

文章编号:1003-8701(2011)04-0051-04

白三叶高频组织培养再生体系的研究

齐广勋^{1,2}, 杨向东², 隋丽², 张正坤², 郭东全², 钱雪燕²,
邢国杰², 杨静², 董英山^{2*}, 王金刚^{1*}, 李启云^{2*}

(1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘要: 高频稳定的组织培养再生体系是开展白三叶遗传转化的重要前提。为进一步优化白三叶再生体系, 本研究以白三叶子叶节为外植体, 对影响丛生芽诱导、增殖的激素种类(2,4-D、KT、6-BA 和 NAA)和浓度进行了优化; 同时研究了不同基质对比对组培苗移栽成活率的影响。结果表明: 在含 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 和 NAA 0.1 mg·L⁻¹ 诱导培养基上丛生芽诱导率最高, 达 68.33%, 且生长状态最好; 在含 IBA 0.2 mg·L⁻¹ 的 1/2MS 培养基上诱导生根率为 90% 以上, 平均每株生根数达 6 条以上; 移栽至腐殖土和珍珠岩(2:1)混合基质中的再生苗成活率可达 85%。本研究结果可为建立豆科植物转化体系、加快白三叶基因工程改良及创制白三叶新种质奠定基础。

关键词: 白三叶; 子叶节; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S541+.203.53

文献标识码: A

Optimization of Regeneration System of *Trifolium repens* L.

QI Guang-xun^{1,2}, YANG Xiang-dong², SUI Li², ZHANG Zheng-kun², GUO Dong-quan²,
QIAN Xue-yan², XING Guo-jie², YANG Jing², DONG Ying-shan^{2*}, WANG Jin-gang¹, LI Qi-yun²

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: High-frequent regeneration is essential for plant genetic transformation. To further improve regeneration efficacy of white clover (*Trifolium repens* L.), different concentration and combination of phytohormones of 2,4-D, KT, 6-BA and NAA were investigated on shoots induction and proliferation from the cotyledon. And acclimation of the regenerated plantlets was also optimized. The results showed that better-quality of the shoots cluster can be induced from the cotyledon when the explants grew on the MS induction medium supplemented with 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ NAA. Besides, about 90% of shoots could take roots with an average of more 6 adventitious roots for every green shoot after four-weeks culture on 1/2MS medium containing 0.2 mg·L⁻¹ IBA. Moreover, over 85% of the regenerated plantlets survived when transplanted on the mixture of the turf and perlite (2:1). Our progress will do good help to genetic transformation system of Leguminosae plants, genetic improvement and germplasm innovation of *Trifolium repens* L.

Keywords: White clover; Cotyledon; Tissue culture; Regeneration system

收稿日期: 2011-01-28

基金项目: 国家 863 计划(2007AA10Z189); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-004); 国家转基因生物新品种培育重点项目(2008ZX08004-006B)

作者简介: 齐广勋(1983-), 男, 硕士, 从事园林植物种质资源创新与利用研究。

通讯作者: 董英山, 男, 博士, 研究员, E-mail: ysdong@cjaas.com

王金刚, 男, 博士, 副教授, E-mail: wangjingang99@yahoo.com.cn

李启云, 男, 博士, 研究员, E-mail: qyli@cjaas.com

白三叶(*Trifolium repens* L.)属豆科车轴草属多年生草本植物。作为牧草饲料具有品质优良、营养丰富、适口性好等优点;同时,在园林绿化、生态环境改善等方面发挥着重要作用。白三叶作为优良牧草和地被观赏植物其应用越来越广泛。近年来,随着生物技术的迅速发展,转基因技术已成为白三叶遗传改良的有效途径^[1-2]。高频组织培养再生体系是开展遗传改良的重要前提,自20世纪80年代初首次以白三叶成熟胚诱导分化出完整植株以来^[3],国内外相关工作者对白三叶节间茎段、芽尖、下胚轴等外植体离体再生做了相关研究^[4-7]。已有的研究表明,由于受基因型、外植体类型、激素种类等因素影响,白三叶再生频率差异较大,遗传转化效率不稳定。为进一步优化白三叶再生体系,本试验就不同激素种类、浓度配比对子叶节离体快繁速率、丛生芽扩繁频率、生根率的影响进行了研究,旨在建立高效稳定的白三叶组培再生体系,为建立豆科植物转化体系、加快白三叶基因工程改良及种质创新研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白三叶品种海法(Haifa)由东北农业大学园艺站提供。

1.2 外植体制备

种子先用自来水冲洗干净,在超净工作台上用75%酒精浸泡30s,依次5%NaOCl浸泡5min,无菌水冲洗3~4遍,无菌水浸泡12h,最后在湿润的无菌滤纸上催芽28~30h;剥去外种皮,沿两片子叶内侧纵劈胚轴^[8],保留子叶及基部2mm左右部分作为接种外植体。

1.3 培养基及培养条件

以MS作基本培养基,附加蔗糖30g·L⁻¹(生根培养为20g·L⁻¹),琼脂7.0g·L⁻¹,用1mol·L⁻¹NaOH调pH至5.8,并于121℃高压灭菌20min。培养温

度(25±2)℃,光强2000lx,光周期(16/8)h(光/暗)条件下培养。

1.4 试验方法

1.4.1 丛生芽诱导

将子叶节外植体接种到不同种类、浓度配比的激素诱导培养基上(表1),每处理接种20个外植体,每处理3次重复,3周继代一次,6周后统计丛生芽诱导率。丛生芽诱导率(%)=(产生丛生芽的外植体数/接种外植体数)×100。

1.4.2 生根诱导

待丛生芽长至3cm以上时分株进行生根诱导。以1/2MS作基本培养基,添加IBA0、0.2、0.4mg·L⁻¹(表3)。每处理接种10株小苗,每处理3次重复,4周后统计生根率。生根率(%)=(生根株数/接种株数)×100。

1.4.3 炼苗与移栽

炼苗时无菌水稍淹没培养基,先用塑料膜罩住无菌苗2~3d,再敞开培养皿口炼苗3d;移栽时将小苗根部培养基用自来水冲洗干净,移栽到腐殖土和珍珠岩不同比例混合的基质中(1:0;2:1),用不含蔗糖的1/2MS营养液浇透基质,塑料膜封闭保湿5d,待小苗恢复生长后逐步通风透气,3周后统计成活率,成活率(%)=(成活植株数/移栽株数)×100。

1.5 数据统计分析

数据采用SAS软件进行方差分析和多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 不同种类植物激素对丛生芽诱导的影响

由表1看出,不同种类激素对子叶节丛生芽诱导差异明显。不添加任何激素的MS培养基不能诱导出丛生芽,诱导培养2周时子叶膨大变绿、子叶节基部长出乳白色毛状根,最终没有丛生芽生成,2,4-D和KT不同浓度组合不能诱导出丛生

表1 不同植物激素组合及浓度对白三叶丛生芽诱导率的影响

培养基编号	激素种类及浓度组合/(mg·L ⁻¹)				接种数	诱导数	诱导率(%)
	KT	2,4-D	6-BA	NAA			
①	-	-	-	-	60	0	0
②	1.0	4.0	-	-	60	0	0
③	1.0	2.0	-	-	60	0	0
④	0.5	4.0	-	-	60	0	0
⑤	0.5	2.0	-	-	60	0	0
⑥	-	-	1.0	0.1	60	31	51.67±2.89c
⑦	-	-	1.0	0.25	60	38	63.33±2.89b
⑧	-	-	0.5	0.1	60	41	68.33±2.89a
⑨	-	-	0.5	0.25	60	42	70.00±0.00a

注:丛生芽指外植体再生芽数≥2,表中数据为3次重复试验平均值,差异显著性水平为0.05,下同。

芽,诱导培养 2 周时子叶节基部生成愈伤组织,其结构疏松水渍状、颜色呈淡黄色,诱导培养 4 周后整个子叶变黄近乎全部死亡,愈伤组织逐渐变白呈透明状不能进一步再分化(图 1 a);6-BA 和 NAA 不同浓度组合都能诱导出丛生芽且再生频率无显著性差异,诱导培养 2 周时子叶节基部浓绿膨大,呈现颗粒状突起,诱导培养 3 周时颗粒状突起分化出丛生芽,此后丛生芽分化成簇、生长迅速(图 1 b)。

2.2 6-BA 和 NAA 不同浓度组合对丛生芽增殖倍数的影响

表 2 6-BA 和 NAA 不同浓度组合对白三叶子叶节增殖倍数的影响

培养基编号	植物生长调节剂/(mg·L ⁻¹)		接种数	诱导率(%)	增殖倍数		
	6-BA	NAA			2~3	4~5	≥ 6
⑥	1.0	0.1	60	51.67± 2.89c	3± 1.00	16± 0.58	12± 0.00
⑦	1.0	0.25	60	63.33± 2.89b	4± 0.58	20± 0.58	14± 0.58
⑧	0.5	0.1	60	68.33± 2.89a	4± 0.58	25± 0.58	12± 0.00
⑨	0.5	0.25	60	70.00± 0.00a	6± 1.00	26± 0.58	10± 0.58

对子叶节丛生芽诱导效果最佳。

2.3 不同浓度 IBA 生根诱导的影响

由表 3 看出,添加不同浓度 IBA 的培养基生根率显著增高。观察表明不含 IBA 的 1/2MS 培养基诱导 10 d 后在小苗基部生出乳白色幼根,该种培养基诱导生根时间比含有 IBA 的培养基生根时间提前 2~3d,此后新生根生长缓慢,根系瘦弱

由表 2 看出,6-BA 和 NAA 不同浓度组合对丛生芽增殖倍数影响较大。在几种培养基丛生芽增殖倍数多在 4 个以上,不同培养基之间诱导状态不同。6-BA 浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 时,单个外植体上丛生芽增殖倍数(≥ 6)显著升高,但丛生芽诱导率较低、玻璃化现象严重,这可能是高浓度 6-BA 容易导致丛生芽出现玻璃化状态;6-BA 浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 时,丛生芽诱导率最高达 70%,6-BA 和 NAA 浓度比例高,丛生芽增殖倍数(≥ 6)降低,且丛生芽生长迅速、长势细弱。综合比较培养基 6-BA 0.5 mg·L⁻¹,NAA 0.1 mg·L⁻¹ 激素浓度组合

少侧根(图 1 c),4 周后统计生根率只有 53.33%;当 IBA 浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 时生根率可达 90%,根系发达,平均根长、平均生根数量达到最高水平(图 1 d),随着 IBA 浓度的升高,生根率下降且每株生根条数减少,当 IBA 浓度为 0.4 mg·L⁻¹ 时生根率只有 76.67%,诱导出的根粗壮但少侧根生成(图 1 e),植株叶片有部分白化死掉。

表 3 不同浓度 IBA 对白三叶生根诱导的影响

培养基编号	IBA(mg·L ⁻¹)	接种数	生根率(%)	平均每株生根数	根长势
⑩	0	30	53.33± 5.77	3.5± 0.00c	细弱、少侧根
⑪	0.2	30	90± 0.00	6.1± 0.06a	较粗壮、多侧根
⑫	0.4	30	76.67± 5.77	4.9± 0.10b	粗壮、少侧根

2.4 不同基质对组培苗移栽的影响

移栽试验表明,不同成分基质对再生苗成活率有很大影响。在全是腐殖土的基质中初期组培苗生长势较好,放到通风条件下组培苗生长势减弱,叶片萎蔫、叶柄倒伏,整个植株死亡,死亡的组

培苗多是基部和根部腐烂死掉,3 周后移栽成活率仅为 40%;在腐殖土和珍珠岩(2:1)混合的基质中组培苗成活率可达 85%,移栽成活的组培苗初期植株较小、生长速度较慢,后期生长速度快而旺盛(图 1 f)。

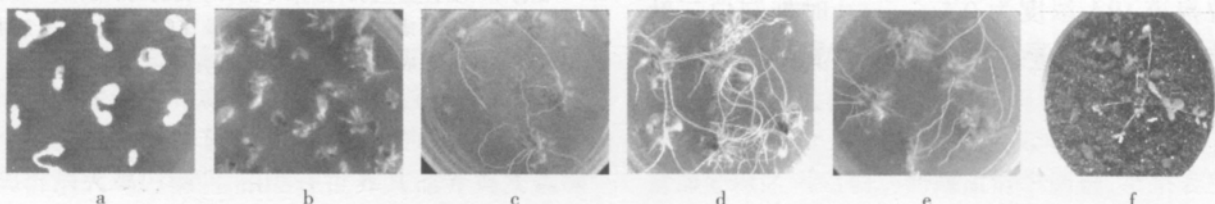


图 1 白三叶子叶节丛生芽诱导、生根与移栽

a: 在 MS 培养基(含 2,4-D 和 KT)上诱导 4 周时子叶和愈伤组织生长状态;b: 在 MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 培养基上 3 周后丛生芽诱导状态;c: 在 1/2MS 生根培养基上根长势;d: 在 1/2MS + IBA 0.2 mg·L⁻¹ 生根培养基上根长势;e: 在 1/2MS + IBA 0.4 mg·L⁻¹ 生根培养基上根长势;f: 移栽成活苗。

3 讨 论

本研究通过器官直接再生途径建立了白三叶

高频离体再生体系。试验就不同激素种类及浓度组合对白三叶丛生芽诱导、增殖等的影响进行了研究。结果表明在含 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 和 NAA

0.1 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基上子叶节丛生芽诱导率可达 68.33% ,且生长状态最好。比赫卫清报道白三叶品种爱丽丝(Alice)子叶在 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ 和 NAA 0.1 mg·L⁻¹ 的 MB 培养基上丛生芽诱导率为 29.4%要高^[9] ,但比张琪报道白三叶品种瑞文德(Riverdel)子叶在 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ 和 NAA 0.05 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基上丛生芽诱导率为 75%稍低^[10] ,这可能跟品种、培养基、激素浓度不同有关系。此外,本试验发现丛生芽增殖倍数多在 4 个以上,为高频扩繁再生体系的研究奠定了基础,6-BA 和 NAA 不同浓度组合对子叶节丛生芽诱导率较高,表明在 6-BA 和 NAA 组合作用下,子叶节基部细胞通过器官再生途径容易形成丛生芽。但不同浓度组合诱导率、增殖倍数、丛生芽生长势呈现差异,可能与激素浓度高低、比例大小有关系,王友生曾报道不同浓度激素配比诱导杂三叶产生效应不同^[11] ;在高浓度 2,4-D 和 KT 组合培养基上子叶节基部容易产生愈伤组织,该愈伤组织结构疏松、湿润、颜色发白,不能进一步再分化,最后变褐死掉。该结果表明高浓度 2,4-D 和 KT 组合对子叶节丛生芽诱导没有促进作用。这可能是高浓度 2,4-D 和 KT 易于促进细胞分裂增殖但抑制细胞再分化能力。Parrot 曾报道高浓度 2,4-D 易于促使愈伤组织产生次生胚而不能正常发育成成熟的体胚^[12] 。至于该种类激素组合是否适合其他外植体诱导还需要做进一步探讨。

在生根诱导试验中发现不添加任何激素的 1/2MS 培养基生根速度最快,诱导 10 d 后在小苗基部观察到乳白色幼根,但根系瘦弱不发达、侧根较少,与黄帆报道结果相似^[13] ;在 IBA 浓度为 0.4 mg·L⁻¹ 时生根率只有 76.67% ,且根系粗壮变短少侧根生成,同时植株叶片有部分变白死亡,可能是高浓度 IBA 对白三叶幼苗生长有抑制作用。杨丽莉曾报道 IBA 浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 时抑制白三叶根系生长且生根率降低^[14] ;在炼苗移栽试验中发

现不同基质混合对组培苗成活率影响较大。基质全部为腐殖土时移栽成活率仅为 40% ,可能是腐殖土保湿性强、透气性差所致;腐殖土和珍珠岩(2:1)混合时,其吸水、透气性好,有助于根系的发育和生长,移栽成活率提高。

参考文献:

- [1] Chen B C, Mcmanus M T. Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase genes during the development of vegetative tissues in white clover (*Trifolium repens* L.) is regulated by ontological cues[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60(3):451-467.
- [2] 韩胜芳,谷俊涛,肖凯. 高效表达黑曲霉 PhyA 基因改善白三叶草对有机态磷的利用[J]. *作物学报*, 2007, 33(2):250-255.
- [3] Gresshoff P M. In vitro culture of white clover [J]. *Botanical Gazette*, 1980, 141(2):157-164.
- [4] White D W R, Greenwood D. Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary agrobacterium vectors [J]. *Plant Molecular Biology*, 1987, 8(6):461-469.
- [5] Voisey C R, White D W R, Dudas B. Agrobacterium-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis[J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(6):309-314.
- [6] 赵志文. 反义磷脂酶 D_v 基因转化白三叶草的研究[D]. 山东农业大学, 2005.
- [7] 谷俊涛,赵红梅,刘祝玲,等. 农杆菌介导白三叶草高效遗传转化和转基因植株再生[J]. *草业学报*, 2007, 16(2):84-89.
- [8] 马晓红,姚陆铭,武天龙. 大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(3):373-378.
- [9] 赫卫清. 农杆菌介导的白三叶遗传转化体系的建立及优化 [D]. 首都师范大学硕士学位论文, 2003.
- [10] 张琪. 农杆菌介导的 SAP1、GNA 基因对白三叶等草坪草的遗传转化研究[D]. 兰州大学硕士学位论文, 2008.
- [11] 王友生,王璞,李阳春. 三叶草愈伤组织诱导及分化的研究[J]. *草业学报*, 2009, 18(2):212-215.
- [12] Parrott W A. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover [J]. *Plant Cell Report*, 1991, 10:17-21.
- [13] 黄帆,王明玖,何丽君,等. 白三叶×高加索三叶草 F₁ 代茎段离体培养器官发生的研究[J]. *草业科学*, 2010, 27(5):85-90.
- [14] 杨丽莉,贾炜珑,张彦芹. 白三叶草高频率植株再生系统的研究[J]. *山西农业科学*, 2002, 30(3):70-72.