

苜蓿组织培养体细胞胚发生体系的建立

刘艳芝, 王玉民, 邢少辰, 王中伟, 董英山

(吉林省农科院生物技术研究中心, 吉林 公主岭 136100)

摘要:采用17个农艺性状优良的苜蓿 *Medicago sativa* 丰产品种, 诱导体细胞胚发生, 结果表明: 苜蓿无菌苗子叶在含有2.0 mg/L 2,4-D和0.25 mg/L KT的MS培养基(有机物质有改变)上诱导出愈伤组织; 愈伤组织在含有0.05 mg/L NAA和0.5 mg/L 6-BA的MS培养基上形成胚性愈伤组织, 并伴随着体细胞胚的发生; 发育到子叶期的体细胞胚在不加任何激素的MS培养基上就可以萌发, 再生成完整植株。

关键词:苜蓿; 愈伤组织; 体细胞胚; 再生植株

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2006)01-0034-03

建立一个好的受体系统是实现基因转化的先决条件, 关系到基因转化的成败, 而受体系统的建立主要依赖于植物组织培养技术。植物组织培养再生途径有2种, 一种是器官发生途径, 另一种是胚胎发生途径。体细胞胚的发生是指二倍体或单倍体细胞在未经性细胞融合的情况下, 模拟有性合子胚发生的各个阶段而发育形成一个新个体的形态发生过程。经体细胞胚发生的在形态结构和功能上类似有性胚的结构称之为胚状体, 它们可以像有性胚那样发育成完整的植株。体细胞胚发生不仅具有普遍性^[1], 而且具有数量多、速度快、结构完整的特点^[2], 是最为理想的基因转化受体系统。建立高效的体细胞胚发生体系可为高等植物在细胞水平上进行遗传操作及品种改良提供有效途径^[3,4]。

苜蓿 *Medicago sativa* 是豆科多年生草本植物, 是世界公认的优良牧草, 受到很多国家的重视。在发达国家, 转基因技术已经被广泛用于苜蓿研究的许多领域, 并在苜蓿抗性育种、减少膨胀病危害、提高干物质消化率、生物可降解材料开发、生物土壤改良、生物疫苗及活性制剂等方面取得了进展和突破。我国在苜蓿转基因研究方面进展不是很快, 其原因是起步较晚、尚不完善的组织培养体系成为主要的制约因素。为此采用17个农艺性状优良的紫花苜蓿丰产品种, 诱导体细胞胚发生, 直至获得再生植株, 建立了1个适应范围较为广泛, 并具有可重复性的再生体系, 为实现外

源基因的高效遗传转化奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织的诱导 苜蓿种子经常规灭菌后接种于不含激素的MS培养基上, 1周后取无菌苗子叶作为外植体, 子叶近轴面向上, 接种于MS + 2,4-D 2 mg/L + KT 0.25 mg/L + 水解酪蛋白 2 000 mg/L的诱导培养基上。培养温度为(25±1)℃, 每天光照16 h, 光照强度1 500 lx。培养8 d左右, 愈伤组织从叶柄处形成, 2周后几乎整个外植体都愈伤组织化。

1.2 胚性愈伤组织的获得 将整块的愈伤组织转移到MS + NAA 0.05 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L培养基上, 逐渐地有黄色的颗粒状愈伤组织出现, 2周后出现大量的胚性愈伤组织。

1.3 体细胞胚发生与萌发 挑取颗粒状的胚性愈伤组织转移到MS + NAA 0.05 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L培养基上, 10 d左右逐渐地出现绿色的簇状胚状体。将胚状体进行快速干燥处理, 然后转入无激素的MS培养基中, 1周即可萌发成完整的植株。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的形成 苜蓿无菌苗子叶在诱

收稿日期: 2004-11-21

作者简介: 刘艳芝(1964-), 女, 吉林公主岭人, 副研究员, 主要从事牧草及草坪草转基因研究。

E-mail: liuyz_g@yahoo.com.cn

通讯作者: 董英山 E-mail: ysdong@cjaas.com

导培养基上培养 2 周,即可形成大量的淡黄色、疏松的愈伤组织。17 个品种全部都可以诱导出愈伤组织,诱导率均为 100%,且在这一阶段各品种的愈伤组织形态差别不大。不同的外植体在初期诱导形成的愈伤组织类型有明显的不同,而外植体最初形成的愈伤组织形态类型能够影响后期胚状体的产生。宫相忠^[5]利用无菌苗下胚轴诱导出的初期愈伤组织为白色、疏松状,是典型的非胚性愈伤组织;李望丰^[6]从无菌苗根诱导出的愈伤组织呈粘稠浆糊状,最后结果是产生少量的胚状体;梁慧敏^[7]对诱导出的愈伤组织进行了分类。I 型为浅黄色,表面有不规则的突起,松软粘连、无组织结构、生长迅速;II 型为白色至浅黄色,有致密紧实的绿色内核,表面有突起;III 型为浅黄色,表面为细小突出颗粒,无组织结构,干燥易碎。其中 I 型和 III 型不能产生胚状体,II 型愈伤组织在继代中有极少量可直接产生胚状体,转入胚状体诱导培养基后能产生胚状体。笔者得到的愈伤组织与 III 型非常相似,但结果却不同,获得大量的胚状体可能是由于后来继代培养基的激素调控所导致的。

2.2 胚性愈伤组织的获得 将诱导出的愈伤组织全部转移到去除 2,4-D、附加 6-BA 的培养基上,部分愈伤组织逐渐出现黄色的、颗粒状结构,甚至整块都呈现颗粒状的松散形态,同时还伴随着绿色胚状体的出现。徐恒^[8]利用下胚轴、嫩茎、子叶和根作外植体最终诱导的胚性愈伤组织也都表现出同样的形态。试验的 17 个品种都获得了胚性愈伤组织,诱导率最高为 78%,最低为 6.7%。不能形成胚性愈伤组织的愈伤组织有的仍然快速生长,有的几乎停止生长,并逐渐褐化,这 2 种状态的愈伤组织最后都没能产生胚状体。为此认为,培养基中的 2,4-D 和 6-BA 在愈伤组织中,只有达到一个最佳的平衡状态,才能诱导产生胚性愈伤组织,如果 2,4-D 在愈伤组织中过多积累就导致了细胞生长势大于细胞分裂势,从而使非胚性细胞大量增殖;反之 2,4-D 积累的水平不够,也不能与 6-BA 共同在愈伤组织内产生良好的协同作用,诱导出胚状体。张万军^[9]在试验中也发现,苜蓿体细胞胚发生是 2,4-D 和 KT 协同作用的结果。

2.3 胚状体的产生与萌发 挑取颗粒状的胚性愈伤组织转移到减低 6-BA 浓度的培养基上,在愈伤组织表面很快产生胚状体。因为胚状体是持续不断地产生,因此能看到各个发育阶段的胚状体,最多的是球形胚和簇状的子叶胚,每簇有胚状体 20~30 个。将发育到子叶期的胚状体进行快速的干燥处理,然后转入去除激素的 MS 培养基中,胚状体 1 周左右即可萌发,形成完整植株。当植株长至 5~6 cm 高,有 3~5 条根时,即可练苗移栽,移栽成活率达 95% 以上。分析萌发率和移栽成活率都较高的原因,是体细胞胚具有良好的极性,体细胞胚发生的植株具有较高程度的完整性。

3 讨论

3.1 在苜蓿体细胞胚发生时,胚状体大部分出现在愈伤组织的表面,也有少部分出现在愈伤组织的内部。贺晓^[10]对发生过程进行了观察,发现苜蓿体细胞胚是起源于愈伤组织中的一些胚性细胞,这些细胞或成群发生于愈伤组织表面,或单个发生于愈伤组织深处。宫相忠^[5]的观察结果也证实苜蓿体细胞胚的发生是起源于单个的胚性细胞,至于体细胞胚与其发生的位置究竟有什么必然联系,还没有很好的解释。

3.2 苜蓿体细胞胚发生是一个持续的过程,胚性愈伤组织可长期保持发生潜力。梁慧敏^[11]在试验中连续 8 次继代保持了稳定的胚状体分化能力。在该试验中诱导获得的胚性愈伤组织已经保持 1 年多,仍然可再生植株。在试验中还发现次生胚现象,就是在一些发育畸形的胚状体上出现大量新的胚状体,且发生率很高,分离后可正常萌发,获得再生植株。梁慧敏^[7]也在试验中发现了次生胚的形成,并且发生周期短、数量大,认为它也可以作为很好的转化受体。

3.3 以胚性愈伤组织或胚状体进行外源基因转化,其优点是胚性组织生长迅速,细胞处于旺盛的分裂状态,更有利于接受外源基因。苜蓿体细胞胚发生体系作为转基因受体系统,除具有上述优点外,还因为苜蓿无论是哪一种体细胞胚发生形式,都表现出再生频率高、周期短的特点,并且再生基因型范围也较为广泛,因此是转基因的首选受体系统^[12]。

参考文献:

- [1] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京:人民教育出版社, 1982. 236-247.
- [2] 朱澄. 植物组织培养中的胚状体[J]. 遗传学报, 1978, 5(1): 79-88.
- [3] Amirato P V. Embryogenesis, Handbook of plant cell culture[M]. New York: Macmillan, 1983. 82-123.
- [4] Mariotti D, Arcioni S. Callus culture of *Coronilla varia* L. [J]. Plant cell tissue organ culture, 1983, (2): 103-110.
- [5] 宫相忠, 黄健. 苜蓿组织培养体细胞胚发生的细胞学观察[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(4): 504-508.
- [6] 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, 21.
- [7] 梁慧敏, 黄剑, 夏阳, 等. 苜蓿外植体再生系统的建立研究[J]. 中国草地, 2003, 25(4): 8-14.
- [8] 徐恒, 黎万奎, 谢志健, 等. 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.
- [9] 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子的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1579-1583.
- [10] 贺晓, 慈忠玲, 孔繁敏. 紫花苜蓿体细胞胚胎发生及其细胞组织学观察[J]. 内蒙古林学院学报(自然科学版), 1999, 21(2): 44-48.
- [11] 梁慧敏, 黄剑, 夏阳, 等. 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.
- [12] 李波, 白庆武, 马兰, 等. 苜蓿抗性变异细胞系筛选[J]. 草业科学, 2003, 20(4): 5-9.

Establishment of alfalfa somatic embryogenesis system from tissue culture

LIU Yan-zhi, WANG Yu-min, XING Shao-chen, WANG Zhong-wei, DONG Ying-shan

(Biotechnological Research Centre, Jilin Academy of Agricultural Sciences,

Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Callus were induced from seedling cotyledon of alfalfa on MS medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 0.25 mg/L KT. Embryogenic callus accompanying somatic embryogenesis formed on MS containing 0.05 mg/L NAA and 0.5 mg/L 6-BA. Somatic embryos germinated on MS basal medium free of plant growth regulators developed into plantlet.

Key words: alfalfa; callus; somatic embryogenesis; plant regeneration

大米草有望变害为宝

外来入侵物种大米草有望变害为宝,成为清洁的生物能源。2005年底,由山东大学等单位完成的大米草气、电、热三联供技术研究课题已通过项目鉴定。

该项目采用热解气化技术,用大米草生产可燃气体用于炊事、发电、供热等。据项目示范工程专家组副组长黄寿祺介绍,该项目采用热解气化技术,将大米草在缺氧状态下加热反应,使碳、氢等元素变成一氧化碳、氢气、甲烷等可燃气体,通过净化处理后,经输配管网输送用于炊事、发电或供热等,终端是清洁廉价的绿色能源产品。0.5 kg 大米草可生产 1 m³ 可燃气体,3 kg 大米草便可生产三口之家一天用的可燃气体。2 m³ 可燃气体可发电 1 kW·h。

大米草是美国的互花米草与欧洲米草的杂交种,我国 1963 年引进,用于保滩护岸、促淤造陆。然而大米草每年以五六倍的速度自然繁殖扩散,成为草害,大米草草场年产鲜草 15~30 t/hm²。

(商金杰)