

提高不同苜蓿品种体细胞胚发生潜力的研究

王玉民, 刘艳芝, 于淑梅, 姜 昱, 谭 化, 董英山

(吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘 要: 在本项研究中, 以来自中国东北和内蒙古地区 7 个商业苜蓿品种为材料, 以无菌苗的子叶和叶片作为外植体, 对其体细胞胚发生进行了研究。在我们所用的组织培养程序中, 所有品种均有体外胚发生, 但品种之间形成体细胞胚的能力差别很大。以从子叶和叶片再生植株的叶片为外植体, 体细胞胚发生率明显提高, 7 个品种的平均值分别为 73.01% 和 85.40%。由于体细胞胚诱导效率大大提高, 建议在对再生频率低的优良苜蓿品种进行遗传转化时, 使用再生植株叶片为外植体。

关键词: 苜蓿; 组织培养; 体细胞胚发生; 植株再生

中图分类号: S541

文献标识码: A

Improvement on the Potential of Somatic Embryogenesis in Different Alfalfa Cultivars

WANG Yu-min, LIU Yan-zhi, YU Shu-mei, JIANG Yu, TAN Hua, DONG Ying-shan

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: In this study, the invitro embryogenic responses of seven commercial alfalfa cultivars in the northeast and Inner Mongolia areas of China were tested using cotyledon and leaf as explants. All the cultivars gave positive responses in our tissue culture procedure and the ability of forming somatic embryos varied greatly amongst cultivars. The frequencies of somatic embryogenesis of regenerated plant leaves from both cotyledons and leaves were significantly improved, with a mean of 73.01% and 85.40% respectively. Because of its high efficiency of somatic embryo induction, it is suggested that regenerated plant leaf be used as explants in genetic transformation of alfalfa, especially for the elite cultivars of low regeneration frequency.

Key words: Alfalfa; Tissue culture; Somatic embryogenesis; Plant regeneration

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是世界上最重要的豆科牧草之一。具有饲用价值好(每千克干物质平均含 0.5 个饲料单位)、粗蛋白质含量高(占干物质的 20%左右)及其在生长期不用大量施用 N 肥(具有固 N 根瘤菌)等特点,在畜牧业生产中长期以来发挥着重要作用,被人们冠以“牧草之王”。在中国苜蓿种植面积约为 130 万 hm^2 ,但是苜蓿的遗传改良工作相对滞后,主要研究目标包括增加苜蓿产量,提高抗寒性及抗病虫性。常规育种可以有效改善苜蓿种群,但由于缺少遗传变异,对改

良抗虫性和抗真菌性上效率不高^[1]。利用生物技术手段可以克服这种限制。目前通过基因工程手段已经获得对除草剂的抗性^[2],提高苜蓿的营养价值^[3],提高苜蓿对非生物胁迫耐受能力^[4,5]。研究表明通过遗传转化可以增加有用的遗传变异,但植株再生仍是应用转基因技术的先决条件^[6]。由于大多数苜蓿品种体细胞胚发生率较低,研究表明,如果进行足够的基因型筛选,在任何苜蓿种质资源都可以发现可再生基因型^[7-9]。国外研究人员在筛选高频再生苜蓿品种方面做了大量的工作^[10-15],并将体细胞胚发生性状成功地转移到商业苜蓿品种中^[1,16]。因此,在进行遗传转化之前,应对适应某一地区品种进行体细胞胚发生能力筛选^[17]。

本研究目的是通过组织培养手段,从适应中国东北和内蒙古地区的商业苜蓿品种中筛选出高频再生基因型,提高体细胞胚发生频率,以满足苜蓿遗传转化的要求。

收稿日期: 2008-10-07

作者简介: 王玉民(1968-),男,黑龙江省呼兰县人,吉林省农业科学院研究员,从事大豆分子生物学和苜蓿遗传转化研究。E-mail: wangym@cjaas.com。

通讯作者: 董英山, E-mail: ysdong@263.net。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验选用广泛种植在中国东北和内蒙古地区的 7 个苜蓿品种:公农 1 号,公农 2 号,草原 1 号,草原 2 号,敖汉, 超产苜蓿和龙牧 803,均由吉林省农业科学院草地研究所夏彤博士提供。每个品种取 100 粒种子,浸泡在 0.1%(w/v)的 HgCl₂ 溶液中 30 min,进行消毒;无菌水冲洗 4 次,置于无菌水中 12~24 h,使种子充分吸胀,然后接种在 1/2MS 基本培养基上以获得无菌苗。

1.2 培养基和培养条件

愈伤组织诱导培养基为 MS^[18]附加 2.0 mg/L 2,4-D,0.25 mg/L KT, 2 000 mg/L 水解酪蛋白, 3%蔗糖。体细胞胚发生所用培养基为 MS 培养基附加 0.05 mg/L NAA,0.5 mg/L 6-BA,3%的蔗糖。植株再生培养基为 MS 培养基附加 3%的蔗糖,不添加任何生长调节剂。所有培养基均用 NaOH 将 pH 值调整到 5.6~5.8,并添加 8 g/L 琼脂进行固化,121℃灭菌 20 min。培养室温度控制在 25℃和 16 h 光照。

1.3 外植体的制备和培养

对于第一轮组织培养,每个品种取 10~14 日龄无菌苗子叶 45 个,取 28~30 无菌苗叶片 45 个,15 个外植体接种于一个培养皿作为一次处理,共 3 次重复。每个培养皿都含有 50 mL 培养基,诱导培养 4 周。将愈伤组织转移到体细胞胚诱导培养基,4 周后进行调查并统计不同品种的体细胞胚发生率。

每个品种来自不同的子叶和叶片再生植株中分别选取 5 株,每株上取 3 个三出复叶接种,3 次重复,用于第二轮的愈伤组织诱导和体细胞胚发生。所用培养基、培养时间及调查时间与第一轮组织培养相同。

1.4 统计分析

本研究所有实验均采用 3 次重复,利用 SAS 统计软件^[19](SAS Institute,1989),采用新复极差法(Duncan's Multiple Range Test)对 4 种类型外植体体细胞胚发生率,进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和体细胞胚发生

本实验中 7 个品种子叶和叶片均成功地诱导形成愈伤组织。接种后 5~7 d,外植体开始产生愈伤组织。接种 28 d 后,将愈伤组织转移到体细胞胚发生培养基。10 d 后可以观察到体细胞胚形成(图 1A,1B),胚性愈伤组织不断地产生体细胞胚,而非胚性愈伤组织没有体细胞胚产生。在本实

验中,我们还观察到一些体细胞胚愈伤化,然后产生许多次生胚。此现象已有前人报道^[20]。

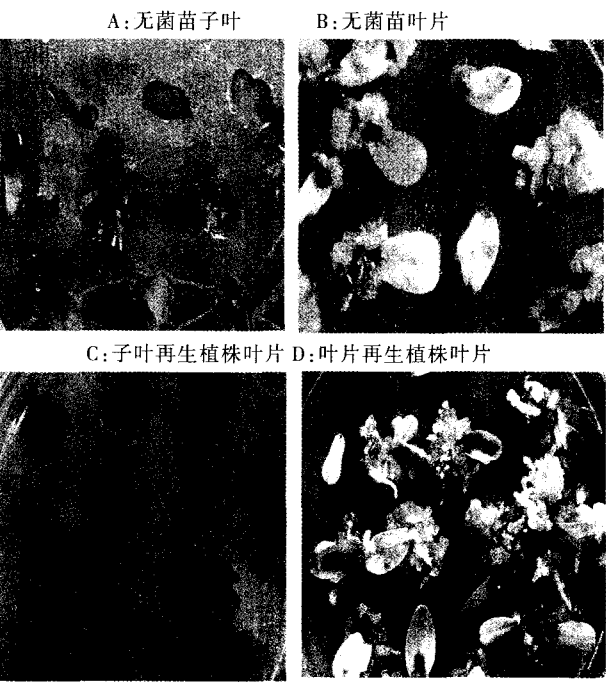


图 1 苜蓿不同外植体体细胞胚发生

2.2 不同品种体细胞胚发生能力

不同品种的体细胞胚发生能力差别很大。这与前人的报道^[7-9]一致。对于子叶外植体,最低的是超产苜蓿,体细胞胚发生率为 12%,最高的是草原 1 号和龙牧 803,其发生率为 34%。对于叶片外植体,最低的是公农 1 号,发生率为 12%,最高的是公农 2 号,发生率为 36%。与已报道的高频再生品种 Regen S^[11]相比,所有这些品种具有较低的体细胞胚发生率。

2.3 再生植株叶片体细胞胚胎发生能力

表 1 不同外植体体细胞胚发生率多重比较结果比较

品种	体细胞胚发生率(%)			
	无菌苗子叶	子叶再生植株叶片	无菌苗叶片	叶片再生植株叶片
公农 1 号	22.22	64.44	13.33	75.56
公农 2 号	17.78	62.22	35.56	93.33
草原 1 号	33.33	88.89	20.00	95.56
草原 2 号	24.44	73.33	17.78	91.11
敖汉	28.89	51.11	26.67	68.89
超产苜蓿	13.33	91.11	22.22	88.89
龙牧 803	35.56	80.00	20.00	84.44
平均数	25.08c	73.01b	22.22c	85.40a

注:相同字母表示的平均数之间差异不显著,P<0.05。

来源于子叶和叶片再生植株叶片的体细胞胚发生率的明显提高(图 1C,1D,表 1)。子叶培养再生植株叶片体细胞胚发生频率为 51.11%(敖汉)至 91.11%(超产苜蓿),平均 73.01%。叶片培养再

生植株叶片的体细胞胚发生率为 68.89%(敖汉)至 95.56%(草原 1 号),平均 85.40%。子叶培养再生植株叶片和叶片培养再生植株叶片的体细胞胚发生率存在着显著差异(表 1)。这种情况的原因可能是,某些基因型在以子叶为外植体时,体细胞胚发生能力较强,而以叶片为外植体时,体细胞胚发生能力较弱,尽管子叶和叶片的体细胞胚发生率差异不显著(表 1)。因此,从苜蓿品种筛选高频再生基因型时,应当使用叶片外植体,以提高体细胞胚发生率。

3 讨 论

在本实验中,第一轮组织培养就像一个筛选过程,具有高潜力再生的基因型通过这一过程得以选择。从理论上来说,再生植株叶片都携带决定其体细胞胚发生能力的基因,这意味着,每一个再生植物叶片都可以产生体细胞胚。然而在本实验中,没有发现全部 3 次重复都获得 100%的体细胞胚发生。部分原因是基因型和培养条件之间的相互作用,但主要原因是每个重复实验中都有极少部分叶片不能诱导形成愈伤组织,因为所有来自再生植株叶片的愈伤组织都能产生体细胞胚。尽管如此,再生植株叶片的体细胞胚发生率已得到很大提高,可以满足遗传转化的需求,这是令人非常鼓舞的结果。

苜蓿体细胞胚发生受多种因素的调控,如培养基的化学成分,外植体来源和其遗传潜力,而基因型和培养基的相互作用是次要的^[7-9,13,14]。Chen, et al.(1987)认为,成熟的叶片产生愈伤组织体细胞胚发生可以通过同一基因型子叶诱导的愈伤组织体细胞胚发生来预测。本研究中,大多数品种子叶外植体体细胞胚发生率(7 个品种的 5 个)均高于叶片外植体的体细胞胚发生率。这表明,子叶外植体的体细胞胚发生和叶片外植体的体细胞胚发生并不总是相关的,有可能存在着外植体和培养程序之间的互作。

参考文献:

- [1] Moltrasio R, Robredo C, Gómez M, Díaz Paleo A, Díaz D, Rios R, Franzone P. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm [J]. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 77(2):119-124.
- [2] D'Halluin K, Botterman J, De Greef W. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions[J]. Crop Science, 1990,30:866-871.
- [3] Schroeder H E, et al. Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1991,18:495-505.
- [4] Mc Kerse B D, Chen Y, De Beus M, Bowley S R, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J, Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Plant Physiology, 1993,103:1155-1163.
- [5] Winicov I, Shirzadegan M. Tissue specific modulation of salt inducible gene expression: Callus versus whole plant response in salt tolerant alfalfa [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100(2): 314-319.
- [6] Hansen G, et al. Recent advances in the transformation of plants[J]. Trends Plant Science. 1999, 4: 226-231
- [7] Brown D C W, Atanassov A. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1985, 4:111-122.
- [8] Chen T H H, et al. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1987, 8:73-81.
- [9] Mitten D H, et al. In-Vitro Regenerative Potential of Alfalfa *Medicago-Sativa* Germ-Plasm Sources [J]. Crop Science, 1984, 24(5): 943-945.
- [10] Saunders J W, et al. Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue [J]. Crop Science, 1972, 12(6): 804-808.
- [11] Bingham E T, et al. Breeding Alfalfa Which Regenerates from Callus Tissue in Culture [J]. Crop Science, 1975, 15 (5): 719-721.
- [12] Oelek M M, Schieder O. Genotypic differences in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants [J]. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, 1983, 91:312-321.
- [13] Nagarajan P, et al. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture [J]. Plant Cell Reports, 1986 (5):77-80.
- [14] Matheson S L, et al. Selection of Regenerative Genotypes from Highly Productive Cultivars of Alfalfa [J]. Euphytica, 1990,45:105-112.
- [15] Romagnoli M V, et al. High frequency somatic embryogenesis with a pampeana-derived genotype of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Euphytica, 1996, 90:89-93.
- [16] Bowley S R, et al. Field evaluation following two cycles of backcross transfer of somatic embryogenesis to commercial alfalfa germplasm [J]. Canadian Journal of Plant Science. 1993, 73(1):131-137.
- [17] Phillips G C. Screening alfalfas adapted to the southwestern United States for regenerator genotypes [J]. In Vitro, 1983, 19:265.
- [18] Murashige T and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15:473-497.
- [19] SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide, Version 9.1 [M]. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2004.
- [20] Won S H, Lee B H. Effect of embryo morphology on plant development in secondary somatic embryogenesis of alfalfa [J]. Journal of the Korean Society of Grassland Science, 1999, 19(4): 297-302.