

# 两个高羊茅无性系的营养器官组织 培养及再生体系的建立

赵智燕, 潘俊松, 何亚丽\*, 王琛, 闫军辉

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:**以2个高羊茅无性系上农矮生高羊茅(SACD)和98-19的幼穗、叶尖、幼茎和幼节等营养器官作为外植体,在MS培养基上分别添加不同浓度的2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),探索其对愈伤组织的诱导、继代和分化的最佳浓度,以建立高羊茅无性系的高效再生体系。结果表明,幼穗是诱导愈伤组织的最好的营养器官外植体,出愈率最高达94%,而幼叶尖、幼茎、幼节则未能诱导出愈伤组织;不同浓度2,4-D诱导愈伤组织的出愈率存在显著差异,最佳诱导浓度范围为7~9 mg/L,出愈率可以达83%~94%;2个无性系愈伤诱导率间有显著差异,但与2,4-D浓度之间的互作不显著;继代培养基以MS加入2,4-D 4 mg/L的处理方案最好,胚性愈伤组织出愈率和绿色芽点诱导率最高,分别达到98%和78%,所得的胚性愈伤组织在MS+2,4-D 2 mg/L+6-苄氨基嘌呤(6-BA) 1 mg/L分化培养基中的绿苗分化率较高,为57%;生根培养基采用1/2 MS+ $\alpha$ -萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L,生根率达100%。

**关键词:**高羊茅;无性系;营养器官;组织培养;再生体系

**中图分类号:**Q945.39;S543+.903 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2009)05-0168-08

\* 高羊茅(*Festuca arundinacea*)是一种多年生冷季型草坪草,具有耐寒、耐热、耐践踏、抗病力较强、夏季不休眠等特点,在世界各国广泛应用。在我国长江中下游地区,如果管理得当,高羊茅能够建植周年常绿草坪。为了改良高羊茅生长迅速需要频繁修剪,质地粗糙形态不美的不良特性,开展了形态育种,选得2个矮生、质地细腻的无性系“上农矮生高羊茅(SACD)”<sup>[1]</sup>和98-19<sup>[2]</sup>。但是矮生品种(系)往往抗逆性不如普通类型品种,如果能通过转抗病基因或与抗病相关的基因育种提高抗病性,则有可能解决矮生和质地细腻与抗性较弱的矛盾。高羊茅是异花授粉植物,采用单株选择和优良单株混合繁殖的常规育种方法培育的品种易发生生物学混杂,新品种自推出后使用5年左右即会被市场上新的品种淘汰。采用把优良单株扩大成无性系,多个形态相近而抗逆性不同的无性系间自由授粉制种,得到的种子群体用于建植草坪,这种群体理论上不容易混杂退化,可以使用较长年限<sup>[2]</sup>。如果把抗病基因或与抗病相关的基因转入矮生高羊茅无性系中,则有可能通过上述“无性系育种法”培育出抗性得以提高的矮生高羊茅新品种。而要进行高羊茅无性系的遗传转化育种,首先需要建立高羊茅再生体系。

高羊茅组织培养方面的研究开始于20世纪80年代,最初的研究大多只是诱导获得愈伤组织,而未再生出植株<sup>[3,4]</sup>。Dale<sup>[5]</sup>从高羊茅的分生组织顶端培育出小植株。Lowe和Conger<sup>[6]</sup>1979年从高羊茅成熟种子胚成功地诱导出愈伤组织并得到再生植株。此后,随着研究的逐步深入,各种植株再生体系相继建立。已有的高羊茅再生体系大多以种子为外植体建立<sup>[7,8]</sup>,但得到的最佳诱导愈伤组织的浓度随基因型、外植体和试验体系中处理浓度的不同而异。也有研究以成熟胚<sup>[9]</sup>、幼胚<sup>[10]</sup>、幼穗<sup>[11,12]</sup>、下胚轴<sup>[13]</sup>、花梗组织<sup>[14]</sup>或叶片基部切片<sup>[15]</sup>为外植体,进行再生体系的建立,有的已经得到转基因植株。支大英等<sup>[13]</sup>用高羊茅下胚轴进行再生体系的建立,其愈伤组织诱导率和分化率都很高;支月娥等<sup>[11]</sup>以高羊茅幼穗为外植体进行愈伤诱导,并未得到再生植株。要保持无性系的基因型与优良形态特征,必须采用其无性器官建立再生体系。鉴于此,本研究以自育的2个无性系的营养器官为外植体材料,探索其高效再生体系的建立方法,为“无性系”的细胞突变体筛选和遗传转化奠定基础。

\* 收稿日期:2008-12-15;改回日期:2009-01-19

基金项目:上海市农业委员会科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2006)第4-5号]和国家科技部“十一五”科技支撑计划(2006BAD01A19-4-6)资助。

作者简介:赵智燕(1982-),女,山东胶州人,在读硕士。E-mail:zhaozhiyan009@hotmail.com

\* 通讯作者。E-mail:heyali@sjtu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

上农矮生高羊茅(SACD)和 98-19 两个无性系的植株,由本课题组自育自繁。分别取其幼穗、叶尖、幼茎和幼节作为外植体。

### 1.2 培养基

**1.2.1 诱导培养基** 以高羊茅种子作为外植体进行愈伤诱导,常用的 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)浓度处理有 2, 5, 9 mg/L,试验结果证实诱导愈伤组织的最佳浓度为 9 mg/L<sup>[16~20]</sup>。也有人以 MS 中添加 2,4,6,8,10 mg/L 2, 4-D 为试验方案,得出 8 mg/L 2,4-D 为最佳的愈伤组织的诱导培养基<sup>[21]</sup>。不同基因型愈伤诱导的适宜 2,4-D 浓度不同<sup>[10]</sup>。那么高于 9 mg/L 的 2,4-D 对愈伤组织的诱导效应又如何?本研究要进行遗传转化育种的对象“SACD”和“98-19”两个无性系不同外植体愈伤诱导的适宜 2,4-D 浓度又是多少?为了回答这个问题,以水平间距为 1 mg/L 2,4-D,设计了在 MS 培养基中添加 0,1,⋯,11 mg/L 的 2,4-D 浓度共 12 个处理,以求证诱导愈伤组织的最佳 2,4-D 浓度。

**1.2.2 继代培养基** 在对高羊茅种子诱导的愈伤组织的继代培养试验中,根据前人对香根草组织培养试验中设置的处理和结果<sup>[22]</sup>,对处理的设置作了改进,采用 2,4-D 3 个浓度(2.0,4.5,9.0 mg/L)和 6-苄氨基嘌呤(6-BA) 3 个浓度(0,1,2 mg/L)的均衡搭配和全面实施的 9 个处理组合,试验筛选出以 2,4-D 4.5 mg/L 和 6-BA 0 mg/L 的处理组合所得胚性愈伤组织最多。以此为基础,在对幼穗诱导的愈伤组织继代时,进一步细化 2,4-D 浓度处理,以 4.5 mg/L 为中心水平,以 0.5 mg/L 为水平间距,设置了 2,4-D 5 个浓度(3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 mg/L)处理,从中筛选最佳的继代培养基中的 2,4-D 浓度。

**1.2.3 分化培养基** 在对高羊茅种子诱导的愈伤组织的继代培养试验(见 1.2.2)中还发现 MS 中添加 2,4-D 2 mg/L 和 6-BA 1 mg/L 的处理上出苗率最高,故本试验中以此作为分化培养基。

**1.2.4 生根培养基** 采用已报道<sup>[16]</sup>的配方:1/2MS 培养基+ $\alpha$ -萘乙酸(NAA)0.5 mg/L。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 材料消毒** 2008 年 3 月 20 日至 4 月 15 日期间,从田间取回的孕穗期植株中剥出幼茎和幼穗,去离子水浸泡 0.5 h,饱和次氯酸钠消毒 10 min,70%乙醇消毒 1~2 min,无菌水冲洗 5~6 次,在超净工作台上晾干备用。

**1.3.2 愈伤组织诱导** 将晾干的高羊茅幼穗切成 0.5 cm 左右的小段,接种在各处理的诱导培养基上。接入每个锥形瓶外植体数为 20 个。试验 1 以“SACD”和“98-19”两个无性系的幼穗为外植体材料,每处理组合重复 2 次,完全随机试验设计。试验 2 以“SACD”的幼穗为外植体材料,每处理重复 2 次,随机完全区组试验设计。接种后置于特制的组培架上,于(25±2)℃下暗培养 28 d 后,转入继代培养基前统计出愈率。

**1.3.3 愈伤组织继代** 以“SACD”幼穗外植体诱导出的愈伤组织为材料,在其诱导约 28 d 后,待愈伤组织长到直径 2~3 mm,及时剥离愈伤组织,转到含有不同浓度 2,4-D 的继代培养基上。每瓶随机接种愈伤组织 15~25 块,每处理重复 3 次,随机完全区组试验设计。于 40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光合有效辐射(photosynthetically active radiation, PAR)10 h/d 和 25℃下继代培养约 28 d 后,转入分化培养基前统计胚性愈伤出愈率和绿芽点(图 1)诱导率。

**1.3.4 愈伤组织分化** 继代培养约 28 d 后待愈伤组织呈结构致密、颗粒状、淡黄色的时候,按继代处理分别转入同一种分化培养基上。每继代处理接种 6 瓶(重复 6 次),每瓶接种 5 块,随机完全区组试验设计。在与继代培养相同的条件下培养 14 d 后出现绿芽,培养 30~35 d 形成无根幼苗(图 2),统计分化率。

**1.3.5 生根和移栽** 将幼苗转移至生根培养基培养 20~30 d 后有大量不定根产生,打开瓶盖炼苗 3 d 后移栽到装有营养土的盆钵中,置于温室内栽培 30 d 后,移栽到大田。

### 1.4 数据统计与分析

诱导率 = 长出愈伤组织的外植体数 ÷ 进行愈伤组织诱导的外植体数 × 100%

胚性愈伤组织出愈率 = 形成胚性愈伤的愈伤块数 ÷ 进行继代的愈伤组织块数 × 100%

绿色芽点的诱导率 = 形成绿色芽点的愈伤块数 ÷ 进行继代的愈伤块数 × 100%

分化率 = 出苗的愈伤组织块数 ÷ 进行分化的愈伤组织块数 × 100%

生根率 = 生根的苗数 ÷ 进行生根试验的苗数 × 100%

对于上述属于二项分布的所有试验数据的百分率(p)资料,因原始数据中有 $<30\%$ 和 $>70\%$ 的观察值,根据方差分析的基本假定与数据转换方法,采用了反正弦数据转换 $[\arcsin(p)^{1/2}]^{[23]}$ 。采用转换后数据进行方差分析和平均数的最小显著差数(LSD)法多重比较。最后将各处理的反正弦转换数据的平均数再转回百分率数据,便于阅读理解。

## 2 结果与分析

### 2.1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导率的影响

试验 1,以 2 个无性系的幼穗为外植体分别在 MS 中添加了 0,1,⋯,11 mg/L 2,4-D(12 个不同浓度)的培养基中进行愈伤组织的诱导。方差分析结果表明,不同 2,4-D 浓度间和不同无性系之间出愈率存在显著差异,但无性系与 2,4-D 浓度之间的交互不显著。SACD 无性系的愈伤诱导率平均为 71%,比 98-19 无性系的平均出愈率显著高出 13%。对不同 2,4-D 浓度处理的愈伤组织诱导率间进行差异显著性检验结果(图 3 A)表明,不添加外源激素(2,4-D 0 mg/L)的 MS 基本培养基上没有愈伤组织的生成,随着 2,4-D 浓度从 1 mg/L 增加至 8 mg/L,出愈率不断提高,从 9 mg/L 开始出愈率逐渐下降,而在 4~10 mg/L 的浓度处理间并没有显著差异,2 无性系的平均愈伤诱导率为 70%~87%。

试验 2 仅以 SACD 无性系的幼穗为外植体材料,进一步验证最佳的 2,4-D 浓度。结果也表明,不同 2,4-D 浓度处理之间存在显著差异,处理平均数的多重比较结果(图 3B)表明从 7~9 mg/L 都属于较好的浓度处理,愈伤组织诱导率为 90%~94%,相互之间没有显著差异,其中 8 mg/L 的处理愈伤组织诱导率最高为 94%。

结合试验 1 和试验 2 的分析结果(图 3)可知 SACD 和 98-19 两个无性系幼穗最佳的诱导愈伤组织的 2,4-D 浓度是在 MS 培养基中添加 7~9 mg/L,愈伤组织诱导率为 83%~94%。

以 2 个无性系的叶尖、幼茎、和幼节等营养组织或器官作为外植体,采用上述的诱导培养基和培养条件,未能获得愈伤组织。

### 2.2 不同 2,4-D 浓度对继代培养中胚性愈伤组织出愈率和绿芽点诱导率的影响

将 SACD 的幼穗诱导所得的愈伤组织,转移到含有不同浓度 2,4-D 的 MS 继代培养基上,光照条件下培养 28 d 后统计其胚性愈伤组织的出愈率。方差分析结果表明不同处理之间存在显著差异。平均数的比较结果(图 4A)表明 3.5 与 4.0 mg/L 的处理所得胚性愈伤组织出愈率分别达到 85%和 98%,彼此间没有显著差异,二者都显著高于 4.5 mg/L 及以上浓度的处理。愈伤组织在继代过程中,除了形成胚性愈伤组织之外,也会生出一些绿色的芽点(图 1),这些芽点以后会长成绿色植株。对不同浓度 2,4-D 继代过程中生成的芽点进行了统计分析,方差分析表明不同处理之间存在显著差异。平均数的比较结果(图 4B)表明 4 mg/L 的处理所得绿芽点诱导率最高,可以达到 78%,其余处理之间的绿芽点诱导率没有显著差异,从 29%~39%不等。

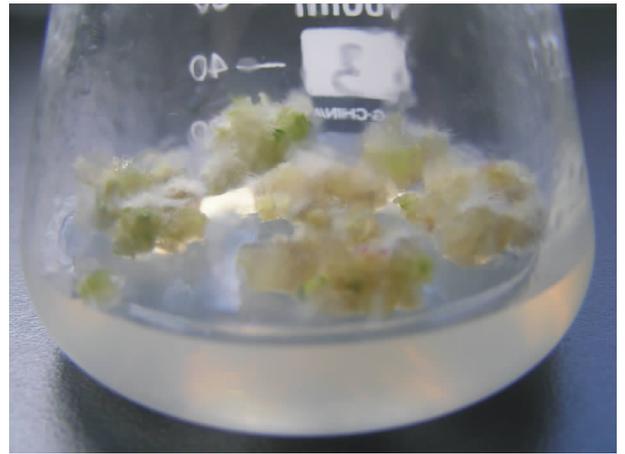


图 1 在 MS+2,4-D 4 mg/L 继代培养基上产生绿色芽点的愈伤组织

Fig. 1 Green bud spots on subculture medium of MS+2,4-D 4 mg/L



图 2 2,4-D 5.5 mg/L 继代培养基上诱导的愈伤组织在分化培养基 (MS+2,4-D 2 mg/L +6-BA 1 mg/L) 上分化的绿苗

Fig. 2 Green plantlets generated from embryogenic callus induced on subculture medium of MS+2,4-D 5.5 mg/L on regeneration medium of MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L

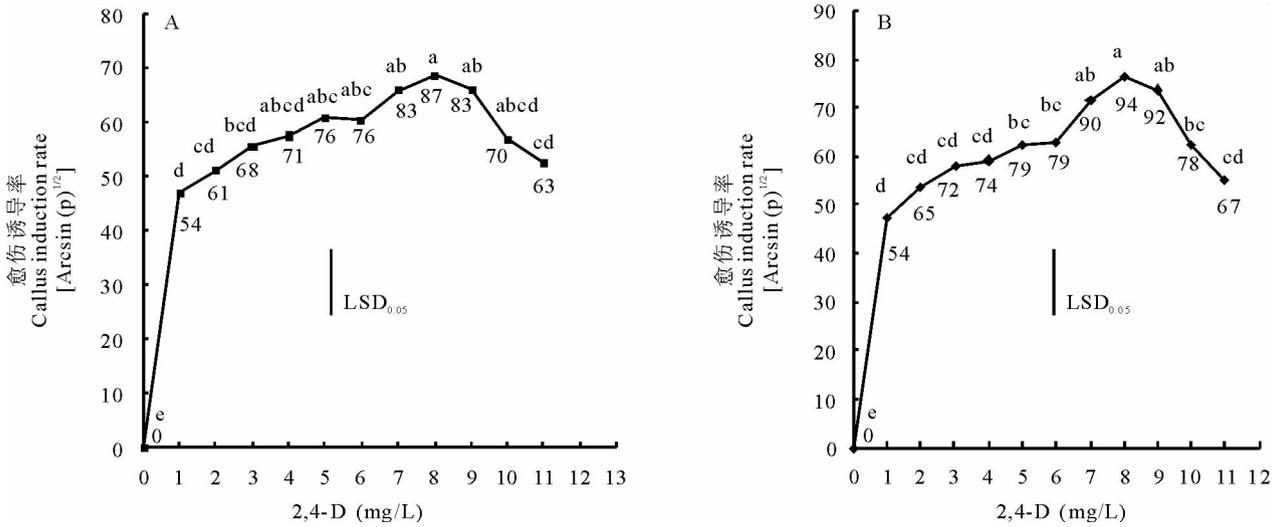


图 3 高羊茅 2 个无性系(SACD and 98-19) (A)与 1 个无性系(SACD) (B)幼穗外植体在 MS 培养基中不同的 2,4-D 浓度下愈伤诱导率(p) 的反正弦转换值平均数的差异显著性

Fig. 3 Significance of difference of means of arcsin (p)<sup>1/2</sup> of callus induction rate (p) averaged in two clones (SACD and 98-19) (A) and one clone (SACD) (B) in MS medium with different 2,4-D concentrations using immature inflorescence as explants

无性系与 2,4-D 浓度间互作效应不显著(A); 图内的线条长度为最小显著差数 LSD<sub>0.05</sub>; 不同字母标记的平均数间有显著差异; 曲线下方的数据为反正弦转换值平均数的返回尺度——愈伤诱导百分率 There is no significant interaction between clones and concentrations of 2,4-D (A); the bar represents LSD<sub>0.05</sub>; Different letters indicate that means of arcsin (p)<sup>1/2</sup> of 2,4-D concentrations differ significantly; Data under the curves are percentages of callus induction transformed from means of arcsin (p)<sup>1/2</sup>

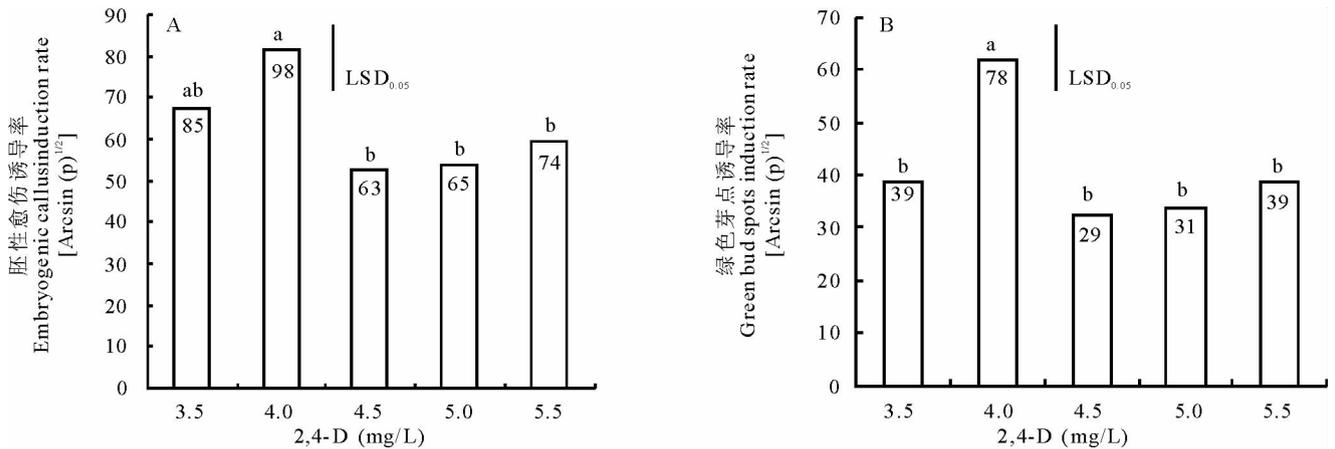


图 4 SACD 无性系愈伤组织在添加不同浓度 2,4-D 的 MS 培养基中继代胚性愈伤组织诱导率(p)(A) 和绿色芽点的诱导率(p) (B)反正弦转换值平均数的差异显著性

Fig. 4 Significance of difference of means of arcsin (p)<sup>1/2</sup> of embryogenic callus induction rate (p) (A) and green bud spots induction rate (p) (B) in MS medium with different concentrations of 2,4-D for callus subculture in Clone SACD

图内的线条长度为最小显著差数 LSD<sub>0.05</sub>; 不同字母标记的反正弦转换平均数间有显著差异; 柱中的数据为反正弦转换值平均数的返回尺度——胚性愈伤组织诱导百分率(A) 和绿色芽点的诱导百分率(B) The bar represents LSD<sub>0.05</sub>; Different letters indicate that means of arcsin (p)<sup>1/2</sup> of 2,4-D concentrations differ significantly; Data in columns are percentages of embryogenic callus induction (A) and green bud spots (B) transformed from means of arcsin (p)<sup>1/2</sup>

2.3 不同浓度 2,4-D 继代后对在分化培养基上绿苗和白苗分化率的影响

把不同继代培养基上培养的胚性愈伤组织转入分化培养基(MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L),光照培养

28 d 后,考察幼苗的分化率。方差分析结果表明,不同继代培养基上所得的胚性愈伤组织在同一种分化培养基上的绿苗(图 2)与白化苗的分化率之间仍然有着显著差异。平均数的比较结果表明,继代培养基中含 2,4-D 5.5 mg/L 的处理上形成的胚性愈伤组织在分化培养基中的绿苗分化率最高(图 5A),达到 68%,显著高于 3.5,4.5,5.0 mg/L 的 2,4-D 处理,但与 4 mg/L 2,4-D 浓度间又未见有显著差异;3.5 mg/L 2,4-D 浓度下的白化苗分化比例最高,显著高于 4.0,4.5,5.5 mg/L 的处理,但与 5 mg/L 处理间又没有了显著差异(图 5B)。综合图 5 结果可见:4 mg/L 的 2,4-D 处理有较高的绿苗分化率(57%),其与最高的绿苗分化率间显著不差异(图 5A),同时它也具有较低的白苗分化率(6%),显著低于 5.0 和 3.5 mg/L 的 2,4-D 处理(图 5B);似乎在继代培养基中较高浓度(5.5 mg/L)2,4-D 下诱导的胚性愈伤组织在分化培养基上易分化正常绿苗,而继代培养基中较低浓度(3.5 mg/L)2,4-D 下诱导的胚性愈伤组织在分化培养基上易分化成不正常的白苗。由于本试验中绿苗、白苗分化率没能与继代培养基中 2,4-D 浓度梯度间形成协同变异的趋势规律,还有待进一步的试验加以验证。

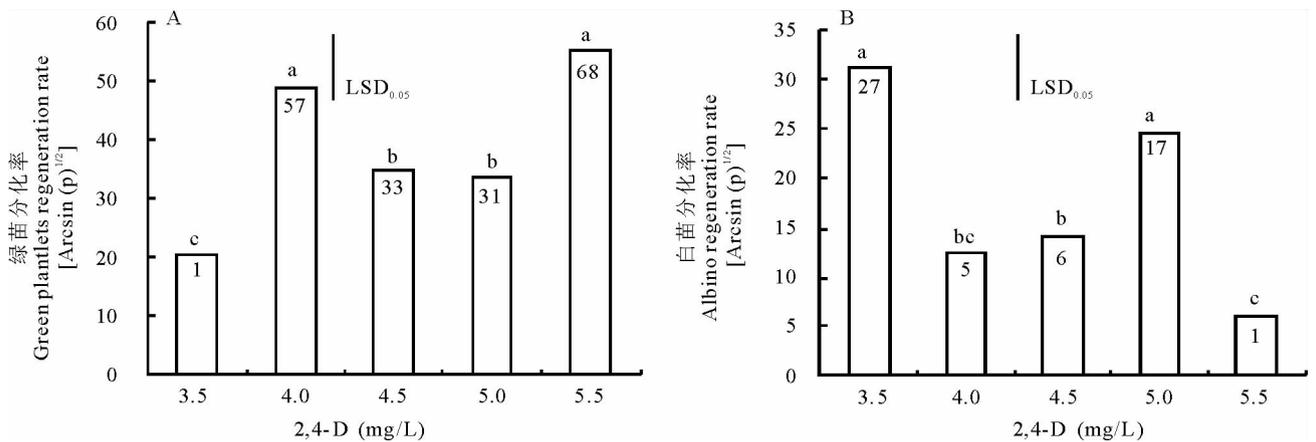


图 5 SACD 无性系在含有不同浓度 2,4-D 的 MS 培养基中继代培养产生的胚性愈伤组织在“MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L”分化培养基上的绿苗分化率(p) (A) 和白苗分化率(p) (B) 反正弦转换值平均数的差异显著性

Fig. 5 Significance of difference of means of arcsin (p)<sup>1/2</sup> of green plants regeneration rate (p) (A) and albino regeneration rate (p) (B) for embryogenic callus induced in MS with different concentrations of 2,4-D during callus subculture in regeneration medium of “MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L” in Clone SACD

图内的线条长度为最小显著差数  $LSD_{0.05}$ ; 不同字母标记的平均数间有显著差异; 柱中数据为反正弦转换值平均数的返回尺度—绿苗分化百分率 (A) 和白苗分化百分率 (B) The bar represents  $LSD_{0.05}$ ; Different letters indicate that means of arcsin (p)<sup>1/2</sup> of 2,4-D concentrations differ significantly; Data in columns are percentages of green (A) and albino (B) plants transformed from mean of arcsin (p)<sup>1/2</sup>

## 2.4 生根培养

采用已报道的“1/2 MS+NAA 0.5 mg/L”生根培养基对分化的无根绿苗进行培养,生根率达到 100%,因此没有必要再对生根培养基进行进一步的研究。

## 3 讨论

### 3.1 外植体

试验材料 SACD 和 98-19 是采用单株分株繁殖而来的矮生高羊茅无性系。为了进一步改良它们的抗病能力,就要利用植株的营养组织或器官,建立高效再生体系,为后续遗传转化打好基础。对于双子叶植物,如菊花 (*Dendranthema morifolium*) 的花蕾<sup>[24]</sup>、野葛 (*Pueraria lobata*) 的子叶<sup>[25]</sup>、芦荟 (*Aloe vera*) 的茎段<sup>[26]</sup> 或苹果 (*Malus pumila*) 树的茎尖<sup>[27]</sup> 等都是人们在组织培养过程中常用的营养器官外植体,人们利用这些外植体都实现了快繁的目的。本试验先后尝试了以幼穗、叶尖、幼茎和幼节作为外植体的再生体系的建立,但最终成功的只有幼穗。这可能是由于幼穗处于细胞的快速生长和分化阶段,组织内有较高的激素含量,促进了细胞的分裂和生长,有利于愈伤组织的生成。

虽然幼穗是很好的营养器官外植体材料,但在自然生长条件下孕穗至抽穗阶段的持续日较少(高羊茅为 15~20 d),因此取材培养工作十分紧张,不便于周年进行组培工作。虽然可以通过不同光照时数处理调节孕穗与抽穗期,但要耗费较多的人力与物力。如何保存高羊茅孕穗期的幼穗活力,值得探索。

### 3.2 诱导培养基

小麦幼穗组织培养的技术研究较多,分别从不同基因型<sup>[28,29]</sup>、添加不同激素种类和浓度<sup>[30~32]</sup>、以及不同蔗糖浓度<sup>[30]</sup>造成的影响等方面进行了研究。不同基因型的小麦(*Triticum aestivum*)幼穗愈伤组织诱导出愈率差异不大,但是分化率却差异显著<sup>[29]</sup>,4.5 mg/L 的 2,4-D 诱导小麦幼穗的出愈率是 100%<sup>[32]</sup>,而蔗糖浓度在 2.5%~5.5% 的范围内,随着其浓度的增加,胚性愈伤组织的形成率也随之提高<sup>[30]</sup>。高羊茅作为禾本科植物,其组织培养难度较大。支月娥等<sup>[11]</sup>以幼穗等作为外植体进行愈伤诱导,在 4 种培养基中进行筛选,得到最佳诱导培养基为 MS+2,4-D 2 mg/L,幼穗的愈伤组织出愈率为 45%。本试验研究了 2,4-D 在(0~11 mg/L)12 个不同浓度中的出愈率,得到最佳浓度为 7~9 mg/L,出愈率达到 83%~94%,比已报道<sup>[11]</sup>的愈伤诱导率高出 38%~49%;而在同样的 2,4-D 2 mg/L 中的出愈率,本研究的结果为 61%~65%,比支月娥等<sup>[11]</sup>在同样浓度下得到的愈伤诱导率高出 16%~20%。虽然对 MS 中不同 2,4-D 浓度对高羊茅幼穗的愈伤组织出愈率影响已经有了较全面的研究,但诱导愈伤的培养基组分与继代培养基组分对于绿色芽点的诱导是否存在互作效应也还值得进一步的探索。

### 3.3 继代培养基

对愈伤组织的继代培养的目的,除了要将愈伤组织扩繁外,还在于将非胚性愈伤转为胚性愈伤组织。余桂红等<sup>[33]</sup>将种子诱导得到的愈伤组织转移到继代基本培养基(MS+2,4-D 5 mg/L)上,以水晶洋菜 3 g 代替琼脂 7 g,愈伤组织可以生长很快,且经过 30 d 培养可以转化为具有分化能力的胚性愈伤组织。有研究表明,在继代培养过程中加入硫酸铜有利于胚性愈伤组织形成<sup>[18,34]</sup>。在继代培养基中添加硫酸铜 2.5 mg/L,所得的胚性愈伤组织频率在继代 5 次后仍然可以达到 15.5%~32.6%,不同品种间存在差异,但都显著高于同品种不添加硫酸铜的处理方案<sup>[34]</sup>。将蔗糖浓度增加到 60 g/L,不但有利于胚性愈伤组织形成,且可以继代 5 次后还具有较高的继代频率(13.3%~27.9%)<sup>[34]</sup>。本研究进行的最佳继代培养基的筛选,最终结果是继代培养基以 2,4-D 4 mg/L 为最佳继代培养基,胚性愈伤组织扩增率达 98%,绿芽点诱导率达 78%,其在分化培养基上分化的绿苗(57%)和白苗率(5%)与分化的最佳处理(继代培养基中添加 2,4-D 5.5 mg/L,绿苗分化率为 68%,白苗分化率为 1%)之间并未见显著差异。Cho 等<sup>[35]</sup>将由高羊茅种子诱导得到的胚性愈伤组织诱导产生的高频再生组织(具有多个淡绿点的芽分生组织样的结构),培养 4~5 个月后作为受体,获得了转基因植株。因此认为本研究中的胚性愈伤组织上的绿色芽点应该属于这种高频再生组织,有利于后续转化。

在本研究的继代培养基筛选过程只完成了由非胚性愈伤到胚性愈伤的转化及胚性愈伤组织的扩增,并没解决可以将胚性愈伤组织长期保存而分化率基本不衰退的问题。这就要求进一步研究如何将胚性愈伤长时间保存,而不影响其分化的频率,以便于后续转基因工作的准备与实施。

### 3.4 分化培养基

在分化过程中有少量白化苗出现,这是高羊茅组培过程中比较普遍的一个问题。韩晓光等<sup>[36]</sup>以下胚轴为外植体做耐盐性筛选,最终得分化率仅为 7.5%,其中 64.1%为白化苗。吕晓波等<sup>[37]</sup>对水稻(*Oryza sativa*)组织培养得到的白化苗进行了电镜扫描,其结果是有质体形成,但内部结构不完整,说明造成白化的直接原因是叶绿素不能正常合成。白化苗由于不能进行正常光合作用,不能生长,开花,结实,所以建立再生体系时要尽量减少白化苗的分化频率。本研究继代培养基中不同 2,4-D 浓度下培养的胚性愈伤组织在分化培养基中的分化结果,似乎继代培养基中较高浓度(5.5 mg/L)2,4-D 下诱导的胚性愈伤组织在本研究特定的分化培养基上有利于分化正常绿苗,而较低浓度(3.5 mg/L 2,4-D)易分化成不正常的白苗。

本研究显示继代培养基中 2,4-D 浓度与分化培养基中的组分与浓度似乎存在互作,有待进一步的研究加以揭示。提高绿苗分化率和降低白化苗分化率的组培技术也有待于进一步的探索。

### 3.5 结论

高羊茅幼穗是营养组织与器官中最好的诱导愈伤组织外植体。MS 培养基中添加 7~9 mg/L 2,4-D 对 2 个

无性系幼穗诱导愈伤组织的效果最好,诱导率达到83%~94%。MS培养基中添加4 mg/L 2,4-D对愈伤组织继代的效果较好,胚性愈伤组织的出愈率达到98%,绿芽点的诱导率达78%。继代培养基中2,4-D浓度对在分化培养基上绿苗与白苗的分化率有显著影响,仍以4 mg/L 2,4-D处理较好。

### 参考文献:

- [1] 何亚丽,胡雪华,唐静,等. 坪用型高羊茅新品系“98-8”和“上农矮生高羊茅”的选育、鉴定和推广[J]. 草业科学,2001,18(6): 60-64, 66.
- [2] 何亚丽,胡雪华,陈伟,等. 草坪型高羊茅新品系的选育和成坪特性及耐热性的鉴定[J]. 中国草地,2002,24(5): 33-39.
- [3] Atkin R K, Barton G E. The establishment of tissue culture of temperate grasses[J]. Journal of Experimental Botany, 1973, 24: 689-699.
- [4] Conger B V, Carabia J V, Lowe K W. Comparison of 2,4-D and 2,4,5-T on callus induction and growth in three Gramineae Species[J]. Environmental and Experimental Botany, 1978, 18: 163-168.
- [5] Dale P J. Meristem tip culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum*, and *Dactylis*[J]. Plant Science, 1977, 9: 333-338.
- [6] Lowe K W, Conger B V. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue[J]. Crop Science, 1979, 19: 397-400.
- [7] 王铖,李青,辛燕. 高羊茅种子愈伤组织诱导与植株再生研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(1):66-69.
- [8] Rajoelina S R, Alibert G, Planchon C. Continuous plant regeneration from established embryogenic cell suspension cultures of Italian ryegrass and tall fescue[J]. Plant Breeding, 1990, 104: 265-271.
- [9] Altpeter F, Xu J. Rapid production of transgenic turf-grass (*Festuca rubra* L.) plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2000, 157: 441-448.
- [10] Bai Y, Qu R. An evaluation of callus induction and plant regeneration in twenty-five turf-type tall fescue cultivars[J]. Grass and Forage Science, 2000, 55: 326-330.
- [11] 支月娥,何亚丽,田龚. 高羊茅组织培养研究初报[J]. 上海农学院学报,1998,16(1):46-48.
- [12] Eizenga G C, Dahleen L S. Callus production, regeneration and evaluation of plants from cultured inflorescence of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) [J]. Plant Cell Tissue Organ, 1990, 22: 7-15.
- [13] 支大英,韩晓光,军胜,等. 8种基因型的高羊茅的组织培养与植株再生[J]. 山东大学学报(理学版),2004,39(4):109-114.
- [14] Kasperbauer M J, Buckner R C, Bush L P. Tissue culture of annual ryegrass × tall fescue F<sub>1</sub> hybrids: Callus establishment and plant regeneration[J]. Crop Science, 1979, 19: 457-460.
- [15] Takamizo T, Sugino K, Ohsugi R. Plant regeneration from suspension culture derived protoplasts of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) of a single genotype[J]. Plant Science, 1990, 72: 125-131.
- [16] 李晓辉,何亚丽,蔡润,等. 高羊茅的组织培养与植株再生[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2005,23(3):244-248.
- [17] Bai Y, Qu R. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue[J]. Plant Breeding, 2001, 120: 239-242.
- [18] 高丽美,徐子勤,刘杨,等. 高羊茅组织培养再生体系及GUS基因瞬间表达研究[J]. 西北植物学报,2001,25(1):40-45.
- [19] 钱海丰,薛庆中. 高羊茅的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2002,38(3):247.
- [20] 刘卫东,邢伟一,唐涛,等. 高羊茅组织培养基的选择[J]. 中南林学院报,2005,25(6):116-119.
- [21] 郎春秀,吴关庭,夏英武. 高羊茅成熟种子组织培养的影响因素研究 I. 多种因素对愈伤组织诱导的影响[J]. 浙江农业学报,2005,17(4):182-186.
- [22] 杨冰冰,夏汉平,马镇荣. 香根草组织培养技术的研究[J]. 草业学报,2007,16(4):93-99.
- [23] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,1999. 125-127.
- [24] 建德锋,赵文若,陈刚,等. 菊花组织培养技术研究[J]. 生物技术,2007,(9):200-201.
- [25] 李玲,刘慧丽,史永忠. 三裂叶葛愈伤组织形成和异黄酮类的产生[J]. 高技术通讯,2001,(5):25-27.
- [26] 刘洋,李斌,伍小兵. 芦荟组织培养技术[J]. 陕西农业科学,2007,(3):96-97.
- [27] 周萍,司少鹏. 嘎拉苹果的茎尖组织培养[J]. 江苏林业科技,1996,23(4):51-52.
- [28] 李艳红,祝长青,覃建兵. 新疆小麦幼穗组织培养效应研究[J]. 作物杂志,2008,(3):32-34.

- [29] 刘香利, 刘缙, 赵惠贤, 等. 小麦幼穗的离体培养及其影响因素研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(2): 79-82, 87.
- [30] 权军利, 刘正全, 任慧莉, 等. 蔗糖与激素对小麦幼穗体细胞无性系形成及生长特性的影响研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 87-91.
- [31] 郎明林, 陈暮敏, 去宝成, 等. 影响小麦幼穗组培效应的几个因素探讨[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 393-395.
- [32] 覃建兵, 汪越胜, 何光源. 激素对小麦幼穗组织培养效果的影响研究[J]. 华中师范大学学报, 2005, 39(2): 379-382.
- [33] 余桂红, 马鸿翔, 陆维忠, 等. 草坪型高羊茅成熟种子胚性愈伤组织诱导及植株再生[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(1): 38-43.
- [34] 吴关庭, 胡张华, 夏英武, 等. 高羊茅成熟种子组织培养的影响因素研究II. 不同因素对胚性愈伤组织继代发生的影响[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 369-372.
- [35] Cho M J, Ha C D, Lemaux P G. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues[J]. Plant Cell Report, 2000, 19: 1084-1089.
- [36] 韩晓光, 薛哲勇, 夏光敏, 等. 高羊茅胚性愈伤组织的高效诱导及其耐盐突变体筛选[J]. 草业学报, 2005, 14(6): 112-118.
- [37] 吕晓波, 刘丽艳, 陈力, 等. 水稻幼穗组培及白化苗的电镜观察[J]. 生物技术, 1996, 6(6): 26-28.

**Tissue culture and plantlet regeneration from vegetative organs of two clones of tall fescue (*Festuca arundinacea*)**

ZHAO Zhi-yan, PAN Jun-song, HE Ya-li, WANG Chen, YAN Jun-hui

(Department of Plant Science, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** In an effort to optimize the tissue culture response of a tall fescue (*Festuca arundinacea*) regeneration system, the effects of 2,4-D on tissue culture responses were investigated using immature inflorescences, leaf tips, young stems, and young nodes as explants. Two clones (SACD and 98-19), which are self-bred dwarf clones of tall fescue were used. Immature inflorescences were the best vegetative organ for callus induction, with the highest callus induction rate of 94%. For tips of leaves, stems and nodes, the callus induction rate was 0%; the optimal concentration of 2,4-D was from 7 to 9 mg/L in MS with a callus induction rate of 83% to 94%. Significant differences were also observed between the tested clones but the interaction between 2,4-D concentrations and the clones was not significant. Subculture medium of 2,4-D 4 mg/L in MS resulted in the highest embryogenic callus induction rate (98%), highest green spot induction rate (78%) during subculture, and high green plant regeneration rate (57%) in regeneration medium of "MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L". The rooting medium used ("1/2 MS+NAA 0.5 mg/L"), gave a rooting rate of 100%.

**Key words:** tall fescue; clone; vegetative organ; tissue culture; regeneration system