

苜蓿胚性愈伤组织诱导及植株再生研究

王红梅

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以苜蓿 5~7 d 苗龄无菌苗的子叶和下胚轴为外植体, 研究培养基中不同激素和浓度配比对苜蓿愈伤组织诱导和分化的影响。结果表明, MS+2, 4-D 2.0 mg/L +6-BA 1.0 mg/L 愈伤组织诱导率达 100%, 且愈伤组织状态良好, 增殖速度快。MS+6-BA 0.5 mg/L +NAA 0.05 mg/L 为苜蓿胚性愈伤组织诱导的适宜培养基, 诱导率为 37.8%。胚性愈伤组织分化成苗培养基为 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L, 生根培养基为 1/2MS+ NAA 0.02 mg/L +蔗糖 10.0 g/L。

关键词: 苜蓿; 胚性愈伤组织; 诱导; 植株再生

中图分类号: S551.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)10-0024-05

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2019.07.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2019.07.006)

Study on Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration of *Medicago sativa* L.

WANG Hongmei

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu, 730070, China)

Abstract: Cotyledon and hypocotyls of 5~7 day's aseptic seedlings after germination were used as explants to study the effect of different hormones and concentrations on callus induction and differentiation with the combinative concentration of hormones. The results showed the callus induction medium was MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L. The ratio of callus was 100%. The callus grew well and proliferated fast. The embryogenic callus induction medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L. The medium for embryogenic callus differentiation into seedlings was MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L, and the rooting medium was 1/2MS+NAA 0.02 mg/L+sucrose 10 g/L.

Key words: *Medicago sativa* Linn; Embryogenic callus; Induction; Plant regeneration

苜蓿(*Medicago sativa* Linn)为豆科苜蓿属多年生宿根草本植物。苜蓿营养价值高, 蛋白质占其干重的 15%~22%, 适口性好, 易于消化吸收, 是世界上公认的绿色优质牧草, 被誉为“牧草之王”^[1]。同时苜蓿具有抗寒抗旱、耐瘠薄、防风固沙及改善土壤养分等特点^[2-4], 大面积种植优质苜蓿, 对促进我国畜牧业发展和西部生态系统恢复与重建

具有重要意义。但苜蓿属于典型的异花受粉植物, 自交结实率极低, 通常为 1%~3%, 通过常规杂交育种方法进行品质改良难以实现^[5-6]。借助于植物组织培养和现代生物技术, 不仅可以克服苜蓿种子产量低的困难, 而且能够将优质、高产、抗病虫害、耐盐碱等相关基因导入苜蓿, 培育适合在不同生态环境下种植的品种^[7-8], 加快育种进程, 丰

收稿日期: 2019-05-23

基金项目: 甘肃省农业科学院科技支撑计划(2018GAAS01); 兰州市科技计划项目(2019-1-67)。

作者简介: 王红梅(1972—), 女, 甘肃灵台人, 副研究员, 硕士, 主要从事生物技术应用研究工作。联系电话: (0)13893659623。

富苜蓿种质资源。

目前,通过转基因改良植物遗传特性的技术已渗透到农业生产的方方面面。我国关于苜蓿转基因研究的报道较多,有通过转基因技术改良抗寒^[9]、耐盐碱^[10],以至作为生物反应器表达免疫蛋白等的研究^[11],但普遍存在体细胞胚诱导困难、植株分化率低、试验周期长、转化效率低等问题^[12],严重制约转基因技术在苜蓿遗传改良中的应用。诱导苜蓿愈伤组织的形成和组织、器官的形态建成是实现苜蓿细胞培养和遗传转化的关键环节。我们以苜蓿子叶和下胚轴为外植体,通过探索和优化培养基成分和植物外源激素的种类和配比来诱导胚性愈伤组织形成,由胚性愈伤组织进而分化形成新的植株,建立苜蓿高频再生体系,以期为进一步开展苜蓿细胞培养和遗传转化研究提供支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

指示苜蓿品种为甘农1号,由甘肃农业大学草业学院曹致中教授提供,为适宜在我国西北部、甘南草原、青藏高原边缘种植的抗寒、抗旱优良品种。

1.2 方 法

1.2.1 种子消毒处理 选取饱满的苜蓿种子,在流水下冲洗30 min,75%酒精消毒45

s,0.1%升汞振荡消毒8 min,无菌水漂洗4次(每次2 min),用无菌滤纸吸干,接种到MS培养基上,于(23±2)℃条件下暗培养。待种子萌发后转至16 h光照/8 h黑暗条件下培养。

1.2.2 外植体的建立 取5~7 d苗龄的无菌实生苗子叶和下胚轴,将子叶沿叶脉方向切成两半,下胚轴切成0.5 cm左右的切断,分别接种在愈伤组织诱导培养基上。每处理接种子叶和下胚轴各20个,3次重复。外植体暗培养3 d后,转16 h光照、8 h黑暗,光强度为2 500 lx,温度(23±2)℃条件下培养。

1.2.3 培养基 诱导培养基3种,I型为MS+2,4-D 2.0 mg/L;II型为MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT1.0 mg/L;III型为MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。胚性愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05~0.20 mg/L。分化培养基为MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01~0.05 mg/L。生根培养基为1/2MS+NAA 0~0.03 mg/L+蔗糖7.5~15.0 g/L。

2 结果与分析

2.1 不同激素及其配比对苜蓿愈伤组织诱导的影响

以MS为基本培养基,不同的植物外源激素和浓度配比对苜蓿外植体愈伤组织诱导率和愈伤组织状态有较大影响(表1)。

表1 不同激素及配比对苜蓿愈伤组织诱导效果比较

诱导培养基	子叶			下胚轴		
	细胞分裂 起始时间 /d	愈伤组织 诱导率 /%	愈伤组织状态	细胞分裂 起始时间 /d	愈伤组织 诱导率 /%	愈伤组织状态
I	5~6	87	愈伤呈肉黄色胶状体,质地紧密,生长缓慢	2~3	100	两端切口先愈伤化,呈乳白色粉末状,生长快
II	8~10	52	愈伤呈淡黄色,生长极慢有褐化现象	5~7	83	愈伤为无色水渍,容易变褐
III	2~3	100	浅黄色和绿色相嵌,表面有绿色颗粒状突起,有光泽	2~3	100	浅黄绿色块状,表明有光泽,分散性好,增殖快

从观察结果看出, 3种培养基均可诱导外植体形成愈伤组织, 但诱导率差异明显, 状态各不相同。从外植体细胞开始分裂的时间来看, III型培养基启动细胞分裂的时间最短, 仅为2~3 d; 其次是I型培养基; II型培养基细胞启动时间最长, 为8~10 d。3种培养基愈伤组织诱导率差异明显, 由高到低依次为III>I>II。从愈伤组织生长状态来看, I型培养基、II型培养基诱导子叶产生的质地紧密, 生长缓慢, 由下胚轴形成的愈伤组织呈白色粉末或无色水渍状, 生长快但易于褐化; 外植体在III型培养基上培养10 d时, 子叶形成的愈伤组织呈新鲜的黄绿色, 表面有颗粒状突起, 下胚轴愈伤组织呈浅黄绿色块状, 质地疏松, 增殖快(图1, 图2)。综合来看, 2, 4-D与6-BA配合使用, 比单一使用2, 4-D效果更好。在II型

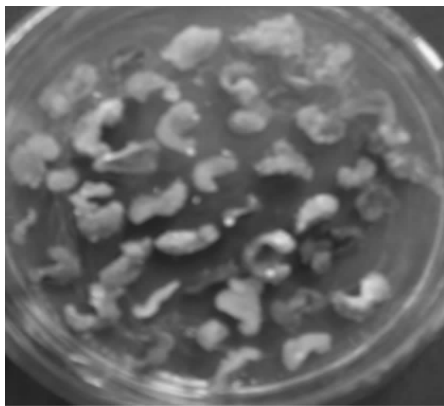


图1 子叶愈伤组织诱导(III型培养基培养10 d)



图2 下胚轴愈伤组织诱导(III型培养基培养10 d)

培养基中, 因加入了激动素KT, 反而抑制了愈伤组织的诱导, 说明了KT不利于启动苜蓿细胞的分裂。可见, 甘农1号子叶和下胚轴愈伤组织诱导以2, 4-D与6-BA配合使用效果较好, MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L是愈伤组织诱导的适宜培养基。

2.2 激素对苜蓿胚性愈伤组织形成的影响

由子叶和下胚轴形成的愈伤组织继代培养2~3次后, 转接到添加6-BA和NAA的培养基上培养21 d时, 部分愈伤组织逐渐转变为颗粒状的胚性愈伤组织, 不同激素配比下胚性愈伤组织形成效果差异明显(表2)。

表2 激素对比对苜蓿胚性愈伤组织的诱导效果

外植体	6-BA /(mg/L)	NAA /(mg/L)	接种愈 伤组织 数 /块	胚性 愈伤 组织数 /块	胚性愈 伤组织 诱导率 /%
子叶	0.5	0.20	45	4	8.9
	0.5	0.10	45	10	22.2
	0.5	0.05	45	17	37.8
下胚轴	0.5	0.20	45	0	0
	0.5	0.10	45	0	0
	0.5	0.05	45	3	6.7

观察发现, 6-BA与低浓度NAA配合使用可促使苜蓿愈伤组织转变成为胚性愈伤组织, 且子叶胚性愈伤组织诱导率高于下胚轴。在6-BA浓度为0.5 mg/L的条件下, 低浓度的NAA更有利于体细胞胚的形成, 此时的愈伤组织表面有颗粒状突起, 结构疏松分散性好, 呈淡黄绿色有光泽(图3)。当NAA浓度由0.05 mg/L增加到0.20 mg/L时, 子叶胚性愈伤组织诱导率由37.8%降低到8.9%, 可见在6-BA存在的前提下, NAA的浓度对胚性愈伤组织形成起决定性作用。在相同培养条件下, 下胚轴愈伤组织增殖速度较快, 呈浅绿色块状(图4), 但胚性愈伤组织诱导率最高仅为6.7%。

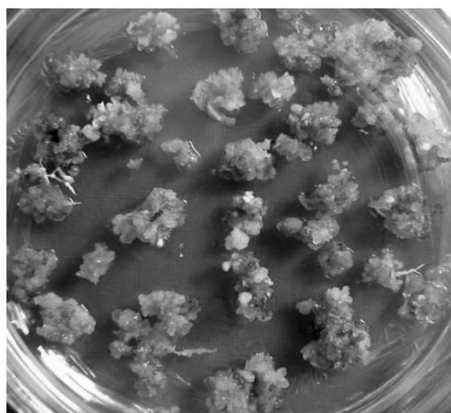


图3 子叶胚性愈伤组织

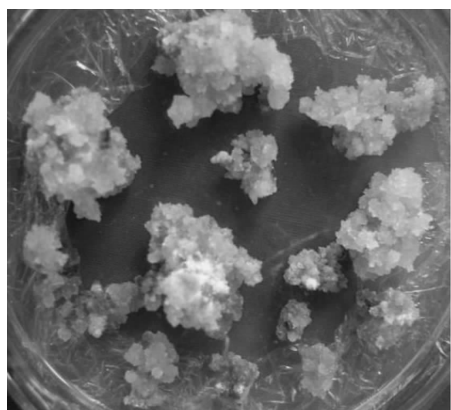


图4 下胚轴胚性愈伤组织

2.3 苜蓿胚性愈伤组织分化成苗

苜蓿胚性愈伤组织形成后,在MS培养基中添加0.2 mg/L的6-BA的条件下,配合使用0.01~0.05 mg/L的NAA,在16 h光照/8 h黑暗条件下培养10~20 d则有助于植株形态的建成(图5),其中胚性愈伤组织接种在培养基MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L上时分化成苗率可达75.2%。



图5 胚性愈伤组织植株再生

2.4 再生植株生根培养

将再生植株转接到蔗糖用量分别为7.5、10.0、15.0 g/L的1/2MS培养基上,培养20 d后陆续有乳白色根生成,且随着蔗糖用量的提高生根所需时间延长。在3种培养基中,以蔗糖用量为10.0 g/L的1/2MS生根时间较短,根的状态较好,有2~3个分叉。当蔗糖用量提高到15.0 g/L时,生根时间延长7 d左右,且生成的根细长,侧根少,可见高浓度蔗糖对苜蓿生根有抑制作用。将培养基调整为1/2MS+NAA 0.02 mg/L+蔗糖10.0 g/L时,再生植株生根时间缩短,10~15 d内生根,根数量多,状态好(图6),有利于提高移栽成活率。



图6 再生植株生根

3 结论与讨论

植物组织培养中可利用的外植体类型很多,如叶片、叶柄、花瓣、花药、种子、块茎、鳞片、根尖等。以种子为培养材料的,大多数是将种子消毒后接种于培养基上,萌发后取无菌实生苗的子叶、下胚轴或根尖为外植体。本研究取苜蓿子叶和下胚轴为材料,从结果可以看出,愈伤组织诱导和分化在二者之间都有差异。单从愈伤组织诱导率来讲,下胚轴诱导率大于子叶;但从愈伤组织状态来看,子叶愈伤组织呈新鲜的黄绿色,表面有颗粒状突起,分化成苗的几率比较大,而下胚轴愈伤组织呈白色雪花状或浅绿色块状,分散性好,生长旺盛,分化成苗

难度大,可作为苜蓿细胞悬浮培养的首选材料。

激素种类及配比对植物愈伤组织的诱导和芽、根等器官的形成起着重要的调节作用^[13]。在本研究中,单独使用 2, 4-D, 或 2, 4-D 与 6-BA、KT 配合使用,均能不同程度地诱导苜蓿外植体产生愈伤组织,但以 2, 4-D 与 6-BA 质量配比为 2 : 1 时诱导率达 100%,愈伤组织状态较好,这与伊风艳等^[14]、秦楚等^[12]关于苜蓿愈伤组织诱导及分化培养研究的结果一致。李聪等^[15]认为 KT 在苜蓿诱导分化过程中起着关键调控作用,但本研究发现,添加了 KT 培养基的甘农 1 号愈伤组织诱导率下降。因此,使用一种或几种培养基并不适合所有苜蓿品种愈伤诱导和再分化,针对不同基因型选择愈伤组织诱导和再生的激素种类和浓度是必要的。

对植物器官、组织、细胞离体培养所产生的愈伤组织,在一定条件下可进一步诱导器官再生或胚状体而形成植株。本研究结果表明,影响苜蓿愈伤组织继代培养的主要因素是激素,如果保持较高的生长素(2, 4-D 2.0 mg/L)和细胞分裂素(6-BA 1.0 mg/L)浓度,则愈伤组织生长旺盛,增殖速度快,但随着继代次数的增多,其分化成苗的能力下降。在去除 2, 4-D、降低 6-BA 浓度(0.5 mg/L)的条件下,在培养基中添加 NAA 0.05~0.10 mg/L 有利于苜蓿胚性愈伤组织诱导,诱导率最高为 37.8%。胚性愈伤组织的诱导是解决苜蓿外植体再生频率低的有效途径。同时,胚性愈伤组织呈浅黄色松散颗粒状结构,活性好,增殖速度快,可作为苜蓿遗传转化研究的理想受体材料,降低嵌合体的形成,大幅度提高遗传转化效率。

参考文献:

[1] 王亮,张克春.苜蓿的营养价值及其对奶牛作用机理的研究[C]//《中国奶牛》编辑部,

第三届中国奶业大会论文集(上册).北京:[出版者不详],2012:5.

- [2] 王龙昌,谢小玉,滨村邦夫.苜蓿沙土盆栽试验的水分生态适应性[J].草地学报,2007(3):227-231.
- [3] 罗志滨,马静,罗晓亮.苜蓿茬土壤耕层肥力动态监测初报[J].甘肃农业科技,2010(8):28-29.
- [4] 李天银,杨自权.15个紫花苜蓿品种在河西走廊沙地的适应性评价[J].甘肃农业科技,2015(3):21-25.
- [5] 耿慧,王志锋,刘卓,等.生根剂对苜蓿扦插的影响初探[J].草业科学,2011,28(3):496-497.
- [6] 王庆飞.提高苜蓿自交结实率方法及其传粉特性的研究[D].新疆农业大学,2010.
- [7] 黄炜,文亦蒂.紫花苜蓿研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2018(13):42-44+51.
- [8] 贾先岩.转基因紫花苜蓿抗逆性研究进展[J].青海农林科技,2018(3):60-63.
- [9] 宋丽莉.紫花苜蓿抗寒转录组测序分析及 MsNCX 和 MsCML 基因的功能研究[D].哈尔滨:哈尔滨师范大学,2017.
- [10] 麻冬梅,秦楚. AtSOS 基因在紫花苜蓿中的表达及其耐盐性研究[J].草业学报,2018,27(6):81-91.
- [11] 陈林涛,韦双双,黄永林,等.重组人血清白蛋白在紫花苜蓿中的转基因表达[J].热带作物学报,2018,39(4):720-725.
- [12] 秦楚,李昱,张喜斌,等.苜蓿高频再生组织培养体系的优化[J].广东农业科学,2016,43(11):22-26;193.
- [13] 崔澄.植物激素与细胞分化及形态发生的关系[J].细胞生物学杂志,1983,5(2):1-5.
- [14] 伊风艳,石凤翎,展春芳,等.黄花苜蓿愈伤组织诱导及分化培养条件的研究[J].中国草地学报,2011,33(6):14-20.
- [15] 李聪,熊德邵,耿华珠.苜蓿愈伤组织再生植株的研究[J].中国草地,1989(3):51-56.

(本文责编:杨杰)