

甘农 4 号紫花苜蓿组培再生体系的建立

马伶俐¹, 柳小妮^{1,2}, 刘晓静¹, 苑力晖¹, 陈 涛¹

(1. 甘肃农业大学草业学院 甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

2. 中一美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为实现对甘农 4 号紫花苜蓿 *Medicago sativa* cv. Gannong No. 4 的遗传改良, 研究拟建立一个操作简便、可重复性强、遗传性稳定、培养周期短和再生率高的转基因受体系统, 为其遗传改良奠定基础。研究以 MS 为基本培养基, 在不同浓度的 2,4-D 与 6-BA 的诱导培养基上, 以甘农 4 号紫花苜蓿下胚轴为外植体, 诱导愈伤组织, 诱导率为 86.85%~99.56%, 其中 MS+2 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA 诱导率最高; 浅黄色至淡绿色的愈伤组织在 MS+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 培养基上的分化最好且植株颜色嫩绿。丛生芽在 1/2MS+0.5 mg/L NAA 的生根培养基上可再生成完整的首蓿植株。

关键词:甘农 4 号紫花苜蓿; 愈伤组织诱导; 再生体系

中图分类号: S551⁺. 703

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2008)12-0067-04

甘农 4 号紫花苜蓿 *Medicago sativa* cv. Gannong No. 4 是从 6 个欧洲苜蓿品种的大面积穴播田中, 通过单株选择和母系选择的方法, 依据株型直立、生长速度快等主要指标, 从 5 万个单株中选出 1 200 个优株, 在隔离区扦插, 种子等量混合, 形成综合品系, 经品种比较试验, 生产试验表现优良, 注册了品种。该品种初期生长快, 在建植第 1 年产量有较大幅度的提高, 而且其生态适应性广泛, 可在西部大部分地区栽培^[1]。至今还没有对其再生体系的相关研究和报道。

尽管甘农 4 号紫花苜蓿有诸多优点, 但也存在抗逆性差、病虫害严重、木质素含量高、反刍动物大量采食易得臃胀病等不足之处, 这给苜蓿产业化带来了许多不便, 很有必要在常规育种的基础上, 利用生物技术对其加以遗传改良, 以培育出优质、高产的新品种^[2,3]。实现对甘农 4 号紫花苜蓿的遗传改良, 一个稳定、高频的再生体系的建立至关重要。试验拟建立一个操作简便、可重复性强、遗传性稳定、培养周期短和再生率高的甘农 4 号紫花苜蓿转基因受体系统, 为其遗传改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料 试验材料选取甘农 4 号紫花苜蓿, 种子由甘肃农业大学曹致中教授提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子灭菌 种子用自来水浸泡 30 min, 在 70% 乙醇中振荡灭菌 1 min, 再放入 0.1% 升汞中振荡灭菌 12~15 min, 最后用无菌水冲洗 3~5 次, 灭菌滤纸吸干种子表面的水分, 接种到 MS 培养基上(培养基 pH 值均为 5.8), 在光周期为 16 h/d、恒温 24 ℃ 的条件下培养。

1.2.2 培养基的配置 以 MS(蔗糖 30 g/L, 琼脂 7.5 g/L) 为基本培养基, 添加不同浓度 2,4-D 和 6-BA(表 1), 进行愈伤组织的诱导^[4]。每个处理 3 个重复, 每个重复 30 块外植体。

表 1 愈伤组织诱导培养基激素浓度组合 mg/L

激素	处理							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
2,4-D	0	1.0	2.0	3.0	2	2.00	2.00	2
6-BA	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.25	0.75	1

以 MS 为基本培养基, 调节细胞分裂素 KT 和生长素 NAA 浓度(表 2), 以期筛选出最适合的愈伤组织分化培养基^[5]。每个处理 3 个重复, 每个重复 30 块外植体。

收稿日期: 2008-01-14

基金项目: 国家科技支撑计划“优质高产抗逆苜蓿和饲料作物新品种选育”(2006BAD04A04-01)

作者简介: 马伶俐(1981-), 女, 甘肃金昌人, 在读硕士生, 主要从事牧草与草坪草种质资源研究。

E-mail: meinvmalingli@yahoo.com.cn

通讯作者: 柳小妮 E-mail: liuxiaoni4035@sina.com

表2 愈伤组织分化培养基激素浓度组合 mg/L

激素	处理			
	B1	B2	B3	B4
KT	0.2	0.5	1.0	1.5
NAA	0.1	0.1	0.1	0.1

1.2.3 外植体获得 以培养7 d后无菌苗的下胚轴(3~5 mm)切段为外植体,进行愈伤组织的诱导^[6]。

1.3 分化苗生根培养 将愈伤组织分化出的丛生芽分成单芽嵌入到添加不同浓度NAA(0, 0.5 mg/L)的1/2MS(蔗糖浓度为15 g/L)培养基上进行生根培养。将根、茎、叶发育完整的小苗继代几次,炼苗后移栽到花盆中^[7](见图1)。

1.4 愈伤组织诱导率及分化率计算

愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的下胚轴数/接种的下胚轴总数×100%。

愈伤组织分化率=分化出芽的愈伤组织块数/接种愈伤组织的总块数×100%。

1.5 数据处理 试验数据采用SPSS软件包进行分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导 通过8种不同培养基诱导培养2周后,愈伤组织的诱导率见表3。

表3 2周后不同诱导培养基

愈伤组织的诱导率 %

培养基	3次重复诱导率			平均值
	I	II	III	
A1	0	0	0	0
A2	92.67	93.77	96.77	94.40 ^{bc}
A3	100.00	100.00	98.67	99.56 ^a
A4	93.33	96.67	95.77	95.26 ^b
A5	96.67	93.33	93.33	94.44 ^{bc}
A6	90.33	90.00	93.33	91.32 ^c
A7	97.00	96.77	96.88	96.88 ^{ab}
A8	90.00	83.87	86.67	86.85 ^d

注:同列不同字母表示0.05水平差异显著,下同。

A1浓度下没有诱导出愈伤组织,其余7个浓度下都诱导出愈伤组织,以A3的诱导率最高,达99.56%,A8的诱导率最低,为86.85%。A3、A6、A7的愈伤组织增殖最快,颜色为淡绿色,组织结构明显,形成愈伤组织团(见图1-a);A2虽

然诱导出愈伤组织,但组织结构不明显,多呈粘稠状;A4上诱导的愈伤组织虽然有组织结构,但表面呈雪花状和白毛状;A8上诱导的愈伤组织褐化严重。8个激素浓度组合的培养基的诱导率的顺序是:A3>A7>A4>A5>A2>A6>A8>A1。

相关分析表明,A2、A4、A5、A6、A7 5个激素浓度组合的培养基诱导率差异不显著,A3、A4差异不显著,A3与A2、A5、A6、A7、A8差异显著,A8与其余6个组合差异显著(表3)。

2.2 愈伤组织的分化 在A3培养基上挑取新鲜淡绿、结构明显的愈伤组织,放到附加激素KT和NAA 4种不同浓度梯度的MS基本培养基上,保证愈伤组织与培养基表面充分接触,培养2周后愈伤组织形成绿点,4周后发现芽分化出来(见图1-b),在第5周统计分化出芽的愈伤块数。

4种培养基的分化率差异不显著(表4)。

表4 5周后分化培养基上愈伤组织的分化率 %

不同激素浓度 培养基	3次重复分化率			平均值
	I	II	III	
B1	30.00	27.27	33.33	30.20 ^b
B2	40.00	37.50	53.33	43.61 ^{ab}
B3	51.67	50.00	61.53	51.07 ^a
B4	40.00	36.36	45.45	40.60 ^{ab}

B2上分化出的丛生芽颜色嫩绿,形态良好,生长势旺盛(见图1-c),分化率为43.61%。B3分化率最高,达51.07%,但分化出的多数芽发生玻璃化现象,整个芽呈半透明状,难以分化成正常小苗,最终导致成苗率降低,B4在分化苗易玻璃化这一现象上表现也很突出。可见芽分化率与KT浓度的高低不呈正相关^[8]。

2.3 分化苗生根培养 将分化苗放到3种生根培养基培养10 d后,0.5 mg/L NAA+1/2MS培养基中的分化苗生出不定根(见图1-d),生根率为82%,1/2 MS和1 mg/L NAA+1/2MS 2种培养基的生根时间都长于0.5 mg/L NAA+1/2MS,生根率也较低,但分化出的玻璃化苗在任何一种培养基上都不能生长。表明0.5 mg/L NAA+1/2MS适合分化苗的生根培养,这与杨起简^[7]对紫花苜蓿生根培养的结论一致。

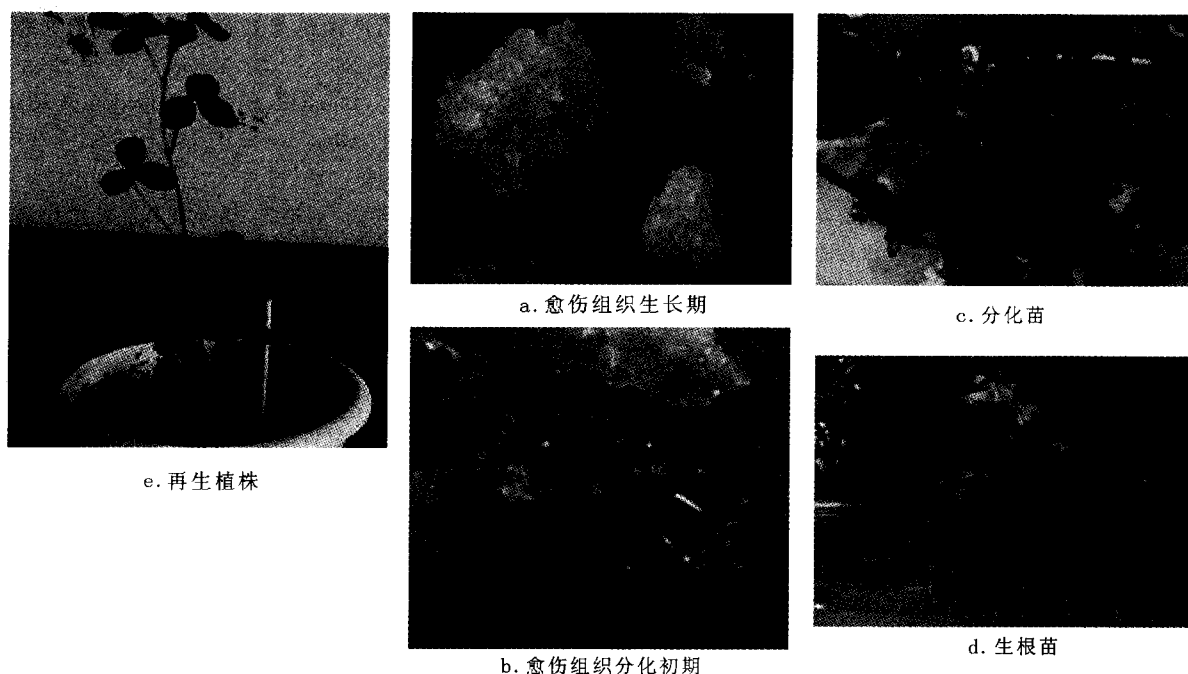


图 1 甘农 4 号紫花苜蓿组培再生过程

3 讨论与结论

在植物组织培养中,外源生长素和细胞分裂素是细胞离体培养所必需的激素,合适的浓度及两者之间的适宜配比不但可以诱导细胞分裂和生长,而且能控制细胞分化和形态建成^[9]。试验中所用的生长素是 2,4-D 和 NAA,细胞分裂素是 6-BA 和 KT。Saunders 和 Bingham 最早确定了 2,4-D 在愈伤组织中的重要作用^[10]。试验中,在没有添加 2,4-D 的培养基上,只单独使用 6-BA 对诱导愈伤不起作用,进一步证实 2,4-D 在诱导愈伤中的关键作用;单独使用 2,4-D 虽能诱导出愈伤组织,但是愈伤组织的组织结构不明显,呈白色粘稠状。有研究表明,此类外植体基本上没有分化能力^[11],不能再生成完整植株。2,4-D 浓度过高也会影响诱导,即使长出愈伤组织,结构松散,体积大,生长迅速,易发生褐化。说明即使 2,4-D 是诱导紫花苜蓿愈伤组织的重要因子^[11],但也要确定其正确的用量。当生长素和分裂素比值高时,有利于愈伤的诱导,培养基 A8(2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA),由于其 2,4-D、6-BA 的比值较小,其诱导率远远低于其他培养基。因此 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 对甘农 4 号紫

花苜蓿愈伤组织的诱导效果最好。

各种细胞分裂素对紫花苜蓿的分化均有重要作用^[5]。激素 KT 作为细胞分裂素促进细胞分裂和愈伤组织或器官分化不定芽,NAA 作为生长素影响到茎和节间的伸长、向性、顶端优势、叶片脱落和生根等现象。试验中,KT(1.0 mg/L)与生长素 NAA(0.1 mg/L)的培养基,有利于愈伤组织芽丛的分化。KT 的浓度不能太高,否则易出现玻璃化苗。KT 在低浓度范围内(0.1~0.5 mg/L)具有促进愈伤形成和体细胞胚发生的作用,而超过 1.0 mg/L 时,则有抑制分化的现象^[13]。为了抑制玻璃化苗的出现,可以在分化苗的继代过程中逐步降低细胞分裂素和生长素浓度。生根培养时,激素 NAA 起重要作用,加 0.5 mg/L NAA 的培养基是生根的最佳培养基。

参考文献

- [1] 苏加楷,张文淑.牧草良种引种指导[M].北京:金盾出版社,2007.181.
- [2] 王强龙,王锁民,张金林,等.紫花苜蓿体细胞胚高频再生体系的建立[J].草业科学,2006,23(11):21-27.
- [3] 黄迎新,周道玮,岳秀泉,等.不同苜蓿品种再生特性的研究[J].草业学报,2007,16(6):14-22.

- [4] 金淑梅,管清杰,罗秋香. 苜蓿愈伤组织高频再生遗传和转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2006, 4(4):571-578.
- [5] 张万军,王涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12):1579-1583.
- [6] 王友生,李阳春,梁慧敏,等. 紫花苜蓿愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 草原与草坪, 2006, (4): 55-58.
- [7] 杨起简,周禾,孙彦,等. 紫花苜蓿的愈伤组织诱导及组织培养[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(2):28-30.
- [8] 张静妮. 苜蓿不同品种植株高效再生体系的建立及根瘤农杆菌介导的 *sacB* 基因转化因素的分析[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2005.
- [9] 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, 26(2):63-67.
- [10] Saunder J M, Bingham E T. Production of alfalfa plants from callus tissue[J]. Crop Sci., 1972, (12):804-808.
- [11] 李望丰,吕德扬,刘艳芝. 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.
- [12] 李聪,熊德邵. 苜蓿愈伤组织再生植株研究[J]. 中国草地, 1989, (3):51-55.
- [13] 马海燕,张博. 苜蓿高效再生体系研究进展[J]. 草业科学, 2005, 22(11):30-35.

Establishing regeneration systems of Gannong No. 4 alfalfa

MA Ling-li¹, LIU Xiao-ni^{1,2}, LIU Xiao-jing¹, YUAN Li-hui¹, CHEN Tao¹

(1. College of Pratacultural Science, Key Laboratory of Grassland Ecology System, Ministry of Education, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Hypocotyls of Gannong No. 4 alfalfa were used as explants, MS was used as the basic medium, different concentration of 2,4-D and 6-BA were added into the medium to induce the callus. The rate of inducement ranged from 86.85% to 99.56%, the treatment of MS+2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA had the highest inducement rate; yellow and green callus had best differentiation on the medium of MS+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA, and the color of plants was tenderly green. The regenerated plants were obtained in the root inducing medium (1/2MS+0.5 mg/L NAA).

Key words: Gannong No. 4 alfalfa; callus induction; regeneration systems

青海湖景区编织生物多样性保护网

为加强普氏原羚的野外种群及其栖息地保护、恢复和发展,青海湖景区保护利用管理局同青海省湖东种羊场签订保护项目协议,以建立社区共管制度,建造普氏原羚试验通道,完善管理、科研和监测体系,恢复和发展普氏原羚种群。这一项目计划投资 70 万元,建设期限自 2008 年 10 月至 2010 年 10 月。

2008 年以来,从保护生态环境,加强景区与社区经济协调发展思路出发,青海湖景区保护利用管理局积极编织生物多样性保护网络,逐渐促成了管理局与当地政府、企业、宗教社团的协议共管模式。在与湖东种羊场签订保护项目协议之前,管理局向中国欧盟生物多样性项目—青海与四川社区生物多样性保护行动项目组提交了“海心山鸟类监测项目和泉湾湿地大天鹅、黑颈鹤保护社区小额赠款项目”建议书,并获得支持。为了使小额赠款充分发挥作用,管理局对每个受赠社区进行了生态学知识、资源监测方法、项目管理等方面的培训,并定期对项目开展情况进行了解,协助受赠社区圆满完成协议内容。

(张利锋)