

苜蓿愈伤组织细胞学观察及芽分化的研究

李 红¹, 李 波², 杨 墓¹

(1. 黑龙江省畜牧研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2.齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江齐齐哈尔 16100)

摘要 以龙牧 801 苜蓿叶片诱导产生愈伤组织为材料, 接种在诱导和胚性发生培养基上, 采用形态学、涂片法和石蜡切片法对愈伤组织的形态和内部细胞结构进行观察。以 NAA 和 KT 两种激素不同水平, 进行芽分化最佳激素配比筛选。结果表明: 胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在形态和细胞学特性方面存在显著差异, 为苜蓿体细胞胚胎发生提供了理论基础。苜蓿愈伤组织芽分化最佳激素配比为 NAA 0.5mg/L+KT 1.5mg/L。

关键词 苜蓿; 愈伤组织; 解剖结构; 芽分化

Cytological Observation and Redifferentiation of on the Alfalfa Callus

LI Hong¹, LI Bo², YANG Zhao¹

(1.Farming research Institute of Heilongjiang, Qiqihar, Heilongjiang Province 161006, China;

2.School of Life Science and Agriculture and Forestry Qiqihar university, Qiqihar, Heilongjiang Province 161006, China)

Abstract: During induced and embryogenic culture medium of the callus of Alfalfa of Longmo 801, histological and cytological observations of the callus were performed with morphology, smear and paraffin slice . In order to the best hormone levels, NAA and KT different levels were shoot differentiation.The results showed there were obvious difference form and structure between embryonic callus and non-embryonic callus. Research of alfalfa somatic embryos can provide theoretical basis. NAA 0.5mg/L+KT 1.5mg/L was the optimum hormone combination on shoot differentiation of callus.

Keywords: Alfalfa; callus; anatomy structure ; shoot differentiation

紫花苜蓿 (*medicago sativa L.*) 是世界上最广泛种植的牧草之一, 为豆科草本植物, 是畜禽优选的饲料, 再生性和适应性较强^[1]。利用植物组织培养技术产生愈伤组织可以进行苜蓿的抗逆性育种, 但是普遍研究中发现苜蓿愈伤组织的再分化率较低, 易产生玻璃化现象^[2]。激素的选择及浓度的筛选更是影响苜蓿愈伤组织形成及分化的首要因素。通过对愈伤组织显微结构分析, 旨在为了解愈伤组织再分化提供一些细胞学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以龙牧 801 苜蓿叶片诱导出的愈伤组织为材料。愈伤组织诱导和继代培养基为 MS+1mg/L 2,4-D +0.5 mg/L 6-BA +琼脂 8.5g + 蔗糖 30g, 每 20d 继代一次。胚性愈伤组织诱导培养基为 MS+0.2mg/L NAA+0.1mg/L 6-BA+0.1mg/L KT +琼脂 8.5g + 蔗糖 30g^[3]。挑取新鲜的苜蓿愈伤组织, 将其切成 5mm³ 的大小, 接种于胚性愈伤组织诱导和芽分化培养基, 在 23-25℃ 和 1000-3000Lx 的光照培养箱下培养。

1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织形态观察

对继代培养第 8 天的愈伤组织进行细胞表面结构、颜色和质地的观察。

1.2.2 愈伤组织涂片和石蜡切片制作

取新鲜的、长势良好的愈伤组织小块, 放在培养瓶中, 滴 3-5 滴卡宝品红染液, 用注射器胶皮头将愈伤组织充分捣碎, 吸取上层清液, 滴 1 滴于干净的载玻片上, 显微镜下观察并拍照。

选取新鲜的、长势较好的愈伤组织材料, 进行常规石蜡切片制作, 用番红和固绿双重染色。

1.2.3 愈伤组织芽分化激素配比的筛选

选用 MS 培养基为基础培养基, 添加 NAA 和 KT 两种激素, NAA 浓度为 0.1 mg/L、0.3 mg/L、0.5 mg/L, KT 浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L, 两种激素进行排列组合的 9 种培养基见表 2。将新鲜的愈伤组织分割成约 5mm³ 的小块, 接种到 9 种不同培养基中, 每瓶 6-9 块。培养条件同上, 培养 15d 后对 1-9 号各培养基的材料进行观察和统计。

2 结果与分析

2.1 胚性与非胚性愈伤组织形态上的差异

胚性愈伤是指具有胚胎发生能力的愈伤组织, 它处于增值旺盛和分化状态。非胚性愈伤是指愈伤组织中的细胞虽具有增殖能力, 但没有胚胎发生能力的愈伤^[5]。这 2 种愈伤组织在形态学和细胞学上有明显的差异。本试验中对培养第 8 天的愈伤组织观察发现两类愈伤组织的特点, 两类愈伤组织的比较见图 1 和表 1。

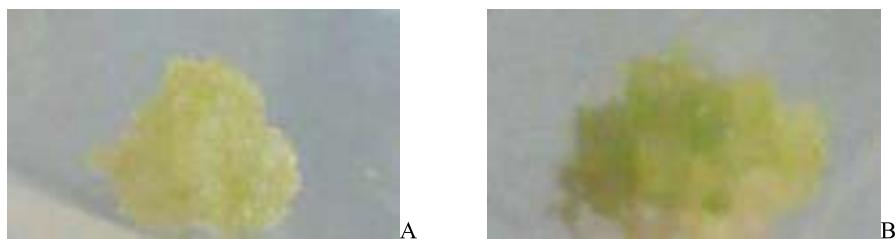


图 1 愈伤组织外部形态

Fig 1 Outer morphology of callus

注: A 非胚性愈伤组织

B 胚性愈伤组织

表 1 胚性与非胚性愈伤组织的形态比较

Table 1 Comparison of embryonic callus and non-embryonic callus morphology

类型	颜色	质地	表面结构
胚性愈伤组织	淡绿色	较致密	较粗糙, 表面有颗粒状突起
非胚性愈伤组织	黄绿色	较疏松	较光滑

2.2 解剖结构的观察

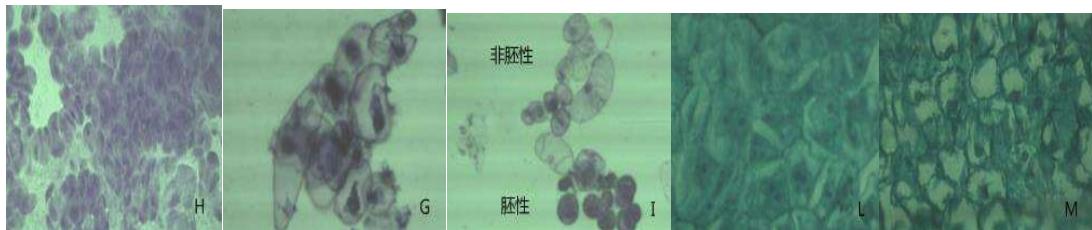


图 2 愈伤组织显微结构

Fig 2 Microstructure of callus

注: G、H、I 为愈伤组织涂片图

L、M 为愈伤组织石蜡切片图

G 和 L 非胚性细胞; H 和 M 胚性细胞; I 胚性和非胚性细胞共存

对愈伤组织显微结构观察(见图2)发现, 胚性细胞与非胚性细胞差异显著。胚性愈伤组织细胞为体积较小, 细胞直径约10μm左右、胞质浓厚、染色深、细胞核大、细胞形状较规则, 排列紧密的近圆形细胞, 具有分生组织细胞的特点, 因此, 胚性愈伤组织细胞分裂能力强, 代谢活跃, 具有体细胞胚发生能力; 非胚性愈伤组织细胞为体积较大, 直径约20 μ m左右、胞质稀薄、染色浅、细胞核小、形状不规则排列疏松的大细胞, 细胞表面褶皱, 细胞分裂能力弱, 无体细胞胚发生能力。初始愈伤组织细胞的形态结构位于上述两者之间, 也无体细胞胚发生能力。

2.3 芽分化的最佳激素 NAA 和 KT 浓度的筛选

本试验在MS 培养基上附加不同浓度的NAA, 并分别与不同浓度的KT配比, 研究其对芽分化的影响, 结果见表2。从接种的第10天开始愈伤组织开始陆续长出绿色芽点(见图3), 不同浓度的NAA和KT的芽的分化率有一定的差异, 1-9号培养基出芽率依次为9>7>8>3>5>6>1>2>4, 9号培养基的出芽率最高, 达到48.8%, 在第15d时长出丛生芽, MS培养基添加NAA 0.5mg/L和KT 1.5mg/L时, 苜蓿愈伤组织出芽率最高, 其他培养基也有芽的分化, 说明添加一定浓度的NAA和KT配合有利于苜蓿愈伤组织芽的再分化。

表 2 芽分化培养基的激素浓度及愈伤组织芽分化率(%)

Table 2 The concentration of hormone in culture medium on shoot differentiation and shoot differentiation ratio of callus

培养基编号	NAA 浓度(mg/L)	KT 浓度 (mg/L)	愈伤组织接种数(块)	分化块数(块)	分化频率(%)
1	0.1	0.5	47	9	19.1
2	0.1	1.0	42	7	16.7
3	0.1	1.5	40	11	27.5
4	0.3	0.5	45	5	11.1
5	0.3	1.0	44	11	25.0
6	0.3	1.5	48	11	22.9
7	0.5	0.5	49	17	34.7
8	0.5	1.0	43	13	30.2
9	0.5	1.5	43	21	48.8

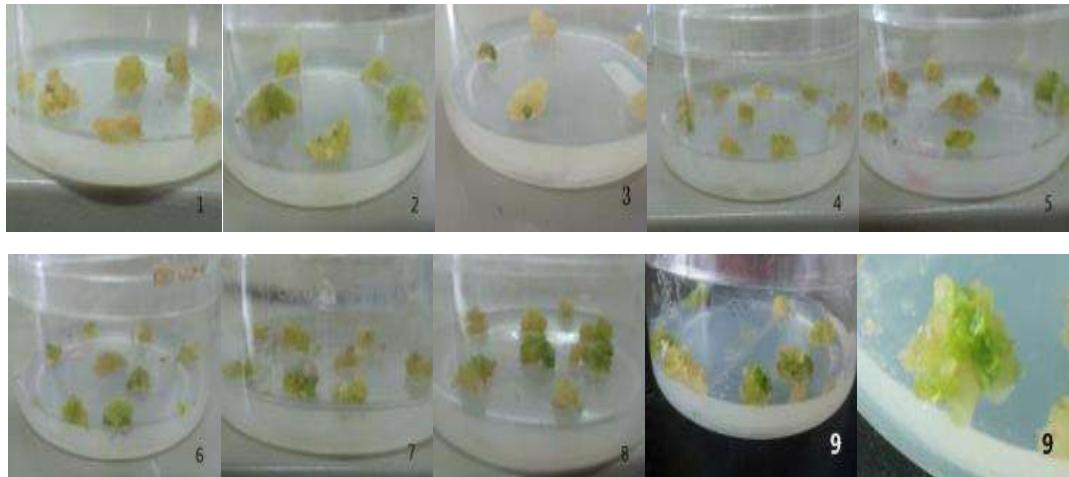


图 3 两种激素配比下苜蓿愈伤组织芽的分化

Fig 3 Effect of different hormone constitution on shoot induction in Alfalfa

3 讨论

3.1 愈伤组织的鉴定为苜蓿不定芽的发生提供可能性

愈伤组织在长期继代过程中，有胚性和非胚性愈伤组织两类组织发生。胚性愈伤组织发生前要经历愈伤组织生长发育阶段。苜蓿成熟叶片在含有一定浓度的 2, 4-D 和 6-BA 的激素配比的培养基中可诱导出大量的愈伤组织，经长期培养愈伤组织失去绿色，变成淡黄色，有的愈伤组织失去胚性化。愈伤组织在 MS+0.2mg/l NAA+0.1mg/l 6-BA+0.1mg/l KT 培养基培养过程中，在培养第 8 天时，发现愈伤组织开始逐渐变成绿色，并逐渐形成颗粒状突起，此类愈伤组织即为胚性愈伤组织。共接种 208 块愈伤组织，有 163 块愈伤组织长出颗粒状突起，诱导率达 78.4%。对苜蓿愈伤组织采用形态学和细胞学的方法对其发生的状态进行观察，准确判断其愈伤组织的发生类型和愈伤组织是否进入胚性化，可为

第六届中国苜蓿发展大会

实现苜蓿愈伤组织的再分化创造条件。

3.2 植物激素在愈伤组织的诱导和再分化的作用

植物激素是植物体愈伤组织诱导的关键因素，调节激素水平和组合已成为提高愈伤组织诱导与分化频率的有效手段。不同的植物激素对植物细胞的识别能力不同，植物激素浓度不同，与植物细胞结合的机会也不同，因此不同种类和浓度的植物激素组合会影响愈伤组织的诱导和再分化。朱苏文等研究表明 2,4-D 对大岩桐愈伤组织诱导的作用最显著^[4]，杜希华等人研究表明，单独使用细胞分裂素不能使愈伤组织生长，而同时加入一定配比的细胞分裂和生长素有利于愈伤组织的诱导，细胞分裂素是植物脱分化所必须的^[5]。实验中发现添加一定配比的 2,4-D 和 6-BA 可以诱导苜蓿叶片产生大量的愈伤组织。2,4-D 的浓度控制在 1.0 mg/L 左右，6-BA 0.5 mg/L 左右时有利于愈伤组织的诱导和继代培养，2,4-D 的浓度过高不利于愈伤组织的再分化。但是愈伤组织的不定芽的分化率和激素的浓度不呈正相关，胡静对甘农 2 号杂化苜蓿最佳的芽分化培养基和伊风艳对黄花苜蓿最适分化培养基筛选均为 MS 附加 0.5 mg/L KT 和 0.1 mg/L NAA^[6-7]。实验发现在愈伤组织芽的分化中，可以配合添加一定浓度 NAA 和 KT，NAA 的浓度在 0.1-0.5 mg/L 之间，KT 浓度在 0.5-1.5 mg/L 时，均有不定芽的分化，以 0.5mg/L NAA 和 1.5mg/L KT 愈伤组织不定芽的分化率最高。

参考文献（略）