黑龙江农业科学 2021(6):119-124
Heilongjiang Agricultural Sciences
http://hljnykx.haasep.cn
DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2021.06.0119

邸桂俐,尤佳,高超,等.羊草幼穗组织培养与再生体系建立的研究[J].黑龙江农业科学,2021(6):119-124.

羊草幼穗组织培养与再生体系建立的研究

邸桂俐[1],尤 佳[1],高 超[1],田春霞[1],申忠宝[1],潘多锋[1],边亚娟[2],王建丽[1]
(1.黑龙江省农业科学院 草业研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;2.黑龙江生物科技职业学院,黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:为了优化羊草组织培养与再生体系,本试验以6个羊草[*Leymus chinensis*(Trin.)Tzvel.]新品系的幼穗为外植体,使用添加不同植物激素的MS培养基对羊草幼穗进行愈伤组织诱导、继代、分化等培养,建立高效再生体系。结果表明:诱导培养基中添加2,4-D激素浓度为5.0 mg·L^{-1}时,6个羊草新品系幼穗的诱导率均较高,其中*Lc*-6出愈率最高,为87.5%,其次是*Lc*-4,诱导率为81.5%;6个品系愈伤组织通过固-液-固(MS2-MSL2-MS2)交替继代培养,愈伤组织结构与状态得到明显改善,愈伤由疏松变得致密,褐化现象明显减少,愈伤变为乳白色颗粒状,*Lc*-6和*Lc*-4的愈伤状态优于其他品系;6个品系愈伤组织在BNKT分化培养基上的分化率显著高于其他2种培养基($P < 0.05$),*Lc*-6分化率最高,为41.25%;6个品系移栽后组培苗成活率均为100%。

关键词:羊草幼穗;组织培养;再生体系;条件优化

羊草分布于我国的东北三省、内蒙古、河北、山西和陕西等省区[1],是一种多年生禾本科牧草,具有抗寒耐旱、抗逆性强、品质优良,适口性好等特点,可以作为建植人工草地和保护生态环境的重要物种,因此得到了广泛的应用[2-3]。近年来,我国基因工程技术得到迅速发展,利用转基因技术对羊草进行品种培育和改良,弥补传统育种方法的缺点,已成为加快羊草育种进程的一种新途径[4]。在羊草组织培养以及利用农杆菌介导法转化研究中发现,羊草幼穗诱导愈伤组织较成熟胚和叶片容易,植株的再生能力强,羊草幼穗作为转化受体更适宜[5-6]。而制约羊草转化率的根本原因在于受体愈伤组织的状态,淡黄色、颗粒状、生长旺盛的胚性愈伤组织转化效率较高,但羊草的愈伤组织多为柔软、粘稠,甚至水渍状,愈伤褐化也是组织培养中经常遇到的问题[7-9],获得的愈伤组织需要长期保存,而继代次数过多其胚性容易丧失。因此,在转化前应先调整羊草愈伤组织的状态,以保证获得较高的转化率[10-12]。关于植物愈伤组织状态的调控,已有学者从培养基成分及培养方法等方面进行了研究,但主要集中在水稻、小麦、禾本科牧草和草坪草等作物上[13-15]。本研究以不同基因型羊草幼穗为外植体诱导愈伤组织,并尝试通过不同的方法改善愈伤组织生长状态,提高分化率,本研究目的是优化羊草再生体系,为羊草高效转化以及分子育种研究奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试羊草[*Leymus chinensis*(Trin.)Tzvel.]幼穗为黑龙江省农业科学院草业研究所通过辐射诱变和空间诱变处理后,经多年选育出的6个新品系的幼穗,分别为*Lc*-1、*Lc*-2、*Lc*-2、*Lc*-4、*Lc*-5和*Lc*-6。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 2020年5月中下旬,6个羊草新品系孕穗期,田间选取叶鞘包裹的幼穗,长约10 cm左右,用75%乙醇浸泡的纱布擦拭叶鞘后,放入无菌操作台内直径为150 mm的无菌培养皿中,用75%乙醇浸泡8 min后,用无菌镊子转移到直径为150 mm的无菌培养皿中晾干。

1.2.2 愈伤组织的诱导 选用MS基本培养基,加入激素2,4-D,浓度梯度分别为1.0,3.0,4.0,5.0,7.0和9.0 mg·L^{-1},同时每个培养基中加入0.15 mg·L^{-1} 6-BA,30 g·L^{-1}蔗糖,7.9 g·L^{-1}琼脂。培养基pH为5.8~6.0,120 ℃高压灭菌20 min后使用。将6个新品系灭菌的幼穗分别接种到诱导培养基上,每个培养皿接种20个小穗,每个处

收稿日期:2021-03-24
基金项目:中央财政林业科技推广示范项目(2019HZT11号);黑龙江省省院合作项目(YS20B08);黑龙江省农业科学院基金项目(2020FJZX038,2020FJZX048)。
第一作者:邸桂俐(1973-),女,硕士,高级农艺师,从事牧草栽培和草地改良研究。E-mail:diguili59@163.com。
通信作者:王建丽(1977-),女,博士,副研究员,从事牧草分子设计与遗传育种研究。E-mail:wangjianlivip@126.com。

理接种10皿，置于(25±1)℃培养间内进行暗培养，接种40 d后，统计愈伤组织诱导率。

诱导率(%)=(出愈外植体数/接种数)×100

1.2.3　愈伤组织继代条件优化　将羊草幼穗诱导40 d的愈伤组织转接到继代培养基上，第一次继代培养基为MS2：MS+2,4-D(2 mg·L^{-1})+6-BA(0.15 mg·L^{-1})+蔗糖(30 g·L^{-1})+琼脂(7.9 g·L^{-1})，第二次继代培养基为MSL2、液体培养基：MS+2,4-D(2 mg·L^{-1})+6-BA(0.15 mg·L^{-1})+蔗糖(30 g·L^{-1})，暗室摇床28 ℃培养，第三次继代培养基为仍为MS2培养，第一次和第三次培养条件(同1.2.2)，每15 d继代1次。对照培养基为MS2继代培养基。观察比较优化继代条件下各品系和对照愈伤组织状态，包括愈伤组织颜色、颗粒状、软硬度等。

1.2.4　愈伤组织分化条件优化　将经固-液-固培养继代3次的生长良好的羊草愈伤组织，分别转移到以下3种分化培养基上，培养条件中光照强度为2 000 lx，光周期为光照/黑暗(16 h/8 h)，每个培养皿放置相同块数羊草愈伤组织，设置3次重复。接种30 d后统计分化率。分化培养基如下：

(1)KT：MS(4.43 g·L^{-1})+KT(1 mg·L^{-1})+TDZ(1 mg·L^{-1})+蔗糖(30 g·L^{-1})+琼脂(7.9 g·L^{-1})；

(2)BT：MS(4.43 g·L^{-1})+6-BA(1 mg·L^{-1})+TDZ(1 mg·L^{-1})+蔗糖(30 g·L^{-1})+琼脂(7.9 g·L^{-1})；

(3)BNKT：MS(4.43 g·L^{-1})+6-BA(1 mg·L^{-1})+NAA(0.15 mg·L^{-1})+KT(1 mg·L^{-1})+TDZ(1 mg·L^{-1})+蔗糖(30 g·L^{-1})+琼脂(7.9 g·L^{-1})；

分化率(%)=(分化植株数/接种的愈伤数)×100

1.2.5　生根及移栽　将分化出有2～3个叶片的羊草组培苗，转入到配制好生根培养基的培养瓶中进行生根培养。生根后移栽到蛭石和草炭土按1∶1比例混合的土壤中，放在温室中培养，成活后搬移到室外进行炼苗3 d，移栽到试验地里实行田间管理。

生根培养基为1/2MS+蔗糖(15 g·L^{-1})+琼脂(7.9 g·L^{-1})。

1.2.6　数据分析　采用Excel 2017进行数据处理和图表制作，SPSS 22.0进行方差分析。

2　结果与分析

2.1　2,4-D对羊草幼穗愈伤诱导的影响

由表1可知，在不同浓度2,4-D诱导处理下，不同品系羊草幼穗愈伤组织的诱导率差异较大。随着添加激素2,4-D浓度的增加诱导率呈先增后降的趋势，6个品系中*Lc*-6和*Lc*-4的出愈率均显著高于其他4个品系($P<0.05$)。当2,4-D浓度在5.0 mg·L^{-1}时，6个羊草品系幼穗出愈率均最高，羊草新品系*Lc*-6愈伤组织的诱导率最高为87.5%，其次是*Lc*-4，诱导率为81.5%，而*Lc*-1的诱导率最低仅有28.5%。综合分析表明，羊草幼穗诱导愈伤最适合的培养基为MS5：MS+2,4-D(5 mg·L^{-1})+6-BA(0.15 mg·L^{-1})+蔗糖(30 g·L^{-1})+琼脂(7.9 g·L^{-1})，6个羊草新品系中，*Lc*-6和*Lc*-4两个品系的幼穗为较适合诱导的外植体。

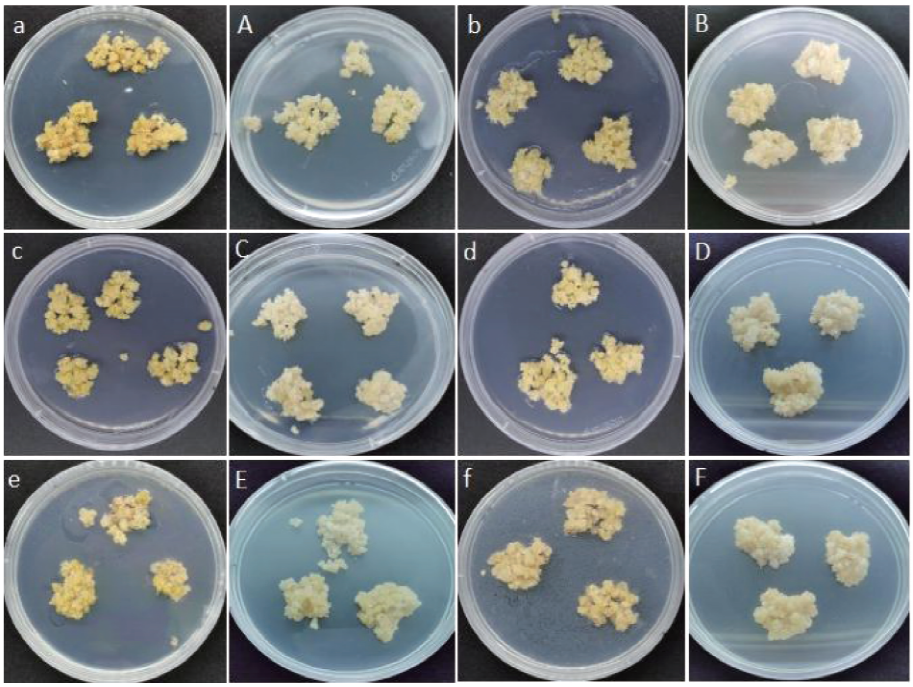
表1　不同浓度2,4-D对羊草幼穗愈伤组织诱导的影响

2,4-D浓度/(mg·L^{-1})	品系	小穗数/个	出愈数/个	出愈率/%
1.0	*Lc*-1	200	15	7.5±0.51 b
	Lc-2	200	7	3.5±0.32 c
	Lc-3	200	9	4.5±0.24 c
	Lc-4	200	22	11.0±1.03 a
	Lc-5	200	12	6.0±0.47 b
	Lc-6	200	24	12.0±1.12 a
3.0	*Lc*-1	200	19	9.5±0.73 b
	Lc-2	200	16	8.0±0.68 b
	Lc-3	200	8	4.0±0.50 c
	Lc-4	200	31	15.5±1.16 a
	Lc-5	200	17	8.5±0.49 b
	Lc-6	200	35	17.5±1.08 a
5.0	*Lc*-1	200	57	28.5±3.07d
	Lc-2	200	121	60.5±2.64 b
	Lc-3	200	86	43.0±3.39 c
	Lc-4	200	163	81.5±5.30 a
	Lc-5	200	107	53.5±4.73 bc
	Lc-6	200	175	87.5±6.15 a
7.0	*Lc*-1	200	18	9.0±1.07bc
	Lc-2	200	15	7.5±1.64 c
	Lc-3	200	23	11.5±1.39 b
	Lc-4	200	33	16.5±2.30 a
	Lc-5	200	14	7.0±1.07c
	Lc-6	200	36	18.0±1.64 a
9.0	*Lc*-1	200	0	0
	Lc-2	200	4	2.0±0.31 b
	Lc-3	200	0	0
	Lc-4	200	12	6.0±1.15 a
	Lc-5	200	7	3.5±0.73 b
	Lc-6	200	17	8.5±0.82 a

注：数值为平均值±标准差(n=3)，不同小写字母表示相同浓度不同品系间差异显著($P<0.05$)。下同。

2.2　固-液-固交替继代培养对羊草幼穗愈伤组织状态的影响

愈伤组织状态是影响农杆菌转化率的主要原因，疏松状态的愈伤进行转化后呈碎屑状，抗性愈伤率极低，不适于直接作为转化的受体。选取 MS5 诱导出的愈伤组织经 MS2（CK）和 MS2-MSL2-MS2 交替继代，由图 1 可知，MS2-MSL2-MS2 交替继代的愈伤组织颜色为乳白色，愈伤生长较为致密，褐化现象明显减少；各品系的愈伤组织状态均比 MS2（CK）明显变好，羊草品系 *Lc*-4 和 *Lc*-6 的愈伤优于其他品系。



a～f：依次代表 *Lc*-1、*Lc*-2、*Lc*-3、*Lc*-4、*Lc*-5、*Lc*-6 MS2 处理（CK）；A～F：依次代表 *Lc*-1、*Lc*-2、*Lc*-3、*Lc*-4、*Lc*-5、*Lc*-6 MS2-MSL2-MS2 交替处理

图 1　羊草品系经 MS2（CK）和固-液-固（MS2-MSL2-MS2）继代后愈伤组织状态

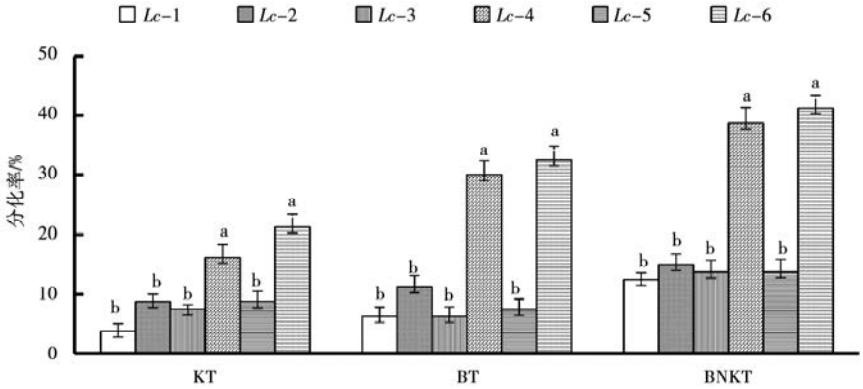
2.3　不同激素对羊草愈伤组织分化的影响

羊草愈伤组织在 KT、BT、BNKT 三种分化培养基上培养 30 d 后统计愈伤组织分化率，由表 2可知，6 个品系在不同激素的培养基处理下分化率整体表现为 BNKT＞BT＞KT，且除 *Lc*-2 和 *Lc*-5 外，其他 4 个品系在 BNKT 培养基下的分化率均显著高于 KT 和 BT（$P<0.05$）。

由图 2 可知，6 个羊草品系的愈伤组织在不同分化培养基上分化率具有一定的差异，其中 *Lc*-6 和 *Lc*-4 在 3 种培养基上的分化率均显著高于其他 4 个品系（$P<0.05$），*Lc*-6 和 *Lc*-4 分化率最高值均出现在 BNKT 分化培养基上，分别为 41.25%和 38.75%，*Lc*-1、*Lc*-2、*Lc*-3 和 *Lc*-5 这 4 个品系的分化率在 3 种分化培养基上的分化率均不高，4 个品系之间均无明显差异（$P>0.05$）。

表 2　不同激素对羊草幼穗愈伤组织分化的影响

品系	分化培养基	接种愈伤数/个	分化愈伤数/个	分化率/%
Lc-1	KT	80	3	3.75±1.32 b
	BT	80	5	6.25±1.57 b
	BNKT	80	10	12.50±1.09 a
Lc-2	KT	80	7	8.75±1.28 b
	BT	80	9	11.25±1.84 ab
	BNKT	80	12	15.00±1.76 a
Lc-3	KT	80	6	7.50±0.73 b
	BT	80	5	6.25±1.61 b
	BNKT	80	11	13.75±2.04 a
Lc-4	KT	80	13	16.25±2.14 c
	BT	80	24	30.00±2.35 b
	BNKT	80	31	38.75±2.62 a
Lc-5	KT	80	7	8.75±1.76 ab
	BT	80	6	7.50±1.69 b
	BNKT	80	11	13.75±2.17 a
Lc-6	KT	80	17	21.25±2.16 c
	BT	80	26	32.50±2.34 b
	BNKT	80	33	41.25±2.09 a



注：不同小写字母表示同一培养基上不同羊草品系间分化率差异显著（$P < 0.05$）。

图 2　6 个羊草品系在 3 种分化培养基上的分化率

2.4　生根及移栽

羊草愈伤组织经过 30 d 分化培养，开始分化变绿后逐渐形成不定芽。当分化出的芽长出 2～3 个叶片时，取分化苗转到生根培养基上培养 30 d，由图 3 可知，当根长约 5 cm 时，移栽到大花盆，6 个品系的再生植株均生长健壮，叶色浓绿。

由表 3 可知，6 个品系的生根率均较高，除 *Lc*-1（94.50%）和 *Lc*-5（95.90%）两个品系外，其他 4 个品系生根率均为 100%，移栽 30 d 后调查组培苗成活率均达到 100%。

a～f：分别为 *Lc*-1、*Lc*-2、*Lc*-3、*Lc*-4、*Lc*-5、*Lc*-6 生根培养；A～F：分别为 *Lc*-1、*Lc*-2、*Lc*-3、*Lc*-4、*Lc*-5、*Lc*-6 组培苗

图 3　6 个羊草品系生根培养和组培苗

表 3　分化苗的生根率和成活率统计

品系	生根培养基	分化苗/株	生根苗/株	生根率/%	移栽苗/株	成活苗/株	成活率/%
Lc-1	1/2MS	18	17	94.50	17	17	100
Lc-2	1/2MS	28	28	100.00	28	28	100
Lc-3	1/2MS	22	22	100.00	22	22	100
Lc-4	1/2MS	68	68	100.00	68	68	100
Lc-5	1/2MS	24	23	95.90	23	23	100
Lc-6	1/2MS	76	76	100.00	76	76	100

3　讨论

在羊草的组织培养研究中，外植体的选择对诱导后植株再生能力的强弱有直接影响[16]。前人选择羊草幼胚、成熟胚和幼穗作为外植体均能诱导出愈伤，但诱导后愈伤再生能力有一定的差别。刘江淑[17]用羊草幼胚作为外植体进行再生体系建立，结果表明授粉 15～16 d 的幼胚能够诱导出愈伤。刘公社等[18]用 6 种赖草属的植物幼胚作为外植体进行愈伤诱导，发现均能诱导再生出完整小植株。肖燕等[8]研究发现羊草成熟胚诱导愈伤是先发芽后出愈伤。本研究选择了 6 个羊草新品系孕穗期幼穗作为外植体，诱导出愈伤时间缩短，而且不同品系幼穗的诱导率差异较大。对于难再生的羊草而言，在继代培养的过程中，添加适量 2，4-D 激素会对后期分化再生有一定的促进作用，但仅靠 2，4-D 来调节细胞的生长状态，促进胚性愈伤发生、增加分化率是远远不够的，因此添加其他激素将会改善细胞内源生长素和分裂素的比例，提高诱导率和分化率[19]。细胞分裂素 6-BA可以与生长素 2，4-D 有协同诱导的作用，在诱导培养过程中，添加少量的 6-BA 将增加胚性愈伤的产量[4]，本试验在诱导过程中选用固-液-固（MS2-MSL2-MS2）交替继代培养可改善单一继代培养基（MS2）产生愈伤褐化状态，愈伤组织颜色为乳白色，愈伤生长较为致密，更利于分化。

分化培养基筛选是羊草离体再生体系搭建过程中的重要环节，转化后愈伤能否分化成苗至关重要[4]。本研究中将羊草幼穗愈伤组织接种到添加 KT、6-BA、NAA、TDZ 等生长素和分裂素的 MS 培养基中，40 d 后 6 个羊草新品系的愈伤在 3 种培养基中均能分化出绿色的芽点，但只有一部分芽点分化出小芽。添加低浓度（1.0 mg·L^{-1}）的 6-BA和 KT 对羊草的分化有明显促进作用，噻苯隆（TDZ）和萘乙酸（NAA）的添加将增加羊草愈伤的分化率，综合比较后，羊草愈伤分化培养基以 MS＋1.0 mg·L^{-1} 6-BA＋1.0 mg·L^{-1} KT＋0.15 mg·L^{-1} NAA＋1.0 mg·L^{-1} TDZ 为最佳，此研究结果与王建丽[4]前期研究结果一致。不同羊草品系的分化率差异较明显，因此筛选优异羊草新品系尤为重要。本研究通过优化羊草幼穗组织培养和再生体系建立的条件，为羊草分子育种改良品种提供了科研技术支持。

4　结论

本试验选用 6 个羊草新品系幼穗作为外植体进行愈伤诱导，诱导培养基中添加 2，4-D 激素浓度为5.0 mg·L^{-1}时，诱导率均较高，6 个品系中 *Lc*-6 出愈率最高，为 87.5%，其次为 *Lc*-4（81.5%）；通过固 MS2-液 MSL2-固 MS2 交替继代培养，愈伤组织颜色均为乳白色，愈伤生长较为致密，褐化现象明显减少，羊草品系 *Lc*-6 和 *Lc*-4 的愈伤优于其他品系；6 个品系愈伤组织均在 BNKT 分化培养基上的分化率最高，*Lc*-6 分化率最高，为 41.25%；羊草幼穗离体组织培养过程中 6 个品系的生根率均极高，移栽后组培苗成活率均为 100%。

参考文献：

[1]　那佳，黄立华，张璐，等. 我国东北草地生产力现状及可持续发展对策[J]. 中国草地学报，2019，41(6)：152-164.

[2]　武胜男，张曦，高晓霞，等. 三江源区“黑土滩”型退化草地人工恢复植物群落的演替动态[J]. 生态学报，2019，39(7)：2444-2453.

[3]　舒庆艳. 羊草细胞差异表达基因分析与遗传转化方法研究[D]. 北京：中国科学院研究生院（植物研究所），2005.

[4]　王建丽. 羊草细胞壁关键组分与糖化效率相关性分析及 *LcCOMT* 基因转化羊草的初步研究[D]. 哈尔滨：哈尔滨师范大学，2019.

[5]　张莹，李晓峰，刘公社，等. 羊草愈伤组织状态的调控[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版），2007(5)：111-114.

[6]　曲同宝，王丕武，关淑艳，等. 羊草组织培养及再生系统的建立[J]. 草业学报，2004(5)：91-94.

[7]　刘公社，汪恩华，刘杰，等. 羊草幼穗离体培养诱导植株再生的研究（英文）[J]. 草地学报，2002(3)：198-202.

[8]　肖燕，王振兴，李东明，等. 羊草成熟胚诱导愈伤组织及植株

再生系统的优化[J]. 植物学报,2020,55(2): 192-198.
[9] 邹吉祥,金华,姜国斌,等. Thidiazuron 对解除羊草种子休眠和植株再生的影响[J]. 草业科学,2015,32(10): 1612-1618.
[10] 于娜,董宽虎. 不同激素处理对白羊草愈伤组织分化的影响[J]. 北方园艺,2014(8): 83-86.
[11] 陈延,马甜,蒙静,肖庆红,等. 羊草抗旱适应性研究[M]. 银川:宁夏人民教育出版社,2015.
[12] 代小梅,孙振元,韩蕾. 草地早熟禾愈伤组织诱导及柠檬酸对其褐化的抑制效应[J]. 核农学报,2015,29(2): 270-277.
[13] 李素娟,樊秀霞,王华,等. 水稻不同品种组培再生和转基因频率研究[J]. 核农学报,2013,27(12): 1817-1827.
[14] 吴晓军,胡喜贵,陈向东,等. 小麦成熟胚再生体系优化效果评价及高再生率基因型筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):74-77.
[15] 周妍彤,郭强,毛培春,等. 长穗偃麦草成熟种胚高频再生体系[J]. 草业科学,2019,36(5): 1317-1322.
[16] 魏健. 羊草体细胞耐盐碱研究[D]. 长春:吉林农业大学,2005.
[17] 刘江淑. 羊草高效再生体系的建立及转化的研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2003.
[18] 刘公社,齐冬梅. 赖草属几种植物幼胚离体培养研究[J]. 草业学报,2004,13(1): 70-73.
[19] 张莹. 羊草种质资源中维生素 E 的评价及农杆菌介导的羊草遗传转化研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006.

Establishment of Tissue Culture and Regeneration System of Young Spikes of *Leymus chinensis*

DI Gui-li[1], YOU Jia[1], GAO Chao[1], TIAN Chun-xia[1], SHEN Zhong-bao[1], PAN Duo-feng[1], BIAN Ya-juan[2], WANG Jian-li[1]

(1. Pratacultural Science Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Heilongjiang Vocational College of Biology Science and Technology, Harbin 150025, China)

Abstract: In order to optimize tissue culture and regeneration system of *Leymus chinensis*, six young panicles of *Leymus chinensis* were used as explants, and MS medium supplemented with different plant hormones was used to induce subculture differentiation of young panicles of *Leymus chinensis*, so as to establish an efficient regeneration system. The results showed that when the concentration of 2,4-D hormone was 5.0 mg·L^{-1} in the induction medium, the induction rate of young panicles of the six new lines of *Leymus chinensis* were all high. The callus rate of *Lc*-6 was the highest (87.5%), followed by *Lc*-4 (81.5%). The callus structure and state of the six strains were significantly improved by solid-liquid-solid (MS2-MSL2-MS2) subculture, the callus changed from loose to compact, the browning was significantly reduced, and the callus turned to milky white granules. The callus state of *Lc*-6 and *Lc*-4 was better than that of the other strains. The callus differentiation rate of the six strains on BNKT medium was significantly higher than that of the other two media ($P<0.05$), the differentiation rate of *Lc*-6 was the highest (41.25); After transplantation, the survival rate of tissue culture seedlings of six strains was 100%.

Keywords: young spike of *Leymus chinensis*; tissue culture; regeneration system; conditional optimization

(上接第 118 页)

than that of Baiyan No. 6, there were significant differences in biomass among the three cultivars. In the analysis of 8 root traits of 3 cultivars, except the difference of root-shoot ratio and root volume at booting stage was not significant, there were significant differences in other root traits among cultivars($P<0.05$), the total root length, root surface area and specific root length of Baiyan No. 6 were significantly higher than those of Beller and Longpimai No. 3($P<0.05$), the root dry weight and canopy dry weight of Longpimai No. 3 were significantly higher than those of the other two cultivars, and only the root diameter of Beller was significantly higher than those of the other two cultivars, and there were significant differences in 8 root traits among the 3 cultivars at maturity($P<0.05$). The soil pH of Baiyan No. 6, Beller and Longpimai No. 3 all decreased after planting, and the soil pH of Baiyan No. 6 at maturity was 8.61, which was 9.4% lower than that before improvement. The results showed that the growth of Longpimai No. 3 and Beller was better than that of Baiyan No. 6.

Keywords: biogas residue; forage; agronomic characters; root index