

无芒雀麦组织培养再生体系的建立

黄帆^{1,2}, 李俊^{1,2}, 刘磊^{1,2}, 师文贵^{1,2}, 李鸿雁^{1,2}, 李志勇^{1,2,*}

¹中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特010010

²农业部牧草资源与利用重点实验室, 呼和浩特010010

摘要: 以无芒雀麦(*Bromus inermis*)的成熟种子为外植体, 建立其组织培养再生体系, 筛选最适愈伤组织诱导、分化及再生植株生根培养基, 为之后的转基因实验奠定基础。结果表明: MS+1 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)+0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)为最佳愈伤组织诱导培养基, 诱导率为68.7%; MS+2 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA)+1 mg·L⁻¹ 6-BA为最佳分化培养基, 分化率高达100%; 不添加任何植物生长调节物质的1/2MS培养基为最佳生根培养基; 组培苗移栽至蛭石与珍珠岩3:1 (V/V)的基质中, 30 d后成活率可达70%~80%。

关键词: 无芒雀麦; 组织培养; 再生

无芒雀麦(*Bromus inermis*)是禾本科(Gramineae)雀麦属多年生草本植物, 具有产量高、适应性强、利用季节长等特征, 是优良的饲用牧草(陈默君和贾慎修2001), 其野生种广泛分布于我国各省区, 为1 000~3 500 m山地草甸草场优势草种。因具有发达的地下根茎, 其抗旱能力较强, 也是建立人工草场和环保固沙的先锋植物(孙铁军等2005)。

近年来, 随着产业结构的调整和环境治理的需求, 我国无芒雀麦的人工种植面积不断扩大, 种子的需求量呈上升趋势, 对其进行品质改良已迫在眉睫(赵云鹏等2005)。随着生物技术的发展, 利用基因工程进行植物品质改良已成为普遍和实用的手段, 而成功进行基因转化的前提就是建立高效、快速的植物组织培养再生体系。目前国内通过组织培养建立粮食作物及经济作物再生体系已经颇为广泛, 而牧草类还主要集中于紫花苜蓿(*Medicago sativa*)等豆科植物(李娟等2014; 王成龙等2015)。禾本科牧草组培再生体系的建立则更多地见于羊茅属的高羊茅(*Festuca arundinacea*) (郭伶俐等2015; 闫军辉等2009; 赵智燕等2009)、冰草属的冰草(*Agropyron cristatum*) (徐春波等2009; 霍秀文等2005)和沙芦草(*A. mongolicum*) (赵彦等2015; 陈雪英等2012), 以及狼尾草属的紫叶狼尾草(*Pennisetum setaceum*)和杂交狼尾草(*P. americanum* × *P. purpureum*) (魏进莉等2015; 刘逸泠和祝建波2015)等牧草中。禾本科雀麦属牧草以成熟种子作为外植体建立组织培养再生体系的研究较为少见, 目前国内仅有通过低能离子束注入的方式对其愈伤组织的诱导差异进行探索的报道(陈玲玲等2009), 而通过不同植物生长调节物质的合理有效

配比来建立无芒雀麦成熟种子组织培养再生体系, 对其再生过程中诱导、分化、生根等关键步骤建立方法的研究鲜有报道。

为加快种质改良进程, 培育出更多的无芒雀麦优异品种, 本试验以其成熟种子为外植体, 通过不同植物生长调节物质配比培养基进行诱导、分化、生根, 探索各步骤的最适培养基, 以期建立无芒雀麦组织培养再生植株体系, 为之后的转基因试验提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为无芒雀麦(*Bromus inermis* Leyss.)野生材料, 原产地为内蒙古自治区锡林郭勒盟。本实验选择其成熟种子作为外植体建立组培再生体系。

1.2 方法

1.2.1 种子的灭菌处理

选择饱满的无芒雀麦种子, 剥掉内外稃, 置于三角瓶中。75% (V/V)乙醇表面消毒1~2 min后用无菌水冲洗, 再用0.1% (m/V) HgCl₂灭菌15 min, 其间均匀振荡三角瓶, 最后用无菌水冲洗4~5次。灭菌后的种子使用无菌水浸泡24 h。以上操作均在超净工作台上完成。

收稿 2017-10-23 修定 2018-03-26

资助 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-IGR-2015-04)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(1610-332018020)。

* 通讯作者(zhiyongli1216@126.com)。

1.2.2 培养基配制

以MS附加0、0.5、1、2、4 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D), 0、1、2、4 mg·L⁻¹萘乙酸(1-naphthylacetic acid, NAA), 0、0.05 mg·L⁻¹ N⁶-呋喃甲基腺嘌呤(kinetin, KT), 0、0.5、1、2、4 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)组成愈伤组织诱导和继代培养基。以MS附加1、2、4 mg·L⁻¹ NAA, 0、0.5、1 mg·L⁻¹ 6-BA, 0、0.05 mg·L⁻¹ KT组成分化培养基。以MS或1/2MS培养基作为生根培养基。以上培养基的pH值均为5.8。

1.2.3 愈伤组织的诱导和继代培养

将灭菌的种子接种于不同植物生长调节物质配比的诱导培养基上, 每种处理接种5粒种子, 20个重复, 光照时间12 h·d⁻¹下进行培养。其中蔗糖含量2.5% (*m/V*), 琼脂含量0.7% (*m/V*), 培养温度保持在27°C左右。30 d后统计出愈率(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%)。

将得到的愈伤组织分别接入诱导时对应的培养基中进行继代培养, 每瓶接种5个, 20个重复, 光照时间及培养温度保持不变。30 d后观察愈伤组织生长情况。

1.2.4 愈伤组织的分化

将诱导产生的愈伤组织切成小块接种于不同植物生长调节物质配比的分化培养基上, 每个处理放置5块愈伤组织, 20个重复。其中蔗糖含量3% (*m/V*), 琼脂含量0.7% (*m/V*), 光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间14 h·d⁻¹下进行培养。观察分化情况, 统计分化率(不定芽形成的愈伤组织块数/接种的愈伤组织总块数×100%)。待不定芽长成4~5 cm的小植株时接入生根培养基中。

1.2.5 根的诱导

将分化产生的小植株接入不添加任何植物生长调节物质的1/2MS、MS培养基上诱导生根, 其中蔗糖含量2.5% (*m/V*), 琼脂含量0.75% (*m/V*)。定期观察生根情况, 筛选适合的生根培养基。

1.2.6 炼苗与移栽

组培苗生根培养30 d后, 将培养瓶移至自然环境下, 放置3 d左右; 打开培养基的封口膜, 继续培养3~5 d; 洗净根部残余的培养基, 栽种于高温灭菌的蛭石与珍珠岩3:1 (*V/V*)的基质中, 30 d后观察并统计结果。

1.2.7 数据统计

采用 Excel 2013、SAS 9.0软件对试验数据进行统计分析。

2 实验结果

2.1 愈伤组织的诱导

灭过菌的种子接种于诱导培养基1周后, 一端开始有愈伤组织生成。结果表明, 不同植物生长调节物质配比的MS培养基对愈伤组织的诱导具有一定差异(表1)。其中添加NAA的Y₈~Y₁₀培养基无愈伤组织生成, 而是由种子直接发芽伸出嫩芽或根(图1-A)。以2,4-D作为生长素配制的培养基均可以成功诱导出愈伤组织(图1-B)。2,4-D搭配6-BA的培养基(Y₁₁~Y₁₃)诱导率整体略高于2,4-D搭配KT的培养基(Y₁~Y₃)。KT及6-BA浓度一定时, 添加1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D的Y₁及Y₁₁培养基的出愈率分别与Y₂、Y₃及Y₁₂、Y₁₃呈显著差异。由Y₄~Y₇可以看出, 2,4-D浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 其出愈率随6-BA浓度的增加而升高, 而6-BA浓度至4.0 mg·L⁻¹时, 没有愈伤组织产生。当6-BA浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 出愈率基本随2,4-D浓度的升高而降低(Y₁₁~Y₁₃)。诱导培养基中以Y₁₁培养基的出愈率最高, 且与除Y₆外的其他处理间差异显著。因此最终选择添加MS+1 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA培养基作为愈伤组织诱导培养基, 30 d后其出愈率为68.7%, 愈伤组织呈浅黄绿色, 黏性。

2.2 愈伤组织的继代与分化

选择具有黏性、浅黄绿色或浅黄色且生长状态良好的愈伤组织, 接入继代培养基中培养约30 d, 愈伤组织逐渐增多(图2-A)。之后接种在编号为F₁~F₉的培养基中进行分化培养并统计分化率(表2)。培养30~35 d, 部分愈伤组织逐渐分化出不定芽(图2-B和C), 之后伸长形成茎和叶(图2-D), 后期成为小株丛(图2-E), 最终长成幼苗(图2-F)。结果表明, 添加6-BA的培养基分化率均在85.9%以上, 显著高于添加KT的培养基。可见, 6-BA在无芒雀麦种子愈伤组织的分化过程中起重要作用。添加0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的3个培养基间的分化率无显著差异。添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA的F₈分化率与F₇、F₉呈显著差异。当NAA浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 不定芽多且生长迅速, 其中以F₈培养基的愈伤组织分化率最高, 褐化程度低。因此选择MS+2 mg·L⁻¹ NAA+1 mg·L⁻¹ 6-BA培养基作为最佳的分化培养基。

表1 不同浓度植物生长调节物质对比对无芒雀麦愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different concentrations of plant growth substances on callus induction of *B. inermis*

培养基编号	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	KT浓度/mg·L ⁻¹	出愈率/%	愈伤组织特点
Y ₁	1.0	—	—	0.05	60.6±4.3 ^b	乳白色, 粘状
Y ₂	2.0	—	—	0.05	48.0±3.5 ^{cd}	浅黄绿色, 黏性
Y ₃	4.0	—	—	0.05	42.0±2.6 ^d	浅黄色, 黏性
Y ₄	0.5	0.5	—	—	36.0±3.2 ^e	乳白色, 粘状
Y ₅	0.5	1.0	—	—	44.0±2.1 ^d	浅黄色, 块状
Y ₆	0.5	2.0	—	—	64.9±2.5 ^{ab}	浅黄绿色, 粘性
Y ₇	0.5	4.0	—	—	0	无愈伤组织
Y ₈	—	—	1.0	0.05	0	发芽, 无愈伤组织
Y ₉	—	—	2.0	0.05	0	发芽, 无愈伤组织
Y ₁₀	—	—	4.0	0.05	0	发芽, 无愈伤组织
Y ₁₁	1.0	0.5	—	—	68.7±1.6 ^a	浅黄绿色, 黏性
Y ₁₂	2.0	0.5	—	—	52.6±2.9 ^c	浅黄色, 黏性
Y ₁₃	4.0	0.5	—	—	49.8±2.1 ^c	浅黄色, 块状

同一指标数据用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P < 0.05$), 下同。

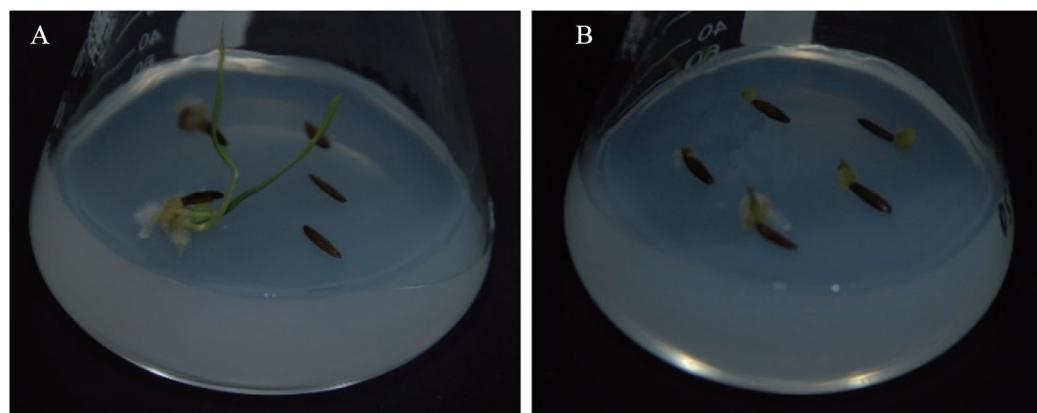


图1 植物生长调节物质NAA与2,4-D的诱导差异

Fig.1 Induction difference between plant growth substances NAA and 2,4-D

A: 添加NAA的培养基; B: 添加2,4-D的培养基。培养时间为8~10 d。

2.3 不同培养基对生根的影响

分化得到的植株丛分别接入1/2MS、MS生根培养基中, 定期观察生根情况。结果发现, 植株丛在两种培养基中均能生根, 生根率可达100%。其中, 植株丛在MS培养基中生出的根较粗, 但生根速度较慢, 培养10 d根长仅2~3 cm (图3-A); 根的数量较少, 培养40 d后单株生根数5~8条(图3-C)。再生苗在1/2MS培养基中生根速度较MS培养基快, 10 d时间根长已达8~10 cm (图3-B); 40 d左右生出的根已经布满整个培养基底部, 其新生根较细但数量多, 根系生长状态良好(图3-D)。最终选用1/2MS培养基作为生根培养基。

2.4 植株的驯化与移栽

当组培苗长至5~6 cm左右且根系生长发达时, 由人工培养箱移至培养室内, 之后除去封口膜在培养室放置3~5 d, 使植物适应外界环境。流水下洗净根部的培养基后将组培苗移出锥形瓶, 移栽至已灭菌的蛭石:珍珠岩为3:1 (V/V)的基质中, 弱光条件下培养10 d左右, 转移至阳光充足的地方继续培养, 20 d后成活率可达70%~80%。

3 讨论

组织培养再生体系的建立是植物基因转化成功的基础。大多数植物的再生体系受基因型、外

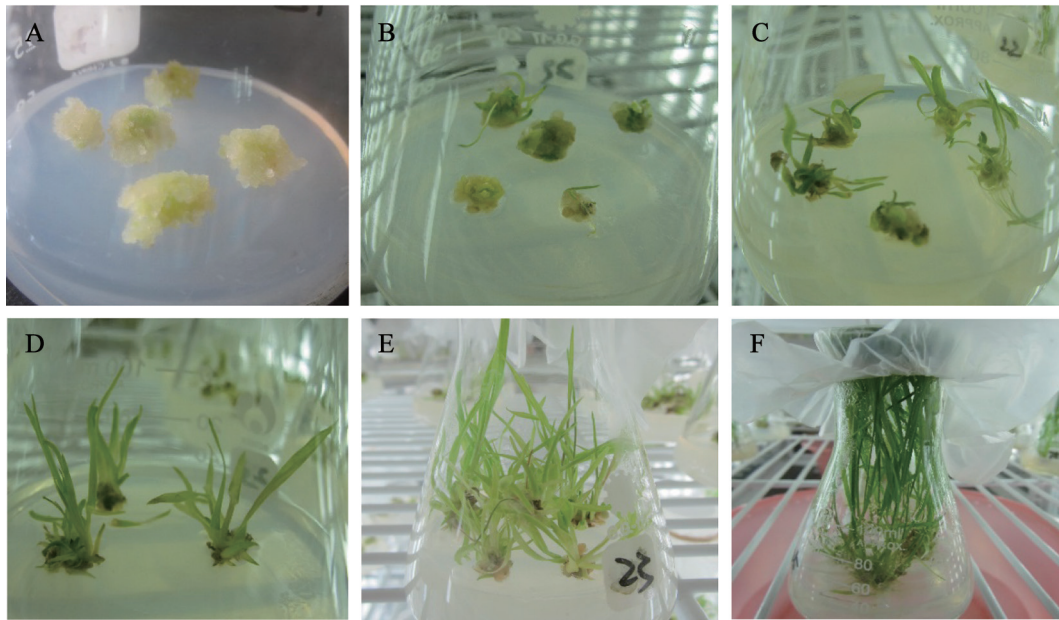


图2 无芒雀麦愈伤组织的分化和植株再生

Fig.2 Callus differentiation and plant regeneration of *B. inermis*

A: 愈伤组织; B: 愈伤组织分化初期; C: 生出不定芽; D: 不定芽伸长形成茎和叶; E: 形成小株丛; F: 小株丛成苗。

表2 不同浓度植物生长调节物质对比对无芒雀麦愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of plant growth substances on callus differentiation of *B. inermis*

培养基编号	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	KT浓度/mg·L ⁻¹	分化率/%	不定芽生长情况
F ₁	—	1.0	0.05	38.7±2.5 ^{de}	生长缓慢, 不定芽少
F ₂	—	2.0	0.05	41.5±4.8 ^d	生长缓慢, 不定芽较少
F ₃	—	4.0	0.05	36.1±3.6 ^e	生长缓慢, 不定芽少
F ₄	0.5	1.0	—	85.9±2.6 ^e	生长快, 不定芽较多
F ₅	0.5	2.0	—	91.1±1.4 ^{bc}	生长迅速, 不定芽多, 褐化
F ₆	0.5	4.0	—	90.5±1.7 ^{bc}	生长快, 不定芽多, 褐化
F ₇	1.0	1.0	—	94.3±1.8 ^b	生长快, 不定芽较多
F ₈	1.0	2.0	—	100.0±0.0 ^a	生长迅速, 不定芽多
F ₉	1.0	4.0	—	92.6±1.4 ^{bc}	生长快, 不定芽较多, 褐化

植物种类的影响, 一个高效再生体系只适用于特定的几种基因型及外植体的类型(Przetakiewicz等2003)。禾本科牧草的组织培养再生相对较难, 主要是适用的外植体较单一且取材困难(Wang等2001)。以成熟种子作为外植体进行组织培养具有取材容易、不受时间季节限制、容易保存等优势。目前已有斑茅(*Saccharum arundinaceum*)、多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)、小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)等禾本科牧草采用成熟种子作为外植体成功建立了组培再生体系(张瑜等2017; 曾庆飞等2017; 王雪芳等2014)。本研究选用无芒雀麦成熟

种子作为外植体, 在不同植物生长调节物质配比的培养基中培养, 同样成功建立了组培再生体系, 且从愈伤组织诱导到再生小植株形成仅需16~18周时间, 为下一步的转基因试验提供了技术支撑。

在组织培养的过程中, 植物生长调节物质在其中起关键作用。不同基因型愈伤组织的诱导及分化存在差异, 而内源激素会直接影响植物组织培养过程中的形态变化。培养基中植物生长调节物质的浓度配比和种类对植物组织培养过程的影响最为明显(赵丽君等2011)。在禾本科植物愈伤组织诱导中, 2,4-D通常是起决定作用的植物生长

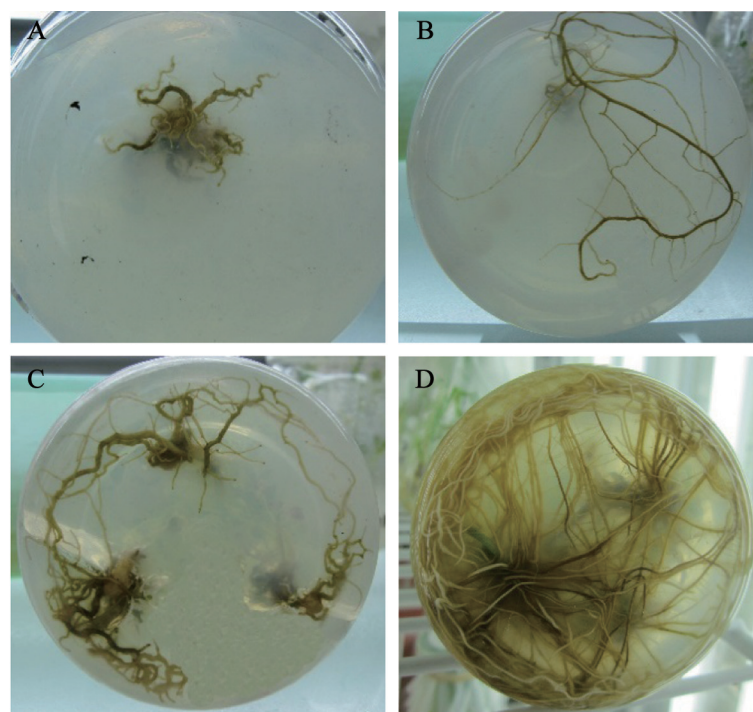


图3 MS与1/2MS培养基的生根差异

Fig.3 Rooting difference between media MS and 1/2MS

A: MS培养基生根效果(培养10 d); B: 1/2MS培养基生根效果(培养10 d); C: MS培养基生根效果(培养30 d); D: 1/2MS培养基生根效果(培养30 d)。

调节物质,这在冰草属、高羊茅等禾本科牧草(霍秀文2004; 郭伶俐等2015)中都得到了证实。李晓玲等(2010)的研究结果表明,2,4-D在小花碱茅和朝鲜碱茅(*P. chinampoensis*)愈伤组织的诱导及继代培养中起着重要的作用。本研究中同样发现,在无芒雀麦组织培养再生体系建立的过程中,仅有在添加2,4-D的培养基中才有愈伤组织生成,而添加NAA的培养基没有诱导出愈伤组织。而在同样的2,4-D浓度水平下,愈伤组织诱导率随6-BA的加入量而升高;但6-BA浓度过高($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,诱导率为0。杨茹等(2010)的研究结果也表明,在含有2,4-D的培养基中加入少量的6-BA能促进黑麦草(*L. perenne*)愈伤组织的诱导,但愈伤组织的诱导率随着6-BA浓度的升高而下降,浓度越高抑制作用越显著。

NAA是植物组织培养中常用的生长素类植物生长调节物质之一,很多研究报道指出NAA有利于愈伤组织芽点的分化,因此在诱导愈伤组织分化时使用较多(贾秀苹2008)。本研究中发现,当NAA浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,无论添加KT还是6-BA,

其分化率都是最高的,可见NAA对无芒雀麦愈伤组织的分化起关键作用。其中添加NAA和6-BA的培养基整体分化率较高,均可达85%以上,说明6-BA较KT更适用于无芒雀麦愈伤组织的分化。在柱花草属(*Stylosanthes*)组织培养和悬浮细胞培养的研究中,高浓度NAA与适当浓度6-BA配合使用明显改善了愈伤组织的质量和生长速度,促进了丛生芽的形成(单国燕2010)。对苜蓿属愈伤组织培养的研究中也指出,当细胞分裂素6-BA、KT与生长素NAA的比值小时较有利于芽的分化(肖燕等2007)。

组培苗生根是无芒雀麦组织培养植株再生的一个重要步骤。已有研究证实,不添加任何植物生长调节物质的培养基更易于组培苗生根,其中1/2MS培养基的生根效果最好,且可以提高组培苗移栽的成活率(张东武等2011; 黄帆等2010)。本研究对不添加植物生长调节物质的MS培养基和1/2MS培养基的生根效果进行了比较,发现在1/2MS生根培养基中,无芒雀麦再生苗生根速度快且根系更发达,生根率高达100%。

参考文献(References)

- Chen LL, Na R, Liu ML, et al (2009). Study on callus induction and differentiation of mature seed of smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss). *Chin J Grassl*, 31 (5): 116–119 (in Chinese with English abstract) [陈玲玲, 那日, 刘美玲等(2009). 无芒雀麦种子愈伤组织诱导技术的研究. *中国草地学报*, 31 (5): 116–120]
- Chen M, Jia S (2001). *Forage Plants in China*. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [陈默君, 贾慎修(2001). *中国饲用植物*. 北京: 中国农业出版社]
- Chen X (2012). The establishment of *Agropyron mongolicum* Keng regeneration system and functional analysis of DREB genes (dissertation). Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese with English abstract) [陈雪英(2012). 蒙古冰草组织培养再生体系建立及其DREB基因功能研究(学位论文). 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Guo LN, Liu JW, Ma DM, et al (2015). Effects of different concentration of hormones on the regeneration system of tall fescue. *Acta Argest Sin*, 23 (3): 517–525 (in Chinese with English abstract) [郭伶俐, 刘建文, 麻冬梅等(2015). 不同浓度激素对比对高羊茅再生体系建立的影响. *草地学报*, 23 (3): 517–525]
- Huang F, Wang MJ, He LJ, et al (2010). Study on organogenesis of stem segments in vitro of F1 generation of *Trifolium ambiguum* × *T. repens*. *Pratacult Sci*, 27 (5): 85–90 (in Chinese with English abstract) [黄帆, 王明玖, 何丽君等(2010). 白三叶×高加索三叶草F1代茎段离体培养器官发生的研究. *草业科学*, 27 (5): 85–90]
- Huo XW, Wei JH, Xu CB, et al (2004). Plant regeneration and genetic transformation in wheatgrass (*Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Mengnong'). *Sci Agr Sin*, 37 (5): 642–647 (in Chinese with English abstract) [霍秀文, 魏建华, 徐春波等(2004). 冰草种间杂种蒙农杂种组织培养再生和遗传转化体系的建立. *中国农业科学*, 37 (5): 642–647]
- Jia X (2008). Induced calli and establishment of regeneration system of mature maize embryo (dissertation). Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese with English abstract) [贾秀莘(2008). 玉米成熟胚愈伤组织诱导及再生体系建立(学位论文). 兰州: 甘肃农业大学]
- Li J, Zhang WJ, Wang T (2014). Establishing a highly efficient plant regeneration system of *Medicago falcata* L. *Acta Argest Sin*, 22 (4): 834–839 (in Chinese with English abstract) [李娟, 张万军, 王涛(2014). 黄花苜蓿高频植株再生体系建立的研究(2014). *草地学报*, 22 (4): 834–839]
- Li XL, Li KX, Yu XM (2010). Establishment of tissue culture system for *Puccinellia tenuiflora* and *Puccinellia chinampoensis*. *Chin J Grassl*, 32 (6): 90–93 (in Chinese with English abstract) [李晓玲, 李克秀, 于晓明(2010). 星星草和朝鲜碱茅组织培养体系的建立. *中国草地学报*, 32 (6): 90–93]
- Liu YL, Zhu JB (2015). Embryonic callus induction and plant regeneration from *Pennisetum* hybrid. *Plant Physiol J*, 51 (1): 136–140 (in Chinese with English abstract) [刘逸泠, 祝建波(2015). 杂交狼尾草胚性愈伤组织的诱导与植株再生. *植物生理学报*, 51 (1): 136–140]
- Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2003). The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 73: 245–256
- Shan G (2010). Study on tissue culture and cell suspension culture of stylosanthes (dissertation). Haikou: Hainan University (in Chinese with English abstract) [单国燕(2010). 柱花草组织培养和细胞悬浮培养的研究(学位论文). 海口: 海南大学]
- Sun TJ, Han JG, Zhao SQ, et al (2005). Effect of fertilizer application on seed yield and yield components of *Bromus inermis*. *Acta Pratacult Sin*, 14 (2): 84–92 (in Chinese with English abstract) [孙铁军, 韩建国, 赵守强等(2005). 施肥对无芒雀麦种子产量及产量组分的影响. *草业学报*, 14 (2): 84–92]
- Wang CL, Zhou ML, Dong XN, et al (2015). Optimization and comparison of two regeneration system of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J Agr Sci Technol*, 17 (4): 53–61 (in Chinese with English abstract) [王成龙, 周美亮, 董雪妮等(2015). 紫花苜蓿两种再生体系的优化及比较. *中国农业科技导报*, 17 (4): 53–61]
- Wang XF, Wang CM, Zhang JL, et al (2014). Development of plant regeneration system via tissue culture in *Puccinellia tenuiflora*. *Acta Pratacult Sin*, 23 (6): 355–360 (in Chinese with English abstract) [王雪芳, 王春梅, 张金林等(2014). 小花碱茅组织培养植株再生体系的建立. *草业学报*, 23 (6): 355–360]
- Wang Z, Hopkins A, Mian R (2001). Forage and turf grass biotechnology. *Crit Rev Plant Sci*, 20 (6): 573–619
- Wei JL, Li LF, Yu XB (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Pennisetum setaceum* 'Rubrum'. *Plant Physiol J*, 51 (2): 207–211 (in Chinese with English abstract) [魏进莉, 李丽芳, 于学斌(2015). 紫叶狼尾草的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 51 (2): 207–211]
- Xiao Y, Zhang B, Fan YG, et al (2007). Effects of 6-BA and NAA on different explants of cultured tissues of alfalfa. *Xinjiang Agr Sci*, 44 (5): 658–662 (in Chinese with English abstract) [肖燕, 张博, 范永刚等(2007). 6-BA、NAA对苜蓿不同外植体愈伤组织培养的影响. *新疆农业科学*, 44 (5): 658–662]
- Xu CB, Mi FG, Wang Y, et al (2009). Factors influencing plant regeneration systems in mature embryo culture of *Agropyron*. *Acta Pratacult Sin*, 18 (1): 80–85 (in Chinese with English abstract) [徐春波, 米福贵, 王勇等(2009). 影响冰草成熟胚组织培养再生体系频率的因素. *草业学报*, 18 (1): 80–85]
- Yan JH, Zhao ZY, He YL (2011). Tissue culture and plant

- regeneration from mature seed of two cultivars of tall fescue. *Acta Pratacult Sin*, 20 (2): 210–218 (in Chinese with English abstract) [闫军辉, 赵智燕, 何亚丽(2011). 两个高羊茅品种成熟种子再生体系的建立. *草业学报*, 20 (2): 210–218]
- Yang R, Yuan QH, Cao ZZ, et al (2010). Establishment and optimization of perennial ryegrass genetic transformation system with agrobacterium-mediated method. *Chin J Grassl*, 32 (1): 26–31 (in Chinese with English abstract) [杨茹, 袁庆华, 曹致中等(2010). 农杆菌介导多年生黑麦草遗传转化体系的建立. *中国草地学报*, 32 (1): 26–31]
- Zeng QF, Wei X, Chen X, et al (2017). Optimization and establishment of a high frequency regeneration system for *Lolium multiflorum* ‘Tetragold’ and *L. perenne* ‘Four seasons’. *Pratacult Sci*, 34 (8): 1649–1660 (in Chinese with English abstract) [曾庆飞, 韦鑫, 陈锡等(2017). 多花黑麦草特高和多年生黑麦草四季高频组培再生体系的优化与建立. *草业科学*, 34 (8): 1649–1660]
- Zhang DW, Liu H, Zhao HX (2011). Optimization of regeneration system of tissue culture from mature embryos and screening of wheat genotypes with high regeneration frequency. *J Trit Crops*, 31 (5): 847–852 (in Chinese with English abstract) [张东武, 刘辉, 赵惠贤(2011). 小麦成熟胚组织培养再生体系的优化及高再生率基因型的筛选. *麦类作物学报*, 31 (5): 847–852]
- Zhang Y, Yan JJ, Mahai TC, et al (2017). Callus induction of mature seed of *Erianthus arundinaceus* and establishment of the regeneration system. *Hubei Agr Sci*, 56 (8): 1570–1576 (in Chinese with English abstract) [张瑜, 鄢家俊, 马海天才等(2017). 斑茅成熟种子愈伤诱导及再生体系的建立. *湖北农业科学*, 56 (8): 1570–1576]
- Zhao LJ, Wang XF, Zhang JL, et al (2011). Plant tissue culture and its research advances and application in the forage plants. *Pratacult Sci*, 28 (6): 1140–1148 (in Chinese with English abstract) [赵丽君, 王雪芳, 张金林等(2011). 植物组织培养及其在草类植物中的研究和应用. *草业科学*, 28 (6): 1140–1148]
- Zhao Y, Chen XY, Yun JF, et al (2016). Induction of callus and plant regeneration from shoot tip in *Agropyron mongolicum* Keng. *J North Agr*, 44 (2): 18–22 (in Chinese with English abstract) [赵彦, 陈雪英, 云锦凤等(2016). 蒙古冰草茎尖愈伤组织及其再生植株诱导. *北方农业学报*, 44 (2): 18–22]
- Zhao YP, Qi BL, Gao GC, et al (2005). A high quality pasturage in soil and water conservation – *Bromus inermis*. *Jilin For Sci Technol*, 34 (6): 5–12 (in Chinese with English abstract) [赵云鹏, 齐宝林, 高国臣等(2005). 水土保持优良牧草——无芒雀麦. *吉林林业科技*, 34 (6): 5–12]
- Zhao ZY, Pan JS, He YL, et al (2009). Tissue culture and plantlet regeneration from vegetative organs of two clones of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Acta Pratacult Sin*, 18 (5): 168–175 (in Chinese with English abstract) [赵智燕, 潘俊松, 何亚丽等(2009). 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. *草业学报*, 18 (5): 168–175]

Tissue culture and regeneration of *Bromus inermis*

HUANG Fan^{1,2}, LI Jun^{1,2}, LIU Lei^{1,2}, SHI Wen-Gui^{1,2}, LI Hong-Yan^{1,2}, LI Zhi-Yong^{1,2,*}

¹Institute of Grassland Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China

²Key Laboratory of Grassland Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Hohhot 010010, China

Abstract: Tissue culture and regeneration of *Bromus inermis* were established using the seeds as explants. The optimal induction, differentiation and rooting media were selected for subsequent transgenic experiment. The results show that the optimal medium for callus induction was MS+1 mg·L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)+0.5 mg·L⁻¹ 6-benzylaminopurine (6-BA), and callus induction ratio reached to 68.7%. The optimal medium for adventitious bud differentiation was MS+2 mg·L⁻¹ 1-naphthylacetic acid (NAA)+1 mg·L⁻¹ 6-BA, and the differentiation ratio was 100.0%. The optimal rooting medium was 1/2MS. Regenerated plantlets were transplanted into the culture matrix with vermiculite and perlite (3:1, V/V), and the survival rate was 70%–80% after 30 d.

Key words: *Bromus inermis*; tissue culture; regeneration

Received 2017-10-23 Accepted 2018-03-26

This work was supported by Chinese Academy of Agricultural Sciences Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-IGR2015-04), and Fundamental Research Funds for Central Non-profit Scientific Institution (1610332018020).

*Corresponding author (zhiyongli1216@126.com).