

PEG 胁迫对不同培养方式下金发草愈伤组织再生能力的影响 Effect of Polyethylene Glycol on the Regeneration of the Callus of *Pogonatherum paniceum* Under Different Culture Conditions

王文国, 赵小光, 王胜华*, 陈 放

WANG Wen-Guo, ZHAO Xiao-Guang, WANG Sheng-Hua* and CHEN Fang

生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川大学生命科学学院, 成都 610064

Department of Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

摘 要 在静置液体培养和振荡液体培养方式下, 研究了聚乙二醇(PEG)胁迫对金发草(*Pogonatherum paniceum*(Lam.) Hack.)愈伤组织的再生能力和游离脯氨酸(F-Pro)积累的影响。发现金发草愈伤组织具有较高的耐PEG胁迫能力, 培养方式与PEG胁迫对其再生抑制上存在时间与程度两个方面的表现。振荡培养方式主要表现为延迟再生时间, 而PEG胁迫则主要表现为降低再生频率。两种培养方式都能使愈伤组织在PEG胁迫下发生F-Pro积累, F-Pro含量随PEG浓度的增加和培养时间的增长而升高。去胁迫后, 大部分愈伤组织都能够恢复再生能力, F-Pro可能在抑制和恢复过程中作用较复杂。因此, 在利用愈伤组织筛选抗旱植株时, PEG浓度应在 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上, 处理时间3周以上, 静置培养更有利于抗旱突变体的筛选。

关键词 金发草, 愈伤组织, 再生, 聚乙二醇, 脯氨酸, 培养方式

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0337-06

Abstract This paper studied the effect of polyethylene glycol(PEG) on regeneration and free proline accumulation of callus of *Pogonatherum paniceum*(Lam.) Hack. under motionless liquid culture condition and shake liquid culture condition. Callus of *P. paniceum* had the ability to resist the stress of PEG. The effects of PEG stress and culture conditions on the callus of *P. paniceum* appeared mainly in two aspects, delaying regeneration time and debasing regeneration rates. The shake liquid culture mainly delayed the regeneration time and PEG stress mainly debased the regeneration rates. Free proline accumulated in the two culture conditions, and the contents of proline were positively correlated with PEG concentrations and culture time. After stress removal, most of the callus could recover the ability of regeneration, and the free proline might pay an important part in the inhibition and recovery. So it must be chosen a more than $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG concentration and long than 3 weeks culture time in the selection of drought-resistant mutants of *P. paniceum*. The motionless liquid culture was more suitable for selection of drought-resistant mutants.

Key words *Pogonatherum paniceum*, callus, regeneration, PEG, proline, culture conditions

Received: September 26, 2006; Accepted: November 27, 2006.

This work was supported by the grants from the Key Project of Science and Technology Research of Ministry of Education of China(No. 104255) and the International Cooperation Research Project of Ministry of Science and Technology of China(No. 2003DFB00005).

* Corresponding author. Tel: +86-28-8541-7281; Fax: +86-28-85417281; E-mail: shwang200@yahoo.com.cn

教育部“973”预研资助项目(No. 104255)和科技部国际合作项目(No. 2003DFB00005)。

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

岩生植物金发草 *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack. 属禾本科 (Gramineae) 多年生草本植物, 广布于我国华南、华中、西南及印度半岛、中南半岛至大洋洲^[1]。其外形优美、耐干旱、耐贫瘠及能够适应复杂多样的环境的特性正被开发为园林绿化植物和许多逆境生态恢复的先锋物种^[2]。为了更好地开发利用金发草, 除了对其形态学、生态学、快速繁殖和遗传多样性等方面^[2-5]的研究外, 筛选更加耐旱耐贫瘠的金发草品种(系)也是极为重要的方面。

利用体外组织培养技术筛选体细胞无性系突变体是筛选耐旱植株的一种有效方法^[6]。在耐旱突变体筛选中, 多以聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 为诱导剂和筛选剂。高分子量的 PEG (≥ 6000) 不能穿过细胞壁, 通过结合细胞外的自由水使细胞处于低水势的环境中, 从而导致细胞内水分流出, 引起细胞塌陷^[7]。因此, PEG 是一种非离子、非穿透性的渗透和干旱调节剂。目前, 利用高浓度 PEG 已在烟草^[8]、苜蓿^[9]、向日葵^[10]等物种中筛选出耐旱的突变体。但是, 在高浓度的 PEG 条件下, 琼脂不固化形成固体培养基^[9], 人们在 PEG 胁迫愈伤组织时, 采用的培养方法主要是液体培养法, 包括振荡液体培养和静置液体培养^[11]。本文在不同浓度 PEG 条件下对比了两种培养方式对金发草愈伤组织分化能力的影响, 为金发草和其它植物利用体细胞无性系变异筛选抗旱突变体提供了一定的理论和方法依据。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的诱导与增殖培养

金发草种子采自四川省仁寿县朱家乡。将成熟的种子用 70% 的酒精浸泡 20s, 0.1% 的 HgCl_2 浸泡约 5min, 无菌水冲洗 5 次后接种到诱导培养基上。培养基成分为: MS + 2, 4-D $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BAP $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂粉 $8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 5.8。(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 暗培养。

诱导 2 个月后, 将愈伤组织转移到继代培养(成分与诱导培养基相同)上进行增殖继代, 每月继代 1 次。本实验所用愈伤组织均为继代 16 次后的愈伤组织。

1.2 两种分化培养方式

胁迫分化培养基为聚乙二醇 (PEG) 6000 + 基本分化培养基。其中 PEG 浓度为 100、200 和 $300\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以无 PEG 的基本分化培养基为对照。基本分化培养基为: MS + BAP $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.2

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 5.8。

静置液体培养: 在锥形瓶内平铺 20 张滤纸, 注入 30mL 液体培养基, 使液体没过愈伤组织的 $1/3 \sim 1/2$, 静置培养。分别在 3 天、1 周、2 周、3 周、6 周观察再生情况, 并取出一部分测定脯氨酸含量, 另一部分置于固体 MS 培养基上观察其去胁迫后再生能力的恢复情况。

振荡液体培养: 将愈伤组织放入 30mL 不同 PEG 浓度的液体胁迫分化培养基中, 60r/min 悬浮培养。分别隔 1 周、3 周、6 周取出, 一部分测其脯氨酸含量, 另一部分置于固体 MS 培养基上观察其分化情况。

每个锥形瓶 (100mL) 随机放入 20 ~ 30 块愈伤组织 ($2 \sim 2.5\text{g}$, FW), 每个浓度设 3 个重复。培养条件均为 (26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 光照 $12\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.3 游离脯氨酸的测定

采用酸性茚三酮显色法测定愈伤组织游离脯氨酸 (Free Proline, F-Pro) 含量。提取和纯化 F-Pro 采用 3% 磺基水杨酸浸提法^[12]。

1.4 数据处理

(预期) 再生率 (%) = 产生绿点的愈伤组织数 / 愈伤组织接种数 $\times 100\%$ 。

用 SPSS12.0 软件包进行 ANOVA 分析和相关性分析, 绘图。

2 结果与分析

2.1 不同培养方式下 PEG 胁迫对再生能力的影响

2.1.1 静置液体培养方式: 静置液体培养 2d 后对照和 $100\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织表面便开始出现绿点, $200\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织则晚 1 天出现绿点, 而 $300\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织培养 3d 后开始出现褐化, 萎缩。1 周后, 对照和 $100\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下已分化的愈伤组织全部变绿并出现小叶片; $200\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织在 9 ~ 12d 后也部分出现小叶片, 而 $300\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织则仅出现少量绿点。3 周后, 对照和 $100\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织长出约 1cm 长的小芽, $200\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下再生出的小芽仅 1 ~ 2mm, 而 $300\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织则表现严重褐化、萎缩, 无再生现象 (图 1)。6 周后, 对照和 $100\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织均已产生 0.5 ~ 1cm 左右的小苗, 而 $200\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织产生的小苗则严重萎缩变黄。

金发草愈伤组织的再生率随 PEG 浓度的增加

而呈下降趋势 ,3 周后 $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织已完全无再生现象(表 1)。在同一 PEG 浓度下 ,随着胁迫时间的增加 ,再生率呈先增加再减少趋势 ; $100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织在 2 周达最高值 ,而 200 和 $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理下的愈伤组织在第 1 周便达最高值(表 1)。

表 1 静置液体培养下金发草愈伤组织在不同 PEG 浓度胁迫下的再生率
Table 1 Regeneration rate of PEG-stressed callus of *Pogonatherum paniceum* under motionless condition

Concentration of PEG($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Regeneration rate				
	After 3 days	After 1 week	After 2 weeks	After 3 weeks	After 6 weeks
0	$26.73\pm0.69\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$
100	$20.42\pm2.65\text{ b}$	$91.69\pm1.19\text{ b}$	$94.82\pm0.74\text{ b}$	$77.03\pm4.36\text{ b}$	$50.42\pm3.83\text{ b}$
200	$9.78\pm1.50\text{ c}$	$43.59\pm0.63\text{ c}$	$39.02\pm3.73\text{ c}$	$20.39\pm6.64\text{ c}$	$10.18\pm0.74\text{ c}$
300	$0\pm0\text{ d}$	$4.08\pm0.43\text{ d}$	$1.87\pm4.92\text{ d}$	$0\pm0\text{ d}$	$0\pm0\text{ d}$

Notes : Different letters mean significant differences at $P=0.05$.

静置胁迫培养 3d、1、2、3、6 周的愈伤组织转移到无 PEG 的 MS 固体培养基培养。各 PEG 浓度胁迫 2 周的愈伤组织的再生率为 100% ,并且在 PEG 持续胁迫下无再生表现的愈伤组织均恢复较强的再生能力。 $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上高 PEG 浓度长时间(>3 周)胁迫的愈伤组织再生能力有所下降。 $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 浓度下处理 6 周的愈伤组织几乎失去了再生能力(表 2)。

表 2 静置液体培养方式下经过不同浓度的 PEG 胁迫后的金发草愈伤组织在固体 MS 培养基上的再生率
Table 2 Regeneration rate of motionless PEG-stressed callus of *Pogonatherum paniceum* on MS solid medium

Concentration of PEG($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Regeneration rate				
	After 3 days	After 1 week	After 2 weeks	After 3 weeks	After 6 weeks
0	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$
100	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$92.88\pm5.39\text{ b}$
200	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$83.27\pm6.10\text{ b}$	$30.85\pm3.49\text{ c}$
300	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$64.24\pm2.27\text{ b}$	$4.21\pm0.24\text{ d}$

Notes : Different letters mean significant differences at $P=0.05$.

2.1.2 振荡液体培养方式 :与静置培养比较 ,金发草愈伤组织在振荡培养下发育进度要慢一些。对照以及低浓度 PEG 处理 1 周后才出现绿点 ,而 $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理则出现褐化。3 周后 ,对照和 $100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理的愈伤组织表面开始出现小芽 ,而 $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理则出现褐化 , $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理褐化程度加重。转到基本分化培养基上后 ,胁迫 1 周和 3 周的愈伤组织均能分化 ,不同浓度 PEG 胁迫下的愈伤组织在再生率上无明显差异(表 3)。

表 3 振荡液体培养方式下经过不同浓度的 PEG 胁迫后的金发草愈伤组织在固体 MS 培养基上的再生率
Table 3 Regeneration rate of shake PEG-stressed callus of *Pogonatherum paniceum* on MS solid medium

Concentration of PEG($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Regeneration rate		
	After 1 week	After 3 weeks	After 6 weeks
0	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$72.97\pm4.96\text{ a}$
100	$100\pm0\text{ a}$	$100\pm0\text{ a}$	$78.12\pm2.03\text{ b}$
200	$100\pm0\text{ a}$	$98.73\pm3.10\text{ a}$	$82.74\pm2.93\text{ c}$
300	$100\pm0\text{ a}$	$98.83\pm3.31\text{ a}$	$84.09\pm2.83\text{ c}$

Notes : Different letters mean significant differences at $P=0.05$.

经过 6 周的胁迫后 ,在液体培养基中的对照和 $100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理的愈伤组织表面能够出现约 1~2mm 的小芽 ,而且愈伤组织表面产生的绿点(小芽)数目随着 PEG 浓度的增加而减少。 $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 处理的愈伤组织已严重褐化 ,表面极少看到绿点(0~2 个/块)。但是继续振荡培养(70d)对照表面产生的小芽已无继续生长趋势 ,并出现枯萎现象 ,不能完成完整的植株再生。

将胁迫 6 周的愈伤组织转移至固体 MS 培养基后 ,在高浓度 PEG(200 和 $300\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)处理的愈伤组织在第 4~5d 表面出现大量绿点 ,在 2 周内愈伤组织表面全部变绿 ,生长速度超过对照 ,再生频率也明显高于对照(表 3 图 1)。

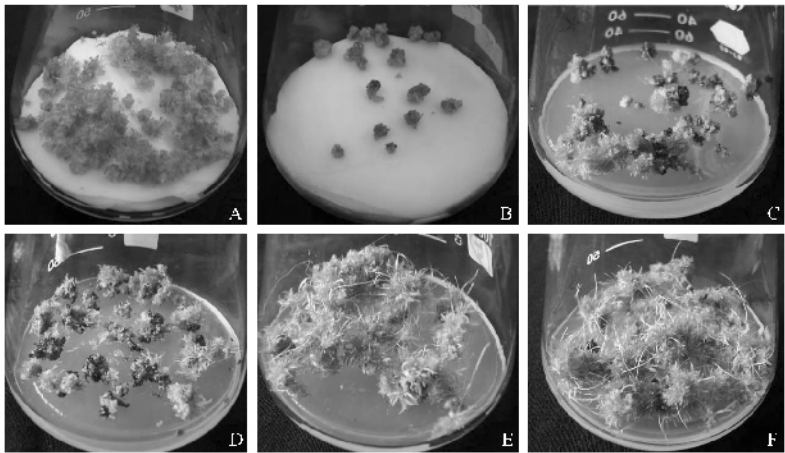


图1 两种培养方式下 PEG 胁迫对金发草愈伤组织分化能力的影响

Fig.1 Effect of PEG on the regeneration of the callus of *Pogonatherum paniceum* under two culture conditions

A、B 再生在滤纸上胁迫在静止液体培养条件下。A: CK; B: $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG。C~F 再生在 MS 固体培养基上胁迫在振荡液体培养条件下。C: CK; D: $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG; E: $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG; F: $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG。

2.2 F-Pro 的积累

2.2.1 静置液体培养下 F-Pro 的积累:静置液体培养方式下,在培养时间 2 周以内,F-Pro 含量随 PEG 处理浓度升高而升高。在 6 周内,随着培养时间延长, $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 浓度处理下的愈伤组织 F-Pro 呈持续增加趋势,如果升高 PEG 浓度,则 F-Pro 含量在培养后期下降,并且随浓度增加下降幅度增大,开始下降时间提前(图 2)。

2.2.2 振荡液体培养下 F-Pro 的积累:金发草愈伤组织振荡液体培养 1 周后,其 F-Pro 含量在各 PEG 浓度间无明显变化(图 3);随着培养的继续,在第 3 周和第 6 周,F-Pro 含量随着 PEG 浓度的增高而增加。6 周后, $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 胁迫下愈伤组织 F-Pro 含量可高达 $8.379\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

另一方面,不同 PEG 浓度胁迫下 F-Pro 含量随时间增长的幅度也不同,高浓度 PEG 胁迫下的愈伤组织 F-Pro 含量的涨幅明显大于受低浓度胁迫的愈伤组织(图 3)。

2.3 F-Pro 含量与再生频率的相关性分析

在静置培养方式下,PEG 持续胁迫的愈伤组织再生率与 F-Pro 含量均呈负相关性,由于随着时间的增加,持续的胁迫使愈伤组织 PEG 高浓度下极度褐变乃至死亡,F-Pro 的含量出现下降趋势,其与再生率的相关程度随着时间增加而降低。胁迫 2 周后去胁迫,所有愈伤组织均可恢复再生能力,再生率均为 100%,与 F-Pro 含量无相关性。胁迫 3 周和 6 周后去胁迫,部分高浓度 PEG 胁迫下的愈伤组织无法恢复再生能力,再生率和 F-Pro 含量表现出一定的负相关性,6 周后去胁迫的 F-Pro 含量与再生率相关程

度明显小于 3 周后(表 4)。

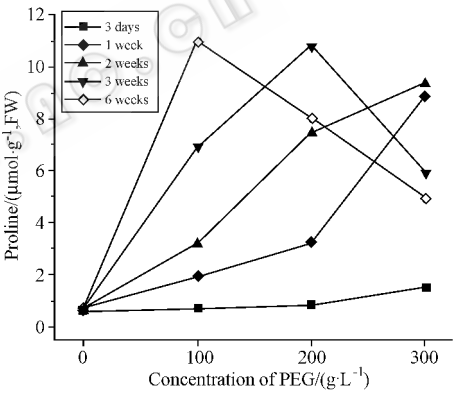


图2 静置液体培养条件下金发草愈伤组织在不同浓度 PEG 胁迫下游离脯氨酸的变化

Fig.2 Effect of PEG concentration on free proline accumulation in callus under motionless liquid culture

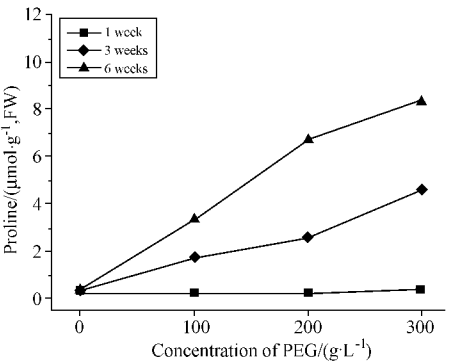


图3 振荡液体培养条件下金发草愈伤组织在不同浓度 PEG 胁迫下游离脯氨酸的变化

Fig.3 Effect of PEG concentration on free proline accumulation in callus under liquid culture

在振荡培养方式下 ,胁迫 1 周和 3 周后去胁迫 ,其再生频率在各 PEG 浓度间无显著差异 ,所以金发草愈伤组织 F-Pro 的积累与再生频率之间无相关性。在胁迫 6 周后去胁迫 ,高浓度 PEG 胁迫下的愈伤组织表现出高的再生率 ,F-Pro 含量和再生率之间表现出极显著的正相关性(表 4)。

表 4 不同培养方式下金发草愈伤组织内游离脯氨酸与再生率的相关性分析
Table 4 Correlation between free proline accumulation and regeneration rate of callus of *Pogonatherum panicum*

Motionless liquid culture			Shake liquid culture	
Culture time	Correlation coefficients		Culture time	Correlation coefficients
	Stressing	After stress removal		
3 days	- 0.957 *	-		
1 week	- 0.944 *	-	1 week	-
2 weeks	- 0.969 *	-		
3 weeks	- 0.644	- 0.342	3 weeks	-
6 weeks	- 0.474	- 0.074	6 weeks	0.994 * *

Notes :“ - ” means no correlation ;“ * * ” means correlation is significant at the 0.01 level ;“ * ” means correlation is significant at the 0.05 level.

3 讨论

大分子量 PEG 胁迫是实验室模拟干旱胁迫的常用手段。本实验对用 PEG 模拟的干旱胁迫对愈伤组织再生行为的影响进行了研究 ,结果表明 ,金发草愈伤组织有较强的耐旱能力 ,即使在较高胁迫环境下(300 g·L⁻¹ PEG)持续胁迫 1 个半月 ,仍有相当一部分愈伤组织保持再生能力 ,而 100g·L⁻¹ PEG 的低胁迫环境较短时间(2 周)对其愈伤组织再生几乎没有影响。

与静置培养比较 ,振荡培养增强了 PEG 胁迫对金发草再生速度的抑制效应 ,表现为金发草愈伤组织绿点和小叶的出现时间都较晚 ,然而 ,对再生能力的抑制上 ,振荡培养则弱于静置培养。因此 PEG 胁迫和培养方式对愈伤组织再生的抑制作用可以分为两个方向 :一个是再生时间的延迟效应 ,另一个是再生程度的抑制效应。振荡培养的抑制效应主要是延迟效应 ,这可能与金发草愈伤组织再生主要通过体细胞胚发生途径(另文发表)有关 ,处于振荡运动中的愈伤组织 ,不利于建立体细胞胚的极性。而 PEG 虽然也能够引起植物生长的延迟^[13] ,但在本实验中 ,PEG 更主要是使金发草愈伤组织在胁迫中的再生能力降低 ,主要为程度效应。

当植物缺水时 ,植株体内 F-Pro 的含量在一定程度上反映了植株体内的水分情况 ,而且在品种选育过程中 ,抗旱性强的品种往往积累较多的 F-Pro^[12-14]。本实验检测了两种培养方式下金发草愈伤组织受 PEG 胁迫而产生的 F-Pro 含量变化。两种培养方式下 F-Pro 都产生了积累 ,PEG 浓度对 F-Pro 含量作图显示出二者存在一定程度的正相关关系 ,F-Pro 在一定范围内具有随 PEG 浓度增高的趋势。这说明两种培养方式下 PEG 都能对金发草愈伤组

织构成干旱胁迫 ,可以应用于抗旱突变体的筛选。静置培养积累的 F-Pro 在量与速率上都要大于振荡培养。其可能的原因是振荡培养加速了小分子 F-Pro 扩散到细胞外 ,从而降低了愈伤组织内部 F-Pro 的积累。

大量研究表明 ,脯氨酸能够促进芒(*Miscanthus* sp.) 大麦、高粱等禾本科植物愈伤组织的分化^[15-17]。但是在本实验中 F-Pro 与金发草愈伤组织再生能力的关系在不同的培养条件下却表现不同。静置培养持续胁迫中愈伤组织积累的 F-Pro 与再生率呈负相关关系。由于本实验中所用的 PEG6000 不能进入细胞内^[7] ,而由其诱导细胞内产生的 F-Pro 则可能参与了这一抑制过程。另一方面 ,去胁迫后 ,两种培养方式下的大部分愈伤组织又可恢复再生能力 ,说明这种抑制是可逆的 ,可能是暂时抑制了某些过程 ,胁迫一旦解除 ,该过程又可恢复。静置培养下胁迫少于 2 周时 F-Pro 随浓度呈递增趋势 ,未达到本实验的最高值(约 11μmol·g⁻¹ ,FW) ,在恢复过程中 ,所有愈伤组织都可恢复再生能力 ,超过 3 周后 ,F-Pro 分别在不同的浓度达到最高值后由于部分愈伤组织受伤害严重而下降 ,虽然再生率与 F-Pro 仍呈一定的负相关性 ,但 6 周后的相关程度明显小于 3 周后。在振荡培养胁迫中 ,由于扩散 ,F-Pro 远未达到最高值 ,胁迫 1 周和 3 周后的愈伤组织几乎全部恢复再生能力 ,而且胁迫 6 周后的愈伤组织的再生率与 F-Pro 含量表现出极显著的正相关性 ,这又表明低浓度 F-Pro 能够促进金发草愈伤组织的再生。因此 ,F-Pro 与愈伤组织的再生的关系较为复杂 ,有待于进一步的研究。

总之 ,鉴于金发草具有较高的抗旱能力 ,在利用愈伤组织筛选抗旱突变体时 ,PEG 浓度应在 300 g·L⁻¹ 以上 ,处理时间 3 周以上 ,静置培养更有利于

抗旱突变体的筛选。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edit. Flora Reipublicae Popularis Sinicae(中国植物志). Beijing: Science Press, 1997, pp.102-104.
- [2] Ma DW(马丹炜), Wang SH(王胜华), Luo T(罗通), *et al.* Effects of environmental factors on the genetic diversity of *Pogonatherum paniceum*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsen*(中山大学学报(自然科学版)), 2006, **45**(2): 73-77.
- [3] Wang WG(王文国), Wang SH(王胜华), Zhuang GQ(庄国庆), *et al.* *In vitro* rapid propagation of rock plant *Pogonatherum paniceum*(Lam.) hack. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2006, **42**(3): 482.
- [4] Wang HY(王海洋), Peng L(彭丽), Li SC(李绍才), *et al.* Growth characteristics of rock plant *Pogonatherum paniceum*. *Chinese Journal of Applied Ecology*(应用生态学报), 2005, **16**(8): 1432-1436.
- [5] Chen H(陈红), Wang HY(王海洋). Differentiation of population structure of *Pogonatherum paniceum* on different substrates. *Journal of Southwest Agricultural University*(Natural Science)(西南农业大学学报(自然科学版)), 2004, **26**(4): 448-451.
- [6] Chawla HS. Introduction to Plant Biotechnology, 2nd eds. Science Publishers, Inc. 2002.
- [7] Zhang L(张立军), Fan JJ(樊金娟), Ruan YY(阮燕晔), *et al.* Application of polyethylene glycol in the study of plant osmotic stress physiology. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2004, **40**(3): 361-364.
- [8] Heyser JW, Nabors MW. Osmotic adjustment of tobacco cell and plants to and penetrating and non-penetrating solutes. *Plant Physiol Suppl*, 1979, **83**: 77.
- [9] Zhang ZS(张志胜), Zhao SX(赵世绪). Growth of alfalfa callus under osmotic stress and its plantlet regeneration. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 1995, **31**(1): 21-23.
- [10] Hassan NS, Shaaban LD, Hashem EA, *et al.* *In vitro* selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. Cv. Myak. *Int J Agr & Bio*, 2004, **6**(1): 13-18.
- [11] Zhao SX(赵世绪), Zhang ZS(张志胜), Lin TA(林延安). Establishment of motionless liquid culture system using polyester fibers. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*(北京农业大学学报), 1992, **18**(3): 243-245.
- [12] Zhang ZL(张志良), Qu WJ(瞿伟菁). The Experimental Guide for Plant Physiology. 3rd eds. Beijing: Higher Education Press, 2003 pp.258-259.
- [13] Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. *Biologia Plantarum*, 2004, **48**(1): 105-108.
- [14] Cheng JF(程建峰), Pan XY(潘晓云), Liu YB(刘宜柏), *et al.* Physiological index of rapid identification for drought resistance of rice germplasms and their genetic backgrounds. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*(西南农业学报), 2005, **18**(5): 529-533.
- [15] Holme IB, Krogstrup P, Hansen J. Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus x ogiformis* Honda Giganteus 'as affected by proline. *Plant Cell Tiss Oeg Cult*, 1997, **50**(3): 203-210.
- [16] He YC(何玉池), Chen JG(陈建国), Tao CC(陶采成), *et al.* Study of free amino acids in barley seeds and anther callus. *Amino Acids & Biotic Resources*(氨基酸和生物资源), 2004, **26**(4): 23-26.
- [17] Rao AM, Padma Sree K, Kavi Kishor BP. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. *Plant Cell Rep*, 1995, **15**(1-2): 72-75.