

紫花苜蓿离体叶片愈伤组织诱导的研究

黄远新, 谭 鹃, 黄玉兰, 冯 超

(西南大学农学与生物科技学院, 重庆 北碚 400716)

摘 要: 以紫花苜蓿田间栽培植株幼叶作为离体诱导的外植体, 培养于 B₅ 培养基附加不同浓度生长素与细胞分裂素的组合中进行愈伤组织诱导试验。结果表明, 2, 4-D 与 KT 组合中, 2, 4-D 浓度高低是决定愈伤组织诱导类型及其分化方向的关键激素, 0.5~2.0 mg/L 低浓度时, 愈伤组织松软、水浸状暗褐色, 培养 25~30 d 后, 从愈伤组织块分化出密集白色毛状根; 4.0~8.0 mg/L 较高浓度时, 则愈伤组织半透明富有光泽, 形成淡黄色的胚性愈伤组织, 培养 35d 后其内层有绿色小芽点的胚状体出现; 2, 4-D 与 6-BA 或 NAA 与 6-BA 组合仅有利于愈伤组织的生长, 其质地较致密、黄绿色, 能继续培养但无分化或胚状体发生的现象。

关键词: 紫花苜蓿; 离体幼叶; 组织培养; 激素组合; 愈伤组织

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1673-8403(2008)06-0001-03

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是一种多年生高蛋白的豆科牧草作物, 具有“牧草之王”的美称; 同时还具有固氮改土、维持生态效益等诸多特点, 这对于我国西部大开发中, 加快牧草业区域规划与布局具有极其重要的意义。目前, 通过组织培养技术、遗传转化技术改良品质、提高抗逆性已经成为紫花苜蓿育种工作中的一条有效途径。国内外学者对紫花苜蓿再生体系的基因型、外植体与培养基及激素等方面进行了广泛的研究, 再生体系研究的外植体大多采用无菌苗下胚轴或子叶, 但对其愈伤组织诱导与体胚分化在不同学者采用相同的激素组合及其浓度下均存在一些差异^[1-9]。紫花苜蓿是同源多倍体异花授粉作物, 单株收获种子理论上讲是一粒种子一种基因型, 即单株群体并不是同质基因型, 因此从试验研究材料的要求上看, 以种子培养获得的无菌苗在基因型的同质性要求方面还有一些不足之处。本试验以田间栽培的紫花苜蓿同质基因型植株的叶片为材料, 探索不同生长素与细胞分裂素浓度组合对诱导愈伤组织类型与形成体胚或分化能力的影响, 以期获得较适于胚状体分化的叶片愈伤组

织的诱导类型, 进一步为建立紫花苜蓿高效再生体系提供技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以无性繁殖的多年生植株为供试材料, 栽培于西南大学试验农场, 由西南大学家畜与牧草研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体准备: 于晴天上午 11:00 左右从田间剪取紫花苜蓿当年生幼嫩枝条, 在自来水龙头下轻轻冲洗 5~10 min 后, 选取倒数 1、2、3 完整的小叶片剪下并放于灭菌杯中, 在超净台上, 按照无菌操作程序对外植体进行常规灭菌。接种时先将消毒后的叶片放于垫有灭菌滤纸的无菌培养皿内吸掉叶片表面的无菌水, 用眼科剪刀或解剖刀切成约 5 mm 见方的小块作为接种外植体, 用镊子轻轻送入到处理培养基表面。

1.2.2 培养基处理: 诱导培养基以 B₅ 为基本培养基, 所附加的生长素和细胞分裂素母液的配制方法是, 生长素 2, 4-D 与 NAA 预先用少量 95% 的乙醇溶解, 细胞分裂素 6-BA 与 KT 预先用少量 1 mol/L 的 HCl 溶解, 分别加蒸馏水定容至 1 mg/ml 的浓度, 用刻度吸管按激素处理浓度吸取到基本培养基中。愈伤组织诱导培养基中的激素种类及其浓度处理见表 1。

收稿日期: 2007-11-28

作者简介: 黄远新 (1966-), 男, 重庆永川人, 西南大学高级实验师, 从事细胞遗传与生物技术研究工作。

表1 诱导愈伤组织各激素浓度处理

激素	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
2, 4-D	0.5	2.0	4.0	6.0	8.0	2.0	4.0	
NAA								3.0
KT	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0			
6-BA						0.5	0.5	0.5

分化培养观察参照黄远新等^[9]所采用的分化培养基对诱导的不同愈伤组织类型观察方法, 即 MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L。愈伤组织诱导时采用随机接种方法, 每处理 5 瓶, 每瓶 3~5 个外植体, 重复 3 次。分化培养时, 按处理分别将诱导的愈伤组织块完整地转接到分化培养基上。

1.2.3 培养室环境条件: 愈伤组织诱导初期采用室内微弱的自然光或散射光, 15~20 d 后转入日光灯下进行培养, 培养室的光照时间 14~16 h/d, 光照强度 3 000~4 000 lx, 温度 25±1℃。

1.2.4 试验观察与分析: 外植体接种后, 每隔 5~7 d 观察诱导的愈伤组织生长速度、质地、色泽变化及其分化培养后的愈伤组织生长变化情况, 并计算其胚性愈伤组织诱导率 (诱导率 (%) = 分化胚性愈伤组织块数 / 转接愈伤组织块数 × 100)。

2 结果与分析

表2 不同生长素与细胞分裂素组合下的愈伤组织诱导类型的观察情况

处理组合	愈伤组织色泽、质地、生长速度
①	愈伤组织从外植体切口向中心发生较慢, 呈暗白色较松软, 表面无光泽, 生长速度缓慢。
②	愈伤组织从外植体切口向中心发生较快, 呈暗白色水浸状, 表面无光泽, 25~30 d 后生长停滞, 分化出密集的水毛状根。
③	愈伤组织从外植体切口向中心发生较快, 呈淡黄白色、松软水平状分布, 25~30 d 后生长速度减缓, 渐变为亮黄色, 有小绿点形成。
④	愈伤组织从外植体切口向中心发生较快, 呈黄白色, 组织半透明、松软, 不完全为水平状分布, 10~25 d 为生长高峰期, 35d 后愈伤组织转为浅黄褐色, 浅内层有间隔小绿点发生, 与周围组织界限清晰。
⑤	愈伤组织从外植体切口向中心发生较快, 呈黄白色, 组织半透明、松软, 不完全为水平状分布, 15~25 d 为生长高峰期, 35d 后愈伤组织转为浅黄褐色, 浅内层间隔出现小绿点, 与周围组织界限较清晰。
⑥	愈伤组织从外植体切口或表面发生, 呈暗黄色至淡绿色, 结构较紧密, 生长速度较慢, 30 d 后生长减缓。
⑦	愈伤组织从外植体切口或表面发生, 呈暗黄色至淡绿色, 结构较紧密, 生长速度较快, 30 d 后生长减缓。
⑧	愈伤组织从外植体切口或表面发生, 呈淡绿色至绿色、结构紧密, 生长速度快, 30 d 后继续生长。

2.2 不同愈伤组织的诱导类型在分化培养基上的生长情况

将各处理诱导的愈伤组织块全部转入分化培养基中, 经过 25 d 的培养观察, 表现出未见分化芽的发生, 只见愈伤组织增殖生长的非胚性愈伤组织仍保持诱导时的状态, 愈伤组织生长速度也不明显, 即原愈伤组织诱导的激素组合是 2, 4-D 与 6-BA 或 NAA 与 6-BA; 而表现出小绿点继续长大, 即胚芽生长明显的胚性愈伤组织, 即原愈伤组织诱导的激素组合是

2.1 不同生长素与细胞分裂素组合对愈伤组织诱导类型的观察

在不同处理中, 叶片外植体均能诱导出愈伤组织, 但接种后 15~25 d 内愈伤组织生长速度、质地色泽情况明显不同, 继续培养至 30~35 d 后愈伤组织有明显不同的生长发育方向, 大致上可以分为两种愈伤组织类型。一是浅绿至绿色致密的愈伤组织类型, 其处理是 2, 4-D 与 6-BA 或 NAA 与 6-BA 的激素组合, 即处理⑥、⑦、⑧中诱导的愈伤组织为浅绿至绿色, 质地较致密或表面呈现坚硬的绿色愈伤组织块, 生长情况也不太一致; 二是黄白色至浅黄褐色松软的愈伤组织类型, 其处理是 2, 4-D 与 KT 的激素组合, 即处理①、②、③、④、⑤中诱导的愈伤组织为黄白色至浅黄褐色愈伤组织, 质地表现为水浸状松软, 扁平分布于培养基表面, 其中处理①、②诱导愈伤组织 30 d 后逐渐失去鲜亮色而变为浅褐色, 从其表面分化出密集的白色毛状根, 而处理③、④、⑤诱导的愈伤组织浅内层有绿色芽点发生, 类似于刘振虎^[9]等人认为的白色粘稠愈伤组织, 与后来通过细胞学观察到的“胚性愈伤组织类型”相吻合, 没有芽点的其余愈伤组织转为浅褐色并停止生长。愈伤组织的不同诱导类型观察情况见表 2。

2, 4-D 与 KT 的③、④、⑤处理, 其中组合④处理的每块愈伤组织形成胚芽数最多, 可达 4~7 个, 诱导率达 85.5% (见表 3)。再经过 25 d 的观察, 非胚性绿色愈伤组织类型表面再次生长出致密的绿色颗粒状组织, 尤以 NAA 与 6-BA 组合诱导的愈伤组织类型在分化培养基上继续增殖, 但仍未发现有分化小芽 (不定芽) 的现象 (见图 1); 根提早分化愈伤组织类型在分化培养基中只见毛状根继续生长的现象, 也未见有分化芽的现象 (即已经失去形成芽的能力); 胚

性愈伤组织类型中诱导出有绿色小芽点的体胚能继续生长,形成明显可见的茎叶和顶芽,且芽点与周围浅褐色的愈伤组织界限分明,可见生长已完全独立于原

来的愈伤组织,很容易剥离出单个胚芽进行下一步单株培养进而直接形成小植株,并建立株系(见图2)。

表3 转接愈伤组织块的分化与生长情况

转接组合	转接愈伤组织块数	非胚性愈伤组织率	胚性愈伤组织率	愈伤组织综合情况
①	68	100.0	—	未见分化,愈伤组织保持诱导时的状态,变化不大
②	65	100.0	—	未见分化,愈伤组织保持诱导时的状态,变化不大
③	70	25.7	74.3	胚芽生长明显,每块愈伤组织形成胚芽2~3个
④	69	14.5	85.5	胚芽生长明显,每块愈伤组织形成胚芽4~7个
⑤	72	16.7	83.3	胚芽生长明显,每块愈伤组织形成胚芽3~5个
⑥	67	100.0	—	未见分化,愈伤组织保持诱导时的状态,可增殖
⑦	71	100.0	—	未见分化,愈伤组织保持诱导时的状态,可增殖
⑧	70	100.0	—	未见分化,愈伤组织保持诱导时的状态,可增殖



图1 非胚性愈伤组织

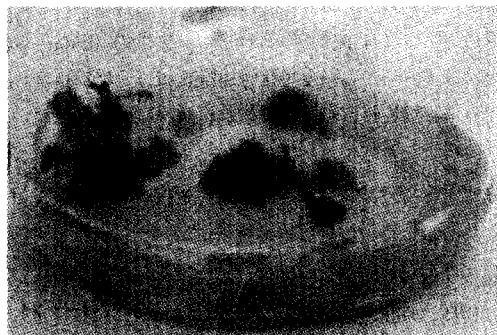


图2 胚性愈伤组织

3 讨论

3.1 诱导愈伤组织类型的关键外源激素组合

在紫花苜蓿愈伤组织的诱导研究中,以前众多学者均采用下胚轴、子叶外植体研究²,4-D、NAA、6-BA、KT等不同激素组合对愈伤组织诱导的影响,但对胚性或非胚性愈伤组织的诱导效应由于不同基因型的差异而存在不同的试验结果^[2,4,7-8]。本试验采用田间栽培植株叶片作为同质基因型的外植体,不同浓度配比的2,4-D、NAA与6-BA、KT的激素组合中,进行系统的对比观察与分析愈伤组织诱导过程中愈伤组织的形成、生长与分化方向的特点。笔者认为,2,4-D与6-BA或NAA与6-BA组合可提高愈伤组织的生长质量,但形成的是非胚性愈伤组织类型;而2,4-D与KT组合有诱导形成胚性愈伤组织的潜力,在适合浓度比下可达到其较高的分化率,并也可达到调控生长发育方向的目的。

3.2 2,4-D浓度高低影响愈伤组织的发育质量

在2,4-D与KT组合试验中,观察表明2,4-D浓度的高低对愈伤组织的分化或发育质量起到关键性的调节效应。试验中,不同的2,4-D浓度诱导的愈伤组织结构形态差异很大,在0.5~2.0 mg/L 较低的范围,其愈伤组织呈现暗白色水浸状,表面无光

泽,生长缓慢,25~30 d后其表层分化出密集的白色毛状根,实质上已经失去了胚的形成能力;当增加至4.0~8.0 mg/L 较高浓度时,其愈伤组织色泽鲜亮、水浸状淡黄色、质地疏软,培养35~40 d后从内层出现绿色小芽点的胚状体,再转移到分化培养基中进行生长观察,发现胚芽数目存在不一致的现象。关于胚性与非胚性细胞在形态上的差别,刘振虎等^[9]认为,体胚形成的早期,胚性化的细胞与周围的细胞界限还不明显,到后期独立性增强,生理上出现相对隔离,有利于形成成熟的体细胞胚及其进一步的发育。笔者认为,以紫花苜蓿离体叶片为外植体诱导形成的胚性愈伤组织是在愈伤组织形成后某一个时间才开始的,较高浓度的2,4-D可能对不同时期愈伤组织的胚性转化发生过程中的内环境条件存在着有差别的保持作用,再者也可能是愈伤组织细胞间激素水平存在梯度效应,从而出现了部分体胚可以进一步成熟和胚芽数目不一致的现象。

参考文献

- [1] Song J, Sorensen E L, Ling G H. Direct embryogenesis from single mesophyll protoplast in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Cell Rep., 1990, (9): 21-25.
- [2] 杨起简, 周末, 孙彦, 等. 紫花苜蓿的愈伤 (下转第10页)

- Journals.2003. 75-80.
- [4] Faineg D T, Hampton J G. Forage seed production (Vol.1). United Kingdom, Cambridge University Press, 1997.
- [5] Hampton JG. Temperate herbage seed production, an overview. Journal of Applied Seed Production. 1991, (9): 2-13.
- [6] 王晓荣, 周禾. 高羊茅不同品种生长初期抗旱性的比较研究[J]. 四川草原, 2001, (4): 25-30.
- [7] 吴佳海, 尚以顺, 牟琼. 高羊茅种子产量与主要农艺性状的通径分析[J]. 种子, 2000, (5): 64-65.
- [8] 王俭珍, 韩建国, 周禾, 等. 6种禾本科牧草种子产量因子与产量的回归模型研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(6): 19-26.
- [9] 韩建国. 牧草种子学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 141-145.
- [10] 韩建国, 李敏, 李枫. 牧草种子生产中的潜在种子产量与实际种子产量[J]. 国外畜牧学——草原与牧草, 1996, (1): 7-11.
- [11] 丁国盛, 李涛. SPSS 统计教程——从研究设计到数据分析[M]. 北京: 机械工业出版社, 2005. 250-258.
- [12] 李志辉, 罗平. SPSS for Windows 统计分析教程[M]. 北京: 电子工业出版社, 2005. 229-242.

Analysis of Seed Yield Components on Varieties of *Festuca arundinacea* L. In SongMing Area

ZHOU Zhen-huan¹, LI Qing-hua¹, YIN Jun², JIANG Long³

(1. Lijiang Livestock and Veterinary Station, Lijiang 674100, China;

2. Yunnan Grassland and Feed Management Section, Kunming 650225, China;

3. Department of Grassland Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Based on correlation and regression analyses about seed yield components of nineteen varieties of *Festuca arundinacea* L., we got a relevant regression model. The results indicated that except for inflorescence length, increasing any seed yield component can increase seed yield; effect of yield components on seed yield was in order of correlation as following: X_2 (florets/shoot) $> X_4$ (shoot) $> X_1$ (inflorescence length) $> X_3$ (spikelets/shoot); The relationship between potential seed yield and harvested seed yield was positive linear correlation.

Key words: *Festuca arundinacea* L.; Seed Yield Components; Potential seed yield; Harvested seed yield; Correlation; Regression Model

(上接第4页)

- 组织诱导及组织培养[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(2): 28-30.
- [3] Ken-ichi Sugino, Tadashi Takamizo. Medium conditions for in vitro selection of Aluminum-tolerant cells of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Journal of Japanese Society of Grassland Science, 1991, 37(1): 157-168.
- [4] 张万军, 王涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因素的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1579-1583.
- [5] 李望丰, 吕德扬, 刘艳芝, 等. 诱导苜蓿胚性愈伤组织分化和再生[J]. 吉林农业科学, 2002, 27(2): 15-16.
- [6] 黄远新, 王永雄, 胡艳. 南方紫花苜蓿不同外植体离体培养研究[J]. 中国草地, 2003, 25(3): 42-47.
- [7] 王凭青, 周兴龙, 杨青, 等. 紫花苜蓿高频再生组织培养体系建立[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2005, 28(2): 132-136.
- [8] 刘艳芝, 王玉民, 邢少辰, 等. 苜蓿组织培养体细胞胚发生体系的建立[J]. 草业科学, 2005, 23(1): 34-36.
- [9] 刘振虎, 卢欣石, 葛军. 紫花苜蓿愈伤组织及体细胞胚的细胞学观察[J]. 草业科学, 2005, 22(2): 37-40.

Callus Induction of Leaf of Alfalfa in Vitro

HUANG Yuan-xin, TAN Juan, HUANG Yu-lan, FENG Chao

(College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The young leaves of Alfalfa (*Medicago sativa*) on field were used as explants and cultured on B₅ media supplemented with different combinations of hormone for callus induction. The results showed that 2, 4-D was important hormone for the types of callus and direction of differentiation under the combination of 2, 4-D and KT in the media, when the concentration of 2, 4-D was 0.5~2.0 mg/L, the callus was loose, waterlogging with dark brown, and only differentiated adventitious root in it after being cultured for 25~30 days. When the concentration of 2, 4-D reached 4.0~8.0 mg/L, the callus was lustrous translucency with thin yellow, and the embryonic callus with small bud from inner callus emerged after being cultured for 35 days. Although the combination of 2, 4-D and 6-BA or NAA and 6-BA in the media could benefit to the growth of callus, which was much thicker with yellow-green, the differentiation and somatic embryos of callus didn't occur if keeping in it.

Key words: Alfalfa; Young leaf in vitro; Tissue culture; Combination of hormone; Callus