

苜蓿高频再生体系的建立

王 静¹, 麻冬梅², 许 兴²

(1. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以 10 个品种苜蓿无菌苗的子叶和下胚轴为外植体, 研究了不同培养基、不同激素种类和配比对愈伤组织诱导率及分化率的影响。结果表明: 国产苜蓿下胚轴外植体愈伤组织分化率最高; 愈伤组织诱导最适培养基为 MS 盐+UM 维生素+2 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L KT+2 g/L 水解酪蛋白+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖; 愈伤组织最适分化培养基为 MS+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA; 最适生根培养基为 1/2MS。

关键词:苜蓿; 外植体; 愈伤组织; 高频再生体系

中图分类号:S 551+.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)02-0109-04

苜蓿(*Medicago sativa* L.) 是世界上分布最广的一种多年生豆科牧草^[1]。苜蓿属于中度耐盐碱植物, 能够耐受较贫瘠的土壤, 种植苜蓿不但能够增加经济收入而且能够改良土壤微环境, 增加土壤肥力。随着草场盐碱化程度的增加及植被的严重退化, 仍需要培育大量的抗逆性苜蓿新品种, 以满足草地畜牧业对牧草需求的日益增加。该试验通过建立苜蓿高频再生体系, 为苜蓿的遗传转化和分子育种研究工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为目前常见苜蓿栽培品种: “杰克林”、“阿尔冈金”、“金皇后 a”、“金皇后 b”、“皇后 2000”、“柏拉图”、“三得利”、“国产”、“敖汉”和“陇东”。种子均由中国草业公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗培养 选取预处理后的苜蓿种子, 先用 75% 的酒精振荡灭菌 1 min, 再用 0.1% 升汞振荡灭菌 10 min, 最后用无菌蒸馏水冲洗 3~5 次, 将无菌苜蓿种子接种到 MS 培养基或 1/2 MS 培养基上。培养条件为温度 25℃, 光照强度 3 000~4 000 lx, 光照培养 7 d。

1.2.2 培养基及培养条件 基础培养基为 MS 培养基。1/2MS 培养基大量元素为 MS 培养基的一半, 其余成分不变, pH 不变。愈伤组织诱导培养基为在 MS 培养基

和 UM 的维生素基础上添加 2,4-D、6-BA、KT、NAA, 所有培养基附加 6 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖, pH 5.8~6.0, 121℃ 高压灭菌 20 min。培养条件为温度 25℃, 光照 16 h/d, 光照强度 3 000~4 000 lx。

1.2.3 愈伤组织诱导与继代培养 切取生长 7 d 的无菌苗的子叶和下胚轴(2~3 mm)为外植体, 接种到不同激素浓度配比的愈伤组织诱导培养基上(表 1), 共 22 个组合, 每个组合设 5 次重复, 每重复接种 20 个外植体, 在不同条件下培养, 诱导形成愈伤组织, 每 15 d 继代 1 次, 共继代 2 次。30 d 后统计愈伤组织诱导率, 愈伤组织诱导率(%)=诱导愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100。

表 1 愈伤组织诱导培养基

Table 1	Induction medium for callus			mg/L
培养基编号 No. of culture medium	激素水平 Hormone lever			
	2,4-D	6-BA	KT	
A1	1.0	0	0	
B1	2.0	0	0	
C1	3.0	0	0	
D1	4.0	0	0	
E1	1.0	2.0	0	
F1	2.0	2.0	0	
G1	3.0	2.0	0	
H1	4.0	2.0	0	
I1	0	1.0	0	
J1	0	2.0	0	
K1	0	3.0	0	
L1	0	4.0	0	
M1	2.0	1.0	0	
N1	2.0	2.0	0	
O1	2.0	3.0	0	
P1	2.0	4.0	0	
Q1+UM	2.0	0	0.25	
R1+UM	3.0	0	0.25	
S1+UM	4.0	0	0.25	
T1+UM	5.0	0	0.25	
U1+UM	6.0	0	0.25	
V1+UM	7.0	0	0.25	

第一作者简介:王静(1988-), 女, 宁夏银川人, 硕士, 现从事植物基因工程研究工作。E-mail: fengqingyangzi@163.com。

责任作者:许兴(1959-), 男, 教授, 博士生导师, 现从事作物逆境生理及生物技术育种研究工作。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAC07B03)。

收稿日期:2011-10-08

1.2.4 愈伤组织分化 愈伤组织继代2次后,挑取淡黄色、致密的颗粒状愈伤组织,转入到不同激素浓度配比的MS分化培养基(表2)上于25℃光照培养。20 d继代1次,40 d后统计芽的分化状况并计算芽的分化率,芽的分化率(%)=分化出芽的材料数/接种的材料数×100。

表2 愈伤组织分化培养基

Table 2 Differentiation medium for callus mg/L			
培养基编号 No. of medium	激素水平 6-BA	Hormone lever KT	NAA
A2	0.3	3.0	0.1
B2	0.5	0	0.05
C2	0.5	0	0.1
D2	0	0.5	0.1
E2	0	1.0	0.1

1.2.5 再生植株的生根 取生长良好、高度约2 cm左右的分化芽,切下小芽移入1/2MS生根培养基中培养。

2 结果与分析

2.1 不同品种发芽率

10个品种苜蓿种子均可以在基本培养基上培养出无菌苗(图1),发芽率从高到低依次为:“三得利”、“柏拉图”、“杰克林”、“阿尔冈金”、“金皇后b”、“金皇后a”、“皇后2000”、“国产”、“敖汉”、“陇东”。发芽率低的原因可能是基因型差异造成的。

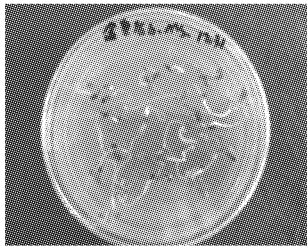


图1 苜蓿的无菌苗

Fig.1 The aseptic seedlings of alfalfa

2.2 不同外植体对愈伤组织诱导率的影响

分别选取苜蓿10个品种无菌苗的子叶、下胚轴做为愈伤组织诱导的外植体接到愈伤组织诱导培养基(图2、3),由图4和表3可知,下胚轴外植体的愈伤组织诱导率相对高于子叶,说明下胚轴具有很强的分化能力,10个苜蓿品种中“杰克林”下胚轴的愈伤组织诱导率是最高的,可达到100.0%。

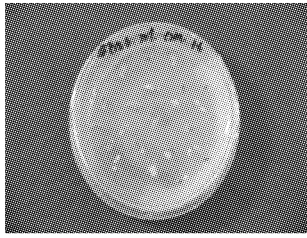


图2 子叶的外植体愈伤组织诱导

Fig.2 The cotyledon explants of the callus induction



图3 下胚轴的愈伤组织诱导

Fig.3 The hypocotyl explants of the callus induction

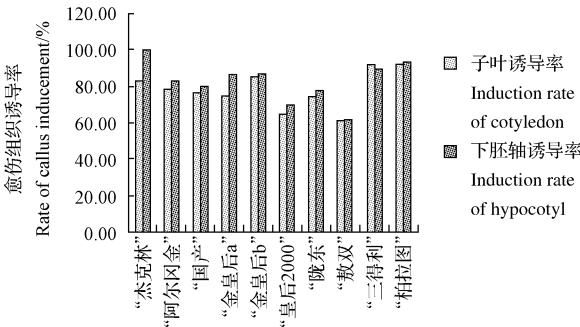


图4 不同品种的外植体对愈伤组织诱导率的影响

Fig.4 The effect of different explants on callus induction

表3 不同外植体对愈伤组织诱导率的影响

Table 3 The effect of different explants on callus induction %		
品种 Name	外植体愈伤组织诱导率 Callus induction ratio of explant	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
“杰克林”	83.3	100.0
“阿尔冈金”	78.6	83.3
“国产”	76.9	80.0
“金皇后a”	75.0	86.7
“金皇后b”	85.7	87.0
“皇后2000”	65.0	70.0
“陇东”	75.0	78.0
“敖汉”	61.5	62.0
“三得利”	92.0	90.0
“柏拉图”	92.3	93.0

2.3 不同培养基及不同激素浓度对比对愈伤组织的影响

2.3.1 不同浓度2,4-D对愈伤组织的影响 分别将不同品种的子叶、下胚轴接种到不同愈伤组织诱导培养基上,培养基分别添加浓度为1.0、2.0、3.0和4.0 mg/L的2,4-D,在愈伤组织诱导阶段,由表4可以看出,2,4-D浓度为2.0 mg/L时最适宜苜蓿愈伤组织的诱导。

表4 2,4-D浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 4 The effect of 2,4-D concentration of on callus induction %										
培养基 Medium	不同品种苜蓿的愈伤组织诱导率 Different gene type alfalfa's induction rate									
	“杰克林”	“阿尔冈金”	“国产”	“金皇后a”	“金皇后b”	“皇后2000”	“敖汉”	“陇东”	“三得利”	“柏拉图”
MS+1.0 mg/L 2,4-D	56	55	50	58	60	50	52	40	62	60
MS+2.0 mg/L 2,4-D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MS+3.0 mg/L 2,4-D	80	70	83	89	74	70	77	85	96	100
MS+4.0 mg/L 2,4-D	72	67	80	83	60	65	70	83	80	75

2.3.2 不同细胞分裂素种类及浓度对比对愈伤组织的影响 在苜蓿愈伤组织诱导培养基中,加入细胞分裂素对愈伤组织诱导起主要作用。并设对照作比较,观察愈伤组织的生长情况。由表 5 可看出,当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时诱导率达到最大值,说明 2.0 mg/L 为 6-BA 的最适浓度。在含有 2 g/L 水解酪蛋白的 MS 培养基加入 UM 的维生素为基础培养基,当 KT 浓度为 0.25 mg/L 时,愈伤诱导率达到最大值,表明 0.25 mg/L 为 KT 添加的最适浓度。试验中还发现 0.25 mg/L 的 KT 要比 2.0 mg/L 的 6-BA 诱导效果好。

表 5 不同细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

Table 5 The effect of different cytokinin on callus induction %

培养基 Medium	不同品种苜蓿的愈伤组织诱导率 Different gene type alfalfa's induction rate									
	“杰克林”	“阿尔冈金”	“国产”	“金皇”	“金皇后 a”	“金皇后 b”	“皇后 2000”	“敖汉”	“陇东”	“三得利”
M1	90	80	85	90	98	90	80	60	90	92
N1	98	95	90	92	100	90	90	80	100	100
O1	96	90	90	90	100	80	88	76	96	95
P1	92	81	82	87	96	88	77	60	90	90
Q1+UM	100	100	95	96	100	100	100	80	100	100

2.4 不同激素浓度处理对愈伤组织分化的影响

10 个品种的愈伤组织在光照 16 h/d 的条件下,培养 30 d 后,愈伤组织不同程度的分化出绿点、须根,或者绿芽(图 5、图 6)。MS 培养基中添加不同浓度配比的 6-BA、NAA、KT 对愈伤组织分化成苗的频率有显著影响。不同激素浓度对比对不同品种愈伤组织分化的影响见表 6。由表 6 可看出,处理 D2 的激素浓度配比最适合愈伤组织分化,30 d 后,愈伤组织分化出绿芽,处理 D2 的 10 个苜蓿品种中“国产”苜蓿的下胚轴外植体分化率最高,达到 90%。“国产”苜蓿的愈伤组织在其它激素配比的培养基上也分化出少数绿芽。

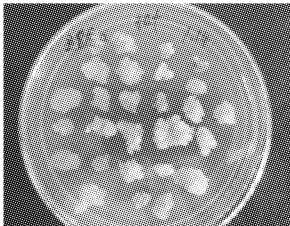


图 5 愈伤组织的继代培养

Fig. 5 The subculture of the callus induction



图 6 愈伤组织分化的芽

Fig. 6 The callus developed shoot

表 6 不同激素对愈伤组织分化的影响

Table 6 The effect of different hormone on callus differentiation %

培养基	外植体(子叶/下胚轴)Explant(Cotyledon/ Hypocotyl)									
基	“杰克林”	“阿尔冈金”	“国产”	“金皇后 a”	“金皇后 b”	“皇后 2000”	“柏拉图”	“三得利”	“敖汉”	“陇东”
A2	75/62	63/45	40/45	18/19	42/47	30/25	23/24	45/59	33/44	7/11
B2	79/70	59/46	25/34	27/25	58/48	17/15	25/27	32/30	36/45	18/18
C2	62/53	60/59	35/45	25/25	56/50	48/47	47/47	30/35	47/51	10/20
D2	77/82	60/60	87/90	34/35	45/50	40/45	47/40	38/40	70/75	20/20
E2	40/48	50/61	70/60	29/32	52/66	30/37	30/34	37/43	67/72	5/7

2.5 再生植株的生根

苜蓿分化芽在 1/2MS 培养基上培养 15 d 左右就可长成再生植株(图 7)。

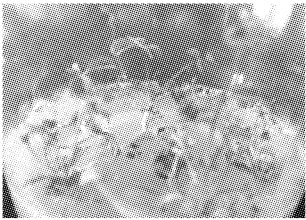


图 7 再生植株

Fig. 7 The replanted alfalfa

3 结论与讨论

3.1 结论

以“国产”苜蓿下胚轴为外植体,在 MS 盐+UM 维生素+2.0 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L KT+2.0 g/L 水解酪蛋白+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖愈伤组织诱导培养基上进行愈伤组织诱导,诱导率可达到 100.0%,愈伤组织继代 2~3 代后,再在 MS+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 分化培养基上分化,分化率可达到 90%,等到分化出的芽长到 2~3 cm 时转入 1/2MS 培养基上生根,即可再生出完整的再生植株。

3.2 讨论

3.2.1 不同外植体对愈伤组织的诱导 虽然植物的子叶和下胚轴都可以作为外植体再生出完整的植株,但是子叶和下胚轴作为不同的外植体在愈伤组织诱导分化及再生植株的发育能力等方面均存在差异。David 等^[2]、杨广东等^[3]研究认为,下胚轴是苜蓿愈伤组织诱导的最佳外植体。该试验结果表明,下胚轴外植体比子叶具有更好的再生能力,因为其具有更高的愈伤组织分化率,该点与很多研究者的文献报道相一致^[4-7]。

3.2.2 不同培养基及不同激素浓度对比对愈伤组织的诱导 该试验采用的不同激素浓度配比组合的愈伤组织诱导培养基中,MS 的盐和 UM 的维生素的培养基的愈伤组织诱导率高于其它培养基。这与 Jin T C 等^[8]的报道相一致。研究发现生长素 2,4-D 对产生愈伤组织的作用最大,也就是说 2,4-D 的浓度是影响苜蓿愈伤组织诱导率的主要因素。李聪等^[9]研究认为在 MS 上诱

导苜蓿产生愈伤组织,2,4-D是不可缺少的,且适宜水平为2.0 mg/L。该试验研究也证明了2,4-D浓度为2.0 mg/L时,愈伤组织的诱导效果最好。另外,该试验研究发现2,4-D与低浓度的细胞分裂素组合的效果更好,尤其是与低浓度的KT组合能产生良好的胚性愈伤组织。而当激素浓度过大时,会导致非胚性愈伤组织的数量增加,0.25 mg/L KT是愈伤组织诱导的最适浓度,这与王涌鑫等^[10]的报道基本一致。

3.2.3 愈伤组织的分化 愈伤组织分化出芽的过程中,分化率低成为愈伤组织分化再生的“瓶颈”。该试验采用MS基本培养基,添加不同激素浓度及配比发现,添加了6-BA的培养基愈伤组织分化率很低,而不添加6-BA的处理形成的愈伤组织则表现水渍状,在不添加6-BA的处理中添加KT和NAA分化率提高,最高可达90%,因此该试验突出的特点即是在诱导培养基中添加6-BA会抑制苜蓿愈伤组织的分化,而添加KT和NAA则可以提高分化率。吕冬霞等^[11]指出,生长素和细胞分裂素的结合使用比单一使用更有利于植物愈伤组织的产生和分化。Ana等^[12]在添加2,4-D和KT的培养基上诱导的苜蓿愈伤组织悬浮培养后,在MS培养基上的分化率达到54.5%。该试验选用的10个苜蓿品种中愈伤组织诱导率最高的是“杰克林”,其余品种的愈伤组织诱导率相差不大,但“杰克林”的分化率并不高,而“国产”苜蓿下胚轴外植体的分化率最高,因此选择“国产”苜蓿下胚轴外植体在MS培养基上添加0.5 mg/L KT和0.1 mg/L NAA的分化率达到90%,有明显的提高。

参考文献

- [1] 从学滋,秦孟根,王书安. 苜蓿总皂甙的提取与分析[J]. 中药通报, 1998,13(9):19-20.
- [2] David A, Stuart, Carol M, McCall Induction of somatic embryogenesis using side chain and ring modified forms of phenoxy acid growth regulators [J]. Plant Physiol., 1992,99:111-118.
- [3] 杨广东,朱楨,李燕娥,等. 大白菜高效遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2002,10(2):127-132.
- [4] 危晓薇,蔡丽娟,李仁敬. 紫花苜蓿组织培养及其再生植株[J]. 新疆农业科学, 1999(2):73-75.
- [5] 刘淑兰,罗松,王天原,等. 苜蓿组织培养及不定根芽分化蛋白质的研究[J]. 北京农业大学学报, 1993(7):35-39.
- [6] 刘明志. 大叶紫花苜蓿愈伤组织原生质体再生植株[J]. 武汉植物学研究, 1996,14(4):329-333.
- [7] 舒文华,耿华珠,阎伦兴. 紫花苜蓿胚轴愈伤组织培养与植株再生[J]. 草业科学, 1993,10(3):65-67.
- [8] Jin T C, Chang Q, Li W F, et al. Stress-inducible expression of *Gm-DREB1* conferred salt tolerance in transgenic alfalfa[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2010,100:219-227.
- [9] 李聪,熊德邵,耿华珠. 苜蓿愈伤组织再生植株研究[J]. 中国草地, 1989(3):51-55.
- [10] 王涌鑫,关宁,李聪. 高效的苜蓿组织培养再生体系的建立[J]. 东北师范大学学报(自然科学版), 2008(3):112-117.
- [11] 吕冬霞,曲长福. 植物生长调节剂对愈伤组织培养的影响[J]. 北方园艺, 2004(5):68-72.
- [12] Ana S D, Ana S P, Dulce M D S, et al. Efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from long-term cell suspension cultures of *Medicago truncatula* cv. Jemalong *In Vitro* cellular and developmental [J]. Biology-Plant, 2006,42(3):270-273.

Establishment of High Frequency Regeneration System of Alfalfa

WANG Jing¹, MA Dong-mei², XU Xing²

(1. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The experiment gets across using ten kinds of the hypocotyl and cotyledon of alfalfa as explants were used to study the effect of different mediums, hormones in different concentrations on callus induction rate and differentiation rate. The results indicated that the *Medicago sativa* L. cv. Guochan hypocotyl callus differentiation rate was the highest; the best medium for callus induction was the MS salt+UM vitamin, 2.0 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L KT, 2.0 g/L casein acid hydrolysate+6 g/L Agar+30 g/L sucrose; the best differentiation medium was the MS medium+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA; the best root medium for plant development was 1/2 MS.

Key words: alfalfa; explant; callus; high frequency regeneration system