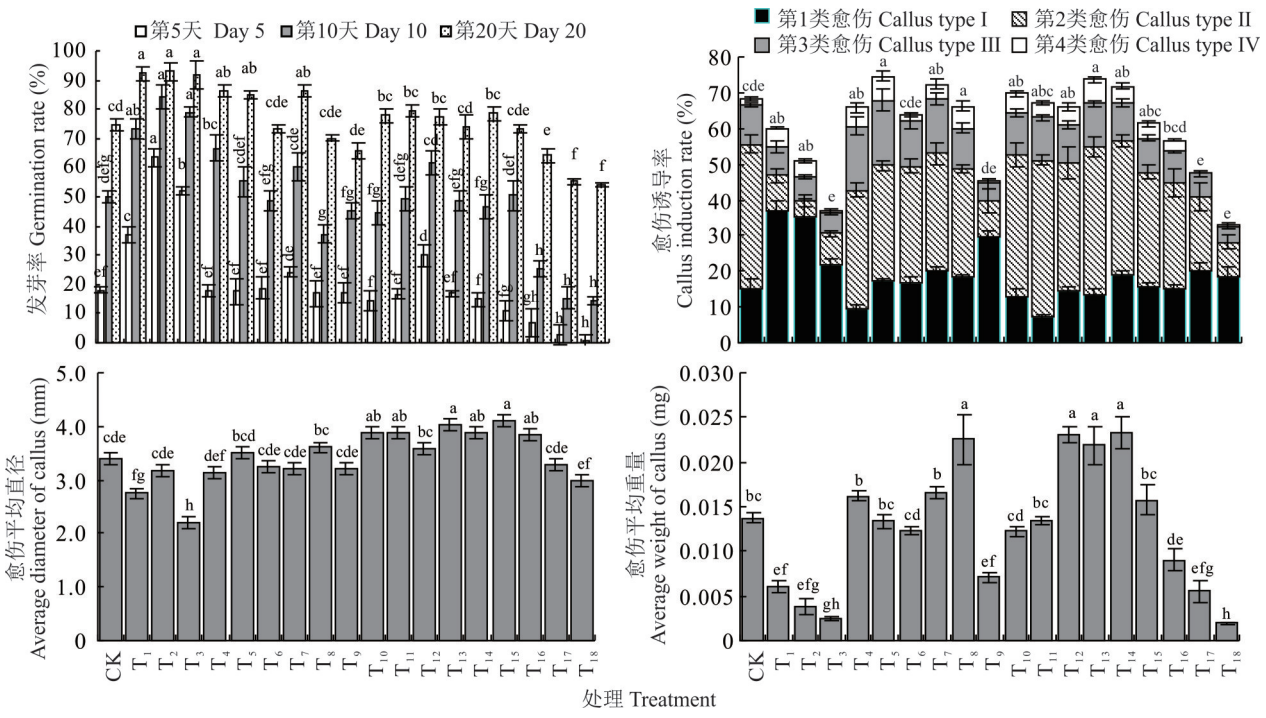


图 2　第 1 轮单因素试验:不同添加物对日本结缕草'Zenith'种子发芽及愈伤诱导和生长的影响

Fig. 2　Single-factor experiment 1: Effects of different additives on germination rate, callus induction and growth of *Z. japonica* cv. 'Zenith' seeds

不同小写字母表示不同处理间结缕草种子平均发芽率(A)、第 4 类愈伤平均诱导率(B)、愈伤平均直径(C)以及愈伤平均重量(D)存在显著性差异($P<0.05$),下同。Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) among different treatments in the mean *Z. japonica* seed germination rate (A), mean type Ⅳ callus induction rate of type Ⅳ (B), mean callus diameter (C), and mean callus weight (D). The same below.

2.3.2　胚性愈伤诱导培养基的最终优化　　基于麦草畏的优异表现,以"IM+2 mg·L^{-1}麦草畏"为新的基础培养基,对在初筛中表现较好的 $CuSO_4·5H_2O$、α-酮戊二酸和 VB_1进行浓度优化,以期进一步提高胚性愈伤的诱导效率。结果表明(图 4),与对照组相比,添加这 3 种物质均能在不同程度上促进胚性愈伤的形成。其中,对第 4 类愈伤而言,α-酮戊二酸的效果最为突出,在添加浓度为 25 mg·L^{-1}(L_5)时,胚性愈伤的比例实现了 62.38% 的增幅。其次是 VB_1,在添加浓度为 5 mg·L^{-1}(L_{10})时增幅为 39.81%。$CuSO_4·5H_2O$ 的作用相对较弱。综合比较,L_5(IM+2 mg·L^{-1}麦草畏+25 mg·L^{-1} α-酮戊二酸)是诱导日本结缕草胚性愈伤的较优培养基配方。

2.4　愈伤组织继代培养中常见问题的应对策略

在继代培养过程中,愈伤组织普遍存在早熟分化(37.33%)、褐化(30.00%)和污染(10.00%)等问题,导致可用的胚性愈伤比例仅为 22.67%(图 5)。

2.4.1　早熟分化的抑制　　为抑制早熟分化,添加了不同浓度的 ABA 进行试验。结果(图 6)表明,添加 0.05 mg·L^{-1}的 ABA 能显著降低早熟分化率,同时将保持胚性性状的愈伤比例提升至 40% 以上。

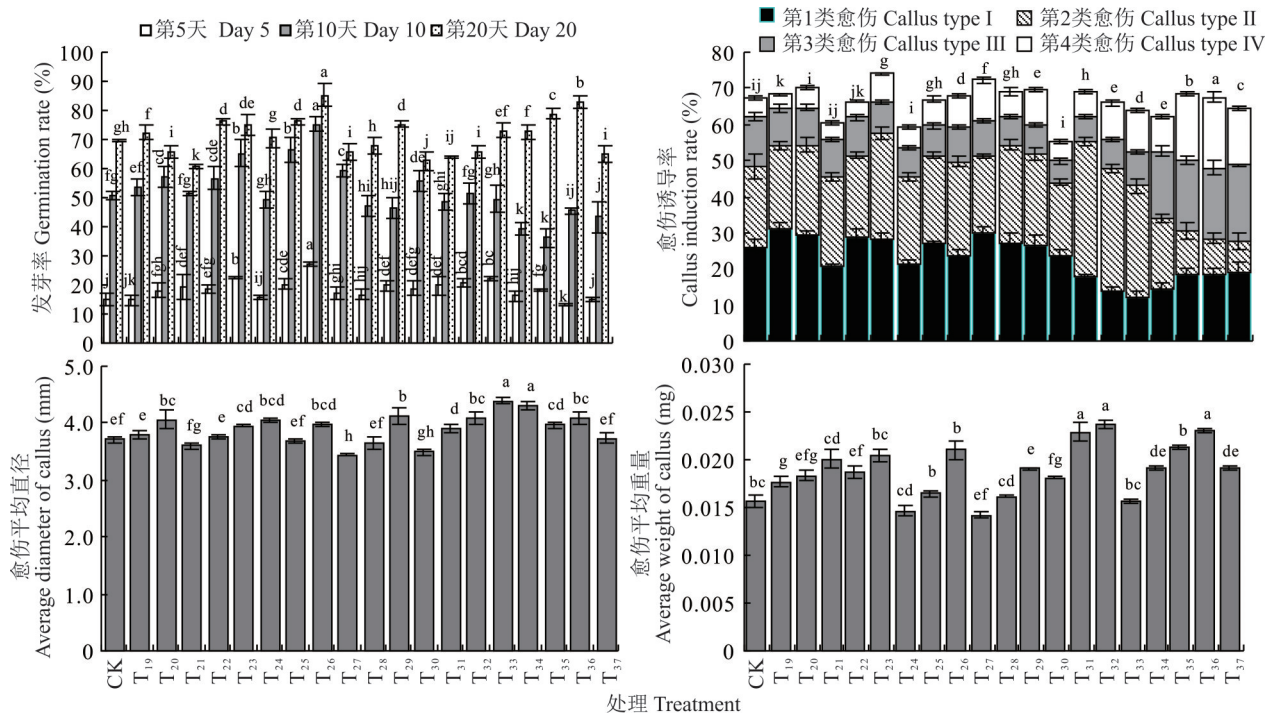


图3 第2轮单因素试验:不同添加物对日本结缕草'Zenith'种子发芽及愈伤诱导和生长的影响

Fig. 3 Single-factor experiment 2: Effects of different additives on germination rate, callus induction and growth of *Z. japonica* cv. 'Zenith' seeds

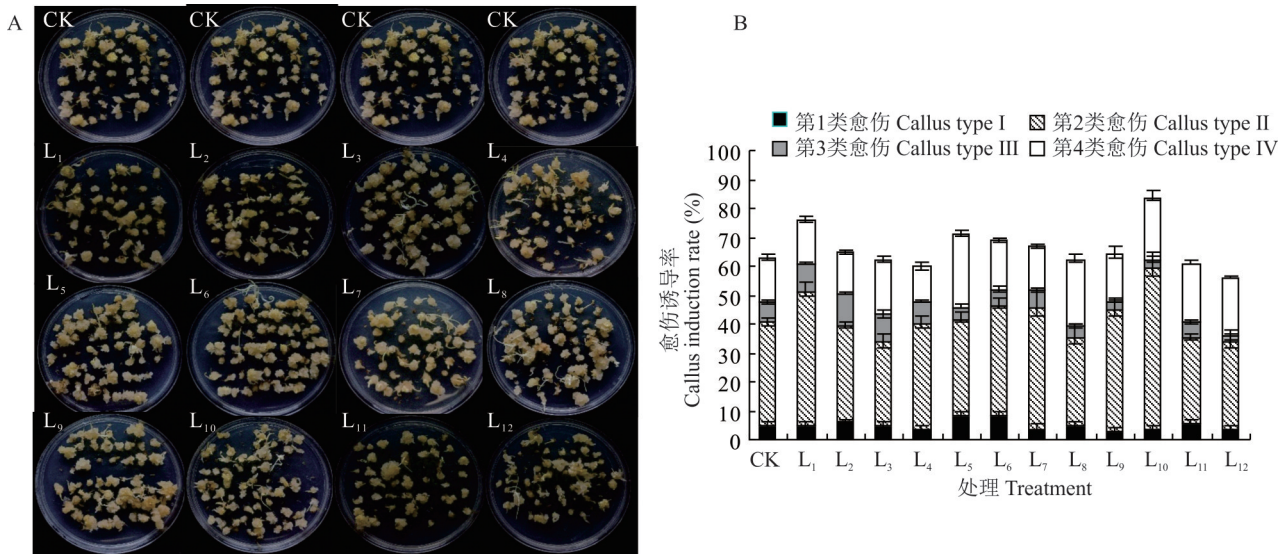


图4 第3轮单因素试验:不同添加物对日本结缕草'Zenith'种子愈伤诱导的影响

Fig. 4 Single-factor experiment 3: Effects of different additives on callus induction in *Z. japonica* cv. 'Zenith' seeds

A:不同处理下的愈伤状况;B:不同处理对4类愈伤诱导率的影响。A: Callus status under different treatments; B: The effect of different treatments on the induction rates of 4 types of callus.

2.4.2 愈伤组织褐化的抑制 针对褐化问题,测试了6种抗褐化剂的效果(图7)。结果显示:PVPP在2~16 g·L^{-1}的浓度范围内均加剧了愈伤组织的褐化。PVP、AC、$AgNO_3$、VC和CA在较低浓度下均能有效抑制褐化。其中,抑制效果最佳的浓度分别为PVP 4 g·L^{-1}、AC 1 g·L^{-1}、$AgNO_3$ 0.001 g·L^{-1}、VC 0.1 g·L^{-1}和CA 0.1 g·L^{-1}。

2.5 高效再生体系的建立

通过上述系统优化,最终建立了一套完整、高效的日本结缕草'Zenith'植株再生体系(图8),涵盖了从种子到

胚性愈伤诱导(图 8A)、继代扩繁(图 8B)、植株分化(图 8C)、生根(图 8D)及炼苗移栽(图 8E)的全过程。

3　讨论

3.1　日本结缕草愈伤诱导体系的建立与优化

建立稳定、高效的植株再生体系是植物遗传转化的前提,其核心在于对培养基各组分,尤其是激素和关键添加物的系统优化。前人对日本结缕草的组织培养进行了诸多有益探索。例如,赵俊侠等[7]和朱晓花[8]的研究均表明结缕草愈伤诱导的最佳培养基为 MS+2.0 mg·L^{-1} 2,4-D;张俊卫等[9]研究发现日本结缕草愈伤组织诱导的最佳培养基为 ND+3.0 mg·L^{-1} 2, 4-D+0.2 mg·L^{-1} NAA+500 mg·L^{-1} 脯氨酸(proline,Pro),愈伤组织诱导率达 57.3%;贺杰[3]以结缕草的成熟胚为外植体诱导愈伤,其研究表明在 MS+2 mg·L^{-1} 2,4-D+4 mg·L^{-1} VB_1的培养基中,诱导率为 43.20%,但愈伤组织质量较差,继代时添加低浓度的 6-BA 可显著改善愈伤质量;樊晓莉[10]的研究认为日本结缕草愈伤组织诱导的最佳激素组合为 2.0～3.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.01～0.02 mg·L^{-1} 6-BA,继代培养基中适当降低 2,4-D 浓度和添加 0.5 mg·L^{-1} KT 有利于愈伤组织的保存。

本研究在前人工作的基础上,以广泛应用的 MS+2.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.2 mg·L^{-1} 6-BA 为基础培养基,通过 3 轮单因素试验,系统评估了多种外源添加物对'Zenith'品种胚性愈伤诱导的影响,取得了关键性突破。首先,本研究首次证实了麦草畏在日本结缕草胚性愈伤诱导中的高效能。麦草畏作为一种激素型除草剂,可打破杂草的激素平衡,导致其发育畸形,细胞分裂、伸长和分化不规律,从而干扰植物的正常生长[11]。在本试验中,2 mg·L^{-1}的麦草畏处理将胚性愈伤(第 4 类愈伤)的诱导率提升至 19.65%,其效果远优于其他所有初筛添加物。这一发现与 Mendoza 等[12]在小麦(*Triticum aestivum*)愈伤组织培养中的研究结果高度一致,他们同样观察到麦草畏相比于传统的 2,4-D 具有更优的愈伤诱导效果。其次,本研究阐明了 α-酮戊二酸、VB_1及微量元素 Cu^{2+}在优化培养体系中的协同促进作用。在确定麦草畏为核心添加物后,本研究进一步优化发现,额外添加 25～50 mg·L^{-1}的 α-酮戊二酸能使黄色胚性愈伤的比例大幅增加 66.68%。α-酮戊二酸是三羧酸循环的关键代谢中间产物,直接关联细胞的能量供应和碳氮代谢。Yoshito 等[13]的研究也曾指出,α-酮戊二酸能够显著促进日本结缕草种子形成胚状芽组织。这表明,在外源激素启动脱分化的同时,供给关键代谢中间物,能够为胚性细胞的快速增殖提供充足的物质与能量基础。此外,本研究也验证了 VB_1和 $CuSO_4·5H_2O$ 的积极作用,这与前人关于 VB_1对愈伤诱

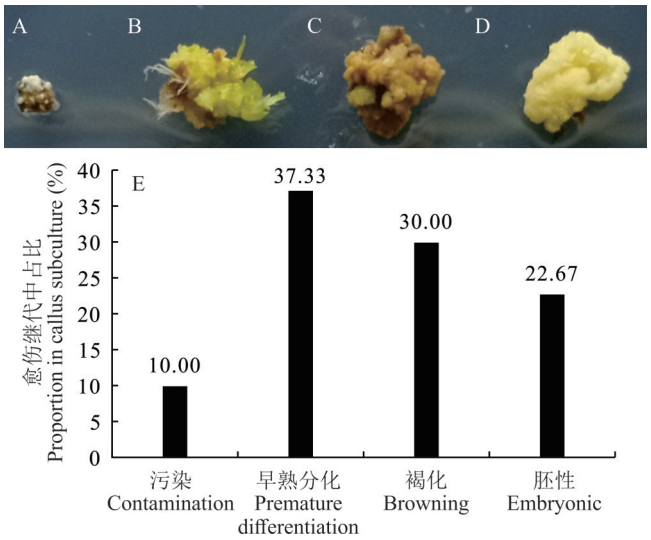


图 5　日本结缕草'Zenith'愈伤继代培养中的早熟分化、褐化及污染问题

Fig. 5　Incidence of premature differentiation, browning and contamination in callus subculture of *Z. japonica* cv. 'Zenith'

A:污染;B:早熟分化;C:褐化;D:保持胚性的愈伤;E:愈伤继代中 4 类愈伤的占比情况。A: Contamination; B: Premature differentiation; C: Browning; D: Embryonic callus; E: Proportion of four types of callus during the callus subculture.

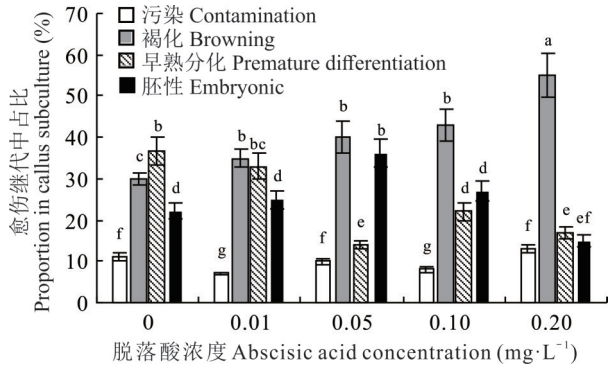


图 6　不同浓度脱落酸对结缕草愈伤组织生长的影响

Fig. 6　Effects of different concentrations of abscisic acid on callus growth in *Z. japonica*

不同小写字母表示添加不同浓度脱落酸后 4 种愈伤在愈伤继代过程中的占比之间差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) in the proportions of the four callus types during subculture after adding different concentrations of abscisic acid.

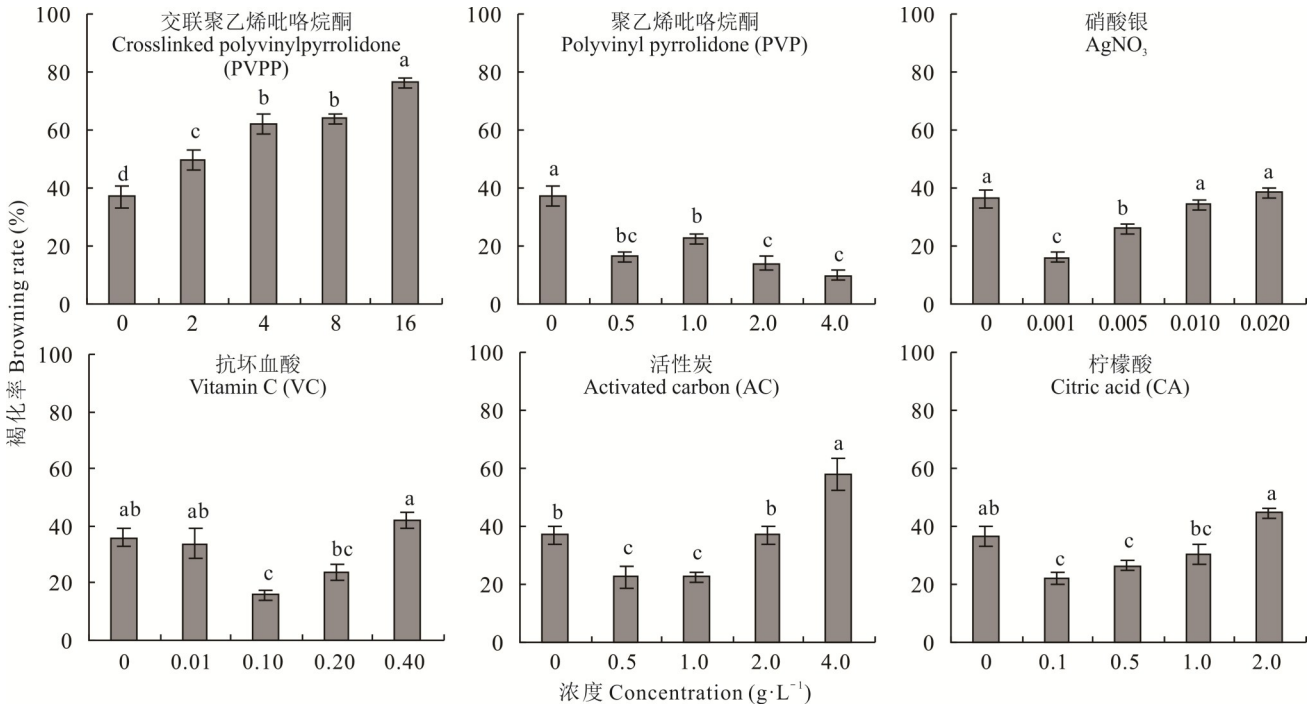


图7 6种抗褐化剂对日本结缕草'Zenith'继代愈伤褐化率的抑制效果比较

Fig. 7 Comparison of inhibitory effects of six anti-browning agents on browning rate of subcultured callus in *Z. japonica* cv. 'Zenith'

不同小写字母表示各浓度间差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters meant significant differences among different concentrations at the 0.05 level.

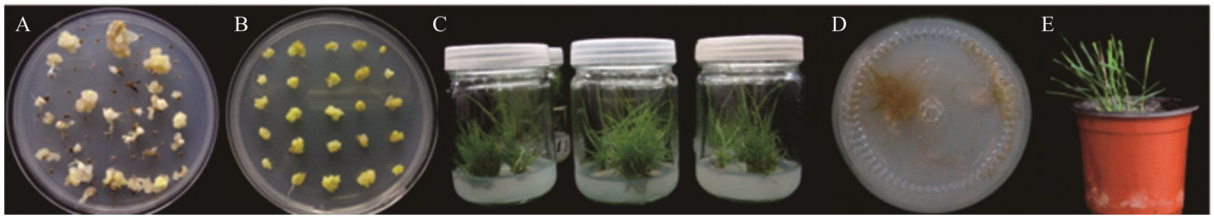


图8 日本结缕草'Zenith'胚性愈伤组织诱导和植株再生体系

Fig. 8 Embryogenic callus induction and plant regeneration system in *Z. japonica* cv. 'Zenith'

A:愈伤诱导;B:愈伤继代;C:愈伤分化;D:植株生根;E:植株移栽。A: Callus induction; B: Callus subculture; C: Callus differentiation; D: Plant rooting; E: Plant transplantation.

导至关重要以及铜元素在一定浓度下能促进愈伤生长发育的报道相符。值得注意的是,本研究发现$CuSO_4·5H_2O$在浓度超过20 mg·L^{-1}时表现出抑制效应,这与邵丽达等[14]在沟叶结缕草中的研究结果一致,说明其促进作用具有严格的浓度依赖性。

3.2 愈伤组织继代过程的优化

愈伤组织褐化是植物组培继代过程中限制再生效率的普遍障碍,其生化基础是酚类物质在多酚氧化酶(polyphenol oxidase,PPO)等作用下氧化形成醌类物质,进而导致组织坏死[15]。本研究中,对照组的愈伤在继代25 d后褐化率高达37.5%,严重影响了可用受体材料的获取。因此,本研究系统评估了6种常用抗褐化剂,并对其作用机制进行了探讨。PVPP、PVP和AC属于无机吸附剂,PVPP、PVP能够在酚类物质被氧化前将其吸附从而抑制褐化[16],而AC则会无选择性地吸附酚类、醌类物质及培养基中的外源激素[17]。本研究发现,PVP和低浓度的AC(0.5~1.0 g·L^{-1})均能有效抑制褐化,其中4 g·L^{-1} PVP处理下的褐化率仅为10.41%,效果显著,这与饶慧云[18]在葡萄(*Vitis vinifera*)上的研究结果一致。然而,PVPP在本试验体系中反而加剧了褐化,这可能是由于浓度过高或物种特异性所致,部分研究也曾报道PVP/PVPP在紫花苜蓿(*Medicago sativa*)和红豆草(*Onobrychis*

viciifolia)中效果不佳甚至起反作用[19]。$AgNO_3$作为乙烯作用的抑制剂,能有效缓解由乙烯积累引发的胁迫性褐化。本试验发现,低浓度的$AgNO_3$(0.001～0.005 g·L^{-1})可显著降低褐化率,但浓度升高则会加剧褐化。这种典型的低促高抑现象,与在紫花苜蓿、三叶草(*Trifolium repens*)等多种牧草愈伤组织中的研究结果完全吻合[19],其原因可能是高浓度的银离子对细胞产生了毒害作用。抗氧化剂VC和CA则通过自身的还原性或抑制PPO活性来减轻褐化。本研究结果表明,低浓度的VC(0.1～0.2 g·L^{-1})和CA(0.1～0.5 g·L^{-1})均能显著缓解褐化现象,这与在紫丁香(*Syringa oblata*)[20]上的研究结论相符。同样,这两种物质在浓度过高时也表现出抑制作用,再次证明了筛选最佳应用浓度的重要性。

4　结论

综上所述,本研究成功优化了日本结缕草'Zenith'品种的高效组织培养与植株再生体系。主要成果包括:确定了诱导胚性愈伤组织的最优培养基配方,明确了第4类(淡黄色、致密颗粒状)愈伤作为高分化潜能(82.67%)的理想受体;验证出添加0.05 mg·L^{-1} ABA可有效抑制愈伤组织早熟分化;并筛选出$AgNO_3$、VC和CA等添加剂对抑制愈伤褐化具有显著效果。该体系为日本结缕草的遗传改良提供了可靠的技术支撑。

参考文献 References:

[1] Wu C F, Ma X M. Present situation and development of turf grass industry in the 21st century in China. Tianjin Agricultural Sciences, 2009, 15(3): 74－77.
吴朝峰, 马雪梅. 21世纪中国草坪业的现状与发展. 天津农业科学, 2009, 15(3): 74－77.

[2] Ma L X, Zhao L P. Study on callus induction and plant regeneration of *Zoysia macrostachya* Franch et. Sav. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2016, 38(9): 15－18.
马龙雪, 赵丽萍. 大穗结缕草愈伤组织诱导及植株再生研究. 黑龙江农业科学, 2016, 38(9): 15－18.

[3] He J. Study on culture and regeneration of *Zoysia japonica* Steud. and its genetic transformation. Hainkou: Hainan University, 2005.
贺杰. 结缕草组织培养再生体系建立及转基因研究. 海口:海南大学, 2005.

[4] Du M H, Liang Z A, Zhang N Q, *et al*. Tissue culture and rapid propagation technique of *Zoysia sinica* Hance meristem. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2007, 29(4): 533－538.
杜敏华, 梁子安, 张乃群, 等. 中华结缕草茎尖的组织培养和快繁技术研究. 江西农业大学学报, 2007, 29(4): 533－538.

[5] Inokuma C, Sugiura K, Cho C, *et al*. Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass. Plant Cell Reports, 1996, 15: 737－741.

[6] Dhandapani M, Hong S B, Aswath C R, *et al*. Regeneration of zoysia grass (*Zoysia matrella* L. Merr.) cv. *Konhee* from young inflorescences and stem nodes. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2008, 44: 8－13.

[7] Zhao J X, Chen G, Xia G X, *et al*. High efficient system establishment of plant regengation in *Zoysia japonica*. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(6): 970－972.
赵俊侠, 陈耕, 夏桂先, 等. 结缕草高效再生体系的建立. 山西农业科学, 2019, 47(6): 970－972.

[8] Zhu X H. The establishment of regeneration system and mutants selection of turf grass (*Zoysia* spp). Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009.
朱晓花. 结缕草再生体系的建立及诱导突变体筛选. 兰州:甘肃农业大学, 2009.

[9] Zhang J W, Tang Q, Bao M Z. Studies on plant regeneration system of *Zoysia japonica* from mature seed. Acta Prataculturae Sinica, 2005, 14(2): 48－51.
张俊卫, 唐蜻, 包满珠. 日本结缕草植株再生体系的研究. 草业学报, 2005, 14(2): 48－51.

[10] Fan X L. Optimization of plant regeneration system and primary studies on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Zoysia japonica*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005.
樊晓莉. 日本结缕草植株再生体系优化及根癌农杆菌介导的遗传转化的初步研究. 武汉: 华中农业大学, 2005.

[11] Tian L, Tan H J. Recent review of production and development on dicamba. World Pesticide, 2010, 32(6): 18－20.
田琳, 谭海军. 麦草畏的生产及发展概述. 世界农药, 2010, 32(6): 18－20.

[12] Mendoza M G, Kaeppler H F. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2002, 38(1): 39－45.

[13] Yoshito A, Hiroshi K, Chie I, *et al*. Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. Journal of Plant Physiology, 1996, 149(314): 413－417.

[14] Shao L D, Wu Y G, Bi B, *et al*. The responses of callus growth and plant regeneration of *Zoysia matrella* to copper stress. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(1): 161－168.
邵丽达, 吴艳歌, 毕波, 等. 沟叶结缕草愈伤组织生长及再生对铜胁迫的响应. 核农学报, 2015, 29(1): 161－168.

[15] Guo Y, Yang H L. Advances in studies on browning in plant tissue culture. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2009, 37(7): 14－16.
郭艳, 杨海玲. 植物组织培养中的褐化现象及解决途径. 山西农业科学, 2009, 37(7): 14－16.

[16] Li J, Wang S T, Zhou Q, *et al*. Preliminary analysis on browning mechanism of *Juglans mandshurica* stem in tissue culture. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(24): 8239－8244.
李佳, 王斯彤, 周强, 等. 胡桃楸组培过程中茎段褐化机理初步分析. 分子植物育种, 2021, 19(24): 8239－8244.

[17] Dai Y, Yang S H, Zhao H Z, *et al*. Research progress on browning phenomenon in tissue culture of medicinal plants. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(2): 344－351.
戴莹, 杨世海, 赵鸿峥, 等. 药用植物组织培养中褐化现象的研究进展. 中草药, 2016, 47(2): 344－351.

[18] Rao H Y. Effect of browning inhibitors on callus subculture of phenolic compounds enzyme and gene expression of grape. Plant Physiology Journal, 2015, 51(8): 1322－1330.
饶慧云. 抗褐化剂对葡萄愈伤组织继代培养过程中酚类物质相关酶及其基因表达的影响. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1322－1330.

[19] Chen A P, Feng W W, Liu Y K. Anti-browning agents affecting callus subculture of three legume forage species. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(22): 138－144.
陈爱萍, 冯维卫, 刘允康. 3种豆科牧草愈伤组织继代培养抗褐化的研究. 中国农学通报, 2017, 33(22): 138－144.

[20] Guo C Z. Optimization of callus induction conditions and anti-browning of *Syringa oblata* by response surface methodology. Seed, 2021, 40(8):141－145.
郭彩珍. 响应面法优化紫丁香愈伤组织诱导条件及防褐化研究. 种子, 2021, 40(8): 141－145.