

文章编号:1673-5021(2006)05-0029-04

苜蓿雄性不育系组织培养技术的研究

高翠萍,石凤翎*,孙 静

(内蒙古农业大学生态环境学院,内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:以苜蓿雄性不育系 Ms-4 幼嫩茎段、叶片、叶柄为外植体,诱导苜蓿雄性不育系再生植株。结果表明:叶柄是诱导愈伤组织的良好外植体,体细胞胚诱导率为 90%,再生率 49%。苜蓿雄性不育系插条生根的最佳处理为接种前用水进行预处理 0.5h,外植体为完整插条,培养基为 A1、A2,其生根率为 97%,生根系数为 5.3。

关键词:苜蓿; 雄性不育系; 组织培养; 体细胞胚

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A

苜蓿的组织培养在国内外已有很多报道^[1~4],最早见于 Saunders 和 Bingham 等(1972)的研究,他们通过器官形成和体细胞胚愈伤组织发育两条途径,最终分化成完整的植株^[5]。有关苜蓿雄性不育系组织培养技术国外已有研究报道^[6],但在我国未见报道。苜蓿雄性不育系 Ms-4 没有找到保持系,大田扦插繁殖成活率低,因此寻找有效的扩繁方法是利用苜蓿雄性不育系 Ms-4 进行杂交制种生产所面临的一个重要问题。本试验以苜蓿雄性不育系 Ms-4 为材料,采用组织培养的方法,通过器官发生和体细胞胚发生两种途径诱导再生植株,建立苜蓿雄性不育系 Ms-4 的再生体系。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料为由内蒙古农业大学培育的草原 1 号杂花苜蓿 (*Medicago varia* Martin. cv. Caoyuan No. 1) 中选育而来的苜蓿雄性不育系 Ms-4。

1.2 方法

1.2.1 体细胞胚诱导再生植株

苜蓿雄性不育系 Ms-4 为大田扦插繁殖生长 1 年的材料,在其分枝期剪取幼叶、叶柄、茎段,用自来水冲洗干净,在超净工作台中先用 70% 酒精消毒 30s,然后用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 1min,无菌水冲洗 4~5 次。将叶片切成 0.5cm² 左右的小块,叶柄、茎段切成 0.5~1cm 小段接种于 SH+KT(2 mg/L)+2,4-D(5 mg/L)培养基上进行愈伤组织的诱导,选择质量好的愈伤组织继代培养 2~3 代后(3~4 周为一个继代周期)转入分化培养基 SH+Pro(5.76g/L)+(NH₄)₂SO₄(1.48g/L),以 SH+KT(2 mg/L)+2,4-D(5 mg/L)培养基做对照。

愈伤组织大部分长出绿点后,统计体胚诱导率;最后转入 1/2MS 培养基中诱导再生植株,统计再生率。培养基 pH 值 5.8~6.0,培养温度 24~26℃,光照 2000~3000lux,光周期为 16h。

1.2.2 无菌插条诱导再生植株

剪取苜蓿雄性不育系 Ms-4 幼嫩插条,采用完整插条和无叶插条,分别用自来水冲洗干净,再用自来水、0.01 mg/L 和 0.005mg/L 萘乙酸溶液预处理 0.5h。然后在超净工作台中先用 70% 酒精消毒 30s,再用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 1min,无菌水冲洗 4~5 次后,接种于 A1、A2、A3、A4 培养基中(表 1),诱导生根。无菌插条扦插 40d 后,统计生根率和生根系数。培养基 pH 值 5.8~6.0,培养温度 24~26℃,黑暗培养 5d 后正常光照培养,光强 2000~3000lux,光周期为 12h。

表 1 诱根培养基成分

Table 1 Component of rooting medium

培养基编号 Numbers of medium	培养基成分 Component of medium
A1	1/2MS+NAA (0.1mg/L)
A2	1/2MS+NAA(0.01mg/L)
A3	1/2MS+NAA (1mg/L)
A4	1/2MS+NAA(0.005mg/L)

2 结果与分析

2.1 体细胞胚诱导再生植株

2.1.1 不同外植体对出愈率的影响

* 通讯作者

收稿日期:2006-03-15;修回日期:2006-05-23

基金项目:国家自然科学基金项目(30160057)

作者简介:高翠萍(1978—),女,2004 级博士研究生,从事牧草组培及细胞形态学方面的研究。

叶片、叶柄、茎段的出愈率分别为 61.5%、85.6%、74.5%(表 2),其中叶柄的出愈率最高;叶柄和茎段的出愈速度较快,愈伤组织黄绿色、结构致密、颗粒小(图 1、图 2),叶片的出愈速度较慢,且愈伤组织略显绿色、松软无定型(图 3);因此,叶柄可作为苜蓿雄性不育系诱导愈伤组织的良好外植体。

表 2 不同外植体对出愈率的影响

Table 2 Effect of different explants on callus inducing rates

外植体 Explants	接种外植体数 No. of explants	出愈率(%) Callus inducing rates(%)	出愈时间(d) Days of callus forming(d)
叶片	49	61.5	7~10
叶柄	57	85.6	3~5
茎段	54	74.5	3~5

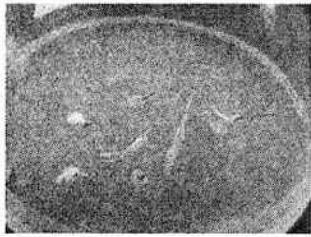


图 1 叶柄的愈伤组织
Fig. 1 The callus of leafstalks



图 2 茎段的愈伤组织
Fig. 2 The callus of stem segments

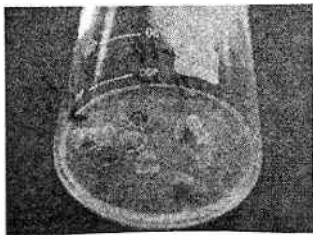


图 3 叶片的愈伤组织
Fig. 3 The callus of leaves

2.1.2 不同培养基对体细胞胚诱导率的影响

在苜蓿雄性不育系 Ms-4 体细胞胚诱导过程中,附加脯氨酸和硫酸铵的 SH 培养基:SH+Pro (5.76g/L)+(NH₄)₂SO₄ (1.48g/L)的体胚诱导率为 90%(图 4),明显高于对照(40%)培养基 SH+KT(2 mg/L)+2,4-D(5 mg/L)。

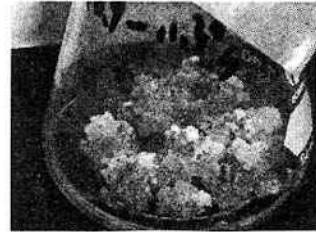


图 4 体细胞胚的诱导
Fig. 4 Somatic embryos were induced

2.1.3 再生植株移栽成活率

成熟胚在 1/2MS 培养基中发育成完整植株(图 5),再生率为 49%。移栽时打开瓶盖注入自来水,于室温下培养 1 周,然后将小苗根部培养基洗掉,移入装有砂土的花盆中,用塑料袋罩 7~10d 后进行常规培养,移栽成活率为 77%(图 6)。



图 5 再生植株
Fig. 5 The regenerated plant



图 6 再生植株移栽
Fig. 6 The regenerated transplant

2.2 无菌插条诱导再生植株

2.2.1 接种前不同预处理对生根的影响

由表 3 可知,接种前用 NAA 进行预处理对生根无显著影响,水处理的生根效果比 NAA 处理效果好。

表 3 不同处理对生根的影响

Table 3 Effect of different treatments on rooting

处理 Treatment	外植体类型 Type of explants	培养基类型 Type of medium	生根时间(d) Rooting time	生根率(%) Rooting rates	生根系数(%) Rooting coefficient
水(0.5h)	完整插条	A1	17	97.0	4
		A2	32	75.0	5.3
	无叶插条	A1	27	41.7	2.6
		A2	34	14.3	2.5
NAA(0.01mg/L, 0.5h)	完整插条	A1	17	25.0	2
		A2	—	—	—
	无叶插条	A1	26	90.0	2
		A2	—	—	—
NAA(0.005mg/L, 0.5h)	完整插条	A1	17	85.0	2
		A2	—	—	—
	无叶插条	A1	29	22.2	4.5
		A2	—	—	—

2.2.2 不同外植体对生根的影响

完整插条、无叶插条在 A1、A2 培养基上分别接种 3~5d 后芽开始生长(图 7),然后生根。完整插条在培养基(A1、A2)上的生根速度快,生根率、生根系数都高于无叶插条(表 3,图 8),其原因可能是叶中含有对生长素的吸收和运输有利的物质,从而使生长素更有效地抵达生根部位^[7]。



图 7 芽的诱导

Fig. 7 Buds were induced

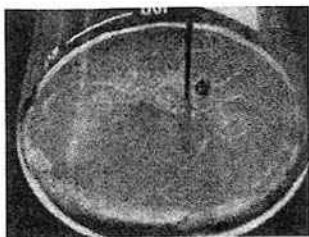


图 8 根的诱导

Fig. 8 Roots were induced

2.2.3 不同培养基对生根的影响

不同处理在 A3、A4 培养基上都没有生根,因此 A3、A4 培养基不利于生根;不同处理在 A1 培养基上生根所需的时间(22d)明显短于 A2 培养基(33d),且 A1 培养基的生根率(97%)高于 A2 培养基(75%),但两者的生根系数差异不显著(表 3)。

3 小结与讨论

3.1 三种外植体的出愈率均较低,原因可能是扦插繁殖的苜蓿雄性不育系 Ms-4 木质化程度高,导致外植体老化,从而造成培养细胞分化难;据报道,愈伤组织继代的时间和次数也是影响愈伤组织生长和体胚诱导率的一个重要因素^[7]。三种外植体的出愈时间不同,其中叶柄和茎段的出愈速度较快,且叶柄的出愈率和愈伤组织质地都好于茎段,因此叶柄可作为苜蓿雄性不育系 Ms-4 诱导愈伤组织的良好外植体。附加一定比例的脯氨酸(5.76g/L)和硫酸铵(1.48g/L)的 SH 培养基可使体细胞胚的诱导率提高 2 倍多。试验过程中发现,愈伤组织在原诱导培养基上可直接分化出芽,但没有根的分化;体细胞胚诱导再生植株的过程中,胚根、胚轴伸长,但子叶不发育且逐渐变黄。

3.2 苜蓿雄性不育系 Ms-4 插条生根的最佳处理方法为接种前用水进行预处理,外植体选用完整插条,培养基为 A1、A2。苜蓿雄性不育系插条生根接种前用水进行预处理生根效果好于 NAA 的处理,

而黄学林(1995)指出,如果插条在水中预先“老化”,则会推迟根的启动^[7],这与本试验结果相反,具体原因还有待于进一步探讨。

3.3 体细胞胚诱导再生植株所需时间长(120~150d)、经济成本高,但扩繁速度快;无菌插条诱导再生植株所需时间短(约 40d)、经济成本相对低,扩繁速度相对体细胞胚诱导再生植株慢,但比大田扦插扩繁速度快且成活率高。因此无菌插条扦插是进行苜蓿雄性不育系扩繁的有效途径。

参考文献(References):

- [1] 梁慧敏,黄剑,夏阳,王天明,孙仲序. 苜蓿外植体再生系统的建立研究[J]. 中国草地,2003,25(4):8-14.
Liang Huimin, Huang Jian, Xia Yang, Wang Taiming, Sun Zhongxu. Establishment of regeneration system for explants of alfalfa[J]. *Grassland of China*, 2003, 25(4): 8-14.
- [2] Arcioni S, Damiani F, Pezzoti M, et al. Alfalfa Lucerne (*Medicago* spp). Bejaj Y. Biotechnology in agriculture and forestry [M]. New York ; Springer, Berlin Heidelberg, 1990, 197-241.
- [3] Chabaud M, Clotilde L, Cornne M, et al. Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaern.) by agrobacterium tumefaciens and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoted fused to the gus reporter gene[J]. *Plant Cell Report*, 1996, 15: 305-310.
- [4] 葛军,刘振虎,卢欣石. 紫花苜蓿再生体系研究进展[J]. 中国草地,2004,(3):63-67.
Ge Jun, Liu Zhenhu, Lu Xinshi. Review on the research progress of regeneration system of alfalfa[J]. *Grassland of China*, 2004, (3): 63-67.
- [5] 杨燮荣,邵根福,周荣仁. 苜蓿组织培养及植株的再生[J]. 植物生理学通报,1981,(5):33-34.
Yang Yirong, Tai Genfu, Zhou Rongren. Plant regeneration and tissue culturing of alfalfa [J]. *Plant Physiology Aviso*, 1981, (5): 33-34.
- [6] Kenji Okumura. 应用体细胞胚进行苜蓿无性系繁殖和保存的研究[J]. 国外畜牧学——草原与牧草,1997,(3):44-45.
Kenji Okumura. Studies on clonal multiplication and storage of alfalfa using somatic embryos [J]. *Overseas Stockbreeding—Grassland and Forage*, 1997, (3): 44-45.
- [7] 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京:科学出版社,1995. 110-111, 24-50, 105-106.
Huang Xuelin, Li Youju. Form founding and adjusting in tissue culturing of high plant [M]. Beijing: Science Press, 1995. 110-111, 24-50, 105-106.

Studies on Tissue Culture Techniques of Male Sterile Line of Alfalfa

GAO Cui-ping, SHI Feng-ling, SUN Jing

(College of Ecology and Environmental Science,
Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract: The infancy stem segments, leaves and leafstalks of male sterile line Ms-4 of *Medicago varia* Martin. cv. Caoyuan No. 1 were taken as explants and induced somatic embryos and roots of male sterile line Ms-4 of *Medicago varia* Martin. cv Caoyuan No. 1. The results showed that leafstalks are good explants for inducing callus. Somatic embryos inducing rates was 90%, regeneration rate was 49%. The best treatment of rooting of quickset of male sterile line Ms-4 of *Medicago varia* Martin. cv. Caoyuan No. 1 is water treat for 0.5h before inoculability, integrity quickset, and A1 and A2 rooting medium, rooting rates was 97%, rooting coefficient was 5.3.

Key words: Alfalfa ; Male sterile line; Tissue culture; Somatic embryos

【责任编辑 胡卉芳】