

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201406024

魏树强, 钱永强, 刘俊祥, 等. 多年生黑麦草再生体系的建立[J]. 广西植物, 2015, 35(5):709—714

Wei SQ, Qian YQ, Liu JX, et al. Establishment of tissue regeneration system of *Lolium perenne*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5):709—714

多年生黑麦草再生体系的建立

魏树强, 钱永强, 刘俊祥, 孙振元*

(中国林业科学研究院 林业研究所/国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要:以多年生黑麦草‘高帽2号’(*Lolium perenne* ‘Top Hat 2’)颖果为外植体,分别研究了胚端半粒颖果、纵切的胚端半粒颖果、胚端颖果小块、颖果小块这四种外植体处理方式与氯化汞、次氯酸钠两种表面灭菌方法对其愈伤组织诱导的影响;利用两因素(2,4-D和6-BA)随机区组试验设计研究了不同植物生长调节物质及其浓度配对外植体愈伤组织诱导的影响;利用三因素(NAA,6-BA和ZT)四水平正交试验设计研究了不同植物生长调节物质及其浓度配比对不定芽诱导的影响;研究了0.10 mg·L⁻¹的NAA和IBA分别对不定根诱导的影响。结果表明:相同条件下,以饱满胚端半粒颖果为外植体,75%酒精表面灭菌1 min后,再用含1 mL·L⁻¹ Tween 20的次氯酸钠溶液(有效氯含量>10%)处理30 min,愈伤组织诱导率最高;适宜的愈伤组织诱导培养基为MS+5 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.03 mg·L⁻¹ 6-BA(pH=5.8),诱导率达68.7%,获得的高质量愈伤组织;不定芽诱导培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA、0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.9 mg·L⁻¹ ZT,不定芽诱导率最高,为56%;不定根诱导培养基为1/2MS+IBA培养基时,根系粗壮,诱导生根率为90%。该研究建立了多年生黑麦草高效组培再生体系,为高效基因工程育种的开展奠定了良好基础。

关键词:多年生黑麦草;组织培养;外植体;诱导;再生

中图分类号:Q943.1,S688.4 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2015)05-0709-06

Establishment of tissue regeneration system of *Lolium perenne*

WEI Shu-Qiang, QIAN Yong-Qiang, LIU Jun-Xiang, SUN Zhen-Yuan*

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The caryopsis of perennial ryegrass(*Lolium perenne*) cultivar ‘Top Hat 2’ was used as explants. Firstly, this paper focused on the effect of four ways of explants treatments (embryo end half a caryopsis, slitting embryo end half a caryopsis, small pieces of embryo end for caryopsis, small pieces of caryopsis) and two ways of surface sterilization methods(disinfection with sodium hypochlorite solution, disinfection with mercuric chloride) on callus induction; Secondly, we studied the effects of different plant growth regulators(2, 4-D and 6-BA) and their concentrations on callus induction by randomized block design of two factors; Thirdly, we studied the effects of different plant growth regulators(NAA, 6-BA and ZT) and their concentrations on adventitious bud differentiation by orthogonal test of three factors and four levels; At last, we separately studied the effects of 0.10 mg·L⁻¹NAA and IBA on adventitious root induction. The results were as follows: Under the same conditions, explants of full end half a caryopsis embryos were surface sterilized with 75% alcohol for 1 min, then treated with sodium hypochlorite solution 1 mL·L⁻¹ Tween 20 (the chlorine content>10%) for 30 min, the rate of callus induction were better than the other’s; The explants inoculated on MS medium with 5 mg·L⁻¹ 2,4-D and 0.03 mg·L⁻¹ 6-BA (pH=5.8), provid-

收稿日期: 2014-09-18 修回日期: 2014-12-13

基金项目: 国家“863”项目(2011AA10020902)

作者简介: 魏树强(1983-),男,山东临沂人,博士研究生,主要从事园林植物抗逆分子育种工作,(E-mail)weishuqiang2008@163.com。

*通讯作者: 孙振元,研究员,博士生导师,主要从事树木生理生态与园林植物分子育种等研究,(E-mail)sunzy@263.net。

ed us a relatively high induction rate of 68.7% and high quality callus; The most high differentiation rate was 56% when adventitious buds were inoculated in MS with 0.5 mg · L⁻¹ NAA, 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA and 0.9 mg · L⁻¹ ZT. The best rooting medium was 1/2MS+IBA with nothing plant growth regulator obtaining stout root, then the regeneration rate was 90%. This paper has established efficient tissue culture regeneration system for perennial ryegrass and laid a good foundation for conducting highly efficient genetic engineering.

Key words: *Lolium perenne*; tissue culture; explants; induction; regeneration

多年生黑麦草(*Lolium perenne*)是一种丛生型多年生禾本科冷季型草坪草,其根系发达,分蘖力强,地上生物量大,成坪速度快,生态适应性强(马博英,2010),是困难立地草坪建立的先锋草种,在我国南北方应用非常广泛,是城市绿化和运动场建设中不可或缺的植被材料。近年来,受镉等重金属污染的土壤面积急剧扩大,且污染程度日趋严重,选择重金属高富集植物材料应用于污染土壤生物修复越来越受到关注。多年生黑麦草对镉等重金属具有较强的富集能力(刘俊祥等,2013),且可通过多次刈割实现对重金属的转移,大大提高对污染土壤的修复效率,极具开发应用潜力。结合基因工程等现代生物技术培育镉等重金属高富集的多抗多年生黑麦草新品种,对丰富重金属污染土壤修复植物材料、提高修复效率具有重要意义。

建立高效组培再生体系,搭建有效的转化平台,是实现多年生黑麦草转基因定向育种的重要途径。迄今,有关多年生黑麦草再生体系建立方面已有研究(冯霞等,2004;陈季琴等,2004;杜雪玲等,2005;李雪等,2005;蔡能等,2007;徐远东等,2008),但主要针对愈伤组织诱导或分化等几个关键环节影响因素筛选与优化,仍存在胚性愈伤组织诱导率低,植株再生效率不高等问题。基于此,本研究从外植体的处理与消毒、愈伤组织诱导、分化和生根这一完整过程来建立多年生黑麦草高效再生体系,为开展高效基因工程育种,培育镉高富集植物新材料奠定良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

多年生黑麦草栽培品种‘高帽 2 号’。

1.2 方 法

1.2.1 外植体类型与表面灭菌方法 外植体类型: I:胚端半粒颖果; II:纵切的胚端半粒颖果。胚端半粒颖果经表面灭菌后,在超净台内无菌滤纸上被纵切; III:胚端颖果小块。胚端半粒颖果经表面灭菌

后,在超净台内无菌滤纸上被切成大小均匀的小块; IV:颖果小块。颖果经表面灭菌后,在超净台内无菌滤纸上被切成大小均匀的小块。

外植体类型的筛选试验利用次氯酸钠进行表面灭菌,且选取愈伤组织诱导率最高和质量最好的前两种外植体类型进行表面灭菌方法的筛选。

表面灭菌方法:氯化汞处理:外植体+75%酒精 1 min,0.1%氯化汞处理的 15 min;次氯酸钠处理:外植体+75%酒精 1 min,1 mL · L⁻¹的 Tween 20+次氯酸钠溶液(有效氯含量大于 10%),30 min 后,在超净台内将胚端半粒颖果纵切。最后均用无菌水冲洗 5 次。每个处理 3 个重复(d=90 mm,培养皿),每个重复 50 个外植体。愈伤组织的诱导与分化每个处理重复数和外植体数量均相同。

1.2.2 愈伤组织的诱导 随机区组实验设计。设置不同的 2,4-D(2,4-二氯苯氧基乙酸)浓度(3、4、5、6、7 mg · L⁻¹)和 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)浓度(0、0.03、0.1、0.3、0.6、1.0 mg · L⁻¹),共 30 个处理。

1.2.3 不定芽的诱导 采用 L₁₆(4³)正交表设计三因素四水平正交实验(表 1),NAA(萘乙酸)浓度为 0、0.30、0.50、1.00 mg · L⁻¹,6-BA 浓度为 0、0.50、1.00、2.00 mg · L⁻¹,ZT(玉米素)浓度为 0、0.30、0.60、0.90 mg · L⁻¹,共 16 个处理。

表 1 L₁₆(4³)正交实验设计

Table 1 Orthogonal design of L₁₆(4³)

试验号 Test No.	植物生长调节物质 (Plant growth regulator)		
	NAA (mg · L ⁻¹)	6-BA (mg · L ⁻¹)	ZT (mg · L ⁻¹)
1	0	0	0
2	0.30	0.50	0.30
3	0.50	1.00	0.60
4	1.00	2.00	0.90

1.2.4 不定芽的生根诱导 生根培养基设 3 个处理,分别为 1/2MS (Murashige and Skoog) 培养基、1/2MS 培养基+0.10 mg · L⁻¹ NAA、1/2MS 培养基+0.10 mg · L⁻¹ IBA(吲哚丁酸)。每处理外植体为 10 个,共 5 个重复。接种后第 30 天,观察并记录不

定芽的生根情况。

1.2.5 培养条件 各阶段所用基本培养基均以 MS 为基础,附加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,添加不同种类和浓度的植物生长调节物质, pH6.0。外植体处理与表面灭菌方法筛选试验所用培养基为在基础培养基中添加最终浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA。继代培养基中植物生长调节物质植物生长调节物质组成与愈伤组织诱导培养基相同,其中 6-BA 浓度不变,2,4-D 浓度减半,添加甘露醇 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养室温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 60%。愈伤组织的诱导与继代阶段均为完全黑暗培养,分化阶段为光照培养,光照强度为 $2\ 000 \sim 3\ 000 \text{ lx}$,光照周期为 14 h/d。

1.2.6 统计与分析 (1)统计方法:愈伤诱导率=(出愈数/外植体数) $\times 100\%$;不定芽诱导率=(产生不定芽的愈伤组织数量/愈伤组织数量) $\times 100\%$;诱导生根率=[(生根苗数/再生苗数) $\times 100\%$]。(2)分析方法:利用 Excel 2007 进行数据整理、标准差的计算,利用 SPSS 13.0 进行方差分析和 Duncan 多重对比($P < 0.05$ 与 $P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 外植体的类型与表面灭菌法对愈伤组织诱导的影响

2.1.1 外植体类型对愈伤组织诱导率的影响 经次氯酸钠处理后的胚端半粒颖果、纵切的胚端半粒颖果、胚端颖果小块、颖果小块这四类外植体中,胚端半粒颖果的愈伤组织诱导率最高,为 60%,它与其他三类外植体在愈伤组织诱导率上的差异均达到显著性水平(图 1),获得了致密、淡黄色愈伤组织。

2.1.2 外植体不同表面灭菌法对愈伤组织诱导率的影响 图 2 显示,无论是以胚端半粒颖果,还是以纵切的胚端半粒颖果为外植体,次氯酸钠处理下外植体的愈伤组织诱导率均高氯化汞处理下的外植体,而且差异达显著水平($P < 0.01$),所以下面的实验均采用次氯酸钠进行外植体的表面灭菌处理。

2.2 2,4-D 和 6-BA 对外植体愈伤组织诱导的影响

以多年生黑麦草饱满胚端半粒颖果为外植体(图 3:A),进行愈伤组织诱导(表 2)。表 2 表明,2,4-D 对愈伤组织诱导率的影响均达到了极显著性水平,但两者的交互效应的影响未达到显著性水平。当 2,4-D 浓度为 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有最大平均愈伤组

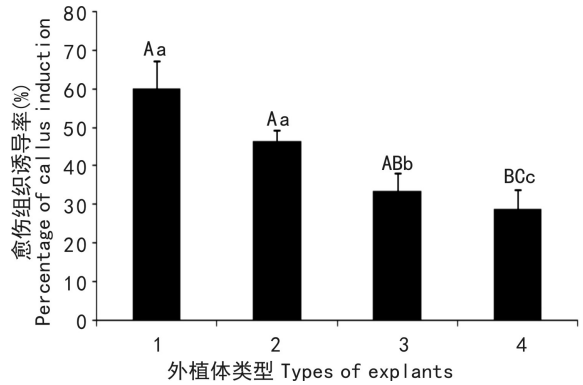


图 1 多年生黑麦草外植体处理方式对其愈伤组织诱导的影响 1. 胚端半粒颖果; 2. 纵切的胚端半粒颖果; 3. 胚端颖果小块; 4. 颖果小块。不同的大写字母和小写字母分别表示在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Fig. 1 Effects of different treatment ways of explants to callus induction for perennial ryegrass 1. Embryo end of half caryopsis; 2. Slitting embryo end of half caryopsis; 3. Small pieces of embryo end for caryopsis; 4. Small pieces of caryopsis. Different little and capital letters mean significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ level, respectively.

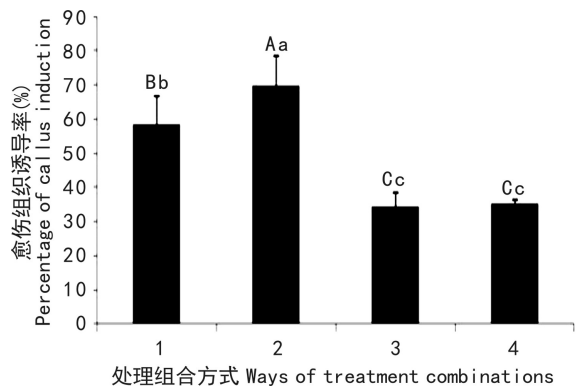


图 2 不同外植体表面灭菌方法对多年生黑麦草愈伤组织诱导率的影响 1. 胚端半粒颖果(氯化汞消毒处理); 2. 胚端半粒颖果(次氯酸钠消毒处理); 3. 纵切的胚端半粒颖果(氯化汞消毒处理); 4. 纵切的胚端半粒颖果(次氯酸钠消毒处理)。不同的大写字母和小写字母分别表示在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Fig. 2 Effects of different ways of surface sterilization to callus induction percentage for explants of perennial ryegrass 1. Embryo end of half caryopsis (Disinfection with HgCl₂); 2. Embryo end of half caryopsis (Disinfection with NaClO); 3. Slitting embryo end of half caryopsis (Disinfection with HgCl₂); 4. Slitting embryo end of half caryopsis (Disinfection with NaClO). Different small and capital letters mean significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively.

织诱导率;当 6-BA 浓度为 $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有最大平均愈伤组织诱导率(表 3),但在此浓度水平下所诱导所得的愈伤组织质量不高。因此愈伤组织诱导

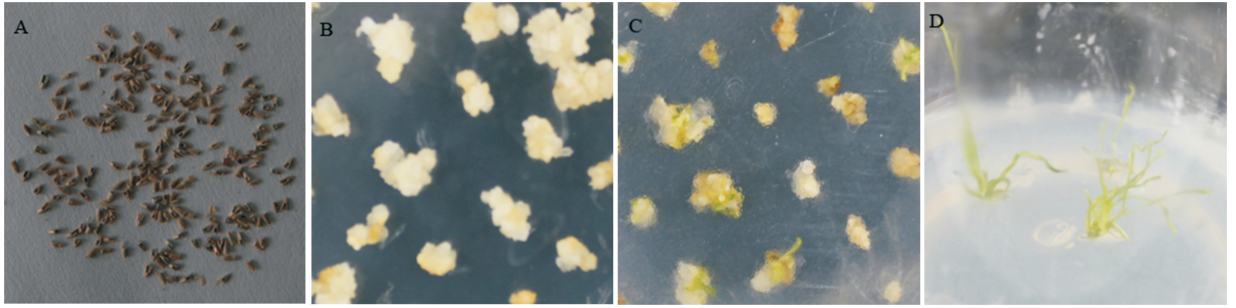


图 3 多年生黑麦草外植体与愈伤组织、不定芽、不定根的诱导 A. 外植体; B. 愈伤组织诱导获得的淡黄的、致密愈伤组织; C. 诱导获得的不定芽; D. 多年生黑麦草的再生植株。

Fig. 3 Explants of perennial ryegrass and its callus induction, differentiation and regeneration A. Explants; B. Dense, yellowish callus obtaining from callus induction; C. Adventitious buds obtaining from induction of adventitious buds; D. Regeneration plant of perennial ryegrass.

表 2 2,4-D、6-BA 两因素随机区组实验方差分析表

Table 2 Two-factor randomized block experiment analysis of variance table for 2,4-D and 6-BA

变因 Variable	平方和 SS	自由度 Df	均方 MS	F	P
区组 Block	178 553.198	1	178 553.198	4 935.205	0.00
处理 Treatment	16 119.741	29	555.853	15.364	0.00
2,4-D	1 636.963	4	409.241	11.311	0.00
6-BA	12 625.840	5	2 525.168	69.796	0.00
NAA×6-BA	747.037	20	37.352	1.032	0.44
剩余 RSS	2 822.000	78	36.179		

表 3 不同浓度水平下 2,4-D、6-BA 对愈伤组织诱导率的显著性分析

Table 3 Analysis of significant levels of callus induction rate in different concentration levels for 2,4-D and 6-BA

植物生长调节物质种类 Types of plant growth regulators	浓度水平 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均愈伤组织诱导率 Average callus induction rate (%)
2,4-D	3.00	35.33±3.34Aa
	4.00	41.00±1.00Bb
	5.00	47.22±7.85Cd
	6.00	45.28±2.26Cd
	7.00	42.44±3.00BCbc
6-BA	0.00	59.13±2.00Ee
	0.03	53.00±1.54Dd
	0.10	43.13±1.56Cc
	0.30	39.53±2.09Cc
	0.50	32.27±1.54Bb
	0.70	26.47±1.21Aa

注: 不同大写和小写字母分别表示在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different small and capital letters mean significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ level, respectively.

最佳植物生长调节物质组合为 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA, 获得淡黄色、致密的愈伤组织(图 3-B), 此时愈伤组织诱导率为 68.7%。

2.3 三种生长调节物质对愈伤组织不定芽诱导率的影响

诱导的愈伤组织经两次继代培养, 进行不定芽的诱导实验(表 4), 表 4 显示, 当 NAA、6-BA、ZT 浓度分别为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或者 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均不定芽诱导率最大, 为 56%(表 4)。

表 4 $L_{16}(4^3)$ 正交实验结果

Table 4 Orthogonal experiment results of $L_{16}(4^3)$

试验号 Test No.	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	ZT ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	不定芽平均诱导率 Average shoot induction rate (%)
1	0	0	0	11
2	0	0.5	0.3	26
3	0	1.0	0.6	26
4	0	2.0	0.9	36
5	0.3	0	0.3	16
6	0.3	0.5	0	6
7	0.3	1.0	0.9	16
8	0.3	2.0	0.6	16
9	0.5	0	0.6	36
10	0.5	0.5	0.9	56
11	0.5	1.0	0	46
12	0.5	2.0	0.3	56
13	1.0	0	0.9	16
14	1.0	0.5	0.6	26
15	1.0	1.0	0.3	1
16	1.0	2.0	0	26

比较三种植物生长调节物质各浓度水平下的平均分化率(表 5)可知, NAA、6-BA、ZT 各浓度水平下的不定芽诱导率按极差大小排序分别为 NAA、6-BA 与 ZT, 这说明 NAA 浓度水平对不定芽诱导率影响最大; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 和 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZT 下平均不定芽诱导率最

表 5 NAA、6-BA 和 ZT 在四种浓度水平下的平均不定芽诱导率

Table 5 Average differentiation rate for adventitious buds at four different concentration levels of NAA, and 6-BA

植物生长调节物质种类 Types of plant growth regulators	浓度水平 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	不定芽诱导率 Average shoot induction rate (%)	极差 Range (%)
NAA	0	24.8	11.3
	0.30	13.5	
	0.50	48.5	
	1.00	17.3	
6-BA	0	19.8	8.7
	0.50	28.5	
	1.00	22.3	
	2.00	23.5	
ZT	0	22.3	8.7
	0.30	24.8	
	0.60	26.0	
	0.90	31.0	

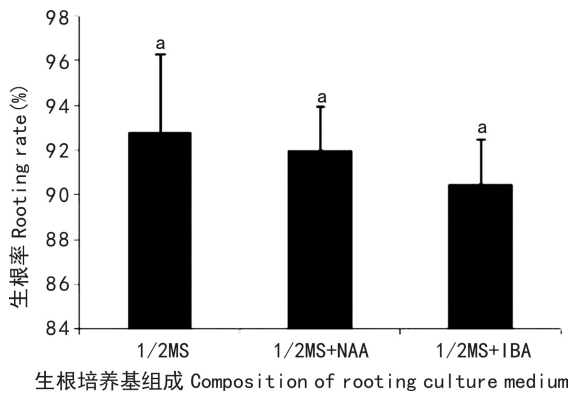


图 4 不同植物生长调节物质对不定芽的诱导生根率的影响 不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Fig. 4 Effects of different plant growth regulators on the root induction of adventitious buds Different small letters mean significant differences at $P < 0.05$ level.

大,结合表 4 实验结果可知,最佳植物生长调节物质的浓度水平组合为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 和 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZT。

2.4 两种生长调节物质对不定芽诱导生根的影响

多年生黑麦草不定芽的生根诱导较容易,各培养条件下其诱导生根率均在 90% 以上(图 4),其中以不添加任何植物生长调节物质的 1/2MS 培养基最高($P > 0.05$)。调查过程还发现,植物生长调节物质影响不定根生根质量,含 IBA 的诱导生根培养基中小苗生有短粗根,含 NAA 的生根培养基不定根根系多但相对细弱,而不含植物生长调节物质的

培养基诱导产生的不定根数量较少、根系细弱。

不定芽转至生根培养基中 1 周后开始生根,30 d 即可完成生根过程,不定芽的诱导生根率均在 90% 以上。当再生植株高度大于 6 cm 时,在玻璃温室(温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 75%)中打开培养瓶,经过 3~4 d 炼苗后,将再生植株根部附着的培养基洗净并移栽到基质(珍珠岩:草炭土=1:1)中,用塑料膜覆盖保湿 10 d 后,揭开塑料膜,成活率在 90% 以上。

3 讨论与结论

3.1 外植体表面灭菌方法和类型对愈伤组织诱导率的影响

多年生黑麦草外植体表面灭菌常用的试剂有氯化汞和次氯酸钠。氯化汞表面灭菌时间短,次氯酸钠没有毒性,各具自己的特点。在本试验中,氯化汞处理降低了愈伤组织诱导率,这可能是有毒汞离子对植物造成了微量的毒害作用。

多年生黑麦草建立组织培养体系采用的外植体有茎尖分生组织(Dale *et al.*, 1977)、未成熟花序(Creemers-Molenaar *et al.*, 1989)、成熟胚(林海, 2005)、花药(Olesen *et al.*, 1988, Boppenmeier, 1989)、营养分生组织(Perez-Vicente, 1993)、完整成熟种子(Zeng *et al.*, 2009)、成熟种子的一部分,包括成熟胚、下胚轴、纵切的半粒成熟种子(杨茹等, 2008)、含胚的半粒成熟种子(蔡能, 2007),也有采用幼苗芽尖、根尖(杨茹, 2008)、幼穗、生长点(余斌, 2009)等材料。然而,胚根、胚轴(陈季琴, 2005)、芽尖、根尖(杨茹, 2008)不适合作为多年生黑麦草愈伤诱导的外植体,李雪等(2008)发现利用成熟胚作为外植体时愈伤诱导率和胚性愈伤诱导率均要明显高于成熟种子,但早有研究表明利用成熟种子做外植体也能取得较高的愈伤组织诱导率(冯霞等, 2004)。直接用成熟种子做外植体愈伤组织诱导率相对较低,将种子纵向切开后再进行接种可以增加愈伤诱导率(Bradley, 2001),通过纵切、横切等手段可提高愈伤组织诱导率,这可能是由于划破种皮,促进了对植物生长调节物质的吸收(杨茹, 2008)。

3.2 不同生长调节物质对愈伤组织诱导和分化的影响

植物生长调节物质的种类与浓度在很大程度上决定了愈伤组织的质量、诱导率与分化率。2,4-D 对禾本科植物愈伤组织诱导率和质量有显著影响,愈伤组织诱导率在一定浓度范围内与 2,4-D 的浓度

呈正相关(李蔚等,2012),但过高的浓度会降低愈伤组织质量(麻冬梅等,2014),影响后期愈伤组织的分化(杨茹,2008),所以过高或过低的浓度都是不可行的,本研究也发现了这一规律。

植物细胞分裂素作为植物生长调节物质能够直接调控基因的活性、翻译与蛋白质的磷酸化。6-BA作为一种高效的细胞分裂素,在已有2,4-D的诱导培养基中加入少量的6-BA能对愈伤组织质量产生积极的作用,高浓度的6-BA则会抑制愈伤组织诱导,本研究中6-BA的浓度以 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 佳,这与杜雪玲(2005)、杨茹等(2008)的研究相同。

2,4-D由于强烈抑制芽的形成,因而在愈伤组织分化培养中常用的生长素为NAA,细胞分裂素为6-BA、ZT、KT(激动素)和TDZ(噻苯隆)。NAA常与细胞分裂素组合使用, $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAA和 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ZT组合使用时最高愈伤组织分化率可达90%(李雪,2008)。细胞分裂素既可以单独使用,也可彼此间组合使用。单独使用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-BA最高愈伤组织诱导率可达87.5%, $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ和 $0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA组合使用愈伤组织分化率最高为31.7%。从总体上看,生长素与细胞分裂素组合使用的效果要优于单独使用细胞分裂素,低浓度的生长素和较高浓度的细胞分裂素的组合更有利于愈伤组织的分化,这与本实验的结果相同。

3.3 外源物质对多年生黑麦草不定芽生根的影响

多年生黑麦草组培苗的生根诱导较为容易(Bradley *et al.*, 2001; 冯霞等, 2004; 姜素云, 2005;),但适宜植物生长调节物质种类和浓度对多年生黑麦草不定芽生根诱导有着积极的影响。尽管不同植物生长调节物质在诱导生根率方面差异不显著,但在生根质量上有所不同,添加IBA的诱导生根培养基中小苗生有短粗根,添加NAA的根系虽多但相对细弱,而不添加任何植物生长调节物质的则根系数量较少、无短粗根出现(冯霞等,2004)。在含 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/2MS培养基中诱导率最高,而IBA过高的浓度会抑制多年其生根诱导(姜素云,2005)。此外,在生根诱导培养基中添加活性炭,在生根速度、根的大小、状态方面可明显促进多年生黑麦草不定根的生长(杨茹等,2008)。

参考文献:

Boppenmeier J, Zuchner S, Foroughi-Wehr B. 1989. Haploid production from barley yellow dwarf virus resistant clones of *Lolium perenne* L.[J]. *Plant Breeding*, **103**(3):216-220

Bradley DE, Bruneau AH, Qu R. 2001. Effects of cultivars, explants, treatment and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass[J]. *Int Turfgrass Sci*, **9**:152-156

Cai N(蔡能), Yi ZL(易自力), Chen ZY(陈智勇), *et al.* 2007. Establishment and modification of high frequency regeneration system of perennial ryegrass(*Lolium perenne* L.)(多年生黑麦草高频再生体系的建立及优化)[J]. *Sin J Grassl*(中国草地学报), **29**(4):45-49

Chen JQ(陈季琴), Han LB(韩烈保). 2004. Application of orthogonal design to tissue culture of perennial ryegrass(正交设计在多年生黑麦草组织培养中的应用)[J]. *Grassl China*(中国草地), **26**(6):57-72

Chen JQ(陈季琴), Han LB(韩烈保), Yang CQ(杨纯奇), *et al.* 2005. Effect of different explants on callus induction of perennial ryegrass(不同外植体对多年生黑麦草愈伤组织诱导的影响)[J]. *Grassl Turf*(草原与草坪), **111**(4):42-46

Creemers-Molenaar J, Vander Valk P, Loeffen JPM, *et al.* 1989. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium perenne* L.[J]. *Plant Sci*, **63**(2):167-176

Du XL(杜雪玲), Zhang ZX(张振霞), Liu P(刘萍), *et al.* 2005. The effect of 2,4-D and 6-BA on callus induction of perennial ryegrass(2,4-D和6-BA对多年生黑麦草愈伤组织诱导)[J]. *Grassl Turf*(草原与草坪), (3):49-51

Feng X(冯霞), Sun ZY(孙振元), Han L(韩蕾), *et al.* 2004. Callus induction and plant regeneration of perennial ryegrass(多年生黑麦草愈伤组织诱导和植株再生)[J]. *Pratac Sci*(草业科学), **10**:23-28

Glass D. J. 2000. Economic Potential of Phytoremediation[M]// Raskin I, Ensley BD. Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean up the Environment. New York:John Wiley and Sons Inc.:15-31

Jiang SY(姜素云). 2005. Genetic transformation of bud tip from ryegrass buds mediated by agrobacterium and regeneration of transgenic plants(农杆菌介导的黑麦草丛生芽芽尖的遗传转化及转基因植株再生)[D]. Jinan(济南):Shandong University(山东大学):23-24

Li W(李蔚), Zhang N(张娜), Li R(李仁), *et al.* 2012. Establishment of high efficient regeneration system of perennial ryegrass and PEPC gene transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*(多年生黑麦草高频再生体系的建立及农杆菌介导PEPC基因的转化)[J]. *Acta Agrestia Sin*(草地学报), **20**(4):747-752

Li X(李雪), Han LB(韩烈保), Chen JQ(陈季琴). 2005. Callus induction and bud differentiation of *Lolium Perenne*(多年生黑麦草愈伤组织诱导与芽分化的研究)[J]. *Pratac Sci*(草业科学), **22**(5):45-49

Li X(李雪). 2008. Research of gene transformation and drought-resistant genetic improvement of perennial ryegrass(*Lolium perenne* L.)(多年生黑麦草基因转化与抗旱性遗传改良研究)[D]. Beijing(北京):Beijing Forestry University(北京林业大学):45-46,50

Lin H(林海). 2005. Studies on culture *in vitro* of mature embryo of ryegrass(黑麦草成熟胚离体培养技术研究)[J]. *J Henan*(下转第774页 Continue on page 774)