维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:1673-5021(2008)02-0043-04

紫花苜蓿组织培养再生体系的建立

苏玉春,韩微微,陈 光

(吉林农业大学生命科学学院,吉林 长春 130118)

摘要:以紫花苜蓿无菌苗的下胚轴、子叶、叶片和叶柄为外植体,研究了不同培养基、不同激素种类和配比对胚性愈伤组织诱导的影响以及不同分化培养基对胚状体分化的影响。结果表明:下胚轴外植体胚性愈伤组织诱导率最高;最佳胚性愈伤组织诱导培养基为改良SH+2.0mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA;最佳胚状体诱导培养基为MSO+2.0 mg/L 6-BA +0.5mg/L NAA;成苗培养基为1/2 MS+1% 蔗糖+0.7%琼脂。

关键词:紫花苜蓿;组织培养;胚性愈伤组织;胚状体

中图分类号:Q813.1 **文献标识码**:A

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)产量高,营养丰富,能形成固氮菌,是改土固氮的重要轮作作物和家畜的优良牧草。然而,随着生态环境的恶化,现有的苜蓿品种已不能满足草地畜牧业日益增加的需要,需培育大量的抗逆性紫花苜蓿新品种[1]。借助转基因技术提高苜蓿抗逆性是育种的重要途径之一,建立一个好的受体系统是实现基因转化的先决条件。本研究采用农艺性状优良的紫花苜蓿种子进行了愈伤组织诱导及植株再生试验,以期为实现外源基因的高效遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

紫花苜蓿品种为公农1号(*Medicago sativa* cv. Gongnong No. 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌苗的培养

选取饱满的种子在流水下冲洗30min,75%的酒精振荡30~60s,放入0.1%氯化汞溶液中消毒8~15min,再用无菌水冲洗5遍,灭菌滤纸吸干水分,接种到1/2 MS培养基上,蔗糖浓度3.0%,琼脂0.7%,pH值为5.8。

1.2.2 培养条件

温度25±2℃,光周期16h,光照强度1000~2000lx。愈伤组织诱导暗培养20d,光照10d。

1.2.3 胚性愈伤组织诱导中的培养基、外植体、激素种类及浓度配比

取萌发5d后无菌苗的子叶(横切成两半)、下胚轴(5mm)和萌发10d后无菌苗的叶片[5~8(mm)^2]、叶柄(5mm)分别接种到附加2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA的MS、MSO、SH、改良MS和改良SH共5种愈伤组织诱导培养基中,每种外植体接种20瓶,每瓶接种5个外植体,各处理均在30d后统计愈伤组织诱导率。

在筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基和外植体的基础上,再设立不同的激素浓度配比。首先将下胚轴接种于附加不同浓度2,4-D的改良SH+0.5 mg/L 6-BA培养基中,选择最适宜的2,4-D浓度;再将下胚轴接种于添加不同浓度6-BA和KT以及2.0 mg/L 2,4-D的改良SH培养基中,以不添加细胞分裂素为对照(表1),各处理均在30d后统计胚性愈伤组织诱导率。

表1 各处理激素添加浓度

Table 1 The concentration of hormone in different treatments

培养基编号 Culture medium No.	激素 Hormone concentration (mg/L)		
	2,4-D	KT	6-BA
CK	2.0	—	—
S1	2.0	—	0.1
S2	2.0	—	0.3
S3	2.0	—	0.5
S4	2.0	—	0.7
S5	2.0	1.0	—
S6	2.0	1.5	—
S7	2.0	2.0	—
S8	2.0	2.5	—

1.2.4 愈伤组织的继代培养

继代培养基成分为改良SH+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA,每15d继代培养1次。

收稿日期:2007-10-23;**修回日期**:2008-01-28

基金项目:教育部生物反应器与药物开发工程研究中心培育项目"木聚糖酶基因导入苜蓿中的遗传转化研究"

作者简介:苏玉春(1977-),女,吉林人,讲师,在读博士,主要从事生物制药的教学和科研工作.

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.5 胚状体诱导及分化

将诱导出的胚性愈伤组织分别转入添加2.0 mg/L 6－BA＋0.5 mg/L NAA的不同胚状体分化培养基(MS、SH、改良MS、改良SH、MSO)中进行胚状体的培养，蔗糖浓度2.0%，琼脂浓度0.7%，pH值为5.8，选择最佳的胚状体诱导、分化培养基，培养30d后统计胚状体的分化率。

1.2.6 生根培养

将无根小苗(2～3cm高)在节间下部1mm处切下，移入生根培养基(1/2 MS＋1%蔗糖＋0.7%琼脂)。

1.2.7 生长发育

当试管苗出现三条根，长约1cm时移栽。先打开瓶盖，经2～3d炼苗后移入花盆，用烧杯罩住，保持湿度，每天打开几次以利于通气。成活后移去烧杯，使其自然生长。

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导

2.1.1 外植体对愈伤组织诱导的影响

外植体的选择是制备愈伤组织的重要步骤，从试验结果看(表2)，下胚轴的愈伤组织诱导率相对高于其他三种外植体，说明下胚轴具有很强的分化能力；愈伤组织形成速度是下胚轴＞子叶＞叶柄＞叶片，但在后续试验中发现，这种形成愈伤组织时间上的差异并未影响胚状体发生的时间。根据试验结果，在以后的试验中将下胚轴作为组培体系的外植体材料。

2.1.2 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基成分很大程度上影响着愈伤组织的诱导。本试验的五种基本培养基上出现了三种类型的愈伤组织：Ⅰ型为白色，水浸状，松软粘连、无组织结构、生长迅速；Ⅱ型为浅黄色，有致密紧实的绿色内核，表面有突起；Ⅲ型为绿色，表面有细小突出颗粒，无组织结构，干燥易脆。五种基本培养基对愈伤组织的诱导差异很大，MS和SH两种培养基诱导出的愈伤组织为Ⅰ型，改良MS诱导出的愈伤组织为Ⅲ型，这两种愈伤组织转至胚状体诱导培养基中均无胚状体产生，是非胚性愈伤组织。改良SH和MSO培养基诱导出的愈伤组织为Ⅱ型，转入胚状体诱导培养基后能产生大量的胚状体，是胚性愈伤组织，且改良SH培养基的诱导率大于MSO培养基。因此，本试验中改良SH培养基为最佳胚性愈伤组织诱导培养基，其愈伤组织浅黄色，有致密紧实的绿色内核，表面有突起，如图1(a)所示。

表2 外植体、培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effect of different explants, culture medium on callus induction

培养基 Culture medium	接种数 Inoculation number	外植体的愈伤组织诱导率(%) Callus induction ratio of explant			
		下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	叶片 Laminae	叶柄 Leaf stalk
MS	100	63	61	57	58
SH	100	79	76	71	74
改良MS	100	85	84	78	80
改良SH	100	98	92	82	86
MSO	100	92	80	76	79

2.1.3 2,4－D浓度对愈伤组织诱导的影响

在愈伤组织诱导阶段，不同的2,4－D浓度诱导的愈伤组织形态、结构差异很大。2,4－D浓度为0时没有愈伤组织发生，且有根生成；在0～2.0 mg/L 2,4－D浓度范围内产生的愈伤组织呈雪花形松散状，基本上没有分化能力；在2.0～4.0 mg/L 2,4－D浓度范围内产生的愈伤组织呈浆糊状，基本上能萌发出胚状体。由表3可以看出，2.0mg/L为2,4－D的最适添加浓度。

表3 2,4－D浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 3 The effect of 2,4－D concentration of on callus induction

2.4－D (mg/L)	外植体接种数(块) Inoculation number of explant piece	愈伤诱导率(%) induction ratio
0	100	0
0.5	100	40
1.0	100	56
1.5	100	78
2.0	100	100
2.5	100	96
3.0	100	89
3.5	100	75
4.0	100	69

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1.4　不同细胞分裂素种类及其浓度配比对胚性愈伤组织诱导的影响

在紫花苜蓿胚性愈伤组织诱导过程中，细胞分裂素对胚性愈伤组织的诱导起主要作用。各处理胚性愈伤诱导率与对照相比均有不同程度的提高，表明细胞分裂素有利于胚性愈伤组织的诱导。在添加 KT 的各处理中，胚性愈伤诱导率随 KT 浓度的增加呈现先升高后降低的趋势，当 KT 浓度为 2.0 mg/L 时，胚性愈伤诱导率达到最大值，表明 2.0 mg/L 为 KT 添加的最适浓度；在添加 6－BA 的各处理中，随着 6－BA 浓度的增加，胚性愈伤诱导率也有所提高，当 6－BA 浓度为 0.5 mg/L时诱导率达到最大值，说明 0.5mg/L 为 6－BA的最适浓度。试验中还发现 2.0mg/L 的 KT 要比 0.5mg/L 的 6－BA 诱导效果要好。

表 4　不同细胞分裂素对胚性愈伤组织诱导的影响

Table 4　The effect of different cytokinin on embryogenic callus induction

培养基编号 Culture medium No.	接种数(块) Inoculation number(piece)	诱导率(%) Induction ratio
CK	100	5
S1	100	9
S2	100	17
S3	100	29
S4	100	16
S5	100	11
S6	100	23
S7	100	31
S8	100	18

2.2　愈伤组织的继代培养

在愈伤组织的继代培养中，逐渐降低 2,4－D 的浓度可使愈伤组织保持较好的胚性能力，在继代的过程中有少量可直接产生胚状体。试验表明，一般经 2 次继代就可以转入分化培养基中，若继代次数增多则不利于愈伤组织的分化。

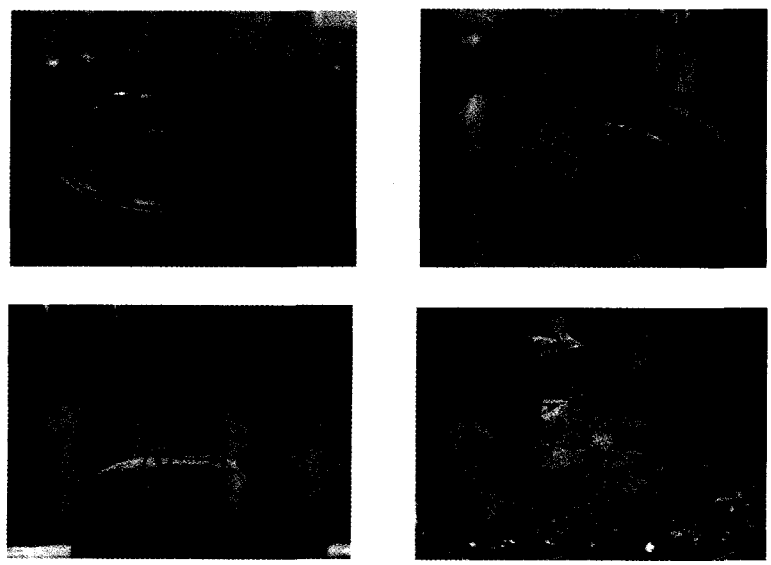
表 5　不同培养基对胚状体诱导的影响

Table 5 The effect of different media on embryoid induction

培养基 Culture medium	愈伤组织接种数(块) Inoculation number of callus(piece)	诱导率(%) Introduction ratio
MS	50	2
SH	50	12
改良 MS	50	16
改良 SH	50	26
MSO	50	32

2.3　不同培养基对胚状体分化的影响

5 种培养基均能诱导产生胚状体，MSO 培养基的诱导率(32%)显著高于其他培养基的诱导率，说明不同培养基对胚状体的诱导能力是不同的。试验选取 MSO 培养基作为胚状体诱导培养基，图 1(b)为发育成熟的体胚。将无根的小苗移入生根培养基，图 1(c)为体胚再生植株，当试管苗出现三条根、长约 1cm 时移栽，炼苗，移入花盆，如图 1(d)所示。



a. 发育好的愈伤组织；b. 发育成熟的体胚；c. 体胚再生植株；d. 再生苗移栽

a. Callus upgrowth; b. Mature embryoid; c. Aftergrowth embryoid; d. Aftergowth transplant

图 1　紫花苜蓿组织培养再生体系

Fig. 1　Establishment of regeneration system of alfalfa

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

3.1 胚性愈伤组织的诱导

3.1.1 不同外植体对胚性愈伤组织的诱导

植株不同器官和部位的生理状态和再生能力之间存在着明显的差别，不同外植体的选择必将导致胚性愈伤组织及体细胞胚形成和发育能力的差异[2]。资料表明[3,4]，下胚轴是紫花苜蓿胚性愈伤组织诱导的最佳外植体。徐恒[5]利用下胚轴、嫩茎、子叶和根做外植体最终诱导的胚性愈伤组织也都表现出同样的形态。本文对紫花苜蓿不同外植体的胚性愈伤组织诱导的试验结果与其它文献报道一致[6]。

3.1.2 不同培养基对胚性愈伤组织的诱导

在本试验所使用的相同激素浓度配比的五种愈伤组织诱导培养基中，改良SH培养基的愈伤组织诱导率高于其他培养基且诱导出的愈伤组织是胚性的。这五种培养基诱导出的愈伤组织形态、结构差异很大，与文献报道有差异[7~9]，具体原因有待于进一步研究。

3.1.3 不同浓度激素对胚性愈伤组织的诱导

自然情况下一些植物细胞再生比较困难是由于内源激素调整缓慢或不完全，外界条件不易控制等因素所致[10]。研究中发现生长素2,4－D对产生体细胞胚的作用最大，其浓度2.0 mg/L对胚性愈伤组织的诱导效果最好。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。

3.2 胚状体的诱导及分化

在胚状体诱导及分化过程中，不同培养基差异比较明显，MSO和改良SH培养基诱导率较高。在实验中，将胚性愈伤组织转接到胚状体诱导培养基上培养一段时间后，会出现浆糊状浅黄色的胚状体，其上镶嵌着许多绿色小颗粒，后发育成单个的植株。当成团状的胚状体长得较大时将其分割培养有利于体胚分化，同时不断继代，防止褐化。

参考文献(References)：

[1] 黄远新，玉永雄，胡燕．南方紫花苜蓿不同外植体离体培养的研究[J]．中国草地，2003，25(3)：42-47.
Huang Yuanxin, Yu Yongxiong, Hu Yan. Tissue culture of different explants of alfalfa cultivated in southern China in vitro [J]. *Grassland of China*, 2003, 25(3): 42-47.

[2] Margareta Dijak. Donor tissue and culture condition effects on mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*, 1987, 9: 217-228.

[3] 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.

[4] 杨广东，朱祯，李燕娥，朱祝军．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.
Yang Guangdong, Zhu Zhen, Li Yane, Zhu Zhujun. Establishment of high-efficient genetic transformation system in chinese cabbage [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2002, 10 (2): 127-132.

[5] 徐恒，黎万奎，谢志健，吴炼，张旭，周宇．苜蓿愈伤组织诱导及GUS基因瞬时表达[J]．四川大学学报(自然科学版)，2001，38(6)：905-908.
Xu Heng, Li Wangkui, Xie Zhijian, Wu Lian, Zhang Xu, Zhou Yu. Inducing of alfalfa calli and transient expression of GUS gene in calli [J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2001, 38(6): 905-908.

[6] 梁慧敏，黄剑，夏阳，王太明，孙仲序，李小玉．苜蓿组织培养高频率再生体系的建立[J]．农业生物技术学报，2003，11(3)：321-322.
Liang Huimin, Huang Jian, Xia Yang, Wang Taiming, Sun Zhongxu, Li Xiaoyu. Establishment of high frequency regeneration system for tissue culture of alfalfa [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(3): 321-322.

[7] Thomas a Skokut, Jill Manchester, Jacob Schaefer. Regeneration in alfalfa tissue culture [J]. *Plant Physiol.*, 1985, 79: 579-583.

[8] 刘艳芝，王玉民，邢少辰，王中伟，董英山．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.
Liu Yanzhi, Wang Yumin, Xing Shaochen, Wang Zhongwei, Dong Yingshan. Establishment of alfalfa somatic embryogenesis system from tissue culture [J]. *Pratacultural Science*, 2005, 23(1): 34-36.

[9] 祝建波，朱先灿，崔燕，周鹏．杂花苜蓿高效再生体系的建立[J]．作物杂志，2006，(5)：14-17.
Zhu Jianbo, Zhu Xiancan, Cui Yan, Zhou Peng. Establishment of high frequency regeneration system in alfalfa [J]. *Crops*, 2006, (5): 14-17.

[10] 钱瑾，刘发央，谢小冬，贾彪．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.
Qian Jin, Liu Fayang, Xie Xiaodong, Jia Biao. Establishment of high frequency regeneration system in alfalfa [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2007, 42(1): 77-81.

(下转第53页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Allelopathy Effect of Extracts from *Artemisia frigida* Willd. on Some Feeding Plants

WANG Yu-zhi[1,2], ZHANG Ru-min[2], GAO Yan[2]

(1. *Agronomy College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010019, *China*;
2. *School of Forestry and Bio-technology, Zhejiang Forestry University. Linan* 311300, *China*)

Abstract: The allelopathy effect of aqueous extract and 50% methanol extract from *A. frigida* Willd. on the germination and seedling growth of *Sorghum sudanense* Piper, *Melilotus officinalis* Lam., *Medicago sativa* L. cv. Aergangjin, *Medicago sativa* L. cv. Zhungeer and *Astagalrus adsurgens* Pall. was assessed by bioassay. The results showed that the germination rate of test plants decreased with the increased concentration of aqueous extracts from *A. frigida* Willd. Treated with 5 mg/ml aqueous extract, the germination rate of the five plants decreased by 3.9%、7.1%、3.6%、5.9% and 1.8% respectively; aqueous extract from *A. frigida* Willd. controlled the germ length and radicle length by affecting accumulation and distribution of nutritive substances of the young seedlings at germination stage, and the growth quantity of the plumule decreased by 1.5%、8.3%、14.2%、13.0% and 3.6% respectively, and the growth quantity of the radicle decreased by 1.0%、4.8%、18.5%、30.7% and 4.7% respectively; the inhibitory effect of methanol extract from *A. frigida* Willd. on the germination and seedling growth of tested plants is in the same condition.

Key words: *Artemisia frigida* Willd.; Allelopathy; Aqueous extract; Methanol extract

(上接第 46 页)

Study on Establishment of Regeneration System of Alfalfa

SU Yu-chun, HAN Wei-wei, CHEN Guang

(*College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118, *China*)

Abstract: The hypocotyl, cotyledon, leaf and petiole of alfalfa were used to study the effect of different mediums, hormones in different concentrations on embryogenic callus induction and the effect of different mediums on embryoid differentiation. The results indicated that the hypocotyl embryogenic callus induction rate was the highest; the best medium for embryogenic callus induction was the modified SH + 2,4－D 2.0 mg/L + 6－BA 0.5 mg/L, the best medium for embryoid induction was MSO + 2.0mg/L 6－BA + 0.5 mg/L NAA; the best medium for plant development was 1/2MS + 1% sucrose + 0.7% agar.

Key words: Alfalfa; Tissue culture; Embryogenic callus; Embryoid