

文章编号:1673-5021(2007)04-0045-05

# 多年生黑麦草高频再生体系的建立及优化

蔡 能, 易自力, 陈智勇, 刘清波, 蒋建雄\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 从外植体预处理方式、基本培养基、激素浓度等方面着手, 对多年生黑麦草愈伤组织诱导、继代、不定芽分化及再生过程中的影响因素进行了研究, 提高了再生频率。结果如下: 切取胚端半粒种子, 经 75% 乙醇处理 1min, 0.1% HgCl 处理 15min, 在经无菌水清洗 4~6 次后接种方式较好; 愈伤组织诱导培养基以 MS+ 2,4-D 8.0 mg/L (或另添加甘露醇 25 g/L) 为佳; 愈伤组织接种于 MS+ 2,4-D 8.0mg/L+甘露醇 25 g/L 上进行 1~2 次继代后于 NB+6-BA2.0 mg/L 上进行分化; 不定芽转接至 MS+6-BA2.0 mg/L 上进行扩繁或于 1/2MS+ NAA0.5mg/L+IAA0.5mg/L 上进行生根。

**关键词:** 多年生黑麦草; 组织培养; 愈伤组织诱导; 植株再生; 不定芽

**中图分类号:** Q943.1      **文献标识码:** A

草坪是园林绿化的重要组成部分, 它在保护和美化环境、防止尘土飞扬和水土流失、调节小气候、净化空气、减轻噪音和维护生态平衡等方面具有重要作用; 另外还是陶冶情操、健康休闲和娱乐的场所。随着我国城市化进程加快、城市绿化标准提升以及城市面积大幅度增长, 造成对草坪的巨大需求, 草坪事业得到了空前的发展, 种植面积逐年上升, 对高质量草坪的需求越来越大。我国常年从国外进口草种, 但许多国外草种不太适应我国的气候条件, 抗性弱、绿期短。为了选育适合我国气候条件的优良草坪草新品系, 草坪工作者进行了大量的研究, 工作主要集中在通过基因工程手段对草坪草的抗性进行改良。为了获得较高的转化效率, 首先必须建立草坪草的高频再生体系, 找到适合进行转基因操作的受体。因此, 我们对高羊茅 (*Festuca arundinacea*)、匍匐翦股颖 (*Agrostis stolonifera*)、早熟禾 (*Poa pratensis*)、多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 等植物的多个品种进行了胚性愈伤组织的诱导和植株再生方面的研究, 本文仅对多年生黑麦草不同品种再生体系的建立和优化进行阐述。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试材料为多年生黑麦草品种爱神特 (Accent)、凯蒂莎 (Caddieshack)、夜影 (Evening Shade)、新速 II (Nuspeed II)、卡特 (Cutter)、匹克威 (Pickwick)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 外植体

颖果和胚端半粒种子。挑选饱满的种子, 将无胚的一端切除, 剩余的胚端半粒种子作为诱导愈伤组织的外植体。

#### 1.2.2 外植体的消毒预处理

I: 颖果, 75% 乙醇 1min, 0.1% 升汞 15min。

II: 颖果, 75% 乙醇 1min, 0.1% 升汞 15min, 浸种待种子露白后切除半截胚乳。

III: 胚端半粒种子, 75% 乙醇 1min, 0.1% 升汞 15min。

IV: 胚端半粒种子, 75% 乙醇 1min, 浓盐酸 1min, 0.1% 升汞 15min。

V: 胚端半粒种子, 75% 乙醇 1min, 0.1% 硫酸铜溶液 1min, 0.1% 升汞 15min。

#### 1.2.3 培养基及培养条件

MS<sup>[1]</sup>: 添加蔗糖 30g/L, 琼脂 8 g/L。

NB<sup>[2]</sup>: N6 大量, B5 微量, B5 有机, MS 铁盐, 脯氨酸 0.5 g/L, 水解酪蛋白 300mg/L, 蔗糖 30g/L, 琼脂 8 g/L。

CC<sup>[3]</sup>: CC 基本营养成分, 甘露醇 25 g/L, 麦芽

\* 通讯作者, E-mail: jxjiang2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-20; 修回日期: 2007-04-23

基金项目: 湖南省自然科学基金项目“抗旱、抗除草剂目的基因转化草坪草获得转基因新材料的研究”(05JJ30036) 和湖南省教育厅科学研究重点项目“转抗旱、抗除草剂双价基因冷季型草坪草新品系的培育”(05A022) 资助

作者简介: 蔡能 (1977-), 女, 湖南益阳人, 在读博士研究生, 研究方向为植物遗传学, 发表论文 7 篇, E-mail: nengcai@163.com.

糖 20g/L, 琼脂 8 g/L。

MB, MS 大量, B5 微量, B5 有机, MS 铁盐, 脯氨酸 0.5 g/L, 水解酪蛋白 300mg/L, 麦芽糖 30g/L, 琼脂 8 g/L。

诱导培养基为基本培养基添加 2.0mg/L、3.0mg/L、4.0mg/L、5.0mg/L、6.0mg/L、7.0mg/L、8.0mg/L 的 2,4-D; 分化培养基为基本培养基添加 2.0 mg/L 的 6-BA; 生根培养基为 1/2MS + NAA0.5mg/L + IAA0.5mg/L; 培养基 pH 值为 5.8~6.2。

培养条件: 愈伤组织诱导暗培养; 分化和生根光照 2500lx, 10h/d; 培养温度(25±2℃)。

### 1.3 数据处理

出芽率 = (出芽数/接种外植体数) × 100%

愈伤组织诱导率(出愈率) =  $\frac{\text{诱导出愈伤组织的外植体数}}{\text{接种的外植体总数}} \times 100\%$

愈伤分化率 =  $\frac{\text{有芽形成的愈伤组织块数}}{\text{接种的愈伤组织总块数}} \times 100\%$

生根率 =  $\frac{\text{有根形成的不定芽}}{\text{接种的不定芽总数}} \times 100\%$

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体处理方式对愈伤组织诱导的影响

将胚端半粒种子和完整种子经不同方式处理后, 接到 CC+2,4-D4.0 mg/L 培养基中诱导愈伤组织。就出愈时间而言, IV 号处理外植体发芽最早, 接种 2d 后便有 50% 发芽, 长出毛状根, 4d 后便开始可见愈伤组织; I、III、V 号处理的外植体 3d 后开始发芽并长出毛状根, 但 8~10d 后才开始出愈; II 号处理的外植体 2d 后露白。从愈伤诱导率和愈伤组织质量来看, II 号处理后愈伤诱导率最高; IV 号处理后愈伤诱导率次之, 但诱导的愈伤组织直径较小, 只有 2~3mm 左右; 而完整种子愈伤诱导率最低(见表 1)。

表 1 不同外植体预处理方式对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of pretreatment to explants on callus induction of *Lolium perenne*

品种 Variety	外植体预处理方式 Pretreatment method	外植体数 Number of explants	发芽数 Number of germinated explants	发芽率 Germination rate	出愈数 Number of callus	出愈率 Callus inducing ratio
爱神特 Accent	I	160	154	96.25%	26	16.25%
	II	138	129	93.48%	83	60.14%
	III	191	185	96.86%	100	52.36%
	IV	178	170	95.51%	104	58.43%
	V	180	173	96.11%	84	46.67%

### 2.2 2,4-D 浓度对不同品种愈伤组织诱导率的影响

在 CC 培养基中添加不同量的 2,4-D, 使终浓度分别达到 2.0mg/L、3.0mg/L、4.0mg/L、5.0 mg/L、6.0mg/L、7.0mg/L、8.0mg/L, 接种外植体诱导愈伤, 结果见表 2。在供试的 6 个品种中, 随着 2,4-D 浓度的增加, 发芽率并没有显著降低, 因此

使用较高浓度的 2,4-D 不会影响总的愈伤诱导。当 2,4-D 浓度较低时, 长出的芽很长, 10d 以后才开始出愈, 愈伤诱导率也低; 随着 2,4-D 浓度的增加, 7~8d 就可以出愈, 10~14d 出愈率超过 50%, 愈伤组织诱导率也呈上升趋势, 其中以新速 II 增幅最快。从整体上看, 凯蒂莎速度最快, 匹克威速度较慢。

表 2 2,4-D 浓度对不同品种愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of concentration of 2,4-D on callus induction of different varieties

2,4-D 浓度(mg/L) Concentration of 2,4-D	诱导率(%) Callus inducing ratio					
	爱神特 Accent	凯蒂莎 Caddieshack	新速 II Nuspeed II	夜影 Evening Shade	卡特 Cutter	匹克威 Pickwick
2.0	30.25	25.00	15.72	44.37	26.38	38.98
3.0	29.94	45.10	24.65	60.96	34.12	49.50
4.0	49.10	56.99	35.93	72.34	48.79	56.00
5.0	59.63	63.53	57.46	73.68	55.74	65.83
6.0	70.55	74.44	71.69	83.82	73.97	81.71
7.0	80.52	77.17	79.34	85.16	78.26	83.50
8.0	82.72	83.16	83.96	88.57	88.41	89.80

### 2.3 外植体在不同基本培养基上诱导愈伤组织的情况

从表 3 可以看出,以 MS、NB、CC、MB 为基本培养基,添加 2,4-D 后进行愈伤组织诱导。从 4 个供试品种愈伤诱导率来看,从低至高排列顺序均

为 MB、NB、CC、MS;NB 培养基上发芽率最高,但是诱导率很低,诱导的愈伤组织毛状根很多,而愈伤很小;CC 培养基上不仅愈伤组织诱导率比 MS 上的低,而且愈伤组织较小,直径只有 3mm 左右,而 MS 上的愈伤组织直径有 5~6mm(图 1-A)。

表 3 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of media on the callus induction of *Lolium perenne*

品种 Variety	基本培养基 Basal medium	外植体数 Number of explants	发芽外植体数 Number of germinated explants	发芽率 Germination rate	出愈外植体数 Number of callus	愈伤诱导率 Callus inducing ratio
爱神特 Accent	MS	139	126	90.65%	104	74.82%
	NB	141	137	97.16%	67	47.52%
	CC	142	130	91.55%	97	68.31%
	MB	107	105	98.13%	35	32.71%
凯蒂莎 Caddieshack	MS	103	96	93.20%	70	67.96%
	NB	124	121	97.58%	67	54.03%
	CC	107	104	97.20%	66	61.68%
	MB	104	97	93.27%	40	38.46%
夜影 Evening Shade	MS	108	100	92.59%	80	74.07%
	NB	117	114	97.44%	56	47.86%
	CC	108	99	91.67%	68	62.96%
新速 II Nuspeed II	MS	122	107	87.70%	43	35.25%
	MS	113	105	92.92%	88	77.88%
	NB	148	144	97.30%	71	47.97%
	CC	107	102	95.33%	59	55.14%
	MB	105	98	93.33%	37	35.24%



图 1 愈伤组织的诱导、继代和芽的分化

Fig. 1 Induction, regeneration of calli and differentiation of adventitious buds

A 为不同基本培养基上诱导的愈伤组织,左为 MS,右为 CC;B 为继代后的愈伤组织,淡黄色的为胚性愈伤组织;C 为愈伤组织上分化出不定芽。  
A. Calli on different media(Left: MS, Right: CC); B. Embryonic calli cultured several times; C. Adventitious buds on differentiation medium.

### 2.4 不同基本培养基对愈伤组织分化不定芽的影响

诱导的愈伤组织在原培养基上进行继代培养,逐渐出现了淡黄色、质地致密、颗粒状堆积的胚性愈伤组织(图 1-B)。通过选用不同的基本培养基进行凯蒂莎、新速 II 号、夜影 3 个品种愈伤组织的分化,4 种培养基的效果基本一致,最好的培养基为 MS 培养基和 NB 培养基,分化率均在 85% 以上,而 CC 培

培养基和 MB 培养基分化率较低,只有 50%~60%。MS 培养基上不定芽较粗壮,颜色深绿,丛芽数较稀疏;NB 培养基上不定芽较纤细,颜色较浅,但丛芽数多而密;CC 培养基和 MB 培养基上愈伤组织分化不定芽分化速度和不定芽生长速度慢,苗高度较低(图 1-C)。

### 2.5 生根和移栽

多年生黑麦草试管苗根的诱导较为容易,即使在未添加生长素的不定芽分化和继代培养基上也会有不定根的生成,尤其是在不定芽继代过程中,不定根的生成量更多,这些试管苗长到一定高度便可以直接进行移栽,移栽成活率在99%以上。而在培养基中添加0.5mg/L的NAA和IAA,对于不定根的诱导更为有利。试管苗长到6~10cm左右即可进行移栽,将试管苗小心取出,洗净琼脂,可以不经炼苗直接移栽至泥土:细河沙为3:1的土壤中,浇足定根水,移栽成活率可以达到98%~100%。

### 3 讨论

#### 3.1 外植体的选择及预处理

在多年生黑麦草再生体系的研究中,当取成熟种子为材料时,多以带颖壳的种子作为外植体<sup>[4~7]</sup>,或将颖壳剥离<sup>[8]</sup>,或剥取胚<sup>[7]</sup>。本实验中直接用颖果接种愈伤组织诱导率很低,与张振霞等人的研究结果一致<sup>[5~7]</sup>。如果先将颖果浸泡待露白后再切除胚乳接种,愈伤诱导率显著提高,但是此项操作比较麻烦,容易引起污染,而且种子在清水中浸泡时间较长,对种子发芽及愈伤诱导不利。用浓盐酸预处理外植体能提早发芽和出愈时间,但是愈伤组织颗粒较小,生长缓慢,这说明盐酸处理仍对外植体产生伤害,影响愈伤组织生长状况。用0.1%的硫酸铜溶液处理胚端半粒种子,愈伤诱导率反而比不处理的要低,可能是硫酸铜溶液对外植体有损害作用。以胚端半粒种子作为外植体诱导愈伤组织,诱导率比以颖果为外植体的高出35%以上,愈伤组织颗粒较大,此方法比先浸泡再切取的方式以及颖壳剥离和剥取胚的方式简便,操作更容易,污染少,是外植体预处理方式中较为理想的一种,与陈智勇进行高羊茅愈伤组织诱导的结果一致<sup>[9]</sup>。

#### 3.2 培养基成分对愈伤组织诱导的影响

2,4-D对禾本科植物愈伤组织的诱导具有重要作用,一般在一定的浓度范围内随着2,4-D浓度的增加诱导率增高<sup>[10,11]</sup>。本实验中诱导多年生黑麦草愈伤组织,2,4-D浓度用到了8mg/L。从MS和CC培养基上诱导出的愈伤组织,除了在直径上能够看出明显差异外,愈伤组织均为淡黄色、质地松软,没有明显区别。在与诱导培养基相同的培养基上,经过1~2次继代后却能发现,除了在生长速度上有差异外,愈伤组织的颜色和质地也有明显差异:CC培养基上的愈伤生长缓慢,但是愈伤颜色较

为鲜黄,质地更为致密;MS培养基上的愈伤生长较快,但是愈伤颜色较浅,质地较疏松。而我们在MS培养基上添加25g/L的甘露醇,发现愈伤不但生长较快,而且颜色和质地都有所改善,这说明甘露醇有利于愈伤组织的质量提高,可能是甘露醇维持了培养基中的高渗透压,从而使愈伤生长更为致密。而易自力等在进行水稻愈伤组织诱导时,添加了甘露醇的CC培养基上愈伤组织比MS和NB培养基上的在颜色和质量上都要好<sup>[12]</sup>。因此,我们在后来的实验中都采用了添加甘露醇的MS培养基。

#### 3.3 愈伤组织分化不定芽

在愈伤组织分化不定芽时采用MS培养基,分化出的不定芽较粗壮,颜色深绿,丛芽数较稀疏;采用NB培养基,不定芽较纤细,颜色较浅,但丛芽数多而密。因此,为了找到一条更适合分化和丛芽继代的途径,我们采用先在NB培养基上分化不定芽,再将不定芽转接至MS培养基上进行壮苗和生根,这样既可以分化出更多的不定芽,又可以使不定芽长得粗壮,利于移栽后的成活。

综合愈伤组织诱导率、愈伤状态、分化不定芽的状况,我们对多年生黑麦草采用的培养方式为:切取胚端半粒种子经消毒后在培养基MS+2,4-D8.0mg/L(或另添加甘露醇25g/L)上培养一个月诱导愈伤组织,愈伤组织诱导率达87%~92%;将芽和根切除,愈伤组织接种于培养基MS+2,4-D8.0mg/L+甘露醇25g/L上进行1~2次继代;继代后的愈伤组织在培养基NB+6-BA2.0mg/L上分化出不定芽;不定芽转接至培养基MS+6-BA2.0mg/L上进行扩繁或接种于1/2MS+NAA0.5mg/L+IAA0.5mg/L上进行生根;最后进行试管苗的移栽。

#### 参考文献(References):

- [1] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Plant Physiol*, 1962, 15: 473-479.
- [2] Li L C, Qu R D, de Kochko A, Fauquet C, Beachy R N. An improved rice transformation system using the biolistic method[J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 250-255.
- [3] Portrykus I, Harms C T, Lorz H. Callus formation from cell culture protoplasts of corn[J]. *Theor Appl Genet*, 1979, 54: 209-214.
- [4] 冯霞, 孙振元, 韩蕾, 彭镇华. 多年生黑麦草的组织培养和植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(5): 586.

Feng Xia, Sun Zhenyuan, Han Lei, Peng Zhenhua. Tissue

- culture and plantlet regeneration of *Lolium perenne* [J]. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40(5): 586.
- [5] 张振霞, 储成才, 席嘉宾, 陈平. 多年生黑麦草种子愈伤组织诱导和植株再生[J]. *草地学报*, 2004, 12(4): 289-293.  
Zhang Zhenxia, Chu Chengcai, Xi Jiabin, Chen Ping. Embryogenic callus production and plant regeneration of *Lolium Perenne* seed explants for genetic manipulation[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2004, 12(4): 289-293.
- [6] 李雪, 韩烈保, 陈季琴. 多年生黑麦草愈伤组织诱导与芽分化的研究[J]. *草业科学*, 2005, 22(5): 45-49.  
Li Xue, Han Liebao, Chen Jiqin. Callus induction and bud differentiation of *Lolium perenne* [J]. *Pratacultural Science*, 2005, 22(5): 45-49.
- [7] 陈季琴, 韩烈保, 杨纯奇, 李雪. 不同外植体对多年生黑麦草愈伤组织诱导的影响[J]. *草原与草坪*, 2005(4): 42-47.  
Chen Jiqin, Han Liebao, Yang Chunqi, Li Xue. Effect of different explants on callus induction of perennial ryegrass [J]. *Grassland and Turf*, 2005(4): 42-47.
- [8] 张永彦, 徐子勤, 高丽美, 黄萱, 王健. 多年生黑麦草成熟胚再生体系的建立及基因枪转化[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(3): 53-59.  
Zhang Yongyan, Xu Ziqin, Gao Limei, Huang Xuan, Wang Jian. Production of transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues [J]. *Progress In Biotechnology*, 2005, 25(3): 53-59.
- [9] 陈智勇, 易自力. 提高高羊茅愈伤组织诱导率的研究[J]. *草业学报*, 2003, 12(4): 69-72.  
Chen Zhiyong, Yi Zili. The research of improving the inductivity of callus of *Festuca arundinacea* [J]. *Acta Pratacultural Science*, 2003, 12(4): 69-72.
- [10] 钱海丰, 薛庆中. 激素对高羊茅愈伤组织诱导及其分化的影响[J]. *中国草地*, 2002, 24(1): 46-49, 60.  
Qian Haifeng, Xue Qingzhong. The effect of hormones on callus induction and plantlet regeneration of tall Fescue (*Festuca arundinacea*) [J]. *Grassland of China*, 2002, 24(1): 46-49, 60.
- [11] 陈季琴, 韩烈保. 正交设计在多年生黑麦草组织培养中的应用[J]. *中国草地*, 2004, 26(11): 57-62, 72.  
Chen Jiqin, Han Liebao. Application of orthogonal design to tissue culture of perennial ryegrass [J]. *Grassland of China*, 2004, 26(11): 57-62, 72.
- [12] Yi Zili, Wang Li, Cao Shouyun, et al. Studies of improving the frequency of indica rice transformation by biolistic bombardment [J]. *High Technology Letters*, 2003, 9(1): 6-10.

## Establishment and Modification of High Frequency Regeneration System of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

CAI Neng, YI Zi-li, CHEN Zhi-yong, LIU Qing-bo, JIANG Jian-xiong

(College of Bioscience and Biotechnology of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The factors influencing calli induction, subculture, differentiation and plant regeneration of Ryegrass which including explants pretreatment, basal medium and concentration of phytohormone were studied. The result showed that the half-seed to embryo, surface-sterilized by 0.1% HgCl for 15 min after dipped in 75% ethanol for 1 min could be used as explants. The calli induced on medium of MS+2, 4-D8.0 mg/L (with mannitol 25 g/L or not) were best. On medium of MS+2, 4-D8.0 mg/L + mannitol 25 g/L calli were subcultured for 1 to 2 times, then cultured on medium of NB+6-BA2.0 mg/L to induce adventitious buds. Adventitious buds can be extending propagated on MS+6-BA2.0 mg/L or induced roots on medium of 1/2MS+NAA0.5mg/L+IAA0.5mg/L.

**Key words:** Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.); Tissue culture; Callus induction; Plant regeneration; Adventitious bud

【责任编辑 刘天明】