

高羊茅成熟种子组织培养的影响因素研究: Ⅲ. 多种因素对胚性愈伤组织分化的影响

吴关庭¹, 胡张华¹, 陈笑芸¹, 郎春秀¹, 王伏林¹, 金卫¹, 陈锦清^{1,*}, 夏英武²

(¹浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021; ²浙江大学 原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要:研究了多种因素对高羊茅胚性愈伤组织分化的影响。结果表明, BAP 在高羊茅胚性愈伤组织分化中的作用要比 KT 大, 但两者配合使用效果更佳, 其适宜组合为 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L KT。在该细胞分裂素水平下, 生长素 NAA 宜用 0.5 mg/L。胚性愈伤组织先在蔗糖浓度较高的分化培养基上预分化, 以及经高渗预分化后的致密愈伤组织在琼脂浓度较高的分化培养基上分化, 都能较好地促进愈伤组织植株再生, 蔗糖和琼脂的适宜浓度分别为 60 和 10 g/L。分化培养基中添加脯氨酸导致总的愈伤组织再生率降低, 但同时有减少白化苗再生的趋势。

关键词:高羊茅; 组织培养; 胚性愈伤组织; 植株再生

中图分类号: S543.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-1524(2006)06-0412-05

Factors affecting tissue culture responses of mature seeds in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.): Ⅲ. The effects of multiple factors on differentiation of embryogenic calli

WU Guan-ting¹, HU Zhang-hua¹, CHEN Xiao-yun¹, LANG Chun-xiu¹, WANG Fu-lin¹, JIN Wei¹, CHEN Jin-qing^{1,*}, XIA Ying-wu²

(¹Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The influences of multiple factors on differentiation of tall fescue embryogenic calli were investigated. The results showed that cytokinin BAP was more effective than KT for plant regeneration of embryogenic calli, but joint application of them produced a little better effects with optimal combination being 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L KT. At this cytokinin level, the appropriate concentration of auxin NAA was 0.5 mg/L. Pre-differentiation of embryogenic calli on medium containing high concentrations of sucrose and differentiation of high-osmoticum pre-differentiated compact calli on medium solidified with high concentrations of agar obviously promoted plant regeneration, the suitable concentration for sucrose and agar being 60 g/L and 10 g/L, respectively. Supplementation of L-proline in differentiation medium led to decrease in frequency of regenerated callus, but simultaneously displayed a tendency to reduce regeneration of albino plantlets.

Key words: tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.); tissue culture; embryogenic callus; plant regeneration

收稿日期: 2006-05-15

基金项目: 浙江绿洲生态股份有限公司风险投资项目; 浙江省“151 人才基金”资助项目

作者简介: 吴关庭(1963-), 男, 浙江萧山人, 博士, 研究员, 从事植物基因工程研究。E-mail: yznszdz@zaas.org。

* 通讯作者 E-mail: j.q.chen@zaas.org

在高羊茅成熟种子组织培养研究中, 通过继代培养诱导和繁殖足够数量的胚性愈伤组织是一个关键环节, 而获得胚性愈伤组织后, 如何有效地再生出尽可能多的植株也是建立高羊茅胚性愈伤组织高效植株再生体系的重要研究内容

之一。愈伤组织高频植株再生主要受细胞分裂素和生长素的种类、浓度及其比值的影响,除此以外,在水稻、小麦、玉米等作物和百慕大等草坪草上的研究表明,高渗预分化和提高分化培养基中的琼脂浓度也能促进愈伤组织植株再生^[1-7]。为此,本文就这些因素对高羊茅胚性愈伤组织分化的影响进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为国内外广泛用于草坪建植的高羊茅品种凌志、猎狗 5 号、美洲虎 3 号和可奇思,种子由浙江绿洲生态股份有限公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 胚性愈伤组织的获得

4 个供试品种成熟种子人工去壳,经 70% 酒精漂洗 30 s 后,在 30% 左右的花王漂白水 中灭 菌 40 min,然后 用 无 菌 水 漂 洗 4 ~ 5 次。灭 菌 种 子 逐 一 纵 切,接 种 于 含 2,4-D 8 mg/L, ABA 2 mg/L, 水 解 酪 蛋 白 和 谷 氨 酰 胺 各 0.5 g/L 的 MS 诱 导 培 养 基 上,在 (25 ± 1) °C 的 条 件 下 暗 培 养 4 周 左 右,诱 导 获 得 初 始 愈 伤 组 织。将 初 始 愈 伤 组 织 转 移 到 含 2,4-D 2.0 mg/L, BAP 0.1 mg/L, 水 解 酪 蛋 白 和 谷 氨 酰 胺 各 0.5 g/L 的 MS 培 养 基 上,在 同 样 条 件 下 继 代 培 养,每 3 ~ 4 周 转 继 一 次,连 续 转 继 多 次,诱 导 和 繁 殖 足 够 数 量 胚 性 愈 伤 组 织。

1.2.2 分 化 试 验 的 基 本 步 骤

将 上 述 胚 性 愈 伤 组 织 接 种 于 MS 分 化 培 养 基 上,每 处 理 50 块 左 右,置 于 光 照 培 养 箱 内,在 10 h 光 照, (25 ± 1) °C 与 14 h 黑 暗, (21 ± 1) °C 交 替,光 照 强 度 3 000 ~ 4 000 lx 条 件 下 进 行 植 株 再 生。分 化 开 始 后 3 ~ 4 周,调 查 统 计 再 生 绿 苗、同 时 再 生 绿 苗 和 白 苗 以 及 完 全 再 生 白 苗 的 愈 伤 组 织 数 并 计 算 其 频 率,三 者 相 加 得 到 总 的 愈 伤 组 织 再 生 率。

1.2.3 分 化 影 响 因 素 及 其 设 计

(1) BAP 与 KT 配 比:在 含 NAA 0.3 mg/L, 蔗 糖 30 g/L, 水 解 酪 蛋 白 0.5 g/L, 琼 脂 8 g/L 的 MS 分 化 培 养 基 中,BAP 与 KT 组 成 8 种 配 比 (BAP + KT, mg/L): 0 + 2.0, 0.5 + 2.0, 1.0 + 2.0, 1.0 + 1.0, 1.5 + 1.5, 2.0 + 0, 2.0 + 0.5 和 2.0

+ 1.0。(2) NAA 浓 度:在 含 BAP 2.0 mg/L, KT 0.5 mg/L, 蔗 糖 30 g/L, 水 解 酪 蛋 白 0.5 g/L, 琼 脂 8 g/L 的 MS 分 化 培 养 基 中,NAA 浓 度 设 置 为 0.1, 0.3, 0.5 和 0.7 mg/L。(3) 高 渗 预 分 化:先 将 胚 性 愈 伤 组 织 接 种 于 蔗 糖 浓 度 为 45, 60 和 75 g/L 的 MS 分 化 培 养 基 MSDM (含 BAP 2.0 mg/L, KT 0.5 mg/L, NAA 0.5 mg/L, 水 解 酪 蛋 白 0.5 g/L, 琼 脂 8 g/L) 上 进 行 高 渗 预 分 化,同 时 以 蔗 糖 浓 度 为 30 g/L 的 作 为 对 照。预 分 化 条 件 为 28 ± 2 °C, 暗 培 养。约 7 ~ 10 d 后,再 挑 选 乳 白 色、结 构 致 密、有 颗 粒 状 突 起 的 胚 性 愈 伤 组 织 转 移 到 蔗 糖 浓 度 为 30 g/L 的 MSDM 分 化 培 养 基 上 进 行 植 株 再 生。(4) 琼 脂 浓 度:将 蔗 糖 浓 度 为 30 g/L 的 MSDM 分 化 培 养 基 中 的 琼 脂 浓 度 由 8 g/L 提 高 到 10, 12, 14, 16 g/L, 并 以 8 g/L 作 为 对 照。(5) 脯 氨 酸 添 加:在 蔗 糖 浓 度 为 30 g/L 的 MSDM 分 化 培 养 基 中,添 加 0.5, 1.0, 1.5 g/L 的 脯 氨 酸,以 不 添 加 作 为 对 照。

2 结 果 与 分 析

2.1 BAP 与 KT 配 比 对 胚 性 愈 伤 组 织 植 株 再 生 的 影 响

BAP 和 KT 是 分 化 培 养 基 中 使 用 的 两 种 主 要 细 胞 分 裂 素。本 试 验 以 各 为 0 ~ 2 mg/L 的 BAP 与 KT 进 行 配 比,研 究 其 对 高 羊 茅 胚 性 愈 伤 组 织 分 化 的 影 响 (表 1)。在 所 有 8 种 配 比 中,凌 志、猎 狗 5 号 和 可 奇 思 的 总 愈 伤 组 织 再 生 率 均 以 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L KT 最 高,美 洲 虎 3 号 的 总 愈 伤 组 织 再 生 率 虽 是 2.0 mg/L BAP 稍 高 于 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L KT,但 再 生 绿 苗 愈 伤 组 织 频 率 仍 是 后 者 高 于 前 者。单 就 BAP 浓 度 进 行 比 较,可 以 看 到,总 愈 伤 组 织 再 生 率 随 BAP 浓 度 的 增 加 而 提 高。只 含 2.0 mg/L BAP 而 不 含 KT 的 总 愈 伤 组 织 再 生 率 明 显 要 比 只 含 2.0 mg/L KT 而 不 含 BAP 的 高,高 出 的 幅 度 为 38.3% ~ 88.9%。表 明 在 高 羊 茅 胚 性 愈 伤 组 织 分 化 时,BAP 比 KT 具 有 更 大 的 作 用。

表 1 还 表 明,4 个 供 试 品 种 的 胚 性 愈 伤 组 织 植 株 再 生 能 力 存 在 较 大 差 异,以 猎 狗 5 号 的 总 愈 伤 组 织 再 生 率 最 高,美 洲 虎 3 号 最 低。在 再 生 的 愈 伤 组 织 中,包 含 3 种 类 型,即 全 部 再 生 绿 苗、同

表 1 细胞分裂素 BAP 和 KT 的不同对比对高羊茅胚性愈伤组织植株再生的影响

Table 1 Effects of different combinations of BAP and KT on plant regeneration of embryogenic callus in tall fescue

| 品种 | 浓度(BAP + KT) /mg·L ⁻¹ | 再生愈伤组织频率/% | | | |
|---------|-------------------------------------|------------|-------------|----------|------|
| | | 再生 绿苗 | 再生绿 苗和白苗 | 再生 白苗 | 合计 |
| 凌志 | 0+2.0 | 24.5 | 8.2 | 2.0 | 34.7 |
| | 0.5+2.0 | 26.0 | 6.0 | 6.0 | 38.0 |
| | 1.0+2.0 | 24.0 | 12.0 | 4.0 | 40.0 |
| | 1.0+1.0 | 28.3 | 3.8 | 5.7 | 37.8 |
| | 1.5+1.5 | 29.2 | 10.4 | 2.1 | 41.7 |
| | 2.0+0 | 36.0 | 8.0 | 4.0 | 48.0 |
| | 2.0+0.5 | 37.2 | 9.8 | 5.9 | 52.9 |
| | 2.0+1.0 | 25.9 | 13.0 | 5.5 | 44.4 |
| | 猎狗 5 号 | 0+2.0 | 23.4 | 4.3 | 10.6 |
| 0.5+2.0 | | 32.7 | 1.9 | 7.7 | 42.3 |
| 1.0+2.0 | | 30.6 | 4.1 | 12.2 | 46.9 |
| 1.0+1.0 | | 32.0 | 4.0 | 8.0 | 44.0 |
| 1.5+1.5 | | 35.3 | 7.8 | 5.9 | 49.0 |
| 2.0+0 | | 44.0 | 2.0 | 10.0 | 56.0 |
| 2.0+0.5 | | 41.5 | 5.7 | 11.3 | 58.5 |
| 2.0+1.0 | | 40.0 | 4.0 | 8.0 | 52.0 |
| 美洲虎 3 号 | | 0+2.0 | 12.0 | 2.0 | 4.0 |
| | 0.5+2.0 | 15.4 | 0 | 3.8 | 19.2 |
| | 1.0+2.0 | 17.0 | 4.3 | 2.1 | 23.4 |
| | 1.0+1.0 | 21.5 | 2.0 | 2.0 | 25.5 |
| | 1.5+1.5 | 16.0 | 8.0 | 4.0 | 28.0 |
| | 2.0+0 | 22.6 | 5.7 | 5.7 | 34.0 |
| | 2.0+0.5 | 26.0 | 4.0 | 2.0 | 32.0 |
| | 2.0+1.0 | 22.9 | 2.1 | 4.2 | 29.2 |
| | 可奇思 | 0+2.0 | 12.0 | 8.0 | 4.0 |
| 0.5+2.0 | | 13.7 | 3.9 | 11.8 | 29.4 |
| 1.0+2.0 | | 21.5 | 11.8 | 2.0 | 35.3 |
| 1.0+1.0 | | 16.7 | 10.4 | 6.2 | 33.3 |
| 1.5+1.5 | | 22.6 | 5.7 | 11.3 | 39.6 |
| 2.0+0 | | 24.0 | 10.0 | 8.0 | 42.0 |
| 2.0+0.5 | | 28.9 | 7.7 | 9.6 | 46.2 |
| 2.0+1.0 | | 20.0 | 12.0 | 6.0 | 38.0 |

时再生绿苗和白苗以及完全再生白苗,4 个品种、各种 BAP 与 KT 配比均有高低不一的再生绿/白苗和再生白苗愈伤组织频率,但品种间的表现不尽相同。凌志的再生绿/白苗愈伤组织频率普遍高于再生白苗愈伤组织频率,而猎狗 5 号刚好相反,另两个品种则没有这种明显趋势。

2.2 NAA 浓度对胚性愈伤组织植株再生的影响

在上述 BAP 与 KT 的配比试验中,分化培养基中的 NAA 浓度为 0.3 mg/L。表 2 表明,在细胞分裂素水平为 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L KT 的条件下,将 NAA 浓度由 0.3 mg/L 提高到 0.5

表 2 激素 NAA 浓度对高羊茅胚性愈伤组织植株再生的影响

Table 2 Effects of NAA concentrations on plant regeneration of embryogenic callus in tall fescue

| 品种 | NAA /mg·L ⁻¹ | 再生愈伤组织频率/% | | | |
|---------|----------------------------|------------|-------------|----------|------|
| | | 再生 绿苗 | 再生绿 苗和白苗 | 再生 白苗 | 合计 |
| 凌志 | 0.1 | 26.0 | 6.0 | 4.0 | 36.0 |
| | 0.3 | 36.7 | 10.2 | 2.1 | 49.0 |
| | 0.5 | 39.6 | 11.3 | 3.8 | 54.7 |
| | 0.7 | 37.3 | 3.9 | 5.9 | 47.1 |
| 猎狗 5 号 | 0.1 | 24.5 | 4.1 | 10.2 | 38.8 |
| | 0.3 | 42.0 | 2.0 | 12.0 | 56.0 |
| | 0.5 | 47.1 | 5.9 | 7.8 | 60.8 |
| | 0.7 | 48.1 | 3.8 | 5.8 | 57.7 |
| 美洲虎 3 号 | 0.1 | 18.0 | 0 | 4.0 | 22.0 |
| | 0.3 | 25.0 | 6.2 | 4.2 | 35.4 |
| | 0.5 | 27.8 | 3.7 | 5.5 | 37.0 |
| | 0.7 | 22.6 | 5.7 | 1.9 | 30.2 |
| 可奇思 | 0.1 | 18.0 | 10.0 | 4.0 | 32.0 |
| | 0.3 | 32.0 | 4.0 | 12.0 | 48.0 |
| | 0.5 | 39.2 | 11.8 | 5.9 | 56.9 |
| | 0.7 | 38.4 | 7.7 | 5.8 | 51.9 |

mg/L,可以获得更高的总愈伤组织再生率和再生绿苗愈伤组织频率,且 4 个供试品种的反应一致。

2.3 高渗预分化对胚性愈伤组织植株再生影响

将高羊茅胚性愈伤组织先接种于蔗糖浓度为 45,60,75 g/L 的分化培养基上,在暗培养条件下进行高渗预分化,然后再挑选乳白色、结构致密、有颗粒状突起的胚性愈伤组织转移到蔗糖浓度为 30 g/L 的相同分化培养基上光照培养,结果使所有 4 个供试品种的总愈伤组织再生率和再生绿苗愈伤组织频率得到明显提高,3 种蔗糖浓度中,以 60 g/L 的效果最好(表 3)。

2.4 琼脂浓度对胚性愈伤组织植株再生的影响

将经过高渗预分化的高羊茅致密愈伤组织转移到琼脂浓度为 8~16 g/L 的分化培养基上进行分化,结果表明,适当增加琼脂浓度能够提高高羊茅胚性愈伤组织的植株再生频率。从表 4 可以看出,4 个供试品种中,猎狗 5 号和可奇思的总愈伤组织再生率和再生绿苗愈伤组织频率在琼脂浓度为 10 g/L 时最高,继续提高浓度则会下降,而另两个品种凌志和美洲虎 3 号的总愈伤组织再生率虽在琼脂浓度为 12 g/L 时最高,但与 10 g/L 的相差不大,而且再生绿苗愈伤组

表3 高渗预分化对高羊茅胚性愈伤组织植株再生影响

Table 3 Effects of high-osmoticum predifferentiation on plant regeneration of embryogenic callus in tall fescue

| 品种 | 蔗糖 浓度 /g·L ⁻¹ | 再生愈伤组织频率/% | | | |
|-------|--------------------------------|------------|-------------|----------|------|
| | | 再生 绿苗 | 再生绿 苗和白苗 | 再生 白苗 | 合计 |
| 凌志 | 30 | 40.0 | 8.0 | 6.0 | 54.0 |
| | 45 | 42.6 | 10.6 | 4.2 | 57.4 |
| | 60 | 47.2 | 11.3 | 5.7 | 64.2 |
| | 75 | 46.1 | 5.8 | 7.7 | 59.6 |
| 猎狗5号 | 30 | 44.9 | 6.1 | 10.2 | 61.2 |
| | 45 | 54.0 | 6.0 | 8.0 | 68.0 |
| | 60 | 55.1 | 4.1 | 14.3 | 73.5 |
| 美洲虎3号 | 30 | 22.0 | 6.0 | 8.0 | 36.0 |
| | 45 | 31.4 | 5.9 | 3.9 | 41.2 |
| | 60 | 30.8 | 1.9 | 11.5 | 44.2 |
| | 75 | 22.4 | 8.2 | 8.2 | 38.8 |
| 可奇思 | 30 | 32.7 | 7.7 | 11.5 | 51.9 |
| | 45 | 36.0 | 4.0 | 14.0 | 54.0 |
| | 60 | 40.7 | 13.0 | 5.6 | 59.3 |
| | 75 | 39.2 | 7.8 | 9.8 | 56.8 |

表4 不同琼脂浓度对高羊茅胚性愈伤组织植株再生的影响

Table 4 Effects of different agar concentrations on plant regeneration of embryogenic callus in tall fescue

| 品种 | 琼脂 含量 /g·L ⁻¹ | 再生愈伤组织频率/% | | | | |
|-------|--------------------------------|------------|-------------|----------|------|------|
| | | 再生 绿苗 | 再生绿 苗和白苗 | 再生 白苗 | 合计 | |
| 凌志 | 8 | 47.1 | 9.8 | 5.9 | 62.8 | |
| | 10 | 50.0 | 10.0 | 8.0 | 68.0 | |
| | 12 | 50.0 | 13.5 | 5.8 | 69.3 | |
| | 14 | 41.7 | 8.3 | 10.4 | 60.4 | |
| | 16 | 42.3 | 11.5 | 7.7 | 61.5 | |
| | 猎狗5号 | 8 | 57.4 | 4.3 | 8.5 | 70.2 |
| 美洲虎3号 | 10 | 62.0 | 10.0 | 6.0 | 78.0 | |
| | 12 | 57.1 | 4.1 | 12.3 | 73.5 | |
| | 14 | 50.9 | 5.7 | 13.2 | 69.8 | |
| | 16 | 46.0 | 8.0 | 10.0 | 64.0 | |
| | 可奇思 | 8 | 36.0 | 6.0 | 4.0 | 46.0 |
| | 10 | 38.9 | 5.6 | 7.4 | 51.9 | |
| 可奇思 | 12 | 36.7 | 10.2 | 6.1 | 53.0 | |
| | 14 | 30.8 | 7.7 | 9.6 | 48.1 | |
| | 16 | 24.5 | 11.3 | 7.6 | 43.4 | |
| | 8 | 38.0 | 10.0 | 8.0 | 56.0 | |
| | 10 | 46.2 | 11.5 | 7.7 | 65.4 | |
| | 12 | 37.2 | 9.8 | 11.8 | 58.8 | |
| 可奇思 | 14 | 35.9 | 15.1 | 9.4 | 60.4 | |
| | 16 | 27.6 | 12.8 | 12.8 | 53.2 | |

织频率也是 10 g/L 时最高。由此可见,高羊茅胚性愈伤组织分化时,分化培养基中的琼脂浓度以 10 g/L 较为适宜。

2.5 添加脯氨酸对胚性愈伤组织植株再生的影响

在吴关庭等^[8,9]的研究中,4个供试品种的各种处理均有不同频率的愈伤组织完全再生白苗及同时再生绿苗与白苗。作为克服这种白化现象的一种可能措施,本试验研究了分化培养基中添加脯氨酸对高羊茅胚性愈伤组织植株再生的影响(表5)。分化培养基中添加 0.5~1.5 g/L 脯氨酸对4个供试品种的总愈伤组织再生率有一定影响,但再生绿苗愈伤组织频率均高于不加脯氨酸的对照,而再生白苗和再生绿/白苗的愈伤组织频率基本上都低于对照,呈下降的趋势,表明分化培养基中添加脯氨酸对绿苗再生有利,可减少白化苗的产生。

表5 分化培养基中添加脯氨酸对高羊茅胚性愈伤组织植株再生的影响

Table 5 Effects of addition of L-proline to differentiation medium on plant regeneration of embryogenic callus in tall fescue

| 品种 | 脯氨酸 浓度 /g·L ⁻¹ | 再生愈伤组织频率/% | | | |
|-------|---------------------------------|------------|-------------|----------|------|
| | | 再生 绿苗 | 再生绿 苗和白苗 | 再生 白苗 | 合计 |
| 凌志 | 0 | 41.2 | 9.8 | 5.9 | 56.9 |
| | 0.5 | 48.1 | 5.8 | 3.8 | 57.7 |
| | 1.0 | 43.8 | 8.3 | 2.1 | 54.2 |
| | 1.5 | 44.0 | 4.0 | 4.0 | 52.0 |
| 猎狗5号 | 0 | 43.8 | 6.2 | 12.5 | 62.5 |
| | 0.5 | 45.3 | 7.5 | 5.7 | 58.5 |
| | 1.0 | 48.0 | 4.0 | 8.0 | 60.0 |
| 美洲虎3号 | 1.5 | 47.1 | 3.9 | 5.9 | 56.9 |
| | 0 | 26.5 | 6.1 | 6.1 | 38.7 |
| | 0.5 | 28.0 | 4.0 | 4.0 | 36.0 |
| | 1.0 | 27.4 | 0 | 5.9 | 33.3 |
| 可奇思 | 1.5 | 28.9 | 1.9 | 3.8 | 34.6 |
| | 0 | 37.0 | 9.3 | 7.4 | 53.7 |
| | 0.5 | 39.2 | 7.9 | 3.9 | 51.0 |
| | 1.0 | 38.0 | 4.0 | 8.0 | 50.0 |
| 可奇思 | 1.5 | 37.5 | 6.2 | 2.1 | 45.8 |

3 讨论

本研究结果表明,采用合适的激素配比和高渗预分化以及适当增加分化培养基中的琼脂浓

度,均可使高羊茅胚性愈伤组织再生频率得到提高。BAP 在高羊茅胚性愈伤组织分化中的作用要比 KT 大,但两者配合使用能够获得更佳效果,其适宜组合为 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L KT。在该细胞分裂素水平下,生长素 NAA 用 0.5 mg/L,总愈伤组织再生率最高。高羊茅胚性愈伤组织先在蔗糖浓度较高的分化培养基上预分化,以及经高渗预分化后的致密愈伤组织在琼脂浓度较高的分化培养基上分化,都能较好地促进愈伤组织的植株再生,其适宜浓度分别为蔗糖 60 g/L 和琼脂 10 g/L。此外,脯氨酸对高羊茅胚性愈伤组织的分化也有一定影响,一方面,导致总的愈伤组织再生率降低,另一方面,有减少白化苗再生的趋势,这与 Takamizo T^[10] 结果一致。

高羊茅作为一种禾本科植物,再生植株白化现象尤为突出。在本研究中,再生植株白化现象也比较严重,再生白苗愈伤组织频率最高达 14.3%(猎狗 5 号)和 14.0%(可奇思),分别占总愈伤组织再生率的近 1/5 和 1/4。随着高羊茅培养物培养时间的延长,再生植株中白苗的比例提高^[11,12]。高羊茅愈伤组织继代 1 次后就转移到分化培养基上再生,白化现象较轻。本研究用于分化试验的胚性愈伤组织都是经多次继代改造后获得,而在早先的非正式试验中,仅继代 1~2 次的少量胚性愈伤组织再生白苗的频率明显要低得多(数据未提供)。作者据此认为,快速获得足够数量的胚性愈伤组织对减轻高羊茅再生植株白化现象至关重要。而要达到这一目的,可以通过 3 条途径来实现:一是增加种子接种量,从初始愈伤组织中尽可能获得较多的胚性类型;二是在对高羊茅胚性愈伤组织发生的影响因素进行更多研究的基础上,改进诱导和继代培养基,提高胚性愈伤组织直接诱导和继代发生频率;三是对业已获得的胚性愈伤组织分割繁殖。

本研究结果还表明,4 个供试品种的胚性愈伤组织植株再生能力存在明显差异,如在 BAP 与 KT 配比、NAA 浓度、高渗预分化和琼脂浓度试验中,各自适宜浓度条件下,猎狗 5 号的总愈伤组织再生率比美洲虎 3 号高 23.8~29.3 个百分点。该结果提示我们,在高羊茅组织培养中,应重视对品种的选择。然而,结合供试品种完全

相同的愈伤组织诱导和继代改造影响因素研究的结果^[8,9]一起分析,同一高羊茅品种在愈伤组织诱导、胚性愈伤组织发生和植株再生 3 个方面的反应并不完全一致:出愈率很高,但胚性愈伤组织发生和分化能力不一定很强;胚性愈伤组织发生能力很强,但再生频率未必很高;相反,愈伤组织诱导率很低,但其植株再生能力可能很强。因此,在选择高羊茅品种时,应根据愈伤组织诱导、胚性愈伤组织发生和植株再生 3 个方面的能力进行综合考虑。

参考文献:

- [1] Rapella MA. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue culture of Argentine maize (*Zea mays* L.) [J]. *J Plant Physiol*, 1985, 121: 119 - 122.
- [2] Vuke TM, Mott RL. Growth of loblolly pine callus on a variety of carbohydrate sources[J]. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 153 - 156.
- [3] Trukahara M, Hirokawa T. Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus[J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11: 550 - 553.
- [4] 杨跃生,简玉瑜.脱水处理对水稻组织培养植株再生的高效调控作用[A].简玉瑜.农业科学集刊第二集(农作物原生质体培养专辑)[C].北京:农业出版社,1995. 39 - 46.
- [5] 颜秋生,张雪琴,滕胜,等.水稻原生质体培养技术体系的建立[A].简玉瑜.农业科学集刊第二集(农作物原生质体培养专辑)[C].北京:农业出版社,1995. 20 - 26.
- [6] 于晓红,朱祯,付志明,等.提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J].*植物生理学报*,1999,25(4):388 - 394.
- [7] 胡张华,陈火庆,吴关庭,等.百慕大成熟胚的组织培养及植株再生[J].*草业学报*,2003,12(1):85 - 89.
- [8] 郎春秀,吴关庭,胡张华,等.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.
- [9] 吴关庭,胡张华,陈笑芸,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(4):369 - 372.
- [10] Takamizo T, Sugimoto KI, Ohsugi R. Plant regeneration from suspension culture derived protoplasts of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) of a single genotype [J]. *Plant Sci*, 1990, 72: 125 - 131.
- [11] Lowe KW, Conger BV. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue [J]. *Crop Sci*, 1979, 19: 397 - 400.
- [12] Dalton SJ. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb., *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* LAM [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1988, 12: 137 - 140.

(责任编辑 袁醉敏)