

文章编号: 1003-8701(2007)01-0017-02

# 8个苜蓿品种抗寒性的初步评价

刘艳芝, 夏彤, 王玉民, 邢少辰, 王中伟, 谭化, 董英山\*

(吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:** 选用8个苜蓿品种进行组织培养, 利用无菌苗子叶诱导愈伤组织, 对均匀一致的愈伤组织低温处理6周, 然后恢复培养获得再生植株, 根据愈伤组织的存活率对各苜蓿品种的抗寒性进行初步评价。

**关键词:** 苜蓿; 组织培养; 低温处理; 抗寒性

中图分类号: S551+.7

文献标识码: A

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是世界重要牧草作物, 其营养价值被列为各种牧草之首, 素有“牧草王”之美誉。但是在高纬度、高海拔地区, 苜蓿因抗寒性差、越冬率低或因早春冻害死亡而影响栽培, 因此在品种选育和引种驯化过程中, 品种的抗寒性是考虑的重要因素之一。

目前国内外评定抗寒性的主要指标包括形态指标、理化指标、生化指标及代谢指标<sup>[1]</sup>, 其中形态指标多用于田间试验, 后3个指标主要用于室内评定。室内评定指标中以理化指标——电导值、K<sup>+</sup>渗出率最为常用<sup>[2-5]</sup>。但是植物抗寒能力的大小也只是相对而言, 并非好的品种各项指标都好, 差的品种各项指标都差。因为植物的抗寒性是受多种因素影响的, 其抗寒生理过程也是错综复杂的, 所以如何对植物的抗寒能力进行综合评价, 一直是研究者的课题。本项研究利用组织培养技术, 对8个苜蓿品种的抗寒性进行初步评价, 探讨室内评定苜蓿抗寒性的方法, 以期对供试材料的抗寒能力作出早期预测; 为抗寒优良新品种的选育、推广、确定适合栽培区域提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

公农1号、公农2号、龙牧803、草原1号、草原2号、超产苜蓿、肇东苜蓿、敖汉苜蓿(由吉林省农业科学院畜牧分院草地研究所提供)。

### 1.2 无菌苗的产生

选取饱满种子, 75%乙醇浸泡2 min, 0.1%升汞浸泡30 min, 无菌水清洗4次, 用无菌水浸泡放置于培养室24 h左右, 至种子膨胀后接种于MS<sub>0</sub>。

### 1.3 愈伤组织诱导

种子萌发6~7 d, 待子叶完全展开时, 切取子叶, 近轴面向上斜插入培养基LM<sub>1</sub>(MS基本培养基+2.4-D 2.0 mg/L+KT 0.25 mg/L+CH 2 000 mg/L+3%蔗糖, pH 5.8), 置于(24±1)℃, 16 h光照/d培养室中培养, 诱导愈伤组织。

### 1.4 愈伤组织继代培养

诱导形成的愈伤组织用LM<sub>1</sub>、MS<sub>0</sub>(MS+3%蔗糖 pH5.8)和LM<sub>2</sub>(MS+NAA 0.05 ml/L+6BA 0.5 ml/L+3%蔗糖, pH 5.8)继代增殖, 之后每2周用原培养基继代增殖1次。

### 1.5 愈伤组织低温处理及恢复培养

每个品种都取LM<sub>2</sub>培养基继代培养2次的大小均匀一致的愈伤组织, 置于4℃冰箱中6周, 期间

收稿日期: 2006-06-25

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

通讯作者: 董英山

可不继代培养,用于对照的愈伤组织不做低温处理,继续在培养室内培养。6周后将低温处理的愈伤组织用新鲜的 LM<sub>2</sub> 培养基继代,在培养室内恢复培养。

### 1.6 体细胞胚发生与萌发

恢复培养 10 d 左右愈伤组织上逐渐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,8 个品种全部都可以诱导出愈伤组织,诱导率均为 100%。

### 2.2 愈伤组织的继代增殖

LM<sub>1</sub> 诱导出的愈伤组织分别转入 LM<sub>1</sub>、MS<sub>0</sub> 和 LM<sub>2</sub> 中,并且用这 3 种培养基继代培养。LM<sub>1</sub> 培养基由于附加了 2,4-D,因此继代后的愈伤组织呈现深绿色、水浸状,玻璃化现象严重;LM<sub>2</sub> 培养基上的愈伤组织呈现黄绿色,由疏松逐渐变得致密,并伴随体细胞胚发生;MS<sub>0</sub> 上的愈伤组织呈现黄白色、松软,没有组织结构。从 3 种愈伤组织形态来看,LM<sub>2</sub> 培养基上的愈伤组织最接近正常,继续培养获得了大量的胚状体,并且萌发出正常植株。因此选择 LM<sub>2</sub> 培养基上的愈伤组织作为低温处理材料。

### 2.3 愈伤组织低温处理

8 个苜蓿品种在低温处理过程中生长都几乎停止,但在形态上却表现出不同的敏感性。大部分品种的愈伤组织在 2 周时就出现褐化现象,但是褐化的愈伤组织上仍然有绿点。处理 6 周后,草原 1 号的愈伤组织已经全部死亡;超产苜蓿和草原 2 号苜蓿的愈伤组织仅在边缘有一些褐化,其余部分都是绿色;另外 5 个品种也同样存在不同程度的褐化。对照材料正常生长,无褐化现象。低温处理后将所有的愈伤组织都进行恢复培养,褐化的愈伤组织死亡,绿色的愈伤组织都能继续生长,并且有体细胞胚胎发生,最后获得再生植株(表 1)。

表 1 8 个苜蓿品种愈伤组织低温处理存活率比较

品种	处理愈伤块数	抗性愈伤块数	存活率(%)
公农 2 号	46	42	91.30
超产苜蓿	52	52	100.00
公农 1 号	40	34	85.00
龙牧 803	48	34	70.83
草原 2 号	48	48	100.00
敖汉苜蓿	46	30	65.22
草原 1 号	48	0	0.00
肇东苜蓿	52	32	61.54

根据各品种愈伤组织的存活率,8 个苜蓿品种抗寒性从强到弱排列:超产苜蓿 = 草原 2 号苜蓿 > 公农 2 号苜蓿 > 公农 1 号苜蓿 > 龙牧 803 苜蓿 > 敖汉苜蓿 > 肇东苜蓿 > 草原 1 号苜蓿。孙祎龙等(2004)在吉林省西部对 41 个苜蓿品种进行了越冬率调查,结果是公农 2 号苜蓿、公农 1 号苜蓿、龙牧 803 苜蓿、肇东苜蓿的越冬率分别为:100%、98.7%、95.3%和 90.7%,抗寒性从强到弱排列:公农 2 号苜蓿 > 公农 1 号苜蓿 > 龙牧 803 苜蓿 > 肇东苜蓿。这与我们的实验结果吻合。

## 3 讨论

苜蓿的秋眠性是苜蓿的一种生长特性,与苜蓿的抗寒力有直接的关系。在美国,苜蓿的秋眠性是苜蓿品种鉴定的一个必测指标,通常分成 9 个秋眠级水平,秋眠级为 1 的品种抗寒能力最强,秋眠级为 9 的品种抗寒能力最差。很多人甚至将秋眠性与抗寒性这两个概念相互替代,以至在评价苜蓿的抗寒性时并不测定越冬率,而是直接用秋眠等级来预测抗寒性。但是李志坚等<sup>[6]</sup>(2004)的试验结果却显示,国内北方几个主要紫花苜蓿品种的越冬率均高于国外紫花苜蓿品种,但秋季的生长速度却高于部分秋眠型的苜蓿品种。

因此苜蓿的秋眠性只是对抗寒性的初步评价,越冬率应该是准确的标准。但是做越冬率试验要受到试验地点的局限,只能是在某特定地区对应供试品种进行抗寒与不抗寒的区分,而对不抗寒死亡和抗寒存活的品种,则需要再进行多次的异地试验,才能得到较为可靠的结果。

本项研究利用苜蓿组织培养技术在几个月就可以得到试验结果,并且可以对不同(下转第 25 页)

- factor protein VirE3. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(3): 860- 868 .
- [47]Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta*. 2003 ,216(4):580- 586 .
- [48]Genome- Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* .*Science*. 2003, 301(5633):653- 657 .
- [49]Generation and flanking sequence analysis of a rice T- DNA tagged population. *Theor Appl Genet*. 2004 ,108(2):306- 314 .
- [50]Brunaud V, Balzergue S et al. T- DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of preinsertion sites. *EMBO Rep*. 2002 , 3(12): 1152- 1157 .
- [51]Kononov,- M.E.; Bassuner,- B.; Gelvin,- S.B. Integration of T- DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant- j. Oxford : Blackwell Sciences Ltd*. May 1997. v. 11 (5) p. 945- 957 .
- [52]Yin,- Z.; Wang,- G.L. Evidence of multiple complex patterns of T- DNA integration into the rice genome. *Theor- appl- genet. Berlin; Springer- Verlag*. Feb 2000. v. 100 (3/4) p. 461- 470 .
- [53]Kim,- K.S.; Baek,- C.H.; Lee,- J.K.; Yang,- J.M.; Farrand,- S.K. Intracellular accumulation of mannopine, an opine produced by crown gall tumors, transiently inhibits growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol- plant- microb- interact. St. Paul, MN : APS Press*. [c1987- . June 2001. v. 14 (6) p. 793- 803 .
- [54]Wen- Tao Peng, Lois M. Banta, Trevor C. Charles et al. The *chvH* locus of *agrobacterium* encodes a homologue of an elongation factor involved in protein synthesis. *J. Bacterid.*2001.183:36- 45 .
- [55]Wen- Tao Peng, Yong- Woog Lee and Eugene W. Nester. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *J. Bacterid.*1998.180:5632- 5638 .
- [56]Zhenying Liu, Mark Jacobs, Dennis A. Schaff et al.ChvD, a chromosomally encoded ATP- binding cassette transporter- homologous protein involved in regulation of virulence gene expression in *agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*.2001.183:3310- 3317 .

## Molecular Base of *Agrobacterium tumefaciens* Transgene

ZHOU Xiao- hang\* , LIU Hong- zhang\* \*

(Faculty of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation included steps such as chemotaxis, attachment, vir region induction, T- DNA processing, transport, insertion, genes expression and so on. The molecular base of that procedure was reviewed in the paper.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens* ; T- DNA; Transport

~~~~~  
(上接第 18 页)苜蓿品种的抗寒性进行比较。如果能与常规试验结合,可能会对苜蓿的抗寒性有一个综合性评价,这还需要进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 王荣富.The kinds of plant hardiness criteria and their application [J] . *Plant Physiology Communication*(植物生理学通讯), 1987, 3:49- 55 .
- [2] 胡荣海 . Applied electro- conductivity gauge to study agriculture science- technology[J] . *国外农业科技*, 1984, 4:29- 31 .
- [3] 杨敏生,王春花,裴保华 . Cold resistance of hybrid clone of white poplar[J] . *东北林业大学学报*, 1997, 25(4):20- 23 .
- [4] 王 毅,杨宏福,李树德 . Studies on chilling injury and cold hardiness of horticultural crop : a literature review[J] . *园艺学报*, 1994, 21 (3):239- 244 .
- [5] 徐 红,张绮纹,陈一山,解荷峰.Study on the cold resistance of *Populus deltoids* clone singene- library[J].*林业科学研究* , 1994, 7(2): 234- 237 .
- [6] 李志坚,郭继勋,张志才等 . 关于吉林省西部紫花苜蓿种植的几点建议[J] . *吉林畜牧兽医*, 2004, 8: 3- 5 .

## Primary Evaluation of Cold Tolerance among Eight Alfalfa Varieties

LIU Yan- zhi, XIA Tong, WANG Yu- min, XING Shao- chen,

WANG Zhong- wei, TAN Hua, DONG Ying- shan

(Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Eight alfalfa varieties were used for tissue culture. The callus were induced from cotyledon of sterile plantlet and were treated with low temperature for six weeks. After the treatment, culture condition was recovered to normal and the regeneration plants were obtained. The evaluation of cold tolerance was confirmed by the rate of survival of callus that can develop into plants.

Key words: Alfalfa; Tissue culture; Low- temperature treatment; Cold resistance