

白三叶种子愈伤组织诱导及再生体系的建立

金忠民, 沙伟, 张艳馥, 孙微, 刘文靖

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以白三叶成熟种子为外植体材料, 探讨不同激素组合对愈伤组织诱导、植株分化以及植株生根的影响。结果表明:白三叶在 MS+2,4-D 2.0 mg/L 的培养基中愈伤组织诱导生长最好, 在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 培养基上植株分化率最高达 61.25%, 在 1/2MS+IBA 0.3 mg/L+NAA 0.3 mg/L 培养基上生根率达 100%。

关键词:白三叶;愈伤组织;再生体系

中图分类号:S 541⁺.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)12-0142-03

白三叶 (*Trifolium repens* Linn) 属于豆科 (Leguminosae) 三叶草属 (*Trifolium*), 也称车轴草属, 又称白车轴草。白三叶草是多年生草本植物, 全球约 250 余种, 原产小亚细亚南部和欧洲东南部。广泛分布于温带及亚热带高海拔地区, 为栽培历史较悠久的牧草之一。该属在农业上有经济价值的有 25 种, 其中最重要的约 10 种。

三叶草主要用作反刍动物的饲草饲料, 是一种世界性分布与栽培的优良豆科牧草。由于白三叶匍匐生长、扩展能力强、再生速度快等习性, 使其成为温带地区观赏性草坪和绿地建植的主要草种。在国内外城镇绿化、水土保持等方面起着不可替代的重要作用。但是白三叶生态幅较窄, 性喜温暖湿润的气候, 不耐干旱、盐碱和长期积水, 耐酸性也较差, 严重影响草坪的成坪及观赏性^[1]。干旱胁迫成为影响草坪草生长最主要的环境胁迫因子之一, 限制了其在我国北方和南方一些地区的使用^[2-4]。因此培育适应性广的优质白三叶新品种尤为重要和迫切^[5-6]。通过基因工程技术改良白三叶, 培育优质、高产白三叶新品种, 具有极强的理论和实际意义^[7]。近年来随着植物基因工程研究的进展, 越来越多的转基因成功的案例报道也不断出现^[2,8-10]。该试验以白三叶种子为外植体对其愈伤组织诱导及植株再生进行了探讨, 目的是建立白三叶高频再生体系, 为以后的转基因

研究打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择抗旱性强的白三叶品种海发 (Haifa), 选用其饱满的种子为外植体。草种由北京种子公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 各阶段培养基成分及含量 基本培养基: MS 培养基; 诱导及继代培养基: MS 培养基+2,4-D (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L); 分化培养基: MS 培养基+6-BA (1.0、2.0、3.0 mg/L)+NAA (0.1、0.2、0.3 mg/L); 生根培养基: 1/2MS 培养基+IBA (0.1、0.2、0.3 mg/L)+NAA (0.1、0.2、0.3 mg/L)。各添加 3% 的蔗糖, 7 g/L 琼脂, pH 5.8。

1.2.2 培养方法 将成熟种子用 0.1% 的升汞消毒 15 min, 然后用无菌水冲洗 3~4 次, 晾干后接种在不同激素配比的诱导培养基上进行诱导。待愈伤组织长到直径为 2~3 mm 时, 继代培养, 将结构致密、颗粒状、浅黄的胚性愈伤组织转至分化培养基上进行培养, 待长出 3~4 cm 的芽时将其转移到生根培养基上培养, 30 d 左右长出 3 cm 左右的幼根, 经 2~3 d 的室内炼苗后进行移栽。每天光照 14 h, 光强约为 2 000 lx。全部培养过程的温度都控制在 (25±1) °C 左右^[17,22]。各处理均重复 3 次, 采用最小显著差数法 (LSD 法) 统计处理数据。

1.2.3 愈伤组织诱导、分化与生根率的计算公式 出芽率=出芽的白三叶种子数/接种的白三叶种子数×100%; 出愈率=(愈伤组织块数/接种的白三叶种子数)×100%; 分化率=(分化植株数/接种愈伤组织块数)×100%; 生根率=(生根愈伤数/接种愈伤组织块数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 2,4-D 对白三叶种子愈伤组织的影响

第一作者简介:金忠民(1968), 女, 在读博士, 副教授, 现主要从事植物生理生态和植物分子遗传学的教学和研究工作。E-mail: jinzhongmin2008@sohu.com。

通讯作者:沙伟(1963), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物生理生态方面研究。

基金项目:黑龙江省教育厅资助项目(11544055)。

收稿日期:2010-03-22

从表 1 可以看出, 白三叶种子出芽率和诱导率随 2, 4-D 浓度的不同而有差异, 2, 4-D 浓度在 2.0 mg/L 出芽率和诱导率均为最高。经继代培养后愈伤组织呈浅黄、紧密的具有分化能力的形态。方差分析结果显示各处理之间差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

表 1 不同浓度 2, 4-D 对白三叶种子愈伤组织影响

处理	2, 4-D 浓度 / mg · L ⁻¹	出芽率 / %	诱导率 / %	褐化率 / %	愈伤组 织形态
1	1.0	80 b	61 b	3	浅黄, 较紧密
2	2.0	87 a	70 a	0	浅黄, 紧密
3	3.0	78 b	48 c	2	浅黄, 松软
4	4.0	60 c	39 d	3	透明, 松软
5	5.0	51 d	28 e	2	透明, 疏松

注: 同一列不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著, 下同。

2.2 不同激素配比对白三叶愈伤组织分化的影响

白三叶愈伤组织在分化培养基上处理 10 d 后开始分化, 一些愈伤组织逐渐开始出现绿点, 直至愈伤组织完全变绿, 处理 30 d 后观察愈伤组织分化率。从表 2 可以看出, 在不同的激素处理下, 以 6-BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.3 mg/L 为最佳, 分化率达到了 61.25%, 最低为 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 组合, 仅为 1.25%。统计分析结果表明, 各处理之间差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

表 2 不同浓度激素配比对白三叶愈伤组织分化影响

处理	6-BA / mg · L ⁻¹	NAA / mg · L ⁻¹	接种愈伤数 / 个	分化愈伤数 / 个	分化率 / %
1	1.0	0.1	80	1 e	1.25 e
2	2.0	0.1	80	42 b	52.50 b
3	3.0	0.1	80	10 d	12.50 d
4	1.0	0.2	80	10 d	12.50 d
5	2.0	0.2	80	36 c	45.00 c
6	3.0	0.2	80	35 c	43.75 c
7	1.0	0.3	80	11 d	13.75 d
8	2.0	0.3	80	49 a	61.25 a
9	3.0	0.3	80	42 b	52.50 b

2.3 不同激素配比对白三叶不定芽生根的影响

白三叶愈伤组织分化培养 30 d 后开始分化变绿的愈伤组织逐渐形成不定芽。当分化出的芽长到 3~4 cm 时, 切取生长健壮的分化植株转到生根培养基上, 1/2MS 培养基+IBA 0.3 mg/L+NAA 0.3 mg/L 生根率最高, 达 100%, 其次是 1/2MS 培养基+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.3 mg/L。培养 30 d 左右长出 3 cm 左右的幼根。经 2 d 的室内炼苗后移栽到花盆, 放入温控培养箱中培养, 小苗成活率达到 100%。

3 讨论与结论

不同浓度 2, 4-D 对白三叶愈伤组织的诱导率差异较大, 出芽的种子均能形成愈伤组织, 2, 4-D 浓度在 1.0 mg/L 时即可达到较好的诱导效果, 2.0 mg/L 为最佳诱导浓度。

经过 2 次继代培养有助于白三叶的愈伤组织向胚

性愈伤转化, 从而提高白三叶愈伤组织的分化率, 继代培养次数增加出现白化苗。

该研究已建立再生频率较高的组织培养方法, 所诱导的愈伤组织可作为转基因研究的受体材料, 用于基因工程操作, 将外源优质基因导入白三叶, 培育优质、高产白三叶新品种。

参考文献

[1] 樊会敏, 张宝军. 冀南地区白三叶草坪杂草的防除技术[J]. 邯郸农业高等专科学校学报, 2002, 19(1): 21.

[2] 陈传芳, 李义文, 陈豫, 等. 通过农杆菌介导法获得耐盐甜菜碱醛脱氢酶基因白三叶草[J]. 遗传学报, 2004, 31(1): 97-101.

[3] 孙吉雄. 草坪学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 249-253.

[4] Bonos S A, Murphy J A. Growth response and performance of Kentucky bluegrass under summer stress[J]. Crop Sci, 1999, 39: 770-774.

[5] 苏德荣. 干旱地区草坪的水分管理[J]. 草原与草坪, 2000(4): 26-29.

[6] Huang B R, Fry J D. Root anatomical physiological and Morphological responses to drought stress for tall fescue cultivars[J]. Crop Sci, 1998, 38: 1017-1022.

[7] 张振霞, 符义坤, 储成才. 豆科牧草基因工程研究进展[J]. 遗传, 2002, 24(5): 607-612.

[8] 赵桂琴, 王锁民, 任继周. 白三叶转基因及其生态适应性研究进展[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 592-598.

[9] 王丹, 雷江丽. 卡那霉素在白三叶遗传转化筛选中的应用研究[J]. 深圳职业技术学院学报, 2009(5): 63-67.

[10] 何德华, 张占路, 唐益雄, 等. 农杆菌介导红三叶草遗传转化体系的建立[J]. 中国草地学报, 2007, 29(3): 67-72.

[11] 王丹, 吴燕民, 刘水, 等. 利用农杆菌浸种法建立白三叶草遗传转化体系的研究[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(1): 96-101.

[12] 赵桂琴, 慕平, Chu P. 苜蓿花叶病毒外壳蛋白基因在白三叶中的表达及转基因植株的抗病性分析[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 230-234.

[13] 梁哲, 姜三杰, 未丽, 等. 三叶草基因工程研究进展[J]. 草地学报, 2009, 18(2): 205-211.

[14] 谷俊涛, 赵红梅, 刘祝玲, 等. 农杆菌介导白三叶草高效遗传转化和转基因植株再生[J]. 草业学报, 2007, 16(2): 84-89.

[15] McManus M T, Laing W A, Watson L M, et al. Expression of the soybean(Kunitz) trypsin inhibitor in leaves of white clover(*Trifolium repens* L.) [J]. Plant Science, 2005, 168(5): 1211-1220.

[16] 李志亮, 邢浩春, 杨清, 等. 白三叶转基因研究进展[J]. 北方园艺, 2009(7): 149-152.

[17] 杨丽莉, 贾玮珑, 张彦芹. 白三叶草高频率植株再生系统的研究[J]. 山西农业科学, 2002, 30(3): 70-72.

[18] 杨珍, 何丽君, 王明玖, 等. 高加索三叶草和白三叶草再生体系的建立[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2008(4): 76-81.

[19] 张德炎, 李建民, 李喜文, 等. 红三叶和白三叶愈伤组织的诱导和胚性细胞悬浮系的建立[J]. 中国草地, 1999(1): 15-18.

[20] 王晓春. 白三叶与红三叶体细胞胚胎途径建立再生体系的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.

[21] Wang Z Y, Scott M, Bell J, et al. Field performance of transgenic tall fescue(*Festuca arundinacea* Schreb.) plants and their progenies[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 406-412.

[22] Bettany A J E, Dalton S J, Timins E, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb) and *Lolium multiflorum* (Lam.) [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 437-444.

微型结球白菜原生质体游离与纯化研究

段英姿

(唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000)

摘要:以微型结球白菜无菌苗子叶为材料,探讨酶液浓度、酶解时间、酶液渗透压、离心转数对其原生质体分离效果的影响以及蔗糖浓度对纯化结果的影响。结果表明:以 1.0% Cellulase R-10, 0.08% Pectinase, 0.4 mol/L 甘露醇, 酶解 6 h, 第 1 次离心转速 1 200 r/min, 24% 蔗糖的条件组合最佳, 原生质体产量为 2.10×10^7 个/g(FW), 活力达 91.20%。

关键词:微型结球白菜; 原生质体; 游离; 纯化

中图分类号:S 634.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)12-0144-03

除去细胞壁后获得的植物原生质体, 适合于进行各种细胞操作和遗传操作, 是理想的起始材料和受体, 可用来诱导融合, 引入细胞器、植物大分子、外源遗传物质和低等生物等^[1]。而分离和纯化获得大量有活力的原生质体是这些研究得以顺利开展的前提。研究表明, 由于植物本身存在差异性, 不同种类, 甚至同种植物不同组织, 其原生质体分离所需条件都存在着很大差异。

微型结球白菜又称娃娃菜、嫩芽菜, 有别于传统的大白菜, 因外观小巧、色泽鲜嫩、风味独特而深受众多消费者喜爱, 近年来在宾馆饭店和超市上非常走俏。目前关于微型结球白菜的研究多停留在种植栽培上, 但对于原生质体方面的研究还未见报道。该试验以微型结球白菜的子叶为试材, 对影响原生质体产量和活力的因素进行研究, 以建立最佳的原生质体制备体系, 为利用体

细胞杂交和遗传转化等手段培育新品种奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

生长 10~15 d 的微型结球白菜的无菌子叶(唐山玉田种植的品种 神狮金娃娃)。

1.2 酶解液的配制

将浓度 0.4%~1.3% 的纤维素酶(Cellulase R-10)和 0.04%~0.16% 的果胶酶(Pectinase)不同组合分别加入 CPW^[2] (101 mg/L KNO₃, 2 710 mg/L KH₂PO₄, 246 mg/L MgSO₄ · 7H₂O, 1 480 mg/L CaCl₂ · 2H₂O), 3 mmol/L MES 及 0.3~0.6 mol/L 甘露醇混合溶液中, pH 5.6。

1.3 原生质体的分离和纯化

取生长 10~15 d 无菌苗子叶 1 g, 切成 1 mm × 1 mm 的小块, 放入 10 mL 酶解液, 于 25 °C 条件下黑暗酶解。采用“过滤—离心—漂浮法”进行纯化^[3]。酶解后经 200 目的镍丝网筛过滤, 滤液第 1 次离心 3 min, 倒去上清液, 加入 0.5 mL 悬浮液 (0.16 mol/L CaCl₂ ·

作者简介: 段英姿(1974), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事植物育种与生物技术研究工作。E-mail: dyz03247@sohu.com。

基金项目: 唐山市科技攻关资助项目 (04360701B-10)。

收稿日期: 2010-03-29

Establishment of Regeneration System and Callus Inducement in Seed of *Trifolium repens* Linn

JIN Zhong-min, SHA Wei, ZHANG Yan-fu, SUN Wei, LIU Wen-jing

(College of life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: The seed of the *Trifolium repens* was taken as the explants and studied the effects of different hormone compositions on callus induction, plantlet regeneration and plant roots. The results showed that MS+2,4-D 2.0 mg/L were better for callus induction, and MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, the regeneration frequency was the highest, about 61.25%. The rooting rate reached 100% in 1/2MS+IBA 0.3 mg/L+NAA 0.3 mg/L. The best regeneration system had laid a sound foundation for the subsequent regeneration of transgenic research.

Key words: *Trifolium repens* Linn; callus tissue; regeneration system