

文章编号: 1003-8701(2002)02-0015-02

诱导苜蓿胚性愈伤组织分化和再生

李望丰¹, 吕德扬², 刘艳芝¹, 刘莉¹, 徐洪志¹, 赵桂兰¹

(1. 吉林省农业生物技术开放实验室, 吉林 公主岭 136100; 2. 中国科学院遗传所, 北京 100101)

摘要:通过不同 2,4-D 浓度对几种苜蓿诱导的研究, 筛选对 2,4-D 敏感, 体细胞胚发生能力高和分化率也高的苜蓿品种, 进一步完善受体再生系统, 使该系统具备重复性强、操作简便、培养周期短、再生率高和遗传性稳定性好的条件。提供程序化技术, 为转基因苜蓿达到产业化规模做好技术储备。

关键词:紫花苜蓿; 组织培养; 体胚分化; 2,4-D

中图分类号:S542.403.53

文献标识码:A

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是重要的豆科饲料牧草, 全世界种植面积 3 300 万 hm^2 , 我国种植面积也有 133 万 hm^2 , 并有 2000 年的栽培历史。苜蓿的营养丰富, 蛋白质占其干重的 17%~20%, 是多种畜禽喜食的优质蛋白饲料, 在畜牧业中占有举足轻重的地位。但近年来我国草场过分开发和管理粗放, 使草场盐碱化程度加重。面对这种现象, 我们一方面注重生态建设, 另一方面也在考虑培育抗虫、抗病、抗逆的苜蓿品种, 改良苜蓿品质, 在提高含硫氨基酸等方面加大了研究力度。转基因技术是一项行之有效的手段, 并且已有相关成功报道。但作为基因转化的受体——紫花苜蓿, 其本身存在着体细胞胚分化困难、分化率低、重复性差等问题。这就制约了苜蓿转基因研究工作的进一步开展, 也是多年来转基因苜蓿研究一直停滞在实验室未能走向市场的症结所在。为此, 有必要筛选出多种体细胞胚分化率高的苜蓿品种, 进一步完善受体再生系统, 使该系统具备重复性强、操作简便、培养周期短、再生率高和遗传性稳定的条件。提供程序化技术, 为转基因苜蓿达到产业化规模做好技术储备。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试苜蓿为苏汉、保定、公主岭 1 号、沈农、武功、美国熊杂 1 号、中牧 1 号、阿尔冈金、苜蓿王、朝阳苜蓿、Rongelander C₂、Rongelander C₃ 共 12 份。

1.2 外植体来源

种子用砂纸打磨 3~4 下, 将种子用 75% 酒精处理 10 min, 用 0.1% HgCl_2 处理 20 min。用无菌水冲洗 3~4 次后, 将种子放到装有无菌水的三角瓶中浸泡 1~2 d, 待种子膨胀后, 将种子接到 MSO 培养基上生根。

收稿日期: 2002-01-05

作者简介:李望丰 (1976-), 男, 黑龙江省佳木斯市人, 东北师范大学生物系毕业, 主要从事苜蓿、大豆生物技术研究。

1.3 体细胞胚愈伤组织诱导及萌发

将长至 1.0 cm 左右的幼根切下,置入(MS+KT 0.2 mg/L(下同)+2,4-D 1—40)的诱导培养基,培养 50~60 d 的胚性愈伤组织转入分化培养基(MS+BA 0.3+NAA 0.05),约 3 周左右,胚性愈伤组织开始发育,萌发成子叶型胚体;在 MSO 培养基中胚体发育完整的小植株。

2 试验结果

2.1 不同基因型对诱导体胚发生能力反应效果

表 1 不同基因型对诱导体胚发生能力反应效果

基 因 型	接种数(块)	胚性愈伤数(块)	胚性愈伤(%)	胚体萌发(%)	分化结果
苏 汉	393	63	16.03	100	植株
沈 农	387	63	16.28	100	植株
中牧 1 号	389	8	2.06	100	植株
公主岭 1 号	374	41	10.96	100	植株
保 定	385	6	1.56	100	植株
美国熊杂 1 号	385	7	1.82	100	植株
阿尔冈金	387	4	1.03	100	植株
武 功	373	5	1.34	100	植株
Rongelander C ₂	374	7	1.87	100	植株
Rongelander C ₃	380	24	6.30	100	植株

实验结果表明,基因型的差异在苜蓿体胚发生能力上反应显著,苏汉、公主岭 1 号表现较佳,但在胚状体萌发率及分化植株的实验中,供试的基因型胚状体萌发率均达 100%,获得植株。

2.2 诱导培养基中 2,4-D 浓度试验

将种子的根切下,长度在 1.0 cm 左右,在 2,4-D 不同梯度(1.0,2.0,10,20,40 mg/L)的 5 个诱导培养基中,每皿接种外植体 20 个,每种培养基接种总数 80 个,在诱导愈伤组织阶段,不同的 2,4-D 浓度,诱导的愈伤组织结构形态差异很大。若愈伤组织呈雪花形松散状,则此外植体基本上没有分化能力;如愈伤组织呈浆糊状、粘稠状,则产生的胚性愈伤组织基本上能萌发出胚状体,在此培养阶段,琼脂浓度尽量低一些。本实验还表明,在诱导愈伤组织过程中,设计的 4 个培养时间梯度(1,5,10,20 d),经过不同的诱导天数处理和不同的 2,4-D 浓度的筛选,得到的胚性愈伤组织中,2,4-D 浓度越低,处理时间越短者,则该苜蓿基因型对 2,4-D 越敏感,在组培过程中就越易分化,在筛选过程中也能从总概率中得出哪个品种的分化率高。

2.3 胚性愈伤组织的分化与再生

将经过不同 2,4-D 处理时间的愈伤组织转移到分化培养基中,经 50~60 d 培养,胚性愈伤组织分化出胚状体,将胚状体用镊子轻轻取下,接到 MSO 中,经过两周左右,即可发育出根、茎、叶完整小苗,将小苗的培养条件控制在 18~20℃,有利于再生植株生根和移栽成活。

3 结论与分析

在植物体细胞胚胎发生诱导研究中,国外曾有学者报道(Ssntarem 1997),2,4-D 对豆科植物体细胞胚发生能力起主要作用。有的学者在激素组合中单一使用 2,4-D 的,有的用细胞激动素与 2,4-D 组合使用,都有一定的作用。本项研究采用 KT 与 2,4-D 组合使用,获得了多种基因型胚状体 100%的萌发率。

- [7] Tu J. et al. Transgenic rice variety IR72 with xa21 is resistant to bacterial blight. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 31—36.
- [8] Kim J K. et al. Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance bar gene. *Molecular Breeding* 1999, 5: 85—94.
- [9] Zhang S P. Wen-Yuan Song, Chen L L. et al. Transgenic elite indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae*. *Molecular Breeding* 1998, 4: 551—558.
- [10] Tang K X. et al. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 1999, 208: 552—563.
- [11] Cao J. et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports*, 1982, 11: 568—591.
- [12] Datta K. et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of the cryIA(b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 20—30.
- [13] Uchimiya H. et al. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplast of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet*, 1986, 204: 204—207.
- [14] Kohli A. et al. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment; molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 1999, 208: 88—97.
- [15] Jeon J S. et al. Introduction and expression of foreign genes in rice cells by particle bombardment. *Journal of Plant Biology*, 1994, 37 (1): 27—36.
- [16] Zhang S P. et al. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 465—469.
- [17] Jain. et al. Optimization of biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 963—968.
- [18] 田文忠, 等. 植物抗毒素转化水稻和转基因植株的生物鉴定[J]. 植物学报, 1998, 40(9): 803—808.
- [19] 燕义唐, 等. 水稻条纹叶枯病毒外壳蛋白基因在工程水稻植株中的表达[J]. 植物学报, 1992, 34(12): 899—906.

(上接第 16 页)

不同 2, 4-D 浓度对体胚诱导差异明显, 并对体胚的发生影响很大, 除了基因型外, 一般来说, 过低过高的 2, 4-D 浓度对体胚发生率都有抑制作用, 发生率曲线基本呈抛物线状, 有 2, 4-D 浓度的最适区域。

不同诱导时间对体胚发生的影响十分明显, 实验结果表明, 2, 4-D 诱导时间对体胚发生的影响, 不同基因型差异很大。在本实验条件下培养 5~10 d 表现最佳。苏汉、沈农这两个品种, 从总的体胚发生率和对 2, 4-D 的敏感程度都要较其它品种好。

参考文献:

- [1] 汪 清, 等. 紫花苜蓿外植体胚状体和植株高频再生的研究[R]. 中国科学院遗传所研究工作年报, 1991, 76—77.
- [2] 黄绍兴, 等. 紫花苜蓿原生质体转基因植株再生[J]. 科学通报, 1991, 36: 1345—1348.
- [3] Hossainadeh A N. et al. Effects of genotype, medium and explant on callus induction and plant regeneration in alfalfa. *Inarian Joural Agricultural Science*, 1998, 29(3): 491—499.
- [4] 曹学远, 等. 紫花苜蓿外源基因共转化植株再生[J]. 中国科学, 2000, 30(4): 342—348.
- [5] Santarem E R. et al. Effect of explant origination, PH. solidifying agent and wounding on inition of soybean somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Development Biology plant*, 1997, 33: 13—19.
- [6] Lv Deyang. et al. Regeneration of foreign genes co-transformed plants of *Medicago sativa* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Science in China (Series C.)* 2000, 43: 387—394.