

牧草组织培养研究进展

程钰宏, 赵瑞雪, 董宽虎

(山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘要:总结了组织培养在牧草上的研究进展, 分别从愈伤组织培养、花药离体培养、悬浮细胞培养、原生质体培养、茎尖培养以及胚胎培养等方面进行了讨论, 概述了影响牧草组培的几种因素, 分析和归纳了该领域研究出现的问题及发展趋势。

关键词:牧草; 组织培养; 再生体系

中图分类号:S541.035.2

文献标识码:A

Research Progress on Tissue Culture of Forage Grass

CHENG Yu-hong, ZHAO Rui-xue, DONG Kuan-hu

(School of Animal Science, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China)

Abstract: Research progress and influencing factors on tissue culture of forage grass was reviewed detailedly by summarizing the callus culture, anther culture, cell suspension culture and protoplast suspension culture, shoot tips culture, embryo culture of forage grass. And the limitation of tissue culture for forage grass was analyzed and the strategy for the future development of forage grass regeneration system was prospected as well.

Key words: Forage grass; Tissue culture; Regeneration system

目前, 我国草原面积为 400 万 km², 占国土面积的 41.41%, 是全国面积最大的陆地生态系统类型, 也是重要的畜牧业基地。随着我国经济的不断发展, 增加畜牧业生产, 大幅度提高畜产品产量已经成为我国农业发展基本形式。

牧草作为畜牧业发展的基础, 驯化和培育多用途的优良牧草已经成为我国畜牧业发展的主要途径之一。目前, 国内外牧草新品种的选育及其基因转化的受体系统主要来源于组织培养途径, 建立高效的组织培养再生体系已成为一种趋势。世界上约有 75% 的牧草属于禾本科牧草, 而禾本科牧草适用的外植体较单一, 如幼穗、花药、幼胚、原生质体、悬浮细胞等^[1], 这些外植体取材困难, 受季节限制, 不能周年供实验使用, 进行组织培养相对较难。相对而言, 组织培养技术的应用则主要集中于豆科牧草。本文对多种牧草再生体系的发生

途径进行分析, 为牧草快速繁殖的现代化生产技术提供科学理论依据, 并为以后的研究提供有价值的参考。

1 愈伤组织培养

影响牧草愈伤组织分化的因素主要包括外植体的来源、激素、营养条件与环境条件等。

1.1 外植体的种类对愈伤组织的影响

组织培养成功的植物外植体几乎包括植物的各个部位, 但不同的器官、组织对离体培养的反应及形态发生的能力是不同的, 是影响组织培养效果的主要因素之一, 目前已经有多种组织或细胞作为组织培养的对象, 包括幼胚 (Wan and Lemaux 1994, Ritala, et al. 1994, Hagio, et al. 1995, Jensen, et al. 1996, McElroy, et al. 1997, Tingay, et al. 1997, Cho, et al. 1998), 幼穗 (Barcelo, et al. 1994), 花粉粒 (Yao and Kasha 1997), 茎尖分生组织 (Zhang, et al. 1999) 以及胚胎悬浮细胞中的原生质体等 (Funatsuki, et al. 1995)^[2-12]。

霍秀文等以冰草属 (*Agropyron Gaertn*) 中的 3 个不同种 (*A. mongolicum* Keng)、航道冰草 (*A.*

收稿日期: 2007-12-25

作者简介: 程钰宏 (1983-), 女, 山西农业大学硕士研究生, 专业方向: 草地资源与草地管理。Tel: 0354-3524432

E-mail: yuhongcheng127@163.com

通讯作者: 董宽虎 (1956-), 男, 教授, 博导, Tel: 0354-6287552

E-mail: dongkuanhu@sxau.edu.cn

cristatum cv. Fairway)、诺丹冰草(*A. desertorum* cv. Nordan)和一个种间杂种冰草—蒙农杂种冰草(*A. cristatum* × *A. desertorum* cv. Mengnong)为材料,分别以幼穗为外植体在改良的 MS+2,4-D 2.0 mg/L 培养基上建立了冰草组织培养再生体系。研究得出,冰草幼穗在护颖原基形成期和小花原基形成期长度介于 1.0~3.0 cm 时是最适宜的培养时期^[13]。余桂红研究表明,高羊茅茎段和花序出愈率和愈伤组织分化率较低,幼穗和未成熟胚出愈率和愈伤组织分化率较高,但取材受时空的限制,而成熟种子可以作为诱导愈伤组织的理想材料^[14]。王玉珍以茎尖作为外植体成功的建立了沟叶结缕草再生体系^[15]。贺杰报道日本和韩国研究者利用日本结缕草、沟叶结缕草和中华结缕草的幼穗、幼胚、茎尖和匍匐茎段均诱导出愈伤组织并再生出植株,研究表明结缕草匍匐茎段是组培快繁的理想材料,但由于取材的限制,目前主要以成熟胚作为理想外植体^[16]。杨丽莉以白三叶的 3 种不同组织作为外植体直接诱导植株再生,研究发现其频率依次为:胚轴顶段 > 子叶 > 胚轴下段^[17]。杨起简以紫花苜蓿无菌苗的子叶和下胚轴为外植体进行愈伤发现,其幼嫩的子叶、胚轴均是理想的外植体,而胚轴优于子叶^[18]。韩露、殷丽青等分别以香根草茎段和基部分蘖节为外植体建立了良好的植株再生体系^[19-20]。

到目前为止,许多牧草品种都已建立了植株再生体系,如禾本科的:多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)、草地早熟禾(*Poa pratensis* L.)、紫羊茅(*Festuca rubra* L.)、巴哈雀稗(*Paspalum notatum* Flugge.)、加拿大披碱草(*Elymus canadensis* L.) × 披碱草 F_1 (*E. dahuricus* Turcz.)和加拿大披碱草 × 圆柱披碱草 F_1 [*E. cylindricus* (Franch.) Honda]等。豆科锦鸡儿属的柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii* Kom.)、中间锦鸡儿、树锦鸡儿、和小叶锦鸡儿(*Caragana microphylla* Lam.)^[21]及二色胡枝子(*Lespedeza bicolor*)、美丽胡枝子(*L. formosa*)准格尔苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Neimeng Zhungeer)、紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)属的阿尔冈金,中苜一号,草原 2 号, WL232, WL323, DEFI 等等。

另外,在组织培养中植物的基因型也是一个重要的影响因子,Hanzel 等(1985)报道,在 91 个大麦系的组培试验中,只有 2 个系建立了高频的植株再生体系^[22]。在植物中用成熟胚或种子来诱

导愈伤组织容易成功,根尖和茎尖分生组织作为外植体也可以建立再生体系,未成熟的胚及花序作为培养材料也有比较好的培养效果,但是此类材料的分离比较困难^[23]。

1.2 外源激素种类及浓度对愈伤组织的影响

激素是组织培养中除了遗传因素之外非常重要的因素,基本培养基能保证培养物的生存与最低生理活动,但只有配合使用适当的外源激素才能诱导细胞分裂的启动、愈伤组织生长以及根、芽的分化等合乎理想的变化。在牧草组织培养上起主要作用的是生长素类、分裂素类及脱落酸。

1.2.1 生长素类

生长素对牧草植物愈伤组织的诱导、胚状体的产生以及试管苗的快速繁殖和生根都是必需的,其最常用的生长素有 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)和吲哚乙酸(IAA),其中 2,4-D 则是外植体诱导体细胞转变为胚性细胞过程中的重要激素。萘乙酸(NAA)相对于 2,4-二氯苯氧乙酸的作用弱一点,但在分化培养基和组织培养快繁体系中 NAA 相对用得较多,其浓度范围是 0.1~1.0 mg/L。吲哚丁酸(IBA)主要在诱导生根方面有好的效果其浓度范围在 0.1~1.0 mg/L。

王铖以两个品种的高羊茅种子为外植体,接种在附加 2,4-D、KT、6-BA、NAA、IAA、水解乳蛋白等不同激素和营养物质的 MS 培养基上,研究得出 2,4-D 是诱导高羊茅种子形成愈伤组织的关键因素,该实验进一步得出高羊茅种子的愈伤组织诱导培养基以 MS+6 mg/L 2,4-D+500 mg/L 水解乳蛋白为最佳。分化培养基以 MS+4 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT 为最佳,初步建立起高羊茅的植株再生体系^[24]。马艳红等以加拿大披碱草与 2 种国产披碱草杂种 F_1 的幼穗作为外植体,在 MS 培养基上添加 400 mg/L CH 和 3.0 mg/L 2,4-D,更好的诱导出胚性愈伤组织并再生植株^[25]。王素彦对加拿大披碱草 × 老芒麦杂种 F_1 代的幼穗进行培养得出 2 mg/L 2,4-D 更利于愈伤组织的诱导和分化^[26]。安骥飞等在 UM 和 MS 培养基上通过添加不同种类和浓度的激素,建立了对百脉根(*Lotus corniculatus* Linn)进行组织培养再生体系的最佳条件:愈伤诱导最佳培养基为 UM+2,4-D 2 mg/L+KT 3 mg/L;最佳分化培养基为 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1 mg/L;最佳生根培养基为 MS+NAA 0.05 mg/L^[24]。谷文英等对红三叶(*Trifolium pratense*)以下胚轴和

子叶为外植体进行愈伤组织的培养,得出添加 2.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基最适合诱导愈伤组织^[27]。金淑梅等以苜蓿子叶为外植体在用 2 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基,诱导出愈伤组织,在 MS+2 mg/L KT+0.15 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA 分化培养基进行最佳分化,其丛生芽在 1/2MS+2 mg/L 酵母提取物的生根培养基上再生成完整的苜蓿植株^[28]。

1.2.2 分裂素类

在牧草组织培养及再生系统中常用的分裂素是 6-BA(6-苄基氨基嘌呤)、KT(激动素)。6-BA 一般与其他生长素配合使用对愈伤组织的诱导率要优于单独使用生长素。而 KT 在禾本科牧草愈伤组织诱导中主要用在分化培养上,浓度范围 0.01~1 mg/L。Kakimoto(1996,1998)研究证明,细胞分裂素类主要作用于愈伤组织的分裂与分化^[29~30]。

丁路明以早熟禾成熟种子作为外植体,MS 为基本培养基,在不同的 2,4-D 和 6-BA 浓度下诱导愈伤组织。结果表明早熟禾在 2,4-D 和 6-BA 配合使用的情况下,愈伤组织的质量和诱导率要优于单独使用 2,4-D 的情况^[31]。易自力等以成熟胚作为多年生黑麦草诱导愈伤组织的最佳外植体,在添加浓度为 2 mg/L 6-BA 的 NB 培养基上其愈伤组织的分化率最高^[32]。

1.2.3 脱落酸类

ABA(脱落酸)在愈伤组织诱导中,则对于胚胎晚期蛋白质合成、淀粉的累积及胚体的成熟有至关重要的作用。胡张华等的研究发现,浓度不同的 ABA 对高羊茅成熟胚愈伤组织诱导率有显著影响,ABA 为 2.0 mg/L 时诱导率最高,可有效抑制胚芽和根的生长,显著提高成熟胚愈伤组织的诱导率,当 ABA 浓度大于 5.0 mg/L 时,其愈伤组织诱导率反而下降^[33]。

由此可见,各类激素的生理作用虽具有相对的专一性作用,但更主要的是各类激素的组合。一般情况下,在培养基上添加一定浓度的 2,4-D、BA、IBA 等生长素有利于愈伤组织的形成,而分化生根则要降低 2,4-D、IBA 等的浓度,提高 NAA、BA 等生长素的浓度。

1.3 营养条件及环境条件对愈伤组织的影响

不同植物种类、不同外植体培养所要求的基本培养基均有差异。目前牧草组织培养采用的基本培养基主要有 MS、B5、1/2MS 培养基,因 MS 培养基的无机盐离子浓度较高,有较高渗透压,含

丰富的氨态氮(NH_4),有利于愈伤组织的发生,安骥飞用 UM 培养基诱导百脉根愈伤组织的研究发现较高的维生素水平可对促进愈伤组织的生长有良好效果^[34]。

另外培养基中不同盐浓度对外植体褐变和试管苗玻璃化均有一定影响。盐浓度过高会导致外植体褐变。另外,培养基中的大量元素、微量元素对外植体的生长、分化不仅仅是起到供给无机营养的作用,更大的作用可能是调节作用^[35]。培养基中的氮源除了供给培养物氮素营养外,还原态氮还具有促进细胞分裂的作用,硝态氮具有抑制细胞分裂的作用。而培养基中高浓度 NH_4NO_3 对植株再生是必需的,甚至能代替植物生长调节剂。付玲玲通过比较 N6、MS 和 B5 这 3 种植物组织培养常用基本培养基的效果,认为在高羊茅成熟种子愈伤组织诱导宜采用 MS 培养基^[36]。

培养基的 pH 值因培养材料不同而异,一般要求 pH 值在 5.0~6.0。可以适当降低培养基 pH 值来降低多酚氧化酶的活性和底物利用率以抑制褐变。另外培养基的 pH 值还可以间接影响一些物质代谢与合成从而影响愈伤组织形成及形态建成。牧草组织培养受各种环境因素的影响,其中最主要的是温度和光照。温度不仅影响细胞的增殖而且还影响器官的分化。王树彦试验认为室内培养温度应处在 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 范围最为合适,试验进一步证明在诱导愈伤组织时进行暗培养比正常光照下平均提前 6 天长出愈伤组织,这说明暗处理对愈伤组织的诱导有一定的促进作用^[46]。

2 花药培养

花药培养就是在离体条件下培养花药,人为改变小孢子的发育途径,使其配子体发育途径终止,转向孢子体发育,通过胚发生或器官发生途径,形成完整的单倍体植株。一是获得纯系育种材料和进行单倍体育种,进而获得的纯合二倍体材料,二是可获得具有双亲优良特性的可育远缘杂种。目前,花药培养已经作为诱导植物单倍体植株的一种主要手段,广泛应用于植物的遗传育种。Jochen Kumlehn(2006)将经农杆菌侵染的花粉通过花粉培养,成功的获得遗传转化的大麦新品种^[47]。随着广泛的研究及技术改进,很多牧草植物的花培效率已达到了很高的水平,如一年生黑麦草、多年生黑麦草、高羊茅、紫花苜蓿、红豆草、百脉根、鹰嘴紫云英等。Utz 和 Oettler(1978)研究发现黑

麦草自花授粉会严重降低其种子活力和产量^[37],而经过花药离体培养即可获得完全纯合的植株(Olesen, et al. 1988, Bante, et al. 1990, Opsahl-Ferstad, et al. 1994)^[38~40]。

2.1 影响花药培养的重要因素

目前花药培养作为获取纯合体植株途径的主要方法,在牧草花药培养方面,同样受到植物界研究者的广泛重视,影响花药培养的主要因素包括花培外植体的选取、培养基的选择及外界条件的设定等多方面。

花粉发育时期是诱导小孢子分裂的关键时期。适合用于花药培养的花粉发育的临界时期在物种之间是不同的。一般来说,培养处于单核中期至晚期的花粉效果较好。王玉英等在花药培养时对比了单核早期、单核靠边期、双核期后指出,对大多数植物而言,单核靠边期效果最佳^[43]。这一结论在红豆草,紫花苜蓿,百脉根,鹰嘴紫云英,以及小麦玉米等中得到证实。培养基的选择及激素的配比对花药培养的成败影响很大,据报道,Nitsch 及 MS 培养基被广泛用于双子叶植物的花药培养,B5 培养基广泛用于豆科的牧草花药培养,而 N6 培养基很大程度上提高了水稻、小麦等花药的诱导频率,另外 C17 和 W14 培养基可以大幅度的提高小麦的花药出愈率。我国提取的马铃薯培养液,现在被广泛地应用于小麦花药培养,效果良好^[44]。众多研究发现,在黑暗条件下花药愈伤组织诱导率最高,黑暗培养有利于花药愈伤组织的诱导,其中对大多数材料,培养的适宜温度是 $28^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

目前我国牧草花药培养在技术上已经获得了很大的改进,并被广泛应用于牧草新品种的选育上,但是牧草花培技术还有待进一步改善和提高。应明确理化因素如接种植株的生长环境控制、花药的消毒处理、培养基的优化选择、激素种类配比及浓度等对花培效果的影响,提高胚状体的诱导频率。

3 细胞悬浮培养

细胞悬浮培养是指将游离的单细胞或细胞团,按照一定的细胞密度悬浮在液体培养基中进行培养的方法,该方法为原生质体分离、体细胞杂交与遗传转化等研究提供了重要材料或受体,同时可以用胚性细胞悬浮培养的方法分离原生质体来进一步的培养。迄今,已在多种牧草上建立了细胞悬浮培养与植株再生体系。如紫花苜蓿、红豆

草、高羊茅、黑麦草、多花黑麦草等,为以后获得遗传稳定的突变体以及提高抗性突变体的突变率和选择效率提供帮助^[45]。

3.1 影响悬浮培养因素

细胞悬浮培养受多种因素的影响,在建立悬浮细胞系时需综合考虑悬浮培养细胞的愈伤组织来源和状态、培养密度、继代次数和周期、培养基的类型和植物生长调节剂配比等因素。

能否获得高质量的悬浮培养系,主要取决于获取的愈伤的质量,一般由外植体直接诱导的愈伤不适合悬浮培养,研究主要以质地疏松、易分散、不分泌黏液的颗粒状胚性愈伤组织为材料进行培养^[46]。余瞬武、朱永生(2001)研究发现不同梯度浓度的铜离子处理愈伤组织,可以更好的将筛选的松脆胚性愈伤组织保存下来,从而快速建立胚性细胞悬浮系。不同的植物其继代培养的次数跟周期也不同,如禾本科植物适宜的继代周期为 20~30 d,对于那些质量差的愈伤组织则要适当的延长。植物生长调节剂适当的配比对于获取松脆型愈伤组织非常重要,在悬浮培养中经常要用到的激素主要是生长素,不同的 2,4-D 浓度可以诱导和改良愈伤组织,而细胞分裂素则与生长素配合使用,另外在培养基中添加一定浓度的 A-BA,可有效地抑制胚芽和根的生长,显著提高其成熟胚愈伤组织的诱导率。有报道认为保持温和的渗透胁迫对植株再生有很大的影响,推测是因为高浓度的琼脂对愈伤组织产生了一种水分或营养胁迫,或者引起愈伤组织透气性的增加,从而促进愈伤组织的再生植株,胡张华以高羊茅为材料证实了这个结论^[33]。Kaarina Pihakaski-Maunsbach (2003) 通过细胞悬浮培养,测得冬小麦(*Secale cereale* L.) 叶子在 0°C 以下低温会诱导其悬浮细胞分泌自由防冻蛋白到溶液中,这样可以保护完整的悬浮细胞而不是原生质体通过与冰结合而防止低温的伤害^[42]。

近年来,多种牧草品种已成功的建立了悬浮培养体系,由于悬浮细胞是由单细胞起源的,选择压力均一,生长周期较短,容易获得耐盐能力较高的突变细胞系,因此在建立悬浮培养体系的基础上,通过盐碱等逆境胁迫获得高抗性植株,这样既可以丰富我国牧草的种质资源,还可以为干旱区及盐碱地生态治理提供新物种。但由于悬浮培养技术难度较大,目前还处于初步研究阶段,在牧草上建立的悬浮培养体系仅处于初步阶段,其进一

步的利用还没有很多报道,还需要我们进一步深入地研究。

4 原生质体培养

植物原生质体是去掉细胞壁的植物细胞,由于没有细胞壁的障碍,可以有目的引进特定基因,为植物遗传转化提供理想受体,从而为植物优良性状的筛选和品质改良提供丰富的材料。通过不同物种原生质体间的融合,可以克服传统育种中的生殖隔离,为远缘植物杂交育种提供可行途径。可见原生质的培养有着非常重要的作用,在牧草上由原生质体培养再生植株的研究报道已经不少,如苜蓿、百脉根、红豆草、白山叶草、红三叶草、沙打旺豆等科牧草,另外还有冰草、小麦、野大麦等禾本科牧草。

4.1 影响原生质体培养的因素

原生质体作为一种细胞水平的研究系统,在培养过程中很容易受培养条件的影响,如材料的来源、酶液的组成、原生质体的接种密度、所用培养基和培养方法等等,因此选择适宜的培养条件对于获取高产量、高品质的原生质体是非常必要的(Navratilova B., 2004)^[47]。

许多资料报道,叶肉组织、茎尖、体细胞胚及胚性愈伤组织和悬浮培养物等均可以作为分离原生质体的材料,但经长期继代培养的细胞因在遗传学上的不稳定较容易出现倍性和数目的变化,这在很大程度上会影响所获得原生质体的活力和产量^[48],在原生质体培养过程中酶种类、酶浓度、酶解时间是影响原生质体高产优质的主要因素,一般纤维素酶和果胶酶是最必要的,但与适量离析酶配合使用,更有利于原生质体产率的提高。另外有实验证明在原生质体分离的混合酶液中加入一定量的 CaCl_2 、 H_2O 、 KH_2PO_4 具有保护膜的作用,加入适量的 PVP 或 MES 能稳定酶解过程的 pH 值^[34]。原生质体的培养基多采用 Km8P 和 NT 培养基。Km8P 培养基是以 B5 培养基为基础,NT 培养基是以 MS 培养基为基础改良的,培养基的 pH 值一般为 5.6~5.8。低温暗处理对获得高产率、高质量的原生质体是必要的^[20]。有实验证明 Ca^{2+} 和 NH_4^+ 对培养基的影响较大,较高的 Ca^{2+} 浓度能提高原生质体的稳定性,而谷氨酰胺、水解酪蛋白等则作为主要氮源用来提高原生质体的分裂频率。

4.2 原生质体培养在牧草上的应用

近年来,随着分子生物学的快速发展,植物原

生质体的研究越来越受到重视。目前已经在多种牧草上进行了原生质体组织培养的研究,并取得了一些成果。如牧草性状改良、遗传转化、新品种选育中间杂交等。金红等(2004)采用 PEG- 高 pH, 高 Ca 法诱导沙打旺与发根农杆菌介导的紫花苜蓿转化系之间的原生质体融合,获得了体细胞杂种,这对于改良豆科牧草的营养品质有着重要的意义。程肖蕊等(1998)以野大麦为材料,成功地建立野大麦稳定的原生质体培养体系,为探索其细胞工程育种和遗传改良奠定基础^[50]。在苜蓿、红豆草、草木樨状黄芪等植物中,以提高豆科牧草甲硫氨酸含量为主要目的抗性突变体筛选研究已取得一定进展。张改娜等以抗甲硫氨酸的鹰嘴紫云英为材料,成功的建立了鹰嘴紫云英甲硫氨酸抗性系原生质体再生植株的实验体系,为进一步运用体细胞杂交改良牧草品质奠定了技术基础^[51]。虽然在牧草原生质体培养技术得到了迅速的发展,并取得了可喜的成绩,但是利用原生质体技术改良高等植物的遗传性状并将之运用于生产实践中还有很大距离,还需要我们作进一步的研究。

5 茎尖分生组织培养

茎尖分生组织培养是指切取茎的先端部分,用无菌培养,使其发育成完整植株的过程。茎尖或顶端分生组织不携带病毒或携带很少,可用来获取无病毒植株。茎尖培养方法简单,繁殖迅速,且遗传性稳定,可以保持植株的优良性状,一般都用在园艺植物或农作物及园林树木上,在牧草上应用得还比较少,目前已用茎尖培养获得再生植株有:紫花斜茎黄芪(*Astragalus adsurgens*)、沟叶结缕草(*Zoysia matrella*)等。

茎尖培养外植体的选取通常根据病毒的大小不同切取 0.1~1.0 cm 大小的生长点,培养基既可以使用液体培养基也可以使用固体培养基,大多数是采用改良后的 MS 培养基,比如适当的提高 K^+ 与 NH_4^+ 含量,可以促进茎尖的生长。另外适当的生长素与细胞分裂素的使用对于茎尖的生长也是必需的。李青用紫花斜茎黄芪腋芽和茎尖作为外植体进行的组织培养和继代增殖培养得出,即 MS+1 mg/LBA+0.1 mg/LNAA 和 MS+0.5 mg/LBA+0.1 mg/LNAA 作为组织培养基培养效果最好,而以 MS+0.1 mg/LNAA 和 MS+0.3 mg/LNAA 作为生根培养基培养效果最佳^[52]。利用茎尖培养通过物理或化学

诱变获取突变体,既可以丰富物种资源,又可以获得理想植株,可以为今后牧草育种提供帮助。

6 胚胎培养

胚胎培养,是将早期生长的胚取出,应用组织培养的方法培养出植株的技术,由于能培育出杂交植物多用来解决杂种败育的问题,旨在获取远缘杂交的重组体、栽培种和杂交品种。

应用胚胎培养技术,第一能够得到杂种或自交种,第二通过分离单倍体细胞,能培育纯合的二倍体优良品系,第三在提高育种多样性的同时缩短了育种时间。

目前在牧草上已经获得的成果报道很少,但牧草与作物的杂种如节节草和普通小麦的属间杂种、小麦+冰草等都已通过胚培养获得了杂种。这为以后牧草中间杂交提供了可贵的材料^[53]。

7 研究展望

随着人们对高品质牧草的不断需求,利用组织培养技术,快速建立牧草高效组织培养再生体系的已经成为一种必然的趋势。从已有的研究中我们可以看到,对牧草进行离体培养已经有愈伤培养,原生质体培养,悬浮培养,花药培养,茎尖培养,胚胎培养等多种方法,来获得再生植株,而且也有了许多成功的范例,但就目前来看,仍有许多问题存在,比如仍有多种优良牧草为建立再生体系,或者是只培育出愈伤,而没有再生植株的发生,或者是没有建立稳定的植株再生体系。另外,虽然有多种牧草已经建立了植株再生体系,但是应用到实际工作中的还很少。这就要求我们需牧草组织培养的技术进一步改进和完善。

牧草组织培养尽管还存在着一些问题,但是由于它周期短,见效快,容易控制,已经成为人们改良牧草性状、培育新品种的新途径。目前,已有多种牧草通过组织培养的方法,获得高品质的新品种,如已经获得的鹰嘴紫云英甲硫氨酸抗性系离体筛选突变体,其硫氨基酸含量有明显提高;具有耐盐碱性的羊草,紫花苜蓿及多种禾草,对盐碱性具有一定的抗性;还有一些抗病虫、耐牧、耐寒等品种。将牧草育种工作和组织培养相结合,建立高频再生体系进行体细胞无性诱导变异的筛选,通过细胞培养方式得到原生质体,进行体细胞的融合和杂交等等,这都为牧草植物的改良和新品种的选育开辟了一个崭新的局面。总之,组培技术

在牧草研究中的应用方兴未艾,随着学科间的互相渗透,研究工作不断深入、研究领域不断拓展,这些技术必定会对草业科学的发展起到重要推动作用。

参考文献:

- [1] 霍秀文,云锦凤,米福贵,等.冰草组织培养再生体系建立及耐旱转基因研究[J].草地学报,2005,13(2):172-276.
- [2] Wan Y, et al. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants [J]. Plant Physiol, 1994, 104: 37-48.
- [3] Ritala A K, et al. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos[J]. Plant Mol. Biol., 1994, 24: 317-325.
- [4] Hagio T T, et al. Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker[J]. Plant Cell Report, 1995, 14: 329-334.
- [5] Jensen L G, et al. Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)- β -glucanase during germination[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93: 3487-3491.
- [6] McElroy D, et al. Development of a simple transient assay for Ac/Ds activity in cells of intact barley tissue [J]. Plant J., 1997, 11: 157-165.
- [7] Tingay S, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation[J]. Plant J., 1997, 11: 1369-1376.
- [8] Cho M J, et al. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism[J]. Plant Sci., 1998, 138: 229-244.
- [9] Barcelo P, et al. Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue[J]. Plant J., 1994, 5: 583-592.
- [10] Yao Q A, et al. Potential of biolistic transformation of barley microspores based on viability and transient β -glucuronidase activity[J]. Genome, 1997, 40: 639-643.
- [11] Zhang S, et al. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings[J]. Plant Cell Report, 1999, 18: 959-966.
- [12] Funatsuki H, et al. Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts[J]. Theor. Appl. Genet., 1995, 91: 707-712.
- [13] 霍秀文,魏建华,张辉.冰草属植物组织培养再生体系的建立[J].华北农学报,2004,19(1):17-20.
- [14] 余桂红,马鸿翔,余建明,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.
- [15] 王玉珍,刘永信,魏春兰.马尼拉草茎尖组织培养优化组合筛选[J].山东农业科学,2006(1):13-15.
- [16] 贺杰,孙振元,魏建华,等.结缕草生物技术研究进展[J].武汉植物学研究,2006,24(1):74-79.
- [17] 杨丽莉,贾炜珑,张彦芹.影响白三叶草高频率植株再生因素的研究[J].华北农学报,2003,18(4):66-68.

- [18] 杨起简,周禾,孙彦,等.紫花苜蓿的愈伤组织诱导及组织培养[J].北京农学院学报,2004,19(2):28-30.
- [19] 韩露,刘必融,潘圳,等.香根草愈伤组织的诱导和快速繁殖[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2004,27(4):237-239.
- [20] 殷丽青,柴晓玲,沈国辉,等.香根草组织培养快速繁殖技术[J].上海农业学报,2005,21(4):63-66.
- [21] 邓正正,王阳,王力华,等.锦鸡儿属防风固沙树种的离体培养试验[J].沈阳农业大学学报,2004,35(3):226-230.
- [22] Hanzel J J, et al. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley[J]. Crop Sci.,1985,25:27-31.
- [23] 王家麟.植物组织培养及其应用研究概况[J].黑龙江农业科学,2006(3):86-89.
- [24] 王铖,李青,辛燕.高羊茅种子愈伤组织诱导及植株再生研究[J].北京林业大学学报,2004,26(1):66-69.
- [25] 马艳红,于卓,李小雷,等.加拿大披碱草与2种国产披碱草杂种F₁愈伤组织诱导及植株再生研究[J].西北植物学报,2006,26(9):1888-1892.
- [26] 王树彦,云锦凤,姜淑慧,等.加拿大披碱草×老芒麦杂种F₁代的幼穗培养[J].中国草地,2003,25(4):61-64.
- [27] 谷文英,陈莹,余飞.红三叶愈伤组织培养与异黄酮的产生[J].草业科学,2006,23(8):45-49.
- [28] 金淑梅,管清杰,罗秋香,等.苜蓿愈伤组织高频再生遗传和转化体系的建立[J].分子植物育种,2006,4(4):571-578.
- [29] Kakimoto T, CKI, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction[J]. Science,1996,274:982-985.
- [30] Kakimoto T. Genes involved in cytokinin signal transduction[J]. Plant Res.,1998,111:261-265.
- [31] 丁路明,龙瑞军,朱铁霞.2,4-D和6-BA对早熟禾愈伤组织诱导的影响[J].草原与草坪,2003(1):34-37.
- [32] 易自力,陈智勇,蒋建雄,等.多年生黑麦草遗传转化体系的建立及其转化植株的获得[J].草业学报,2006,15(4):99-103.
- [33] 胡张华,陈火庆,吴关庭,等.高羊茅悬浮细胞系的建立及绿色植株的高频再生[J].草业学报,2003,12(3):95-99.
- [34] 安骥飞,王永雄,等.百脉根组织培养的研究[J].山西农业大学学报,2005(4):337-339.
- [35] 邵宏波.禾本科牧草的组织培养研究及其应用[J].广西植物,1992,12(1):42-58.
- [36] 付玲玲.狗牙根根质资源的RAPD分析[D].兰州:甘肃农业大学硕士论文,2003.
- [37] Utz H F, et al. Performance of inbred lines and their top crosses in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Z[J]. Pflanzenzucht,1978,80:223-229.
- [38] Olesen A, et al. Anther culture response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)[J]. Plant Breeding,1988,101,60-65.
- [39] Bante I, et al. Anther culture of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*. In: R. S. Sangwan, and B. S. Sangwan-Norreel (eds). Impact of Biotechnology in Agriculture[J]. Kluwer Academic Pub-Ushers, Dordrecht,1990:105-127.
- [40] Opsahl-Ferstad H, et al. Influence of medium and cold pretreatment on androgenetic response in *Lolium perenne* L.[J]. Plant Cell Report,1994,13,594-600.
- [41] Jochen Kumlehn, et al. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Biotechnology Journal,2006,4,251-261.
- [42] Kaarina Pihakaski-Maunsbach, et al. Antifreeze proteins are secreted by winter rye cells in suspension culture[J]. Physiol. Plant,2003,118:390-398.
- [43] 王玉英,李春玲,蒋钟仁.辣椒和甜椒花药培养的新进展[J].园艺学报,1981,8(2):41-45.
- [44] 李守岭.植物花药培养及其影响因素研究进展[J].庄南生亚热带植物科学,2006,35(3):76-80.
- [45] 陈发棣,蒋甲福,郭维明.小菊悬浮细胞培养与植株再生研究[J].园艺学报,2006,33(5):1021-1026.
- [46] 谢从华,柳俊.植物细胞工程[M].北京:高等教育出版社,2004:95-112.
- [47] Navratilova B. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae_a review[J]. Hort. Sci. (Prague), 2004,31(4):140-157.
- [48] 黄培铭,颜昌敬.大麦叶肉原生质体的分离与培养初报[J].上海农业学,1990,6(4):17-20.
- [49] 姜淑慧,管荣展,董海滨,等.播娘蒿愈伤组织原生质体培养体系的研究[J].草业学报,2006,15(4):94-98.
- [50] 程肖蕊,李彦舫,李喜文,等.野大麦原生质体培养形成愈伤组织[J].中国农业科学,1998,31(5):85-87.
- [51] 张改娜,王瑛华,王学仁.鹰嘴紫云英甲硫氨酸抗性系原生质体培养及植株再生[J].2006,39(3):191-198.
- [52] 李青.紫花斜茎黄芪腋芽茎尖组织培养和植株再生研究[J].草原与草坪,2002(3):49-50.
- [53] 邓年方,等.植物组织培养快速繁殖类型综述[J].江苏林业科技,2006,33(1):41-44.