

6-BA、NAA 对苜蓿不同外植体愈伤组织培养的影响

肖燕¹, 张博¹, 范永刚^{2,3}, 王彩虹¹, 赵红娟¹, 王玉祥¹

(1. 新疆草地资源与生态重点实验室/新疆农业大学草业工程学院, 乌鲁木齐 830052;

2. 中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐 830011; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以新牧1号和新疆大叶两个苜蓿品种为试材,研究了7个培养基对不同无菌苗外植体愈伤组织诱导和生长影响,以及不同浓度的植物生长调节物质6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA)对愈伤组织生长及分化的作用。结果表明:(1)浓度在2~8 mg/L, NAA有利于苜蓿愈伤组织的诱导,随浓度的增大呈促进作用,而在1~3 mg/L, 1mg/L 6-BA有利于苜蓿愈伤组织的诱导,随浓度的增大呈抑制作用;(2)MS+2,4-D 2 mg/L+NAA 4 mg/L+6-BA 1 mg/L即MS₄为新牧1号的较佳诱导培养基,MS+2,4-D 2 mg/L+NAA 8 mg/L+6-BA 1 mg/L即MS₅为新疆大叶苜蓿的较佳诱导培养基;(3)以无菌苗下胚轴、子叶及叶片为外植体,确定下胚轴为诱导愈伤组织的最佳外植体。

关键词:苜蓿;愈伤组织;外植体;6-BA;NAA

中图分类号:S551.704.8

文献标识码:A

文章编号:1001-4330(2007)05-0658-05

Effects of 6-BA and NAA on Different Explants of Cultured Tissues of Alfalfa

XIAO Yan¹, ZHANG Bo¹, FAN Yong-gang^{2,3}, WANG Cai-hong¹, ZHAO Hong-juan¹, WANG Yu-xiang¹

(1. Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology of Xinjiang, College of Pratacultural Science of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011 China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

Abstract: The paper studied effects of seven kinds of medium on induction and growth of callus, using different of explant of *Medicago varia*. cv. Xinmu No.1 and *Medicago sativa* L. cv. Xinjiang Daye, and effects of different concentration of 6-BA (6-Benzylaminopurine) and NAA (1-Naphthylacetic Acid) on induction, differentiation callus. The results are as follows: (1) The concentration of 2~8 mg/L, NAA is benefit to induce callus, if it's concentration was higher, the callus of alfalfa were better. The concentration of 1~3 mg/L, 1mg/L 6-BA is benefit to induce callus, if it's concentration was higher, the callus of alfalfa were worse. (2) MS+2,4-D 2 mg/L+NAA 4 mg/L+6-BA 1 mg/L was the better induction medium of Xinmu No.1. MS+2,4-D 2 mg/L+NAA 8 mg/L+6-BA 1 mg/L was the better induction medium of Xinjiang Daye. (3) Using the explant of hypocotyls, cotyledon and leaves as explants, hypocotyls was the best explant of induction callus medium.

Key words: alfalfa; callus; explants; 6-BA (6-Benzylaminopurine); NAA (1-Naphthylacetic Acid)

苜蓿 (*Medicago sativa*) 是多年生豆科草本植物,是世界公认的优良牧草,受到很多国家的重视^[1]。有关苜蓿不同组织器官的离体再生组织培养已有报道^[2~4],其中添加的植物生长调节剂种类和水平是获得高效再生植株的重要影响因素之一。实验通过研究苜蓿无菌苗的子叶、下胚轴和叶片的愈伤组织培养,探讨其生长过程中不同激素浓度配比对不同外植体的影响,从而筛选出最适的培养基及其最佳的外植体,为进一步研究利用提供参考。

收稿日期:2007-03-12

基金项目:新疆维吾尔自治区科技厅高新技术项目“利用细胞工程技术培育强优势苜蓿单交种的研究”(200511102)

作者简介:肖燕(1982-),女,云南人,硕士研究生,研究方向为牧草育种

通讯作者:张博(1963-),男,甘肃人,副教授,硕士生导师,研究方向为牧草育种,(E-mail)xycyl@xjau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

材料选取国家注册的新牧 1 号杂花苜蓿品种 (*Medicago varia*. cv. Xinmu No.1)、大叶苜蓿 (*Medicago sativa* L. cv. XinJiang Daye) 地方品种, 所有供试种子均为原种, 由新疆农业大学草业工程学院牧草育种与生产教研室提供。

1.2 方 法

1.2.1 外植体来源

将新牧 1 号、新疆大叶苜蓿种子用 75% 的乙醇浸泡 30 s, 在 0.1% HgCl₂ 溶液中浸泡并不断搅拌 10 ~ 15 min, 无菌水冲洗 3 ~ 5 次后, 接种于无激素的 1/2MS 培养基上使其发芽。取 5 ~ 7 d 苗龄的无菌苗下胚轴、子叶和 15d 苗龄的无菌苗叶片, 分别切成 3 ~ 4 mm 长的小段, 接种于 7 种附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 愈伤组织诱导培养基上。表 1

表 1 不同阶段的培养基组合

Table 1 Composition of media in different stage

不同阶段培养基用途 Use of media in different stage	基本成分 Basic composition
无菌苗的形成 Formation of sterility seedlings	1/2MS + 琼脂 Agar + 蔗糖 Sucrose
愈伤组织诱导 Induction of callus	MS + 2,4-D + NAA + 6-BA + 琼脂 Agar + 蔗糖 Sucrose
增殖阶段 Proliferation phase	MS + 2,4-D + NAA + 6-BA + ABA + 琼脂 Agar + 蔗糖 Sucrose
分化阶段 Differentiation phase	MS + NAA + 6-BA + 琼脂 Agar + 蔗糖 Sucrose
	MS + NAA + 6-BA + KT + 琼脂 Agar + 蔗糖 Sucrose
生根阶段 Rooting culture	1/2MS + 琼脂 Agar + 蔗糖 Sucrose

注: ABA: 脱落酸 Abscisic acid, KT: 6-糠氨基嘌呤 6-Furfurylaminopurine, 除分化阶段的琼脂为 0.8%, 蔗糖 4%, 生根阶段的琼脂为 0.7%, 蔗糖 2%, 其他阶段均为 0.7%, 蔗糖 3%

Note: ABA: Abscisic acid, KT: 6-Furfurylaminopurine, agar (except differentiation phase) is 0.8%, sucrose is 4%, agar in rooting period is 0.7%, in other periods, agar is 2%, sucrose is 3%

1.2.2 培养条件

在愈伤组织的诱导和增殖阶段, 将材料置于 (25 ± 2) °C 黑暗条件下培养。分化、生根阶段则转入 16 h/d, 2 000 lx 条件下光照培养。表 2

表 2 不同浓度的 6-BA 和 NAA 配比

Table 2 Different concentration composition of 6-BA and NAA

		培养基编号 No. of medium						
		MS ₁	MS ₂	MS ₃	MS ₄	MS ₅	MS ₆	MS ₇
激素浓度 (mg/L) Phytohormone concentrations	6-BA	1	2	3	1	1	1	1
	NAA	2	2	2	4	8	12	16

注: MS 为基本培养基, 附加 2 mg/L 2,4-D 和以上不同浓度的 6-BA、NAA

Note: MS is basic medium, added 2 mg/L 2,4-D and the above 6-BA, NAA of different concentration composition

2 结果与分析

下胚轴、子叶和叶片在 7 个附加不同浓度激素的诱导培养基上培养 4 周, 下胚轴在第 2 ~ 3 d 首先开始出现愈伤组织并能快速的生长, 子叶在 5 ~ 7 d 出现愈伤组织, 生长较缓慢, 而叶片则需要 7 ~ 10 d 才有愈伤组织的出现, 而且生长很缓慢。3 种不同外植体在 7 个不同诱导培养基上培养均能诱导出愈伤组织, 但生长状况差异显著, 说明不同外植体适宜的激素浓度各不相同。经过 4 周的观察, 在 7 个诱导培养基上选择出最佳的外植体为下胚轴。

2.1 不同培养基对不同外植体形成愈伤组织及其生长的影响

2.1.1 下胚轴在 7 个不同诱导培养基上愈伤组织的生长情况(表 3)

下胚轴在 7 个不同诱导培养基上生长均良好,但品种间的差异明显,如新疆大叶 1 周在 MS₅ 上出愈率高达 92.3%,而新牧 1 号只有 50%。

培养 2~4 周时,两个苜蓿品种的愈伤组织生长迅速发生了明显变化,第 4 周时在 7 个培养基上都能达到出愈率 100%,但生长状态有明显差异。

新牧 1 号愈伤组织在诱导培养基 MS₄ 上的生长良好,明显比新疆大叶要大,而新疆大叶在诱导培养基 MS₅ 上愈伤组织大小明显比新牧 1 号要大。

在第 2~4 周,两品种的愈伤组织在 7 个培养基上表现有区别。在诱导培养基 MS₁、MS₂、MS₃ 上的愈伤组织均呈乳白色、水样状,表面光滑无突起,质地柔软,在 MS₆、MS₇ 上的愈伤组织呈现黄褐色,表面干燥无突起,质地硬实,第 4 周时出现褐化现象,细胞开始死亡。

在诱导培养基 MS₄、MS₅ 上两品种均表现良好,愈伤组织呈黄绿色,表面干爽有大量鱼雷状突起,质地松脆。只是两品种间稍有差异,在 MS₄ 上新牧 1 号优于新疆大叶,而在 MS₅ 上新疆大叶优于新牧 1 号。

由此看出,新牧 1 号的最佳诱导培养基是 MS₄,而新疆大叶的最佳诱导培养基是 MS₅。

表 3 7 个不同诱导培养基对两个苜蓿品种下胚轴愈伤组织诱导及生长的影响

Table 3 Effect of seven kinds of induction media on callus induction and growth of two varieties of hypocotyls of alfalfa

培养基编号 No. of medium	品种 Variety	基因型 Genotype	外植体 Explants	1 周 First week		2 周 Second week		4 周 Forth week	
				出愈率 (%) Callus ratio	愈伤长 (mm) length of callus	出愈率 (%) Callus ratio	愈伤长 (mm) Length of callus	出愈率 (%) Callus ratio	愈伤长(mm) Length of callus
MS ₁	XM	40	200	78	4.83	89	4.96	100	5.51
	DY	40	200	82	4.3	79	4.56	100	4.64
MS ₂	XM	40	200	81.42	4.94	85	5.21	100	5.35
	DY	40	200	86.67	4.63	83	4.8	98	5.0
MS ₃	XM	40	200	54	2.84	88	3.1	100	3.8
	DY	40	200	76	2.95	82	3.11	93	4.16
MS ₄	XM	40	200	94	3.0	100	3.02	100	4.06
	DY	40	200	80	2.62	98	2.94	100	3.78
MS ₅	XM	40	200	50	3.0	76	3.13	100	4.1
	DY	40	200	92.3	3.82	100	4.18	100	5.31
MS ₆	XM	40	200	72	5.56	96.39	5.74	98	6.53
	DY	40	200	80	5.02	99.2	5.22	100	6.05
MS ₇	XM	40	200	68	5.23	83	5.42	97	6.27
	DY	40	200	76	4.96	87.4	5.20	95	5.94

注:XM:新牧 1 号,DY:新疆大叶,下同

Note: Xinmu 1, DY: Xinjiang Daye, The same as below

2.1.2 子叶在 7 个不同诱导培养基上愈伤组织的生长情况

两个苜蓿品种的子叶在 7 个诱导培养基上均能诱导出愈伤组织,经过 4 周观察,新牧 1 号在 MS₁ 上出愈率最高,可达到 92.5%,新疆大叶在 MS₃ 上也能达到 93.75%。在这两种培养基上,两品种的愈伤组织质地都明显优于其它的培养基,颜色鲜亮,且有少量突起物。表 4

表 4 7 个不同诱导培养基对两个苜蓿品种子叶愈伤组织诱导及生长的影响

Table 4 Effect of seven kinds of induction media on callus induction and growth of two varieties of cotyledon of alfalfa

品种	接种数	MS ₁	MS ₂	MS ₃	MS ₄	MS ₅	MS ₆	MS ₇
Variety	Inoculation number of callus	80	80	80	80	80	80	80
XM	出愈率(%)	92.5	80	78	82.5	75	67.5	55
	Callus ratio							
DY	出愈率(%)	66.25	77.5	93.75	85	73.75	48.75	53.75
	Callus ratio							

2.2 不同浓度的激素对两品种愈伤组织诱导、生长及其分化的影响

2.2.1 不同浓度的 6-BA 和 NAA 对两品种愈伤组织诱导及生长的影响

经过对两品种下胚轴诱导愈伤组织诱导及其生长的 4 周观察,在 2~8 mg/L, NAA 有利于苜蓿愈伤组织的诱导,随浓度的增大呈促进作用,而在 1~3 mg/L, 1 mg/L 6-BA 有利于苜蓿愈伤组织的诱导,随浓度的增大呈抑制作用。另外添加适宜的生长素有助于愈伤组织的生长。表 3

2.2.2 不同浓度激素对两品种愈伤组织分化的影响

愈伤组织经过 20 d 的增殖培养后,将其接种到分化培养基上,新疆大叶接种后第 5 d 出现了体胚,新牧 1 号接种后第 10 d 才出现体胚。配合适宜的 6-BA 和 NAA 浓度,体胚的分化率随 KT 浓度的增加而增加,其中以 KT 1.0 mg/L 为最佳,至第 4 周的分化率新牧 1 号为 16.67%,新疆大叶为 34.78%。但在同一品种内的不同基因型个体表现差异明显,新牧 1 号有 2 个基因型、新疆大叶有 5 个基因型表现出较高的体胚发生能力,颜色呈乳白色,表面鲜亮光滑。当 6-BA 为 0.5 mg/L, KT 为 0 mg/L, NAA 为 1.0 mg/L 时,有大量根产生;当 6-BA 为 0.1 mg/L, KT 为 0.5 mg/L, NAA 为 0.5 mg/L 时,愈伤组织膨大,有少量的芽和根;当 6-BA 为 0.1 mg/L, KT 为 0.5 mg/L, NAA 为 1.0 mg/L 时,有大量幼芽的产生。表 5

表 5 不同浓度的激素对两个苜蓿品种愈伤组织分化的影响

Table 5 Effects of different phytohormone concentration on callus differentiation of two varieties of alfalfa

项目 Item	新牧 1 号 Xinmu No.1			新疆大叶 Xinjiang Daye		
6-BA 浓度(mg/L) 6-BA concentration	0.5	0.1	0.1	0.5	0.1	0.1
NAA 浓度(mg/L) NAA concentration	1.0	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5
KT 浓度(mg/L) KT concentration	0	0.5	1.0	0	0.5	1.0
接种数(个) Inoculation number of callus	117	156	180	117	65	69
分化愈伤数(个) Differentiation number of callus	15	12	30	27	14	24
分化率(%) Differentiation ratio	4.27	7.69	16.67	23.08	21.54	34.78

3 结论

3.1 植物组织培养中通常采用的植物生长调节物质主要有细胞生长素和植物细胞分裂素。主要应用的植物生长素有 2,4-D、NAA 和 IAA,在离体培养中主要诱导愈伤组织形成和根的发育。而细胞分裂素主要应用的则是 6-BA、ZT、KT 和 2ip,当生长素与分裂素比值低时,有利于芽的分化,比值均衡时,同时产生茎芽和根或愈伤组织,比值高时,有利于根的诱导^[2]。实验结果证明,当细胞分裂素 6-BA、KT 与生长素 NAA 的比值小时有利于芽的分化。

3.2 在 *Brassica juncea* 和 *B. napus* 进行体胚杂交时,G. Q. Zhang 等^[5]发现在 MS 培养基中添加 0.3 mg/L NAA + 1.5 mg/L 6-BA 和 0.3 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA 能获得最佳的体胚数,在两种培养基上形成愈伤组织和植株再生能力分别能达到 55.43% 和 26.65%, 66.98% 和 24.61%。Y. BAI and R. Qu^[6]在对草坪型酥油草的研究中发现 6-BA 能明显提高愈伤组织的再生能力。另外,6-BA 和 NAA 在提高植物愈伤组织的体胚的发生能力和植株的再生能力上发挥着不可忽视的作用^[7~9]。

3.3 6-BA 和 NAA 的组合在实验中的浓度较适宜下胚轴愈伤组织的培养,并且已获得大量再生植株,子叶及叶片的愈伤组织在分化培养基上逐渐褐化死亡,分化成苗率很低,因此愈伤组织的外植体来源和

培养基成分应十分重视,实验结果将为两个苜蓿品种在突变体植株的诱导育种工作提供重要的理论指导和技术基础。

参考文献:

- [1]刘艳芝,王玉民,邢少辰,等.苜蓿组织培养体细胞发生体系的建立[J].草业科学,2005,23(1):34-36.
- [2]沈海龙.植物组织培养[M].北京:中国林业出版社,2005.
- [3]马海燕,张博,郝兴明,等.新疆苜蓿愈伤组织再生体系建立的研究[J].新疆农业科学,2005,42(1):19-23.
- [4]兰妍,张博,李培英.水解酪蛋白对诱导苜蓿愈伤组织的影响[J].新疆农业大学学报,2006,29(1):87-89.
- [5]G. Q. Zhang, W. J. Zhou, H. H. Gu, et al. Plant Regeneration from the Hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* Through Embryo Culture [J]. *J. Agronomy & Crop Science*, 2003, (189):347-350.
- [6]Y. BAI and R. Qu. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue [J]. *Plant Breeding* 2001, (120):239-242.
- [7]C. R. K. Reddy, G. Raja Krishna Kumar, A. K. Siddhanta, A. Tewari. In Vitro Somatic Embryogenesis and Begeneration of Somatig Embryos From Pigmented Callus of *Kappaphycus Alvarezii* (DOTY) [J]. *J. Phycol*, 2003, (39):610-616.
- [8]N. E. Bohorova, W. H. Peiffer, M. Merogum, et al. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos [J]. *Plant Breeding*, 2001, (120):291-295.
- [9]Dhia S. Hassawi, Jiahua Qi and G. H. LIANG. Effects of Growth Regulator and Genotype on Production of Wheat and Triticale Polyhaploids from Anther Culture [J]. *Plant Breeding*, 1990, (104):40-45.

本刊被《中国学术期刊文摘》收录

《中国学术期刊文摘》创刊于1994年,是我国惟一的综合性科技检索期刊。该刊精心选择了我国最重要的和最有影响的300多种学术期刊作为来源期刊,学科覆盖理、工、农、医和社会科学。主要刊登国家自然科学基金、国家省(部)级基金支持课题论文和综述,有摘要和题录两种形式,年登载论文量约30000篇。刊出时间一般在原始论文发表半年之内。每期附有关键词和作者检索。该刊为月刊,页码400页。