

· 技术方法 ·

## 羊草成熟胚诱导愈伤组织及植株再生系统的优化

肖燕<sup>1</sup>, 王振兴<sup>1</sup>, 李东明<sup>2</sup>, 齐艳华<sup>2</sup>, 恩和巴雅尔<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022

<sup>2</sup>内蒙古大学生命科学学院, 牧草与特色作物生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010000

**摘要** 羊草(*Leymus chinensis*)为异源四倍体禾本科牧草, 利用成熟胚诱导愈伤组织获得再生植株的效率极低, 难以运用遗传转化方法进行品种改良。我们以羊草成熟胚为外植体, 使用适宜羊草愈伤组织生长的新型培养基配方, 筛选诱导愈伤组织、不定芽分化及生根阶段的最适植物激素浓度、光照和温度条件, 从而优化羊草成熟胚的组织培养方案。研究结果表明, 羊草成熟胚诱导阶段2,4-D的最适浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 变温暗培养, 诱导率可达74.1%; 分化阶段6-BA和NAA的最适浓度均为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 分化率可达57.1%; 生根阶段NAA的最适浓度为 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 移栽后成活率为100%。

**关键词** 成熟胚, 羊草, 愈伤组织, 植物激素, 植株再生

肖燕, 王振兴, 李东明, 齐艳华, 恩和巴雅尔 (2020). 羊草成熟胚诱导愈伤组织及植株再生系统的优化. 植物学报 55, 192–198.

羊草(*Leymus chinensis*)也称碱草, 为多年生禾本科(Gramineae)赖草属(*Leymus*)野生牧草, 主要分布在中国(东北、华北和西北等地)、朝鲜、蒙古、苏联和日本等国(Olson and Rudney, 1983)。羊草品质优良, 适口性好, 蛋白质含量在禾本科牧草中位居前列(张玉芬和周道玮, 2002)。其不仅抗寒、耐旱、耐盐碱、耐践踏和耐贫瘠(Zhu et al., 1981), 而且春季返青早, 秋季枯黄晚, 是一种不限季节的青饲料(孟宪宝, 2010)。此外, 羊草也是人工草地和生态环境建设的重要物种, 其根系发达, 可有效控制风蚀、荒漠化和水土流失, 及用于治理草地盐碱化, 对草原畜牧业发展意义重大(李艳波和李凤芹, 1998; 孔祥军和梁正伟, 2007; 刘滨硕等, 2014; Liu et al., 2015)。近年来, 受自然环境和过度放牧的影响, 羊草出苗率、产草量和结实率均较低, 生物多样性面临严重威胁, 开展羊草种质生物多样性保护成为目前亟待解决的问题(汪恩华, 2002)。随着生物技术的快速发展, 科研工作者在羊草的组织培养与植株再生方面取得一定进展, 转基因体系建设也初见成效(崔秋华等, 1990; 刘公社等, 2002; 曲同宝等, 2004, 2010; 魏琪等, 2005)。

影响羊草愈伤组织培养的因素主要包括外植体的选择、基因型、培养基、氮源、外源激素和继代培养时间等(邹吉祥, 2012), 诸多因素中外源激素的影响尤为为重要。在羊草愈伤组织培养成植株的过程中, 使用的实验材料不同, 加入各类激素浓度的实验结果也会不同。最初研究者使用羊草种胚作为外植体, 将胚横切和纵切后放入培养基中, 在切口即可产生愈伤组织(韩德复, 1996)。汪恩华(2002)以羊草幼穗作为外植体诱导植株再生, 基础培养基使用MS培养基, 诱导培养基添加了 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, 继代培养基添加了 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, 分化培养基添加了 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  KT与 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 在无激素的基础培养基上获得生根苗。张莹等(2007)进行的羊草幼穗离体培养实验使用的分化培养基则是含 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA与 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  KT的MS培养基, 并加有3.0%蔗糖和0.75% Ag。刘公社等(2002)和邹吉祥(2012)在使用羊草种子(黑色、浅黄色和黄色)作为外植体进行植株再生实验时, 发现诱导阶段, 黑色种子在添加 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的培养基中出愈率最高(为16.5%); 浅黄色和黄色种子诱导愈伤组织的情况要好于黑色种子, 在添加 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的培养基中出愈率最高, 浅黄色种

收稿日期: 2019-11-17; 接受日期: 2020-02-26

基金项目: 内蒙古大学骏马计划高层次人才启动经费(No.21400-5195108)

\* 通讯作者。E-mail: nmsdenhe@imnu.edu.cn

子可达28.5%。曲同宝(2004)在以羊草种子作为外植体进行植株再生实验时则发现, 添加 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2, 4-D的培养基诱导效果最佳(其它相关研究也得出了类似结论), 继代培养阶段添加 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D; 在培养基种类上, 诱导和继代阶段用MB培养基效果最好, 分化培养基添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA效果最佳, 生根阶段使用添加 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的培养基效果最好。

近20年来, 利用羊草幼胚或成熟胚诱导愈伤组织的诱导率有了一定提高。例如, 孔祥军等(2008)使用羊草成熟胚作为外植体, 通过变温处理, 将诱导率从23.3%提高到48.3%。但是, 离体再生效率还是较低, 影响了羊草基因工程研究的开展。因此, 建立高效稳定的羊草成熟胚组织培养体系, 对今后的转基因及体细胞突变研究具有重要意义。

本研究以羊草成熟胚为外植体, 通过使用新培养基及改良培养基配方、培养时间和培养条件提高羊草成熟胚愈伤组织诱导效率, 筛选适宜分化培养的激素浓度配比, 获得高效稳定的羊草成熟胚诱导植株再生体系, 为羊草遗传转化体系的建立奠定基础, 并为羊草分子设计育种与遗传改良提供技术支持。

## 1 植物材料

供试羊草(*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel.)种子为中国农业科学院草原研究所沙尔沁育种基地于2018年扩繁的羊草种子, 千粒重为2.306 g。

## 2 培养基成分与培养条件

### 2.1 外植体消毒

取充分成熟且结构完整的羊草种子, 人工剥去种皮置于灭菌后的离心管中进行消毒, 用70%乙醇溶液清洗5分钟, 5%次氯酸钠溶液清洗10分钟, 无菌水清洗5次(前4次每次清洗5分钟, 最后1次清洗30分钟), 将清洗好的种子放在灭菌的且铺有滤纸的玻璃皿上晾干。

### 2.2 成熟胚的诱导

基本培养基的配制参照Hiei等(1994)的方法, 并加以改良。诱导培养基:  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白+ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脯氨酸+ $2.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺+ $4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 植物凝胶, pH5.8,  $120^\circ\text{C}$ 高压灭菌20分钟后使用。诱导

阶段的2,4-D浓度分别为1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将消毒晾干的羊草种子放入培养基中, 每皿9粒, 每种浓度12皿, 置于培养箱中。 $16^\circ\text{C}/28^\circ\text{C}$ , 12小时光照/12小时黑暗条件下培养20天, 计算诱导率(诱导率=(诱导愈伤组织块数/接种的成熟胚个数) $\times 100\%$ )。

### 2.3 愈伤组织的继代培养

愈伤组织诱导30天后进行继代培养, 时间为14天。培养基成分(除 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺外)和培养条件同诱导阶段。

### 2.4 愈伤组织的分化培养

分化培养基基本成分同继代培养基。将经继代培养的愈伤组织接种于含不同浓度6-BA (0.5、1.0、2.0、3.0、4.0和 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )与NAA (0.25、0.5、1.0、2.0、3.0和 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )正交组合的分化培养基中, 在组培间内培养,  $25^\circ\text{C}$ 恒温, 14小时光照/10小时黑暗。接种30天后统计分化情况, 分化率=(分化成植株数/接种愈伤组织个数) $\times 100\%$ 。

### 2.5 生根培养

生根培养基与继代培养基成分相同, 所用激素NAA浓度为0.25、0.5、1.0和 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH5.8。挑选分化培养后大小相似的试管苗移入生根培养基进行生根培养, 具体分为3种情况: (A) 苗高2–3 cm, 根长( $0.5\pm 0.1$ ) cm, 根数3–5; (B) 苗高3–5 cm, 根长( $0.5\pm 0.1$ ) cm, 根数3–5; (C) 苗高5–7 cm, 根长( $0.5\pm 0.1$ ) cm, 根数3–5。在 $25^\circ\text{C}$ 恒温, 14小时光照/10小时黑暗的组培间内培养2周后统计生根率。

### 2.6 炼苗与移栽

待苗长至试管顶部, 打开封口膜, 加入适量去离子水, 炼苗1天。然后洗去琼脂, 挑选根部和茎叶分化完好的苗移栽到钵中生长。

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同浓度激素、光照和黑暗对羊草成熟胚诱导率的影响

羊草成熟胚接种于培养基后, 第3天开始露出白芽,

接着长出愈伤组织。起初愈伤组织生长较慢, 20天后开始快速生长。

不同2,4-D浓度下, 光照和黑暗培养对羊草成熟胚愈伤组织诱导的结果见图1。从图1可以看出, 羊草成熟胚在相同2,4-D浓度下, 黑暗培养的诱导率显著高于光照培养。在不同2,4-D浓度下, 诱导率随其浓度的升高呈先上升后下降趋势。光照条件下, 诱导率在2,4-D浓度为1.5 mg·L<sup>-1</sup>时最低(为24.1%), 当2,4-D浓度上升至2.5 mg·L<sup>-1</sup>时, 诱导率最高(为50.9%); 黑暗条件下, 诱导率同样在2,4-D浓度为1.5 mg·L<sup>-1</sup>时最低(为34.3%), 但在2,4-D浓度为2.0 mg·L<sup>-1</sup>时达到最高值(74.1%)。

3.2 不同激素浓度对比对愈伤组织分化的影响

在分化培养基上愈伤组织约5天后长出绿色生长点, 接着分化出地上部, 根比叶分化慢, 2周后才开始分化出根, 且根的生长速度较慢, 多数情况在分化阶段仅有少量的根部。

对分化阶段的结果分析表明, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA组合的分化率最高(为57.1%), 其次是

2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA、4.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA和3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+3.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA组合, 分化效率均为47.6% (表1)。分化出根部后,

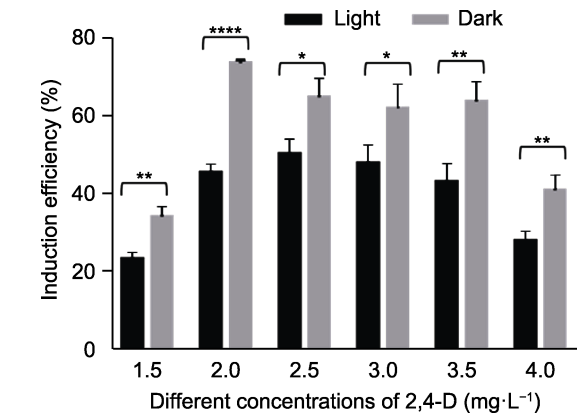


图1 羊草成熟胚在光照/黑暗条件下不同2,4-D浓度诱导20天的诱导率

\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*\*  $P<0.0001$

Figure 1 Induction efficiency of different 2,4-D concentrations in mature embryos of *Leymus chinensis* under light/dark conditions for 20 days

\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*\*  $P<0.0001$

表1 不同浓度6-BA和NAA配比下羊草愈伤组织的分化率(平均值±标准误)

Table 1 Differentiation efficiency of *Leymus chinensis* callus under different concentrations of 6-BA and NAA (means±SE)

6-BA/NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	Callus number	The number of adventitious buds in proliferation	The number of roots in reproduction	Differentiation efficiency (%)
0.5/0.25	21	0	0	0
1.0/0.25	21	1A	4+	4.8±4.8 ab
2.0/0.25	21	0	0	0
3.0/0.25	21	3AB	0	14.3±8.3 abcd
4.0/0.25	21	8AB	0	38.1±4.8 efgh
5.0/0.25	21	4A	0	19.1±4.8 abcde
0.5/0.5	21	0	0	0
1.0/0.5	21	7BC	6+	33.3±9.5 defg
2.0/0.5	21	10BC	5+	47.6±9.5 gh
3.0/0.5	21	7AB	4	33.3±4.8 defg
4.0/0.5	21	10AB	0	47.6±9.5 gh
5.0/0.5	21	3BC	0	14.3±0 abcd
0.5/1.0	21	2A	8+	9.5±4.8 abc
1.0/1.0	21	12AB	4	57.1±4.8 h
2.0/1.0	21	9A	0	42.9±8.3 fgh
3.0/1.0	21	5AC	3	23.8±8.3 bcdef
4.0/1.0	21	4A	1+	19.1±4.8 abcde
5.0/1.0	21	5A	0	23.8±12.6 bcdef
0.5/2.0	21	5ABC	9+	23.8±4.8 bcdef
1.0/2.0	21	1A	5	4.8±4.8 ab
2.0/2.0	21	0	0	0

表1 (续)

Table 1 (continued)

6-BA/NAA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Callus number	The number of adventitious buds in proliferation	The number of roots in reproduction	Differentiation efficiency (%)
3.0/2.0	21	2A	1+	9.5±4.8 abc
4.0/2.0	21	2AB	4	9.5±4.8 abc
5.0/2.0	21	0	0	0
0.5/3.0	21	1A	3	4.8±4.8 ab
1.0/3.0	21	4A	3	19.1±4.8 abcde
2.0/3.0	21	7AB	3	33.3±4.8 defg
3.0/3.0	21	10ABC	1	47.6±9.5 gh
4.0/3.0	21	0	0	0
5.0/3.0	21	0	0	0
0.5/4.0	21	6A	3	28.6±8.2 cdefg
1.0/4.0	21	0	0	0
2.0/4.0	21	8AB	2	38.1±4.8 efgh
3.0/4.0	21	0	0	0
4.0/4.0	21	3AB	5	14.3±8.2 abcd
5.0/4.0	21	6AB	0	28.6±8.2 cdefg

A: 株高1.0–3.0 cm; B: 株高3.1–5.0 cm; C: 株高>5.0 cm. +: 根部分化长度>0.5 cm。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
A: Plant height of 1.0–3.0 cm; B: Plant height of 3.1–5.0 cm; C: Plant height > 5.0 cm. +: Root differentiation length > 0.5 cm. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at  $P<0.05$ .

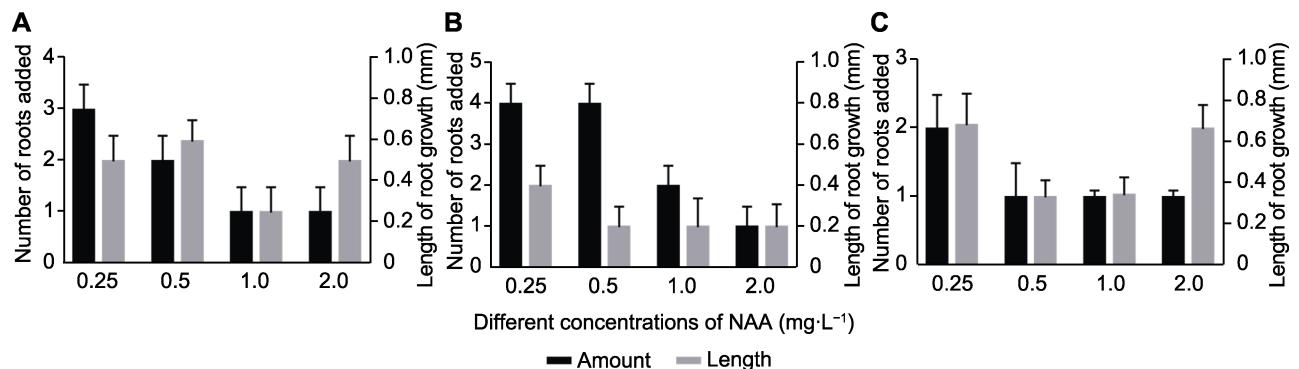


图2 不同浓度NAA对羊草组培苗生根的影响

(A) 株高2.0–3.0 cm幼苗的生根; (B) 株高3.1–5.0 cm幼苗的生根; (C) 株高5.1–7.0 cm幼苗的生根。所有数据均是在幼苗具有3–5个不定根及主根长为(0.5±0.1) cm时测定。

Figure 2 Effect of different NAA concentrations on rooting of tissue culture seedlings in *Leymus chinensis*

(A) Rooting of 2.0–3.0 cm of seedlings; (B) Rooting of 3.1–5.0 cm of seedlings; (C) Rooting of 5.1–7.0 cm of seedlings. All seedlings with (0.5±0.1) cm of primary root and 3–5 of adventitious roots were used to the related experiments.

较短也可移栽成功, 因此, 移栽的成活率为100%。综合分析地上部和地下部(包括幼苗大小、根数以及根长)共同分化的效率, 我们认为2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的浓度配比更适用, 在此浓度激素组合下的综合分化情况最好, 地上部均可长至3 cm以上, 根部分化较多且较长, 生长稳定。

### 3.3 生根培养基的选用

羊草愈伤组织分化后转移至含有不同浓度(0.25、0.5、

1.0和2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) NAA的生根培养基中培养2周, 不定根数量和长度均有不同程度的增加(图2)。但在NAA浓度为0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生根培养基中, 所有幼苗的不定根数均增加2–4个(图2A–C), 高于其它浓度处理。3.1–5.0 cm (图2B)和5.1–7.0 cm (图2C)高的幼苗在NAA浓度为0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生根培养基中, 主根分别增长了0.4和0.7 cm, 也高于其它浓度处理, 表明NAA浓度为0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对羊草组培苗的生根促进效率最高。

### 3.4 讨论

随着全球气候变化的加剧,日益恶劣的自然环境显著影响了植物的生长(Mathur et al., 2019)。盐碱化是造成植物栖息地退化的主要原因之一(周道玮等, 2011)。马红媛和梁正伟(2007)研究发现,羊草种子萌发的最适pH值介于8.0–8.5之间,这为利用羊草改良重度盐碱地提供了思路。羊草受自然环境和自身特性的影响,结实率非常低,种子休眠期较长,过了休眠期的种子发芽率也很低,故自然环境下的育种工作极其困难。本研究以羊草成熟胚为外植体诱导愈伤组织并最终获得再生植株,筛选出适宜的外源激素浓度并优化了培

养条件,提高了羊草成熟胚诱导愈伤组织的诱导率和转化效率。

以羊草成熟胚为外植体进行组织培养,从诱导愈伤组织开始至成苗约需3个月。成熟胚诱导3天开始发芽,然后长出愈伤组织,苗也会随之生长,因此在继代培养前需先将苗剥离。新长出的愈伤组织质地较软,形状不规则,扩大培养后变硬,并会有颗粒状愈伤组织产生。为促进地上部和地下部一同分化,在分化阶段同时加入6-BA和NAA两种外源激素。相对地上部,根部分化更难,但羊草的存活能力强,即使有很少的根分化出来也可移栽成功。图3为羊草成熟胚经诱导

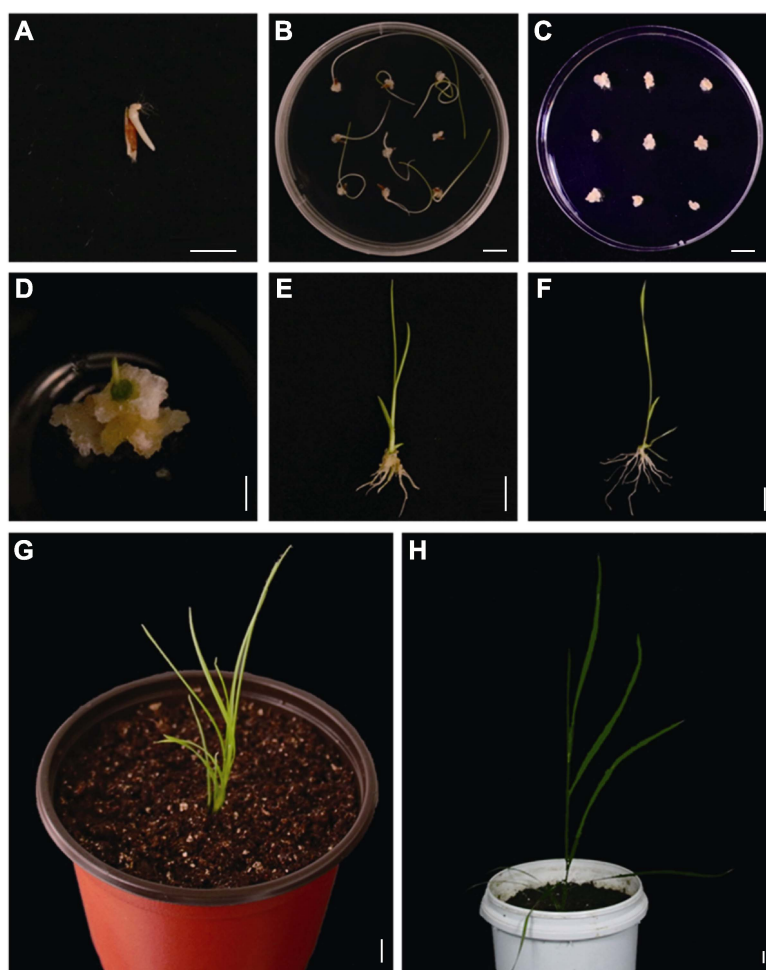


图3 羊草成熟胚的诱导、继代、分化和移栽

(A) 成熟胚诱导5天; (B) 成熟胚诱导20天; (C) 愈伤组织的继代; (D) 愈伤组织的分化; (E) 分化培养40天的幼苗; (F) 生根培养14天的幼苗; (G) 移栽14天的植株; (H) 移栽2个月的植株。Bars=1 cm

**Figure 3** Induction, subculture, differentiation and transplanting of mature embryos of *Leymus chinensis*

(A) Mature embryo induction for 5 days; (B) Mature embryo induction for 20 days; (C) Subculture of callus; (D) Callus differentiation; (E) The differentiated 40-day seedlings; (F) Rooting culture for 14 days; (G) Plants transplanted for 14 days; (H) Plants transplanted for 2 months. Bars=1 cm

愈伤组织至再生成苗的全部过程。

羊草种子愈伤组织的诱导对2,4-D浓度比较敏感,随着2,4-D浓度的升高诱导率呈先上升后下降趋势,以其浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时效果最佳。故在诱导阶段,添加 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D,变温( $16^{\circ}\text{C}/28^{\circ}\text{C}$ ),黑暗培养,得到的诱导率最高,且愈伤组织较大,质地软但有型,不会呈水渍状或易碎。羊草愈伤组织的分化能力较差,相比其它外源激素6-BA对愈伤组织分化的影响更为显著。为使分化效果最佳,加入NAA使地上部和地下部同时分化。

羊草幼穗和成熟胚均可作为外植体诱导愈伤组织。本研究使用成熟胚作为实验材料与幼穗相比有很大优势,可随时进行实验,不受取材时间的限制。在实验中使用的外源激素为生长素类的2,4-D和NAA,细胞分裂素类的6-BA,最终确定了各阶段的最适培养基和外源激素浓度。诱导培养基中加入 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D;分化培养基中加入 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的分化效率最高(可用于一般的组织培养实验),培养基中加入 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA则更适合进行羊草遗传转化研究;生根培养基中加入 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA。本研究对羊草成熟胚组织培养方法(包括成熟胚诱导、分化和生根培养)进行了优化,为分子设计育种改良羊草品种提供了技术支持。

## 参考文献

- 崔秋华, 张玉珍, 朴铁夫, 顾德峰, 张为群, 许耀奎, 孙振雷, 刘海学 (1990). 羊草胚性愈伤组织的形成及植株再生. 吉林农业大学学报 **12**(3), 1–5.
- 韩德复 (1996). 羊草组织培养的研究. 吉林农业大学学报 **18**(S1), 140–141.
- 孔祥军, 梁正伟 (2007). 羊草分子生物学研究进展. 生命科学 **11**, 289–294.
- 孔祥军, 梁正伟, 马红媛, 刘森 (2008). 变温培养对羊草胚性愈伤组织诱导率的影响. 生物技术 **10**(5), 60–62.
- 李艳波, 李凤芹 (1998). 松嫩盐碱草地羊草群落的产量动态. 黑龙江大学自然科学学报 **15**(2), 103–106.
- 刘滨硕, 康春莉, 王鑫, 包国章 (2014). 羊草对盐碱胁迫的生理生化响应特征. 农业工程学报 **30**(23), 166–173.
- 刘公社, 汪恩华, 刘杰, 齐冬梅, 李芳芳 (2002). 羊草幼穗离体培养诱导植株再生的研究. 草地学报 **10**, 198–202.
- 马红媛, 梁正伟 (2007). 不同pH值土壤及其浸提液对羊草种子萌发和幼苗生长的影响. 植物学通报 **24**, 181–188.
- 孟宪宝 (2010). 优质饲草羊草栽培技术. 黑龙江畜牧兽医 **13**, 97–98.
- 曲同宝 (2004). 羊草遗传转化受体系统的建立及转*BADH*基因的研究. 硕士论文. 吉林: 吉林农业大学. pp. 12–25.
- 曲同宝, 孟繁勇, 张友民, 王丕武 (2010). 影响羊草愈伤组织分化因素的研究. 安徽农业科学 **38**, 6125–6127, 6130.
- 曲同宝, 王丕武, 关淑艳, 刘玲芝 (2004). 羊草组织培养及再生系统的建立. 草业学报 **13**(5), 91–94.
- 汪恩华 (2002). 羊草繁殖生物学特性的研究. 硕士论文. 北京: 中国科学院植物研究所. pp. 39–45.
- 魏琪, 胡国富, 李凤兰, 胡宝忠 (2005). 羊草种子愈伤组织的诱导及植株再生. 东北农业大学学报 **36**, 41–44.
- 张莹, 李晓峰, 刘公社, 陈耀锋 (2007). 羊草愈伤组织状态的调控. 西北农林科技大学学报(自然科学版) **35**(5), 111–114.
- 张玉芬, 周道玮 (2002). 羊草分化及育种研究进展. 中国草地 **24**(2), 54–58, 74.
- 周道玮, 李强, 宋彦涛, 王学志 (2011). 松嫩平原羊草草地盐碱化过程. 应用生态学报 **22**, 1423–1430.
- 邹吉祥 (2012). 羊草高频再生体系建立及转*CodA*基因的初步探索. 硕士论文. 吉林: 延边大学. pp. 3–4.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**, 271–282.
- Liu BS, Kang CL, Wang X, Bao GZ (2015). Tolerance mechanisms of *Leymus chinensis* to salt-alkaline stress. *Acta Agric Scand Sect B-Soil Plant Sci* **65**, 723–734.
- Mathur S, Tomar RS, Jajoo A (2019). Arbuscularmycorrhizal fungi (AMF) protects photosynthetic apparatus of wheat under drought stress. *Photosyn Res* **139**, 227–238.
- Olson RE, Rudney H (1983). Biosynthesis of ubiquinone. *Vitam Horm* **40**, 1–43.
- Zhu TC, Li JD, Yang DC (1981). A study of the ecology of Yang-cao (*Leymus chinensis*) grassland in Northern China. In: Proceedings of the 14th International Grassland Congress. Lexington: Westview. pp. 429–431.

## Optimization of Tissue Culture and Plant Regeneration System of Mature Embryo of *Leymus chinensis*

Yan Xiao<sup>1</sup>, Zhenxing Wang<sup>1</sup>, Dongming Li<sup>2</sup>, Yanhua Qi<sup>2</sup>, Enhebayaer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Huhehot 010022, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biotechnology, Ministry of Education, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhehot 010000, China

**Abstract** *Leymus chinensis* is a heterotetraploid grass. It is hard to use genetic transformation method for improving breeding since the efficiency of regeneration using callus induced from mature embryo is very low. In this study, we optimized the protocol of culturing mature embryo with *L. chinensis* as explants by screening optimum plant hormone concentrations, light conditions and culturing temperatures at different culturing stages including callus induction, differentiation, rooting and transplanting. Our results showed at the callus induction stage, the induction rate could reach up to 74.1% under  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, variable temperature and dark culture. The differentiation rate could reach up to 57.1% with optimum condition of  $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA and  $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. In the rooting stage, the survival rate was 100% when cultured with  $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA.

**Key words** mature embryo, *Leymus chinensis*, callus, plant hormone, plant regeneration

Xiao Y, Wang ZX, Li DM, Qi YH, Enhebayaer (2020). Optimization of tissue culture and plant regeneration system of mature embryo of *Leymus chinensis*. *Chin Bull Bot* **55**, 192–198.

---

\* Author for correspondence. E-mail: nmsdenhe@imnu.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)