

紫花苜蓿组织培养高频再生体系的建立

段亚楠, 卢福荣, 茹 艺, 李曹娜, 韩 阳

(辽宁大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要:以紫花苜蓿品种“甘农1号”的子叶为外植体,研究了不同培养基和不同浓度激素对紫花苜蓿愈伤组织诱导、分化及生根的影响。结果表明:最佳愈伤组织诱导培养基为 NSH+2,4-二氯苯氧基(2,4-D) 4 mg/L+6-苄氨基嘌呤(6-BA) 0.4 mg/L+3%蔗糖+0.7%琼脂;最佳诱导愈伤组织分化培养基为 MS+2%蔗糖+0.7%琼脂;最佳诱导无根苗生根培养基为 1/2MS+萘乙酸(NAA) 0.2 mg/L+1%蔗糖+0.7%琼脂;再生植株适宜的移栽基质为营养土:草炭:蛭石=1:2:1。该研究建立了一个紫花苜蓿稳定的高频再生体系,为其作为转基因受体奠定了基础。

关键词:紫花苜蓿;子叶;组织培养;植株再生

中图分类号:S 541+.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0127-03

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生豆科牧草,也是我国乃至世界上种植最多的牧草品种。由于其具有适应性强、产量高、品质好等优点,素有“牧草之王”之美称。紫花苜蓿含有大量的粗蛋白、维生素、矿物质等营养素,具有较高的营养价值,传统的苜蓿利用中,以牲畜饲料为主,近年来苜蓿已作为天然保健食品被广泛应用。苜蓿生物技术研究,国际上始于20世纪70年代初,我国始于20世纪80年代初^[1]。通过组织培养得到一个高效的、稳定的再生体系对于通过生物技术手段改

良紫花苜蓿品质是必不可少的。Saunders等^[2]首先从紫花苜蓿的愈伤组织上获得了再生植株,此后,开展了对苜蓿再生的广泛研究。虽然目前对紫花苜蓿再生体系的研究较多,但是已建立的再生体系的可重复性差,不符合紫花苜蓿作为转基因受体的条件,因此对紫花苜蓿再生体系的研究仍具有重要意义。由于“甘农1号”稳定性好,再生性强^[3],因此国内对于“甘农1号”的研究是比较多的,但是对其研究大多是以下胚轴^[4]、子叶节^[5]作为外植体,而利用子叶,通过诱导愈伤组织分化获得胚状体,进而获得再生植株尚鲜见报道。该研究以“甘农1号”紫花苜蓿的子叶为外植体,通过研究不同培养基和不同浓度激素对紫花苜蓿再生体系的影响,旨在建立一个高效的、通过胚状体途径获得植株的紫花苜蓿再生体系,为实现外源基因的转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为“甘农1号”紫花苜蓿。

第一作者简介:段亚楠(1987-),女,山东聊城人,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail: dyn87219@126.com.

责任作者:韩阳(1962-),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向植物生物技术。E-mail: hanyang_0802@163.com.

基金项目:辽宁省教育厅重点实验室资助项目(LS2010070);辽宁省自然科学基金资助项目(201202083)。

收稿日期:2013-04-08

Preliminary Study on Callus Induction of *Corydalis decumbens*

WANG Fei, ZHU Xiao-lan, HE Sha-sha, LIAO Yan, HUANG Sheng-he
(Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou, Jiangxi 344000)

Abstract: Taking *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. as material, the effect of different disinfection methods, explants and hormone proportion on callus induction were studied. The results indicated that the better disinfection treatment was 10 min with 0.1% HgCl_2 for blade, but 8 min for tuber and leafstalk. As an explants, leafstalk was superior to tuber and blade. The induction rate (43.3%) was the highest in the MS medium with 0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA for blade, but the induction rate (80.0%) was the highest if the leafstalk was put in the MS medium with 1.0 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA.

Key words: *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.; tissue culture; callus

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的来源 选取饱满、有光泽的种子,用75%酒精浸30 s,转入0.1%氯化汞中浸泡10 min,用无菌水洗涤5次,然后用无菌滤纸吸干种子表面的水分,将无菌的种子置于无激素的MS培养基上培养。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将生长7~9 d的无菌苗置于已灭菌的培养皿中,切取0.5 cm²大小的子叶,接种到愈伤组织诱导培养基中。培养基为A₁、A₂ 2种(A₁:MS+2,4-D 4 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+3%蔗糖;A₂:NSH+2,4-D 4 mg/L+6-BA 0.4 mg/L+3%蔗糖)。培养45 d后,统计愈伤组织发生率。每种培养基中接种外植体200块。

1.2.3 愈伤组织的分化 子叶在愈伤组织诱导培养基上培养50 d左右,将所形成的嫩绿色愈伤组织置于已灭菌中的培养皿中切成0.5 cm²大小,接种到2种不同的分化培养基B₁、B₂上。所用分化培养基分别为:B₁(MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+2%蔗糖)和B₂(MS+2%蔗糖),30 d之后统计愈伤组织的分化情况,以分化率表示。每种培养基中接种愈伤组织200块。

1.2.4 根的诱导及移栽 在分化培养基上,胚状体萌发,形成无根苗。将胚状体萌发后形成的无根苗分别移入含有不同蔗糖浓度的生根培养基(C₁:1/2MS+NAA 0.2 mg/L+1%蔗糖;C₂:1/2MS+NAA 0.2 mg/L+2%蔗糖;C₃:1/2MS+NAA 0.2 mg/L+3%蔗糖)中,培养2周,待根长到2 cm左右时,将培养瓶的封口扎数个小孔,移出培养箱,练苗2 d后,用自来水洗净植株根部残余的培养基,移栽至装有营养土:草炭:蛭石=1:2:1的培养基质中,在温室中常规管理。移栽1周后统计成活率。

基本培养基选用MS培养基、1/2MS培养基和NSH培养基^[6],并添加各种生长素和细胞分裂素,上述培养基中琼脂浓度均为0.7%,pH 5.8,培养温度(26±1)℃,光照时间16 h/d。以上试验均设3次重复。

1.3 项目测定

愈伤组织发生率=发生愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数×100%,分化率=分化的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数×100%,成活率=成活小苗数/移栽小苗总数×100%。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

由表1可知,选用的2种不同愈伤组织诱导培养基(A₁、A₂)在最终诱导效果上无显著差异。在2种愈伤组织诱导培养基中,子叶均在培养7 d后开始发生愈伤组织;培养14 d后,A₂培养基中外植体的出愈率比A₁培养基高10%;在培养14~45 d之间,2种培养基中愈伤组织

的诱导率均有所提高;培养45 d后,A₁培养基的外植体出愈率达到92%,A₂培养基的出愈率达到95%,统计分析表明,二者愈伤诱导率无显著差异(图1A)。

表1 不同的培养基对紫花苜蓿子叶诱导愈伤组织的影响

培养基名称	接种外植体数	诱导出愈伤组织的个数	愈伤组织发生率/%
A ₁	200	184	92a
A ₂	200	190	95a

注:同列内不同字母表示经检验在0.05水平上差异显著。下同。

2.2 愈伤组织的分化

在分化培养基中,经过20~30 d的培养,愈伤组织上有胚状体的分化(图1B)。在B₁培养基上培养的愈伤组织只少量分化出胚状体,而在B₂培养基上培养的愈伤组织大部分能分化出胚状体,平均每块愈伤组织分化胚状体30~50个,B₁、B₂差异显著(表2)。

表2 不同的培养基对愈伤组织分化的影响

培养基名称	接种愈伤组织数	分化出胚状体的个数	愈伤组织分化率/%
B ₁	200	10	5a
B ₂	200	144	72b

为比较愈伤组织诱导培养基对后续分化的影响,将在A₁和A₂上获得的愈伤组织分别转入B₂中培养30 d之后,统计分化情况。来源于A₁的愈伤组织,其分化率为53%;而来源于A₂的愈伤组织,其分化率为80%。该结果表明,虽然A₁、A₂培养基在诱导愈伤组织上没有太大差别,但在愈伤组织分化时,在A₂中培养的愈伤组织分化率高于在A₁培养基中获得的愈伤组织。

2.3 根的诱导和移栽

将胚状体萌发形成的无根苗分别转入不同的生根培养基中,培养1周后,C₁、C₂均开始生根且植株生长正常,培养2周之后,C₁、C₂中的材料根长至2 cm左右且根数较多,此时,C₁中材料生根率为80%,C₂中材料生根率为50%,C₃中的胚状体仍没有生根。继续培养1周后,C₁中材料生根率可达到100%。该试验结果表明,当蔗糖浓度为10 g/L时,更有利于苜蓿无根苗的生根。将培养得到的再生植株(图1C)移栽到装有营养土、草炭和蛭石的培养基质中培养,常规管理,再生植株成活率100%(图1D)。

3 讨论与结论

在自然情况下,由于内源激素调整缓慢或不完全及外界环境控制等因素导致一些植物营养器官和细胞再生比较困难^[7],而2,4-D则有利于紫花苜蓿愈伤组织的形成^[1],因此该试验选用2,4-D诱导苜蓿的愈伤组织并且成功诱导出绿色疏松的愈伤组织,且该愈伤组织能够继续分化形成胚状体。研究表明,蔗糖的浓度也会影响紫花苜蓿体胚发生的数量和质量^[8],Neves等^[9]的研究表明,较低的蔗糖浓度有利于紫花苜蓿体胚的发生。该试验结果表明,在以MS为基本培养基的A₁上,虽然出

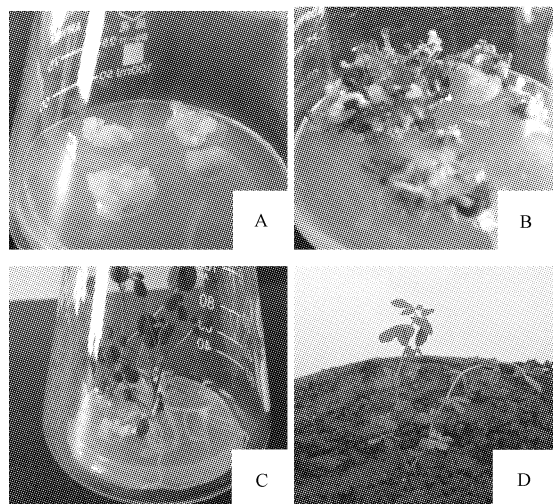


图1 紫花苜蓿再生过程

注:A:来源于子叶的愈伤组织;B:愈伤组织分化形成的胚状体;
C:无根苗生根后获得的再生植株;D:移栽成活的再生植株。

Fig. 1 Alfalfa regeneration process

Note: A: Callus derived from cotyledon; B: Embryoid from callus differentiation; C: Regenerative plant after rooting; D: Survival regenerative plant after transplanting.

愈率很高,但是愈伤组织大多为白色疏松,在后续培养中很难诱导出胚状体,而培养基 A_2 采用NSH作为基本培养基,不仅能够形成粘性嫩绿状的愈伤组织,出愈率高并且在后续培养中基本都能诱导出胚状体,这与夏阳等^[6]的试验结果相一致。该研究中,愈伤组织形成后能成功分化成胚状体,而且分化周期短,数量大,培养出的愈伤组织在连续3次继代培养之后仍具有较稳定的分化能力。该试验建立的再生体系胚状体的诱导率和再生率都很高,符合作为基因转化受体系统的条件。

在豆科牧草组织培养过程中,再生植株根的诱导是较为困难的一步,马晖玲等^[10]研究表明,1/2MS是紫花苜蓿最佳的生根培养基,另外还有研究报道,NAA有利

于紫花苜蓿的生根^[11-13],在蔗糖含量为10 g/L的培养基中更有利于成熟胚状体的生根^[14]。该试验分别在含10、20、30 g/L蔗糖的生根培养基中诱导胚状体生根,并发现在蔗糖含量为10 g/L时,生根率最高可以达到100%。

参考文献

- [1] 葛军,刘振虎,卢欣石. 紫花苜蓿再生体系研究进展[J]. 中国草地, 2004,26(2):63-67.
- [2] Saunders J W, Bingham E T. Production of *Medicago sativa* plants from callus tissue[J]. Crop Science, 1972,12:804-808.
- [3] 阎旭东,朱志明,李桂荣,等. 六科苜蓿特性分析[J]. 草地学报, 2001, 9(4):302-306.
- [4] 张何,黄其满. 苜蓿不同品种愈伤组织诱导、分化和再生能力的比较研究[J]. 科技导报, 2008,26(2):38-41.
- [5] 张静妮,王铁梅,卢欣石,等. 紫花与杂花苜蓿再生影响因子的比较研究[J]. 草地学报, 2008,16(1):45-49.
- [6] 夏阳,梁慧敏,燕丽萍,等. 一种真空渗透辅助农杆菌介导转化苜蓿的方法:中国,200810138770. 7[P]. 2009-6-17.
- [7] 钱瑾,刘发央,谢小冬,等. 紫花苜蓿高频植株再生体系的建立[J]. 甘肃农业大学学报, 2007,42(1):77-81.
- [8] Wayne A P, Matthew A B. Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on auxin-free medium[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993,32:69-76.
- [9] Neves L O, Duque S R L, Almeida J S. Repetitive Somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis* and *M. truncatula* Gaerth cv. *Jemalong*[J]. Plant Cell Reports, 1999,18:398-405.
- [10] 马晖玲,卢欣石,曹致中,等. 紫花苜蓿不同栽培品种植株再生的研究[J]. 草业学报, 2004,13(6):99-105.
- [11] 黄远新,王永雄,胡艳. 南方紫花苜蓿不同外植体离体培养的研究[J]. 中国草地, 2003(3):42-47.
- [12] 肖荷霞,王瑛,高峰,等. 外植体及激素对SANDI-T1紫花苜蓿愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 河北农业大学学报, 2003,26(4):47-52.
- [13] 杨起简,周禾,孙彦,等. 紫花苜蓿的愈伤组织诱导及组织培养[J]. 北京农学院学报, 2004(19):28-30.
- [14] 王强龙,王锁民,张金林,等. 紫花苜蓿体细胞胚高频再生体系的建立[J]. 草业科学, 2006,23(11):21-27.

Establishment of High Frequency Regeneration System of *Medicago sativa*

DUAN Ya-nan, LU Fu-rong, RU Yi, LI Cao-na, HAN Yang

(School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang, Liaoning 110036)

Abstract: Taking the cotyledons of *Medicago sativa* 'Gannong No. 1' as explants, the effects of different induction media and different concentrations of hormone on influence of callus induction, differentiation and rooting were investigated. The results showed that NSH+2,4-D 4 mg/L+6-BA 0.4 mg/L+3% sucrose+0.7% agar was the optimal medium for callus induction; MS+2% sucrose+0.7% agar was the optimal media for differentiation; MS+NAA 0.2 mg/L+1% sucrose+0.7% agar was the optimal medium for rooting. The regenerative plant could survive after transplanting into the suitable substrate consisted of nutritive soil: peat: vermiculite=1:2:1. This study built an stable high frequency regeneration system for alfalfa, and laid a foundation for the transgenic receptor.

Key words: alfalfa; cotyledon; plant tissue culture; plant regeneration