

草木樨状黄芪甲硫氨酸抗性系的原生质体培养及植株再生

金红^{1,2} 贾敬芬^{1*} 郝建国¹

¹(西北大学生物技术省级重点实验室,西安 710069)

²(深圳市仙湖植物园,深圳 518004)

摘 要 建立了草木樨状黄芪(*Astragalus melilotoides* Pall.)甲硫氨酸抗性系原生质体再生植株的实验体系。以茎切段诱导的松软愈伤组织为材料,通过酶法分离出大量有活力的原生质体。原生质体经培养持续分裂形成了愈伤组织,并高频率地分化出再生苗。比较了不同培养基、培养方法和培养密度对原生质体分裂和再生的影响。结果表明,原生质体以 3×10^5 /mL的植板密度,采用琼脂糖岛法培养在附加 1.0mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 0.5mg/L 6-苄氨基嘌呤(6BA) 500mg/L 水解酪蛋白、3%蔗糖、 0.3mol/L 甘露醇的 KM_{sp} 培养基中,可获得最佳效果,其细胞分裂频率达38%左右。原生质体培养后仍然保持对甲硫氨酸的抗性,同时对乙硫氨酸表现交叉抗性。

关键词 草木樨状黄芪,原生质体培养,植株再生

中图分类号 Q943 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0221-06

草木樨状黄芪(*Astragalus melilotoides* Pall.)是豆科多年生牧草,具植株高大、根深耐旱的特性。除可用作动物饲料,还是较好的水土保持、土壤改良及绿肥植物。在我国北方,尤其是西北干旱地区普遍种植。关于它的组织培养^[1-3]、单细胞培养^[4,5]已有成功的报道。已有从下胚轴再生苗叶片原生质体培养获再生植株的报道^[6]。本实验室通过 NaN_3 诱变筛选出草木樨状黄芪抗甲硫氨酸变异系及抗性植株^[7]。在此基础上,我们利用这一抗性系再生植株诱导的愈伤组织为材料游离原生质体,经培养成功地获得了对甲硫氨酸和乙硫氨酸具交叉抗性的再生植株。这一研究对于将该抗性系用于做体细胞杂交亲本奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

用本实验室筛选获得的草木樨状黄芪甲硫氨酸抗性系再生植株^[7]为起始实验材料。将抗性系再生植株的茎切成 0.5cm 小段,经诱导培养成愈伤组织^[3]。选择淡黄绿色疏松的愈伤组织进行原生质体游离。诱导培养基为 Murashige 和 Skoog 培养基(MS培养基)^[8] + 1.0mg/L 2,4-D + 0.5mg/L 6BA +

500mg/L 水解酪蛋白 + 250mg/L 酵母提取物 + 3%蔗糖 + 0.65% 琼脂粉, pH 5.8。愈伤组织的诱导在 25°C 、800 lx光照下进行。

1.2 原生质体的分离、收集及纯化

将质地疏松的淡黄绿色愈伤组织转入新鲜的诱导培养基,取在新鲜培养基上转代2d、4d、6d、8d、10d、12d的愈伤组织 $1\sim 2\text{g}$,置于盛有 10mL 酶液的三角瓶中,在 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、黑暗下静置15h,接着在 25°C 恒温摇床上 50r/min 振荡1h,以分离原生质体。所用酶类包括纤维素酶 Cellulase Onozuka R-10 (Yakult, Japan),半纤维素酶 Hemicellulase (Sigma),离析酶 Macerozyme R-10 (Yakult, Japan),果胶酶 Pectinase (Serva)。酶液中除所示酶类,均添加 0.4mol/L 甘露醇,0.1% MES[2, (N-玛琳)-乙烷磺酸], 0.05mol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 5.8。

酶解液用400目不锈钢筛过滤,于 800r/min 离心5min收集原生质体。原生质体悬浮于洗涤液中。洗涤液的组成为 0.16mol/L CaCl_2 , 0.1% MES, pH 5.8。用18%蔗糖溶液离心(500r/min 离心10min)漂浮纯化原生质体,漂浮的原生质体吸至新管,用洗涤液洗涤一次,再用原生质体培养液洗涤一次,随后计数原生质体产率和活力。用酚藏花红(溶于0.4

mol/L 甘露醇中)染色检查原生质体活力,并以存活原生质体占原生质体总数的百分数表示结果。每次分离的原生质体随机检查 20 个视野,每个处理至少 3 次重复。

1.3 原生质体培养

纯化的原生质体重新用原生质体培养液悬浮,放入直径 6cm 的玻璃培养皿中,每皿 2mL,采用液体浅层培养。此过程均在 25℃、暗条件下进行。试用的原生质体培养液包括 MS、DPD^[9]、KM_{8p}^[10]的基本成分,同时都附加 2,4-D 1.0mg/L、6BA 0.5mg/L、水解酪蛋白 500mg/L、蔗糖 3%、甘露醇 0.3mol/L, pH 5.8。相对分裂频率以培养 7d 时发生分裂的原生质体数占植板的存活原生质体总数的百分数表示。每次分离的原生质体随机检查 20 个视野,每个处理至少 3 次重复。此外,还用 KM_{8p} 培养基尝试了以下两种培养方法对原生质体培养的影响:

1.3.1 固-液双层培养:先将含 0.8% 的低熔点琼脂糖的 KM_{8p} 培养基 2mL 在直径 60mm 的培养皿底部铺一薄层,待其凝固后,再将适当密度的原生质体悬液 2mL 平铺于固体薄层上;

1.3.2 琼脂糖岛培养:将 2 倍于正常密度的原生质体悬液与 1.0% 低熔点琼脂糖 KM_{8p} 培养基在 40℃ 等量混合,用滴管滴至直径 60mm 的培养皿底上,凝固后,再向每皿加 KM_{8p} 液体培养基 2mL。

1.4 愈伤组织形成及植株分化

大约在培养 2 周后,原生质体分裂形成小细胞团时,向培养皿添加 0.5mL 甘露醇浓度减半的培养基,以后每 10 天加入渗透压逐渐降低的新鲜培养基。将生长至 2mm 左右的小愈伤组织转入 MS 固体培养基(同 1.1 诱导培养基)进行增殖。待愈伤组织形成后转入分化培养基,在 25℃ ± 2℃, 2500lx 下诱导分化^[3]。分化培养基为:MS 培养基基本成分 + 6BA 1.0mg/L + KT 0.2mg/L + 水解酪蛋白 500mg/L + 酵母提取物 200mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%, pH 5.8。待再生苗长到 2~3cm 时切下,转入 1/2MS + 蔗糖 3% + 琼脂粉 0.7% 的培养基上(pH 5.8)诱导生根。

1.5 原生质体来源的愈伤组织对甲硫氨酸的抗性以及对乙硫氨酸的交叉抗性测定

将原生质体培养形成的愈伤组织(AMet^rPPs)和正常种子苗诱导的愈伤组织(对照)分别转入含 0, 4mmol/L, 8mmol/L, 12 mmol/L, 16mmol/L 甲硫氨酸(methionine)的 MS 培养基上(同 1.1 诱导培养基),

比较二者对甲硫氨酸的抗性。同样将 AMet^rPPs 和对照愈伤组织分别转入含 0, 0.2mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6mmol/L, 0.8mmol/L 乙硫氨酸(ethionine)的 MS 培养基(同 1.1 诱导培养基)上培养,比较二者对乙硫氨酸的交叉抗性。在 25℃ ± 2℃, 1500 lx 光照下培养 3 周后,测定愈伤组织的鲜重相对增长率。每个处理设 3 次重复。

2 结果和讨论

2.1 原生质体分离和纯化

2.1.1 酶液组成对原生质体产量和活力的影响:将在新鲜培养基上转代 8d 的松软愈伤组织置于表 1 所示 3 种不同组合的酶液中,酶解后收集的原生质体的活力基本上都在 70% 以上。组合(1)和组合(2)相比,纤维素酶与果胶酶组合比与离析酶组合效果好。组合(2)与组合(3)比较,半纤维素酶的加入,更有利于原生质体的分离。在这种情况下,原生质体产量(2.1 × 10⁶/g 鲜重)最高。故下面研究均采用组合(3),即 2% 纤维素酶 Cellulase (Onozuka R-10), 0.5% 果胶酶 Pectinase (Serva) 和 0.5% 半纤维素酶 Hemicellulase (Sigma) 的组合来分离原生质体。进行原生质体培养,要保证分离得到的原生质体完整、有活力,就要求除了应当尽量降低所用酶的浓度,保证酶的纯度外,酶液还要有合适的渗透浓度。酶液渗透压应大致和原生质体内的渗透压接近,渗透压略大些有利于原生质膜的稳定,但过大会使原生质体收缩并阻碍分裂。浓度在 0.4~0.6mol/L 的甘露醇、山梨醇、蔗糖、葡萄糖或麦芽糖是普遍使用的渗透压调节剂。加入 CaCl₂、MES、KH₂PO₄ 都可以提高原生质膜的稳定性,增加完整原生质体的数目和活力^[11]。本研究中用于试验的酶液也均添加了一定浓度的甘露醇、MES、CaCl₂·2H₂O,对于维持原生质体的稳定性取得了良好的效果。另外,用蔗糖漂浮法纯化原生质体的关键是蔗糖液的浓度,离心速度和时间。经试验,用 18% 的蔗糖(pH 5.8)溶液漂浮,用 500r/min 的低速离心 10min,可以有效地使原生质体集中在蔗糖液的表面,获得纯净原生质体。

2.1.2 不同取材时间对分离原生质体的影响:原生质体来源材料(即愈伤组织)的状态是影响原生质体分离及培养的一个非常关键的因素。实验中比较了以不同继代培养时间的愈伤组织为材料分离原生质体的效果。结果如图 1 所示,转入新鲜培养基上的变异系愈伤组织在培养到 8d 时用作原生质体分离材料,可以获得大量有活力的原生质体,这时细胞处

于旺盛增殖期,以这种状态的细胞进行原生质体分离比较合适。刚分离出的原生质体呈球形,直径在 $16 \sim 30 \mu\text{m}$ 之间(图 2A)。这种以处于对数生长期的疏松愈伤组织为游离材料的方法对一些胚性系不易建立的植物进行原生质体培养可能具有普遍的参考价值。Xu & Jia 以转代后 9~10 d 的红豆草羟脯氨酸抗性细胞系游离原生质体也有成功的报道^[21]。

表 1 酶液组成对原生质体产量和活力的影响*

Table 1 The effect of different enzyme compositions on the yield and viability of protoplasts*

Different combinations of enzyme solution	Yield of protoplasts (/g Fresh weight)	Viability of protoplasts /%
(1) 2% Cellulase(OnozukaR - 10) 1% MacerozymeR - 10	8.6×10^5	69.2
(2) 2% Cellulase(OnozukaR - 10) 1% Pectinase(Serva)	1.3×10^6	75.6
(3) 2% Cellulase(Onozuka R - 10) 0.5% Pectinase(Serva) 0.5% Hemicellulase(Sigma)	2.1×10^6	78.7

* The enzyme solutions in the table were supplemented with 0.4mol/L manitol 0.1%(W/V)MES and 0.05mol/L CaCl_2 ,PH was adjusted to 5.8.

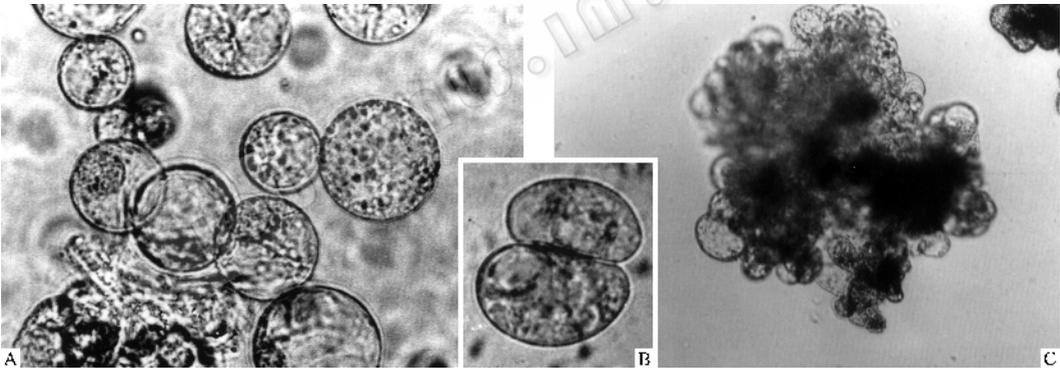


图 2 原生质体的早期分裂

Fig.2 Primary divisions from protoplasts

A Freshly isolated protoplasts of methionine resistant of *Astragalus melilotoides* Pall.($\times 630$)

B First division of protoplast($\times 785$)

C A cluster from protoplast - derived cells($\times 40$)

2.2 原生质体的早期分裂及其影响因素

2.2.1 基本培养基对原生质体分裂的影响

培养基是维持离体组织细胞生活和生长最基本的需求条件。原生质体培养与组织及细胞培养所需要的营养条件类同,原生质体培养所用的培养基往往是由组织及细胞培养基改良而来。本实验中比较了 MS、DPD、 KM_{8p} 等 3 种基本培养基对草木樨状黄芪甲硫氨酸抗性系原生质体培养的影响。在用液体浅层培养到 7d 时 MS 培养基中未见到有原生质体分裂,大部分细胞已破碎死亡。DPD 培养基中原生质体相对

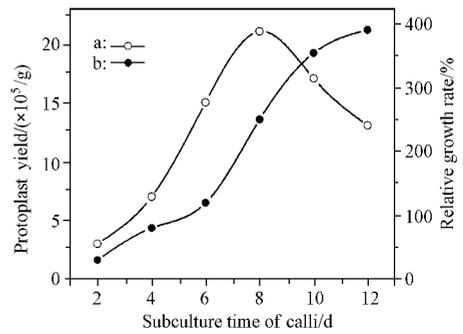


图 1 愈伤组织相对生长率与原生质体产量的关系

Fig.1 Relationship between relative growth

rate and protoplast yield of the calli

a Relationship between subculture time of calli and protoplast yield of the calli

b Relationship between subculture time of calli and relative growth rate of the calli

分裂频率较低,为 17.5%。而在 KM_{8p} 中效果最佳,相对分裂频率达到 32.6%。可见 KM_{8p} 培养基是草木樨状黄芪甲硫氨酸抗性系原生质体培养的适宜培养基,这种培养基由于含有丰富的有机成分,已在许多豆科植物,如大豆^[13],百脉根^[11]和多变小冠花^[15]原生质体培养中得到广泛应用。

2.2.2 原生质体培养的早期分裂

用 KM_{8p} 培养基进行液体浅层培养,原生质体在培养 24h 后,体积增大,有的呈椭圆形。48h 出现细胞间聚集现象。在培养 3d 后出现第一次分裂(图 2B)。4d 后出现第二次

分裂 2 周后形成小细胞团(图 2C)。实验观察到,胞质较浓厚的小细胞易于分裂,而胞质稀少的细胞仅能分裂 1~2 次,不能继续分裂形成细胞团。

原生质体密度对其分裂频率有明显的影响。刚分离的原生质体以不同密度在 KM_{8p} 培养基中进行液体浅层培养,结果如图 3 所示,图中曲线走向显示原生质体的起始培养密度显著影响再生细胞的早期分裂。原生质体无论是处于低密度还是高密度下,均不易获得较高的分裂频率。只有处于适当密度的原生质体,才易于分裂。草木樨状黄芪抗甲硫氨酸变异系来源的原生质体在所试条件下的最佳培养密度为 3×10^5 /mL,此时其分裂频率可达 32.6%。细胞在分离、脱壁以前是一个统一的有机体,彼此之间相互影响和协调。分离培养的原生质体彼此孤立,只有达到一定的培养密度后,才能使他们通过代谢分泌物重新建立起联系,这可能是原生质体在低密度下极少分裂的原因。但如果原生质体密度过高,大量聚集,彼此之间由于相互竞争营养,亦不能获得较高的分裂频率。然而,物种不同,原生质体的最适培养密度也有差别^[16,17]。

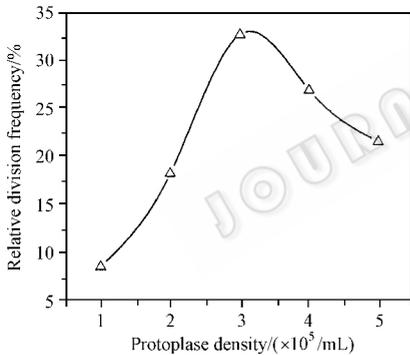


图 3 原生质体密度对相对分裂频率的影响

Fig.3 Effect of protoplast density on the relative division frequency

2.2.3 培养方法对原生质体分裂频率的影响 将草木樨状黄芪甲硫氨酸抗性系的原生质体培养密度调至 3×10^5 /mL 来比较液体浅层培养、固-液双层培养和琼脂糖岛培养等三种培养方法的效果。表 2 的结

表 2 培养方法对草木樨状黄芪甲硫氨酸抗性细胞系来源原生质体再生细胞的分裂和愈伤组织形成的影响

Table 2 The effect of culture methods on the protoplast division and protocalli formation

Culture methods	Initiation time of the first division/h	Frequency of division after 7 days in culture/%	Formation of cell colonies/d	Microcalli formed (2mm in diameter)/d
Liquid shallow layer	72	32.6	14	28
Solid-liquid dual layer	72	33.5	13	26
Agarose beads	48	38.7	12	22

果显示,双层培养略优于液体浅层培养,而琼脂糖岛培养又明显优于前两者,在这种培养环境中无论是原生质体出现第一次分裂的时间,还是形成小愈伤组织的时间都大大提前,且相对分裂频率上升至 38.7%。Shillito 等^[18]建立的琼脂糖岛培养法以及 Thompson 等^[19]在水稻原生质体培养中使用的琼脂糖珠培养法有其相似的优点,由于琼脂糖珠处于液体培养基的包围之中,便于通过改变液体培养基的渗透浓度来逐渐降低琼脂糖珠中的渗透浓度,因而能有效地促进原生质体再生细胞的持续分裂。

2.3 愈伤组织的形成及植株再生

在培养 2 周后,原生质体分裂形成细胞团后,添加渗透浓度减半的新鲜培养基明显利于细胞的增殖。大量植物原生质体培养的实践表明,随着细胞壁的再生和细胞的持续分裂,渗透剂的浓度需不断降低,才有利于培养物的生长。待 2mm 左右的小愈伤组织形成(图 4A)后,将它们转到 MS 培养基上。一般经 3 周后将愈伤组织转到分化培养基上。在 2500lx 光照下经 2 周培养,愈伤组织表面即出现深绿色的芽点(图 4B),这些芽点经 1 周可形成丛生芽(图 4C)。丛生芽继续长大到 2~3cm 高时,移入生根培养基,约 10d 有不定根出现,一个月后形成发达的根系(图 4D)。

2.4 原生质体培养后对甲硫氨酸和乙硫氨酸的抗性特征

植物蛋白质中各种氨基酸的含量不均衡,动物机体利用这些蛋白质时以含量最少的一种必需氨基酸为基点,按比例吸收其它种类氨基酸来组成机体蛋白质,因此只要有一种限制性必需氨基酸含量不足,就会限制对总氨基酸的吸收^[20]。

在豆科植物中第一限制性氨基酸是甲硫氨酸,因而培育能够较多积累甲硫氨酸的豆科牧草对农牧业的发展具有重要价值。以提高豆科植物甲硫氨酸含量为主要目的的突变体筛选工作已取得一定进展,并在苜蓿^[21]、红豆草^[22]等植物中获得了能过量合成甲硫氨酸的抗性变异系。图 5 与图 6 的结果显

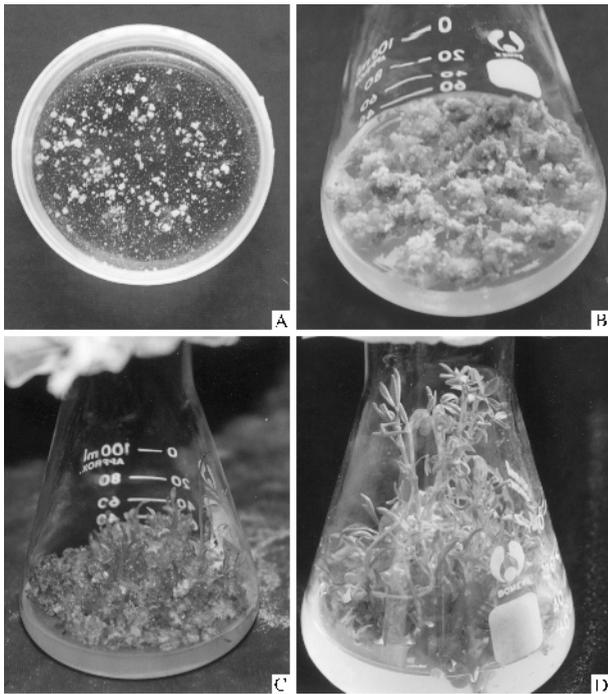


图4 愈伤组织的形成和植株再生

Fig.4 Callus formation and plant

A: Microcalli from protoplasts

B: Green buds and calli derived from protoplasts

C: Shoots differentiated from protoplast-derived calli

D: Regenerated plantlets from protoplasts

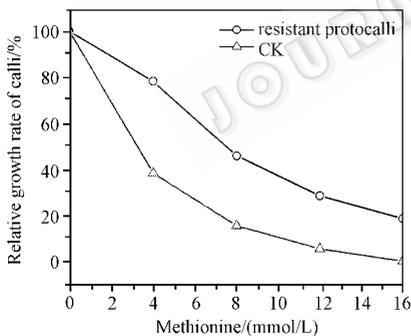


图5 原生质体来源的抗性系对甲硫氨酸的抗性

Fig.5 Effect of methionine on the growth of the protocalli from the resistant variant of *Astragalus melilotoides* Pall

示,与对照愈伤组织相比,变异系原生质体分裂形成的愈伤组织 AMet^rPPs 在含不同浓度甲硫氨酸或乙硫氨酸的培养基上,虽然二者的相对生长量均随着甲硫氨酸或乙硫氨酸浓度的增加而下降,但 AMet^rPPs 下降的幅度比对照小。在同一浓度下, AMet^rPPs 的相对增长率显著高于对照。如在含 16mmol/L 甲硫氨酸的 MS 培养基上 AMet^rPPs 具有 18.5% 的相对增长率,且在含 0.8mmol/L 乙硫氨酸的 MS 培养基上仍具有 6.1% 的相对增长率。而在

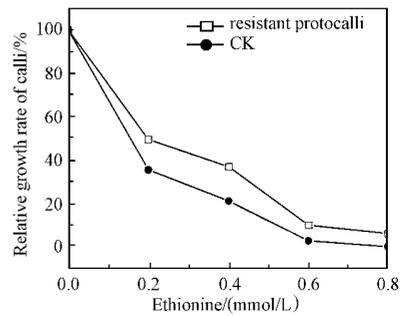


图6 原生质体来源的抗性系对乙硫氨酸的抗性

Fig.6 Effect of ethionine on the growth of the protocalli from the resistant variant of *Astragalus melilotoides* Pall

这两种条件下,对照愈伤组织全部褐化死亡。抗性试验表明,经过长期的原生质体培养后,抗性系对甲硫氨酸和乙硫氨酸的抗性仍然保存。可见对甲硫氨酸抗性在细胞水平上是可以稳定保持的,也不会因为原生质体的培养过程而丢失。

3 结论

植物原生质体由于没有细胞壁的障碍,可以进行诱导融合,绕过有性不亲和障碍,实现远缘种间体细胞杂交。原生质体可以摄取外源遗传物质,因而也是遗传工程比较理想的受体。豆科植物以其固氮特性和重要的经济价值而成为生物工程领域广泛研究的对象。但由于原生质体培养技术尚不甚完善,大多数植物原生质体再生植株的频率较低,有些还不能再生植株,这样就极大地限制了原生质体在遗传工程受体系统中的应用。因此,选择适宜基因型的植物,并建立原生质体高频再生植株的培养系统是十分必要的。草木樨状黄芪是一种良好的原生质体培养材料,有可能成为遗传工程基础研究较为理想的材料。本研究对草木樨状黄芪抗甲硫氨酸变异细胞系进行原生质体游离和培养,并再生了植株。对影响 AMet^rPPs 分离及培养的一系列因素进行了探究。所提供的实验体系不仅为通过体细胞杂交、基因转移等手段对其进行品质改良提供可行途径,也对豆科其它植物的原生质体培养有一定的参考价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Tian YJ (田永军), Xi Y (奚惕). Tissue culture and plantlet regeneration of *Astragalus melilotoides*. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), 1989, 3: 44
- [2] Yuan X (袁清), He M (何茂森), Qi CL (祁翠兰) et al. Pollen and stem segment culture of *Astragalus melilotoides*. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), 1990, 6: 48

- [3] Chen X(陈刚),Jia JF(贾敬芬),Jin H(金红) *et al.* Establishment of a high efficient regeneration system from internode segments of seeding in *Astragalus melilotoides* Pall. *Acta Bot Boreal -Occident Sin* (西北植物学报) 2001, **21**(1):136-141
- [4] Zhang XQ(张相岐),Wang XF(王献平),Yang Y(杨勇). Plant regeneration from monocell culture of *Astragalus melilotoides*. *Grassland of China*(中国草地),1994, **3**:50-54
- [5] Zhang GF(张根发),Li FX(李凤霞),An LJ(安利佳) *et al.* Study on plant regeneration and their influencing factors in monocell culture of *Astragalus melilotoides* Pall. *Acta Bot. Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),1994, **14**(1):8-13
- [6] Zhang XQ(张相岐),An LJ(安利佳),Xiang W(向卫) *et al.* Plant regeneration from mesophyll protoplast of *Astragalus melilotoides*. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*(实验生物学报),1993, **26**(1):11-17
- [7] Chen X(陈刚),Jia JF(贾敬芬),Hao JQ(郝建国). In vitro selection and characterization of methionine-resistant variant in *Astragalus melilotoides* Pall. *Acta Biologiae Experimentalis sinica*(实验生物学报) 2003, **36**(2):118-122
- [8] Murashige T and Skoog F. Revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*,1962, **15**:473-479
- [9] Durand J, Potrykus I, Donn G. Plants from protoplasts of *Petunia*. *Z Pflanzenphysiol*,1973, **69**:26-34
- [10] Kao KN. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mole Gen Genet*,1977, **150**:225-230
- [11] Xu ZH(许智宏),Wei ZM(卫志明). Plant protoplast culture and genetic operation. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1997, pp. 12-14
- [12] Xu ZQ, Jia JF. Plant regeneration from protoplasts of hydroxyproline resistant cell line in *Onobrychis viciifoli*. *Cell Research*,1995, **5**:187-195
- [13] Wei ZM, Xu ZH. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max L.*). *Plant Cell Reports*,1988, **7**:348-351
- [14] Lu DY(吕德扬),Ma JY(马秀叶),Wang X(王超) *et al.* Protoplast culture and plant regeneration of forage legume *Lotus corniculatus*. *Chinese Science Bulletin*(科学通报),1986, **10**:770-772
- [15] Lu DY(吕德扬),Li FY(李凤叶),Chen M(陈明) *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts and explants of seedlings of crownvetch(forage legume). *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*(实验生物学报),1987, **20**(1):31-39
- [16] Luo JF(罗建平),Jia JF(贾敬芬),Gu YH(顾月华) *et al.* Improved protoplast-derived plants of *Astragalus adsurgens* through somatic embryogenesis. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000, **16**(1):17-21
- [17] Xu ZQ, Jia JF. Plant regeneration from protoplasts of hydroxyproline resistant cell line in *Onobrychis viciaefolia*. *Cell Research*,1995, **5**:187-195
- [18] Shillito R D, Paszkowki J, Potrykus I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast derived colonise in number of plant species. *Plant Cell Rep*,1983, **2**:244-247
- [19] Thompson J A, Abdullah R, Cocking E C. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa L.*). Using media solidified with agarose. *Plant Sci*, 1986, **47**:123-132
- [20] Liu B(刘博林),Jing YX(荆玉祥),Kuang TY(匡廷云). Screening of lysine-rich plant species and identification of the purified proteins. *Acta Botanica Sinica*(植物学报),1993, **35**:62-65
- [21] Zhao Z(赵忠),Jia JF(贾敬芬). Selection of methionine-resistant variant in *Medicago Sativa*. *Acta Botanica Sinica*(植物学报),1997, **39**(10):933-939
- [22] Zhao Z(赵忠),Jia JF(贾敬芬). Selection of methionine-resistant variant in *Onobrychis Viciaefolia Scop.* *Acta Botanica Sinica*(植物学报),1996, **38**(4):268-275

Protoplast Culture and Plant Regeneration of the Methionine Resistant Variant of *Astragalus melilotoides* Pall

JIN Hong^{1,2} JIA Jing-Fen^{1*} HAO Jian-Guo¹

¹(Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Northwest University, Xi'an 710069, China)

²(Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden 518004, China)

Abstract An efficient protocol for plant regeneration from protoplasts of the methionine resistant variant of *Astragalus melilotoides* was established. The friable calli induced from internode segments of variant plants were used for protoplast preparation. The protoplasts were isolated through enzyme digestion. Calli were formed after sustained divisions of protoplasts. High frequency of shoot differentiation was obtained from the protocalli on differentiated medium. The effects of different media, culturing methods and plating densities on protoplast divisions and plant regeneration were studied. The results show that agarose-beads culture method, KM_{8p} medium supplemented with 1.0mg/L 2,4-D, 0.5mg/L 6BA, 0.3mol/L mannitol, 2%(W/V) sucrose and 500mg/L casein hydrolysate at a plating density of 3×10^5 /mL are the appropriate conditions for protoplast division of the methionine resistant cell line. The division frequency is over 38%. The protoplast-regenerated plants still preserve resistance to methionine and ethionine. This research builds up the foundation for the resistant cell line as a parent of somatic hybridization.

Key words *Astragalus melilotoides* Pall, protoplast culture, plant regeneration, methionine resistant

Received: 09-11-2003

This work was supported by Grant from the National Science Foundation of China(No. 30070366).

* Corresponding author. Tel: 86-29-8303484; Fax: 86-29-8303484; E-mail: wangxl@nwu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>