

紫花苜蓿下胚轴愈伤组织诱导及再生植株的研究

王姝杰¹, 闫淑珍¹, 李世访^{2*}

(1. 南京师范大学生命科学学院微生物工程实验室, 江苏 南京 210097;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 以培养 4~5d 的紫花苜蓿无菌苗的下胚轴为材料, 改良 SH (SH 大量元素 + MS 微量元素 + MS 铁盐 + UM 有机) + 水解酪蛋白(CH)2000 mg/L 为基本培养基, 对紫花苜蓿愈伤组织诱导和植株再生进行了研究。愈伤组织诱导和继代培养基分别为 2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L 及 2,4-D 0.05 mg/L + BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L, 将获得的愈伤组织转入正交设计的培养基上进行筛选, 得到了愈伤组织分化率相对较高的培养基配方: 基本培养基 + KT 0.4 mg/L + 蔗糖 20 g/L, 其分化率为 73.0%。获得的再生芽在生根培养基上(1/2MSO)培养约 10d 便能获得具有根和叶的再生植株。本试验结果为下一步将来自蓝藻的 Na⁺/H⁺ antiporter 基因转入苜蓿, 获得转基因耐盐苜蓿奠定了基础。

关键词 基因工程; 紫花苜蓿; 下胚轴; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号 S 180.7110

Callus induction and plant regeneration derived from hypocotyls of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

WANG Shu-jie¹, YAN Shu-zhen¹, LI Shi-fang²

(1. Laboratory of Microbiology Engineering, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract Hypocotyls of 4-5d's seeding after germination was used as explants and modified SH (SH macronutrients + MS micronutrients + UM organic compound) + Casein Enzymatic Hydrolysate N-Z-Amine (CH) 2 000 mg/l as a basal medium to study callus induction and plant regeneration of alfalfa. The induction and continued medium of callus was added 2,4-D 1.0 mg/l + KT 0.5 mg/l + sucrose 30 g/l and 2,4-D 0.05 mg/l + BA 0.5 mg/l + sucrose 30 g/l. The callus was transferred into different medium, according to Orthogonal design principle, so that an optimal culture medium was selected, the results showed that the basal medium + KT 0.4 mg/l + sucrose 20g/l was the optimal medium for differentiation. And it's differentiation ratio from hypocotyls of alfalfa was 73.0%. Within 10 days after the regenerated bud was transferred into the rooting medium (1/2MSO), it is possible to get a plantlet with shoots and roots. The result provide a basic foundation to produce transgenic alfalfas that are resistant against salt stress by introducing Na⁺/H⁺ antiporter gene from synechocystis species pcc 6803.

Key words gene engineering; *Medicago sativa* L.; hypocotyls; callus; tissue culture

土壤盐渍化是造成农业生产力下降、生态环境破坏的重要因素之一。现在我国约有 6.7×10^6 hm² 土地有不同程度的盐渍化, 占耕地面积的 10%, 而且由于工业污染、灌溉方法不当等原因, 还有逐年增加的趋势。因此, 培育作物耐盐新品种是目前亟待解决的问题之一。

Nhap 基因是通过 PCR 方法从蓝藻 (*Synechocystis pcc6803*) 中分离得到的, 编码质膜 Na⁺/H⁺ 逆向运输蛋白, 基因全长 1 581bp (不包括终止密码子), 编码 527 个氨基酸, 已有研究表明该基因在原核生物中具有耐盐性^[1]。为进一步明确其耐盐性, 构建了植物表达载体 pBI121-Nhap, 并通过

农杆菌介导法转入烟草中,经过耐盐性分析,确定了该基因在真核生物中的表达,提高了烟草的耐盐性(另文发表)。利用该类基因进行耐盐转基因研究是目前作物耐盐性研究的一大热点,具有很大的潜力。

紫花苜蓿将大量根系遗留在土壤里,在改良土壤结构、理化性质、保持水土和保护环境等方面具有重要作用,因此通过基因工程手段获得耐盐性苜蓿具有很大的应用价值。但紫花苜蓿作为基因转化的受体,其分化能力比较低,在一定程度上限制和影响其应用^[2]。为此,本研究进行了苜蓿再生体系(重复性好、愈伤组织分化稳定且分化频率高、再生周期短)的建立,为苜蓿的遗传转化提供技术储备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

阿尔贡奎因紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)由中国农业科学院畜牧研究所杨青川赠送。

1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导

将饱满的苜蓿种子在灭菌蒸馏水中浸泡 30min 后,用 75% 酒精处理 1min,然后用 2% 次氯酸钠溶液消毒 20min,无菌水洗 3~5 次,接种在 1/ 2 MS 培养基上,置于(25±1)℃ 温度下培养。光照强度为 2 500lx,光照周期为光照//黑暗=16h//8h。待 4~5d 子叶完全展开而真叶尚未长出时,取其下胚轴切成 2~3mm,进行愈伤组织的诱导和继代培养。所用的愈伤组织诱导和继代培养基分别以改良 SH + CH 2 000 mg/ L 为基本培养基,分别添加不同浓度的激素(表 1)。

1.2.2 愈伤组织的分化

外植体在上述培养基上培养 30d 左右,转入分化培养基上,并加入不同浓度的激素和蔗糖,通过正交设计筛选出愈伤组织分化率相对较高的组合。

1.2.3 再生植株的获得

将从愈伤组织上分化得到的不定芽(长至 1~2cm)从母体切下,转至生根培养基(1/ 2MSO)上进行生根培养。培养 20d 左右,幼苗大部分长出 4~5 条粗根,统计生根率并炼苗。打开瓶盖室温放 2d,小心取出幼苗用自来水将根部的培养基洗掉,再移至花盆中(蛭石:营养土:灰土=1:1:1)培养,即可获

得再生植株。

2 结果与分析

2.1 苜蓿愈伤组织的诱导

本试验以下胚轴为外植体,在同一培养基上添加不同浓度的激素,结果发现愈伤组织发生的时间和发生率均有所不同(表 1)。其中基本培养基 + 2, 4-D 1.0 mg/ L + KT 0.5 mg/ L 愈伤组织的发生时间较短,约 3d,且愈伤组织的发生率也较高,达 100%。同时,在继代培养过程中,减少 2,4-D 的浓度,改变细胞分裂素的种类可以很大程度上减少愈伤组织的褐化,而且有利于后期愈伤组织的分化。预试验表明,基本培养基 + 2,4-D 0.05 mg/ L + BA 0.5 mg/ L 是较好的继代培养基。

表 1 激素对苜蓿愈伤组织诱导率的影响			
2,4-D (mg/ L)	KT (mg/ L)	愈伤组织 发生时间(d)	愈伤组织 发生率(%)
1.0	0.25	5	85
1.0	0.50	3	100
2.0	0.25	4	94
2.0	0.50	5	90

2.2 苜蓿愈伤组织的分化

本试验在基本培养基 + 2,4-D 1.0 mg/ L + KT 0.5 mg/ L 进行愈伤组织的诱导和 2,4-D 0.05 mg/ L + BA 0.5 mg/ L 的继代培养,获得大量的愈伤组织后,利用正交设计对紫花苜蓿分化培养基进行了优化筛选。取 3 个因素:2,4-D、KT、蔗糖。每个因素设 3 个水平(表 2),用 L₉(3³)表来安排,共 9 个试验处理。试验发现在不添加 2,4-D,蔗糖浓度为 20g/ L 时,愈伤组织生长状态较好,有时还能分化出同时具有根和芽的小植株。

表 2 因素水平表			
水平	2,4-D (mg/ L)	KT (mg/ L)	蔗糖 (g/ L)
1	0	0.3	10
2	0.5	0.4	20
3	1.0	1.0	30

试验结果(表 3)经 SPSS11.5 统计软件的 LSD 分析表明,以愈伤组织的分化率为考察指标,2,4-D 的影响达到显著水平($P<0.05$),KT、蔗糖的影响未达到显著水平($P>0.05$),且蔗糖作用大于 KT 作用,即 3 种影响因素对愈伤组织分化的影响程度依次为 2,4-D>蔗糖>KT。 R (极差)可以

表 3 正交设计试验结果

编号	2,4-D(mg/ L)	KT(mg/ L)	蔗糖(g/ L)	分化率(%)
1	1(0)	1(0.3)	1(10)	35.2
2	1(0)	2(0.4)	2(20)	73.0
3	1(0)	3(1.0)	3(30)	41.7
4	2(0.5)	1(0.3)	2(20)	36.0
5	2(0.5)	2(0.4)	3(30)	31.6
6	2(0.5)	3(1.0)	1(10)	27.1
7	3(1.0)	1(0.3)	3(30)	18.3
8	3(1.0)	2(0.4)	1(10)	30.4
9	3(1.0)	3(1.0)	2(20)	36.3

反映哪种因素对愈伤组织分化的影响最大。从表 4 看出 *R* 最大值为 64.9,从而得出 2,4-D 的浓度对愈伤组织分化的影响较大。无论是 LSD 分析还是极差分析都表明,2,4-D 和蔗糖是影响苜蓿愈伤组织分化率的重要影响因子。其水平的最优方案是:改良 SH + 2,4-D 0 mg/ L + KT 0.4 mg/ L + 蔗糖 20 g/ L。

表 4 L₉(3³)的极差分析考察指标¹⁾

激素成分	K1	K2	K3	R
2,4-D	149.9	94.7	85.0	64.9
KT	89.5	135.0	105.1	45.5
蔗糖	92.7	145.3	91.6	53.7

1) K1、K2、K3 分别是 3 种影响因素在不同水平上之和,*R* 表示极差。

2.3 再生植株的获得

有研究发现紫花苜蓿在无激素的培养基上便可生根,本试验将分化的不定芽分别转入 1/ 2MSO 和 MSO 培养基上,就蔗糖浓度对生根的影响进行了研究。

从表 5 看出,蔗糖浓度对生根有较大的影响,1/ 2MSO 生根率最高达 100%,所需时间也较短,约 10d;MSO 也能生根,但生根率下降为 75%,时间会推迟 4~5d。

表 5 蔗糖浓度对苜蓿不定芽生根的影响

培养基	生根所需时间(d)	生根率(%)
1/ 2MSO	10	100
MSO	15	75

3 讨论

3.1 激素对愈伤组织诱导和分化的影响

在苜蓿组织培养中所使用的生长素有 2,4-D、NAA、IAA、IBA 等,通常认为 2,4-D 是体细胞胚再

生的关键激素^[3~9],本试验的结果也说明了这点;所用的细胞分裂素主要有 KT、BA,其作用是促进细胞分裂,促进芽的分化等,就阿尔贡奎因紫花苜蓿而言,在改良 SH 培养基中添加 KT 0.4 mg/ L 可以使得到的愈伤组织高度分化,同时在适合的时间将愈伤组织转入到没有生长素刺激的培养基上也有利于愈伤组织的分化和植株再生。

3.2 利用正交设计筛选最佳分化培养基

目前已报道的苜蓿培养基的配方筛选多为随机选择几种激素配比,这种筛选方法随机性和工作量大,且往往忽视了激素之间的交互作用,而正交设计则可以把各种影响因素均匀的搭配在一起,用少数几次试验便能反映出很多次试验的情况。本试验用 9 次试验反映了 3³=27 次试验的情况^[10]。另外,还通过统计软件和极差分析了解到 2,4-D 的浓度对愈伤组织的分化影响最大。

参考文献

[1] 李世访,王法龙,徐世昌. 蓝藻(Na⁺/H⁺ antiporter, Nhap)基因的克隆及其介导的抗盐能力[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3)增: 28.

[2] Kathleen D H, Johan B, Willy D G. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions[J]. Crop Science. 1990(30): 860-871.

[3] 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.

[4] 邓百万,张兆清,刘世贵. 几种豆科牧草植物组织培养体细胞胚诱导研究[J]. 汉中师范学院学报(自然科学), 2000, 18(1): 72-78.

[5] Walker K A, Wendeln M L, Jaworki E G. Organogenesis in the callus tissue of *Medicago sativa* L. the temporal separation of induction processes from differentiation processes[J]. Plant Sci Lett, 1979, 16: 23-30.

[6] 张万军,王涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因子的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1579-1583.

[7] Shao C Y, Russinova E, Iantcheva A, et al. Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago sativa* L.) via direct somatic embryogenesis[J]. Plant Growth Regulation, 2000, (31): 155-166.

[8] Tian L, Brown D CW, Walton E. Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2002, 38(3): 279-283.

[9] 吴祖建,林奇英,谢联辉. 甘薯分生组织培养配方的筛选[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(增刊): 81-83.