

文章编号:1001-1498(2004)01-0095-07

# 几种作用因子对多年生黑麦草组织培养影响的研究

刘文真<sup>1,2</sup>, 玄松南<sup>2</sup>, 陈惠哲<sup>2</sup>, 朱睦元<sup>1</sup>, 孙宗修<sup>2\*</sup>

(1. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012;

2. 中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室, 浙江 杭州 310006)

**摘要:**以多年生黑麦草成熟种子为外植体进行了愈伤组织诱导和分化的研究。结果表明:dicamba 替代 2,4-D,蔗糖替代麦芽糖可以显著提高愈伤组织诱导率和植株再生率;在一定的浓度范围内(3~9 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D) 2,4-D 浓度的升高可明显提高愈伤组织的诱导率,但同时却降低了分化率;在愈伤诱导培养基中同时使用两种生长激素(2,4-D 和 NAA)的效果要好于单独使用一种生长激素(2,4-D)的效果;水解酪蛋白、脯氨酸和谷氨酰胺浓度的增加并没有促进植株再生率的升高。

**关键词:**多年生黑麦草;组织培养;愈伤组织;碳源;生长激素

中图分类号:S543.6

文献标识码:A

多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)是一种优良的冷季型禾本科(Gramineae)草种,广泛分布于欧洲、美洲和亚洲的温带地区,具有叶片光滑柔软、色泽美丽和绿色期长等优点。在我国长江以北的温带地区多年生黑麦草是最重要的草种之一,在长江以南的亚热带和热带地区也经常与其它草种混播,广泛应用于公共绿地,家庭庭院,运动场和高尔夫球场的建设。为了提高多年生黑麦草抗热、抗病、耐践踏等性能,并使其获得更加优良的农艺性状,育种家们利用品种选育,种间杂交和辐射育种等传统方法对多年生黑麦草进行改良,取得了一定的成绩并培育出一系列优良品系,但是难以取得突破性进展。组织培养和遗传转化技术的发展为作物品种的改良开辟了更加广阔的天地,使不同物种的基因交流和基因的定向转移成为现实,也为多年生黑麦草的培育提供了新的手段。

在国内,关于多年生黑麦草组织培养和遗传转化的研究报道较少,而国外多年来一直致力于通过组织培养及遗传转化技术对多年生黑麦草进行改良,并获得了转基因植株<sup>[1~3]</sup>。他们使用的方法有基因枪法<sup>[1]</sup>,原生质体直接吸入法<sup>[2]</sup>和碳化硅纤维法<sup>[3]</sup>,使用的受体均是悬浮细胞或原生质体,所以关于多年生黑麦草组织培养的报道多为悬浮细胞培养和原生质体培养<sup>[4~6]</sup>,而直接通过愈伤组织获得再生植株的报道则很少。愈伤组织培养技术不仅是悬浮细胞培养和原生质体培养的基础,而且愈伤组织本身也可以作为基因枪法和农杆菌介导转化法

收稿日期:2003-05-06

基金项目:2001—2003年浙江省科学技术厅项目“应用转基因技术培育草坪草新品种及产业化研究”(NO. 011102188)和2003—2005年国家自然科学基金项目“应用抗冷冻基因延长草坪草绿色期的研究”(NO. 30270942)

作者简介:刘文真(1975—),男,江西万年人,硕士生。

\* 为通讯作者。

的受体,因此对愈伤组织培养的研究是十分必要的。本实验通过对培养基中碳源、生长激素和有机添加物的调整,对多年生黑麦草组织培养进行了研究,进一步优化了多年生黑麦草的组织培养条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试材料为多年生黑麦草的成熟种子,来源于中国农科院研究生院。

### 1.2 材料处理

成熟种子在4℃条件下浸种过夜,第2天转移到次氯酸钠原液(质量分数为5.25%)中灭菌30 min,用无菌水冲洗3~5次,再用质量分数为5%的过氧化氢浸泡10 min,最后用无菌水冲洗4~6次,经过上述处理后的种子即可用于接种。

### 1.3 培养基

种子愈伤诱导培养基有8种(参看表1),培养基的共同成分是:MS无机盐<sup>[7]</sup>、B5有机物<sup>[8]</sup>、0.2 mg L<sup>-1</sup>BAP和8 g L<sup>-1</sup>的琼脂。继代培养基与相应的愈伤诱导培养基成分相同。所有的分化培养基的成分均为:MS无机盐、B5有机物、300 mg L<sup>-1</sup>水解酪蛋白、200 mg L<sup>-1</sup>脯氨酸、200 mg L<sup>-1</sup>谷氨酰胺、30 g L<sup>-1</sup>麦芽糖、2 mg L<sup>-1</sup>BAP、0.2 mg L<sup>-1</sup>NAA和8 g L<sup>-1</sup>琼脂。生根培养基为1/2 MS培养基另加30 g L<sup>-1</sup>蔗糖(不加任何激素)。所有培养基的pH值均调至5.8,然后在121℃下高压蒸汽灭菌15 min。

### 1.4 培养方法

将灭过菌的成熟种子置于愈伤诱导培养基中,在每个直径为9 cm的培养皿中接种约50颗种子,置于25℃下黑暗培养。50 d后统计不同培养基中种子的愈伤组织诱导率,把愈伤组织从外植体上分离出来,转移到相应的继代培养基上,在25℃黑暗条件下继续培养10 d后转移到分化培养基上,光下培养,30 d后统计愈伤组织分化出再生苗的频率。

### 1.5 数据处理

试验对种子发芽率、愈伤组织诱导率、愈伤组织分化率和植株再生率进行了统计。每种处理有8个以上重复,每个重复包括约50个外植体。所有的实验完全是随机的。

种子发芽率 = (发芽种子数 / 置种数) × 100 %

愈伤组织诱导率 = (转分化的愈伤组织总数 / 发芽种子总数) × 100 %

愈伤组织分化率 = (获得再生苗的愈伤组织数 / 愈伤组织总数) × 100 %

植株再生率 = (获得再生苗的愈伤组织数 / 发芽种子数) × 100 %

## 2 结果与分析

成熟种子在愈伤诱导培养基上培养1~2 d后,大部分种子开始发芽,从表1的统计结果来看各种培养基中种子的发芽率都很高,种子的发芽率在94.4%至96.9%之间,说明不同的愈伤诱导培养基对成熟种子发芽率的影响并不明显。种子在诱导培养基的高发芽率有利于对其进行进一步研究。

种子在诱导培养基上生长10 d以后大部分种子开始在种子的盾片处长出愈伤组织。从诱导培养基诱导出来的愈伤组织通常大小不一,形状也不规则,但总的来说可分为两类,非胚性愈

伤表现为湿润、排列松散,颜色为白色或黄褐色,而胚性愈伤表现为干燥、颗粒明显、易脆、排列紧凑、生长迅速,颜色为白色或黄色。实验结果表明,一些胚性愈伤组织在转移到分化培养基之前就已经长出芽,而非胚性愈伤组织只能形成水化结构,甚至变褐,极少长成再生植株。

愈伤组织从继代培养基中转移到分化培养基上,30 d 后统计愈伤组织的分化率,从得出的结果来看,虽然所有的分化培养基均一样,但是从不同诱导培养基上长出的愈伤组织在分化培养基中的分化率却并不一致,说明诱导培养基对愈伤组织的分化有明显的作用。

当芽长到 2 ~ 3 cm 高时被转移到无生长激素的生根培养基上诱导生根。大约 4 个星期后,生根的幼苗转移到塑料盘中继续培养,生长旺盛后转到大田里。图 1 展示了多年生黑麦草组织培养的全过程。

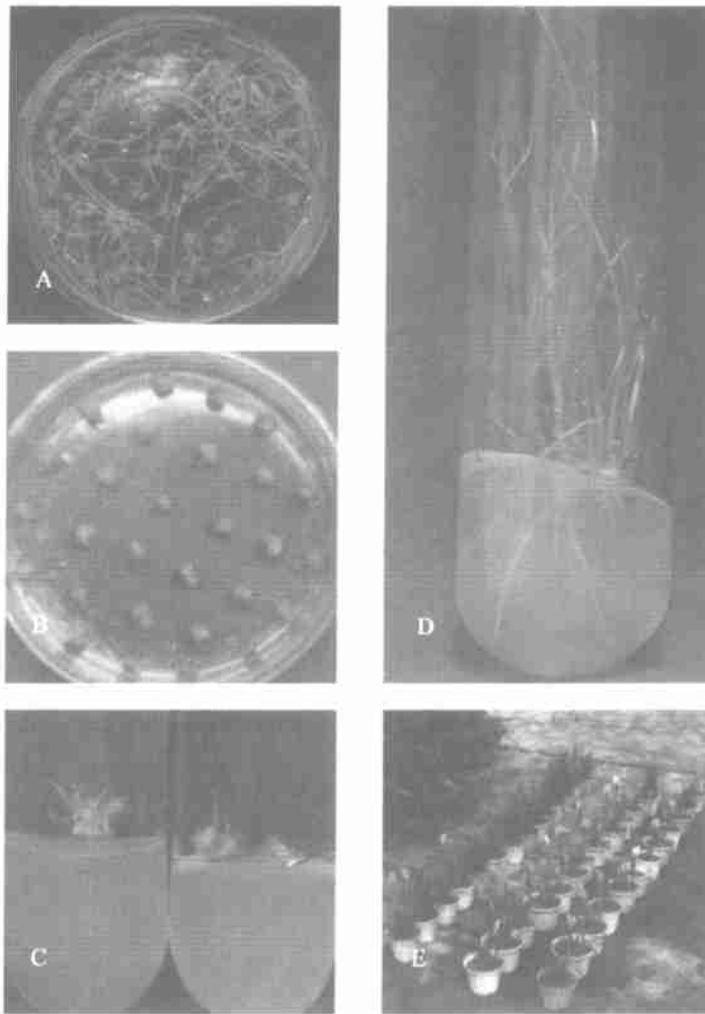


图 1 多年生黑麦草组织培养全过程

- A. 成熟种子在愈伤诱导培养基上生长 20 d; B. 愈伤组织在继代培养基上;  
C. 愈伤组织的分化; D. 幼苗壮根培养; E. 植株生长在塑料盘上

## 2.1 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导和再生的影响

以 2,4-D 作为唯一的生长激素来源,试验设计其质量浓度分别为 3、5、7、9 mg L<sup>-1</sup>以获得适合多年生黑麦草组织培养的最佳 2,4-D 浓度。实验结果显示,虽然在各种处理中发芽率变化不大(表 1),但低质量浓度的 2,4-D 处理芽的生长速度要快于更高浓度的 2,4-D 处理。种子接种到诱导培养基上 7 个星期后,从 2,4-D 质量浓度为 3 mg L<sup>-1</sup>的诱导培养基中长出来的愈伤在所有的 4 个处理中体积最小。

表 1 多年生黑麦草种子在各种诱导培养基中的发芽率

培养基	不同成分及含量		置种数/粒	发芽数/粒	发芽率/%
	生长激素	碳源			
1	3 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	485	463	95.5
2	5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	595	562	94.5
3	7 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	431	407	94.4
4	9 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	506	487	96.2
5	5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg L <sup>-1</sup> NAA	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	308	296	96.1
6	5 mg L <sup>-1</sup> dicamba	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	359	348	96.9
7	5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	30 g L <sup>-1</sup> 蔗糖	549	523	95.3
8	5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	30 g L <sup>-1</sup> 麦芽糖	486	466	95.9

注:表中培养基 8 添加了水解酪蛋白,脯氨酸和谷氨酰胺各 500 mg L<sup>-1</sup>;而其它培养基添加了 300 mg L<sup>-1</sup>水解酪蛋白,200 mg L<sup>-1</sup>脯氨酸和 200 mg L<sup>-1</sup>谷氨酰胺。dicamba 为麦草畏。培养基中共同成分见 1.3 节。

表 2 显示愈伤组织的诱导率从 7.34% (3 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D) 到 40.9% (9 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D) 不等,说明在一定的 2,4-D 浓度范围内,提高 2,4-D 浓度可显著提高愈伤组织的诱导率;但随着 2,4-D 浓度的升高,所获愈伤组织的质量却下降,从表 2 看到,当 2,4-D 质量浓度为 9 mg L<sup>-1</sup> 时愈伤组织的分化率为 44.8%,明显低于处理 1 的 61.3% 和处理 2 的 62.0%。然而,由于在 9 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的诱导培养基中愈伤组织的诱导率是 3 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的 5 倍,前者处理的植株再生率(18.3%) 仍明显高于后者的处理(4.5%),所以 9 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 在多年生黑麦草的组织培养中效果最好。

表 2 2,4-D 浓度对多年生黑麦草愈伤诱导和分化的影响

项目	2,4-D 质量浓度			
	3 mg L <sup>-1</sup>	5 mg L <sup>-1</sup>	7 mg L <sup>-1</sup>	9 mg L <sup>-1</sup>
发芽种子数/粒	463	562	407	487
转移到分化培养基的愈伤数/个	34	82	99	199
愈伤诱导率/%	7.34 ± 2.19	14.6 ± 3.55	24.3 ± 7.62	40.9 ± 6.80
分化培养基中愈伤数/个	31	79	76	192
获得再生苗的愈伤数/个	19	49	36	86
愈伤组织分化率/%	61.3	62.0	47.4	44.8
植株再生率/%	4.5	9.1	11.5	18.3

注:表中诱导培养基的基本组分包括 MS 无机盐<sup>[7]</sup>, B5 有机物<sup>[8]</sup>, 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP, 300 mg L<sup>-1</sup> CH, 200 mg L<sup>-1</sup> Pro, 200 mg L<sup>-1</sup> Gn 和 30 g L<sup>-1</sup> 麦芽糖。

## 2.2 不同的激素和激素组合对愈伤诱导和植株再生的影响

高浓度的 2,4-D 处理易引起组织培养细胞突变,因此试验进一步研究不同的激素和激素

组合对多年生黑麦草组织培养的影响。与只含有  $5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 的培养基相比,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 和  $1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 的组合更有利于愈伤的诱导(表 3), 后者的愈伤诱导率(20.3%)高于前者(14.6%), 而它们的愈伤组织分化率分别为 55.2% 和 62.0%, 虽然在提高愈伤组织诱导率的同时也使愈伤组织的分化率出现下降, 但总的来说, 植株再生率还是有所提高。

表 3 不同的激素和激素组合对多年生黑麦草愈伤诱导和分化的影响

项 目	激素处理		
	$5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	$5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA	$5 \text{ mg L}^{-1}$ dicamba
发芽种子数/粒	562	296	348
转移到分化培养基的愈伤数/个	82	60	205
愈伤诱导率/%	14.6 ± 3.55	20.3 ± 5.46	58.9 ± 6.03
分化培养基中愈伤数/个	79	58	75
获得再生苗的愈伤数/个	49	32	63
愈伤组织分化率/%	62.0	55.2	84.0
植株再生率/%	9.1	11.2	49.5

注:表中诱导培养基的基本组分包括 MS 无机盐<sup>[7]</sup>, B5 有机物<sup>[8]</sup>,  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP,  $300 \text{ mg L}^{-1}$  CH,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  Pro,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  Gn 和  $30 \text{ g L}^{-1}$  麦芽糖。

玄松南等<sup>[9]</sup>在草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 的组织培养中发现 dicamba 对愈伤诱导的效果要好于 2,4-D, NAA, picloram(毒莠定)。作者在研究多年生黑麦草的组织培养中也同样发现加入 dicamba 的愈伤诱导培养基效果要好于以 2,4-D 为激素的培养基。另外, 研究还发现经 dicamba 处理生长的芽在形态上明显不同于其它经 2,4-D 处理长出的, dicamba 处理生长的芽普遍较短, 且细, 而且这些芽发生卷曲的频率也更高。

在含 dicamba 的处理中, 不仅愈伤组织的诱导率很高, 达到 58.9% (表 3), 明显高于对照, 而且生长出来的愈伤组织质量也很好。同时实验结果表明, 在所有的处理中, dicamba 的处理获得的愈伤组织分化率最高, 高达 84%, 而总的植株再生率为 49.5%, 因此, dicamba 在多年生黑麦草的组织培养中是一种较好的生长激素。

### 2.3 不同 C 源对愈伤组织诱导和分化的影响

在谷类植物的组织培养中显示, 以麦芽糖为 C 源效果要好于蔗糖<sup>[10]</sup>, 然而 C 源对草坪草组织培养影响的研究却不多见。试验用相同质量浓度 ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) 的麦芽糖取代蔗糖比较不同 C 源对多年生黑麦草组织培养的影响。结果显示, C 源对愈伤组织诱导的影响是巨大的。用蔗糖作为 C 源的处理愈伤组织诱导率(37.1%)明显高于其它条件相同情况下的以麦芽糖为 C 源的处理(14.6%), 而两者的愈伤组织分化率变化不大(表 4), 因此, 蔗糖的使用提高了黑麦草组织培养的再生率。实验结果表明, 在多年生黑麦草的组织培养中, 以蔗糖为 C 源要好于以麦芽糖为碳源。

### 2.4 不同浓度的有机添加物对植株再生的影响

脯氨酸(Pro), 谷氨酰胺(Gn)和水解酪蛋白(CH)有利于胚性愈伤组织的发生和生长。试验设计了两种氨基酸添加物浓度(见表 5), 结果发现, 3 种有机添加物质量浓度的提高(Gn  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , CH  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , Pro  $500 \text{ mg L}^{-1}$ )对组织培养效果的影响并不显著(表 5)。

表 4 C 源对多年生黑麦草组织培养的影响

项 目	C 源	
	30 g L <sup>-1</sup>	30 g L <sup>-1</sup>
	麦芽糖	蔗糖
发芽种子数/ 粒	562	523
转移到分化培养基的愈伤数/ 个	82	194
愈伤诱导率/ %	14.6 ±3.55	37.1 ±4.47
分化培养基中愈伤数/ 个	79	115
获得再生苗的愈伤数/ 个	49	73
愈伤组织分化率/ %	62.0	63.5
植株再生率/ %	9.1	23.6

注:表中诱导培养基的基本组分包括 MS 无机盐<sup>[7]</sup>,B5 有机物<sup>[8]</sup>,0.2 mg L<sup>-1</sup>BAP,5 mg L<sup>-1</sup>2,4-D,300 mg L<sup>-1</sup>CH,200 mg L<sup>-1</sup>Pro 和 200 mg L<sup>-1</sup>Gn。

表 5 不同浓度的有机添加物对多年生黑麦草植株再生的影响

项 目	有机添加物/(mg L <sup>-1</sup> )					
	Pro		Gn		CH	
	200	200	300	500	500	500
发芽种子数/ 粒	562		466			
转移到分化培养基的愈伤数/ 个	82		56			
愈伤诱导率/ %	14.6 ±3.55		12.0 ±3.24			
分化培养基中愈伤数/ 个	79		27			
获得再生苗的愈伤数/ 个	49		20			
愈伤组织分化率/ %	62.0		74.1			
植株再生率/ %	9.1		8.9			

注:表中诱导培养基的基本组分包括 MS 无机盐<sup>[7]</sup>,B5 有机物<sup>[8]</sup>,0.2 mg L<sup>-1</sup>BAP,5 mg L<sup>-1</sup>2,4-D 和 30 g L<sup>-1</sup>麦芽糖。

### 3 结论与讨论

研究显示,不同的生长激素以及生长激素的不同浓度对愈伤组织的诱导和再生产产生不同的影响。试验显示,在愈伤诱导培养基中加入 dicamba 比加入 2,4-D 的效果要好,这一结果和 Giffin 等<sup>[11]</sup>及玄松南等<sup>[12]</sup>对草地早熟禾的研究报道相一致。Brosema 等<sup>[12]</sup>报道高浓度的 2,4-D 形成很少的胚性愈伤,甚至不形成愈伤。本项研究显示,当以 2,4-D 作为唯一生长激素时,随着 2,4-D 质量浓度的升高(从 3 mg L<sup>-1</sup>到 9 mg L<sup>-1</sup>),植株的再生率明显提高。然而,随着 2,4-D 浓度的升高,培养细胞和组织发生突变的几率也增大,因此,适合于多年生黑麦草组织培养的生长激素种类、浓度及最佳组合还需进一步研究。

Altpeter 等<sup>[6]</sup>在多年生黑麦草悬浮细胞培养的研究中发现,用麦芽糖替代蔗糖作为 C 源可显著提高悬浮细胞的再生率;而目前的研究却发现用蔗糖替代麦芽糖可显著提高多年生黑麦草愈伤组织培养中的植株再生率。用蔗糖作为 C 源可以获得更高的愈伤诱导率,而愈伤分化率在两者之间差别不大。以蔗糖为 C 源的效果要好于以麦芽糖为 C 源;而另一方面,蔗糖又更为经济,所以,在多年生黑麦草的组织培养中,蔗糖是一种较理想的 C 源。

在对一些重要的禾本科植物的研究中发现,脯氨酸和谷氨酰胺有利于组织培养中胚性愈伤组织的发生<sup>[13]</sup>,而水解酪蛋白则可以改善愈伤组织的质量和再生率<sup>[14]</sup>。本实验通过增加这些氨基酸添加物的浓度中发现,高质量浓度的氨基酸添加物(Gn 500 mg L<sup>-1</sup>,CH 500 mg L<sup>-1</sup>,Pro 500 mg L<sup>-1</sup>)与对照(Gn 300 mg L<sup>-1</sup>,CH 200 mg L<sup>-1</sup>,Pro 200 mg L<sup>-1</sup>)相比并没有改善植株的再生率。正确合理的使用这些氨基酸添加物还有待进一步研究。

总之,作者通过试验已经建立了一套通过胚性愈伤获得再生植株的高效组织培养系统。在所用的愈伤诱导培养基中,MS 无机盐,B5 有机物,5 mg L<sup>-1</sup>dicamba,0.2 mg L<sup>-1</sup>BAP,300 mg L<sup>-1</sup>CH,200 mg L<sup>-1</sup>Pro,200 mg L<sup>-1</sup>Gn,30 g L<sup>-1</sup>麦芽糖和 8 g L<sup>-1</sup>琼脂的组合效果最好。目前的研究为下一步通过农杆菌(*Agrobacterium* sp.)转化多年生黑麦草打下了坚实的基础。

## 参考文献:

- [1] Statistic E C. Standing Group on Seeds of the Advisory Committee on Agriculture Product, Health and Safety[M]. Belgium, 1999
- [2] Wang G R, Binding H, Bosselt U K. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam[J]. J Plant Physiol, 1997, 151:83 ~ 90
- [3] Dalton S J, Bettany A J E, Timms E, et al. Transgenic plants of *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures[J]. Plant Sci, 1998, 132:31 ~ 43
- [4] Creemers-Molenaar J, Loeffen J P M, Zaai M A C M. Isolation, culture and regeneration of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* protoplasts[J]. Curr Plant Sci Biotech Agric, 1988, 7:53 ~ 54
- [5] Wang Z Y, Nagel J, Btrykus I, et al. Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species[J]. Plant Sci, 1993, 94: 179 ~ 193
- [6] Altpeter F, Bosselt U K. Improved plant regeneration from cell suspensions of commercial cultivars, breeding and inbred lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. J Plant physiol, 2000, 156:790 ~ 796
- [7] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Planatarum, 1962, 15: 473 ~ 497
- [8] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K J. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Exp Cell Res, 1968, 50: 151 ~ 158
- [9] 玄松南, 陈惠哲, 傅亚萍, 等. 两种草坪草愈伤组织的诱导及其分化研究[J]. 浙江农业科学, 1997, 9(6):295 ~ 299
- [10] 孙宗修, 斯华敏, 程式华, 等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究[J]. 中国水稻科学, 1993, 7(4):227 ~ 231
- [11] Griffin J D, Dibble M S. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Plant Cell Rep, 1995, 14:721 ~ 724
- [12] Bronsema F B F, van Oostveen W J F, van Lammeren A A M. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2001, 65:45 ~ 56
- [13] Shetty K, Asano Y. The influence of organic nitrogen sources on the induction of embryogenic callus in *Agrostis alba* L. [J]. J Plant Physiol, 1991, 139:82 ~ 85
- [14] Artunduaga I R, Taliaferro C M, Johnson B B. Effects of auxin concentration on embryogenic callus induction from cultured young inflorescences of old world blue stems (*Bothriochloa* spp.) and bermudagrasses (*Cynodon* spp.) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1988, 12:13 ~ 19

## Factors Effecting on Tissue Culture of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

LIU Weizhen<sup>1,2</sup>, XUAN Songnan<sup>2</sup>, CHEN Hui-zhe<sup>2</sup>, ZHU Muzhuan<sup>1</sup>, SUN Zongxiu<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang, China;

2. China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, Zhejiang, China)

**Abstract:** Plantlets were regenerated from seed-derived callus of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). The replacements of 2,4-D by dicamba, maltose by sucrose in the callus induction medium significantly improved callus induction frequency and overall plant regeneration ability. From 3 mg L<sup>-1</sup> to 9 mg L<sup>-1</sup>, the stepwise increase of the 2,4-D concentration in maltose containing callus induction medium obviously increased callus induction frequency but decreased callus differentiation frequency. The callus induction medium supplemented with two auxins (2,4-D and NAA) was much better than that with 2,4-D individual. Elevating concentrations of casein hydrolysate, proline and glutamine did not improve overall plant regeneration frequency.

**Key words:** *Lolium perenne*; tissue culture; callus tissue; carbon source; auxin