

文章编号:1000-582X(2005)02-0132-05

# 紫花苜蓿高频再生组织培养体系建立\*

王凭青<sup>1</sup>,周兴龙<sup>1</sup>,杨青川<sup>2</sup>,吴明生<sup>1</sup>,谢伟伟<sup>1</sup>

(1. 重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400030; 2. 中国农业科学院畜牧研究所,北京 100094)

**摘要:**以8个品种的无菌实生苗子叶和下胚轴为外植体,研究了4种不同培养程序及基因型对紫花苜蓿胚性愈伤组织、胚状体诱导及成苗移栽的影响。结果显示:4种培养程序对苜蓿的出愈率影响差别不大,但不同培养程序对苜蓿的分化率和成苗率影响差异显著,其中SHK-MSO-MSO在分化率和出苗率上表现较佳;另外,不同基因型在苜蓿出愈率和成苗率上反应不显著,但在分化率上反应显著,其中中苜一号,草原2号和保定苜蓿表现较佳。

**关键词:**紫花苜蓿;组织培养;愈伤组织;胚状体  
**中图分类号:**S188

**文献标识码:**A

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)属多年生豆科植物,为重要的高蛋白质饲料牧草,被誉为“牧草之王”,在畜牧业生产中占有重要的地位<sup>[1]</sup>。近年来,由于我国生态环境遭到破坏,草场盐碱化程度加重,造成产草量不足,影响了畜牧业的发展。而恢复草场生态环境,投资大,周期长,这就需要考虑培育抗虫,抗病,抗逆的苜蓿品种<sup>[2]</sup>。传统的遗传育种见效慢,转基因技术则是一项行之有效的手段,然而紫花苜蓿作为基因转化的受体,其组织培养体系还存在再生率低、培养的周期长等缺点,因此需要建立紫花苜蓿高频再生组织培养体系,为今后通过基因转化改良紫花苜蓿性状和实现其产业化作准备<sup>[3]</sup>。

培养48 h,种子开始萌发(见图1),然后16 h光照,8 h黑暗培养3~5 d后,长出子叶(见图2),切取苜蓿新生苗的子叶和下胚轴,用于诱导愈伤组织<sup>[4]</sup>。



图1 种子萌发



图2 长出子叶

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料

供试苜蓿品种为阿尔冈金,中苜一号,草原2号,WL232,WL323,DEFI,Sitel,保定苜蓿。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 外植体的准备

将苜蓿种子用75%酒精浸泡10 min,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒8~15 min,无菌水冲洗5次,每次5 min后,将种子放到装有无菌水的三角瓶中浸泡2 h,待种子膨胀后,将种子接种到1/2MS培养基上,27℃黑暗

\* 收稿日期:2004-10-20

基金项目:教育部重点科技基金资助项目(01145和02156);国家“863”重大项目(2002AA241101);重庆市应用基础研究科学基金资助项目(7900)

作者简介:王凭青(1962-),男,湖北鄂州人,重庆大学副教授,博士,从事生物工程与农业生物技术研究工作。

### 1.2.2 培养基及培养程序

本实验在借鉴前人工作的基础上,共设计了4种培养程序,进行愈伤组织和胚状体的诱导及植株成苗再生。

I. 诱导愈伤组织形成的培养基:SHK;诱导体胚分化的培养基:SHK;成苗培养基:1/2MS。

II. 诱导愈伤组织形成的培养基:MSH;诱导体胚分化的培养基:Boi2y;成苗培养基:1/2MS。

III. 诱导愈伤组织形成的培养基:SHK;诱导体胚分化的培养基:Boi2y;成苗培养基:1/2MS。

IV. 诱导愈伤组织形成的培养基:SHK;诱导体胚分化的培养基:MSO;成苗培养基:MSO。

### 1.3 实验处理

#### 1.3.1 接种

在无菌环境下,将切好的苜蓿子叶和下胚轴分别接入MSH,SHK,SHK,SHK培养基上,每种培养基上接种15块愈伤组织(见图3),10次重复,接种后用封口膜封口。

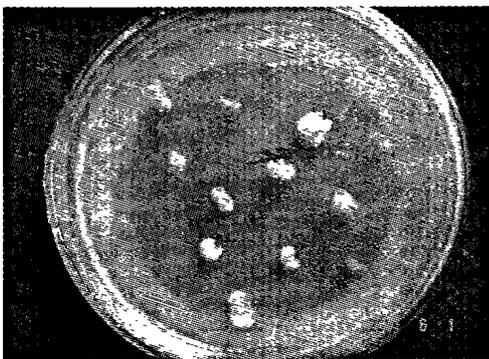


图3 诱导3天后的愈伤组织

#### 1.3.2 诱导愈伤

接种后,在27℃黑暗条件下培养,诱导愈伤组织。连续经过两轮继代选择培养后,第3次继代淘汰呈褐色和水浸化的愈伤组织,得到质地结实,浅黄绿色的胚性愈伤组织(见图4)。



图4 浅黄绿色的胚性愈伤组织

#### 1.3.3 诱导体胚分化

将浅黄绿色愈伤组织分别转接到Boi2y,Boi2y,

SHK,MSO培养基上,27℃黑暗条件下,诱导体胚分化。连续经过多次继代培养,淘汰褐色的愈伤,筛选出呈黄白色、浆糊状、并镶嵌有绿色小颗粒的愈伤组织(见图5)。



图5 体胚

#### 1.3.4 成苗

将出现胚状体(呈簇状)的愈伤组织转接到1/2MS,1/2MS,1/2MS,MSO培养基上,27℃,光强3000lx,每日光照16h,黑暗8h培养,约3周,体胚发育成正常的植株(见图6)。



图6 体胚发育成正常的植株

#### 1.3.5 练苗移栽

当再生的小植株出现5条以上的健壮根时,可将小三角瓶上的封口膜去掉,室内锻炼24h然后将幼苗从三角瓶中取出,自来水冲净根部的培养基,移栽于混有灭过菌的营养土和蛭石(1:3)的小花盆中(见图7,图8),最初3~5d,幼苗应遮上塑料薄膜,以保持湿度,当苜蓿小苗长出健壮的茎叶时,可将其移入大田或大花盆中(见图9,图10)。

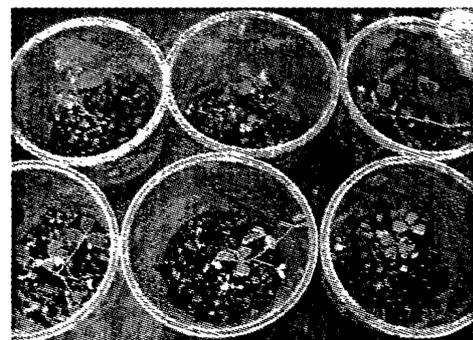


图7 移苗

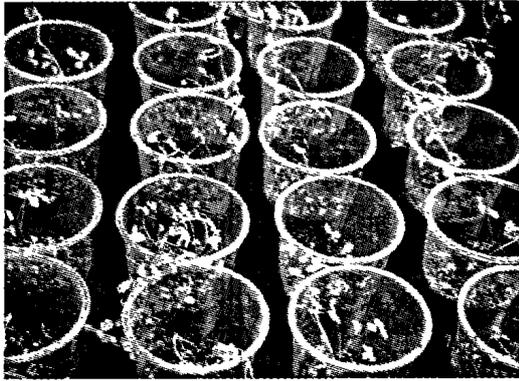


图8 移苗



图9 移入大花盆中

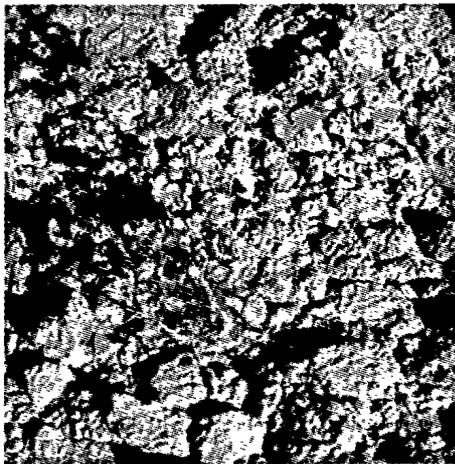


图10 移入大田中

### 1.4 高频再生体系的建立

采用胚状体诱导率和再生率均较高的苜蓿品种和培养程序,利用它们胚状体形成的植株叶片进行多轮诱导分化,筛选出高频再生组织培养体系。

## 2 结果与分析

1) 不同培养程序对出愈率,分化率和成苗率的影响,如表1—表4所示。

表1 SHK - SHK - 1/2MS 出愈率,分化率和成苗率

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均数
成苗数	25	33	6	8	8	4	4	38	
分化的愈伤	28	39	7	8	9	5	4	47	
愈伤块数	132	137	121	126	129	126	130	135	
接种数	150	150	150	150	150	150	150	150	
成苗率	0.89	0.85	0.86	1	0.89	0.80	1	0.81	0.89
分化率	0.21	0.28	0.06	0.06	0.07	0.04	0.03	0.35	0.14
出愈率	0.88	0.91	0.81	0.84	0.86	0.84	0.87	0.90	0.86

表2 MSH - Boi2y - 1/2MS 出愈率,分化率和成苗率

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均数
成苗数	10	6	0	0	0	0	0	14	
分化的愈伤	15	11	2	3	0	0	0	18	
愈伤块数	133	130	122	119	131	125	113	131	
接种数	150	150	150	150	150	150	150	150	
成苗率	0.67	0.55	0	0	0	0	0	0.78	0.25
分化率	0.11	0.08	0.02	0.03	0	0	0	0.14	0.05
出愈率	0.89	0.87	0.81	0.79	0.87	0.83	0.75	0.87	0.84

表3 SHK - Boi2y - 1/2MS 出愈率,分化率和成苗率

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均数
成苗数	20	28	5	5	3	1	1	25	
分化的愈伤	25	33	7	7	5	3	4	40	
愈伤块数	129	133	118	122	125	127	123	135	
接种数	150	150	150	150	150	150	150	150	
成苗率	0.80	0.85	0.71	0.71	0.60	0.33	0.25	0.63	0.61
分化率	0.19	0.25	0.06	0.06	0.04	0.02	0.03	0.30	0.12
出愈率	0.86	0.89	0.79	0.81	0.83	0.85	0.82	0.90	0.84

表4 SHK - MSO - MSO 出愈率,分化率和成苗率

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均数
成苗数	32	44	12	9	10	8	9	78	
分化的愈伤	32	49	12	910	8	9	82		
愈伤块数	132	133	120	121	119	125	128	133	
接种数	150	150	150	150	150	150	150	150	
成苗率	1	0.90	1	1	1	1	1	0.95	0.98
分化率	0.24	0.37	0.10	0.07	0.08	0.06	0.07	0.62	0.20
出愈率	0.88	0.89	0.80	0.87	0.79	0.83	0.85	0.89	0.84

说明:编号栏(1,2,3……8)分别代表中苜一号、草原2号、阿尔冈金、WL232、WL323、DEFI、Sitel、保定苜蓿8个品种,其中每个品种接种时共10次重复。

由图11可以看出,4种培养程序对苜蓿的出愈率影响差别不大。图12,图13表明,不同培养程序对苜蓿的分化率和成苗率影响差异显著,SHK - MSO - MSO 在分化率和出苗率上表现较佳。

2) 不同基因型对出愈率,分化率和成苗率的影响,如表5所示。

实验结果表明,基因型的差别在苜蓿出愈率和成苗率上反应不显著,但在分化率上反应显著,其中中苜一号,草原2号和保定苜蓿表现较佳。

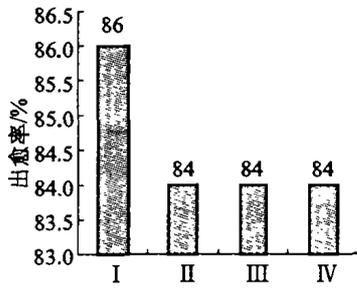


图 11 不同培养程序对出愈率的影响

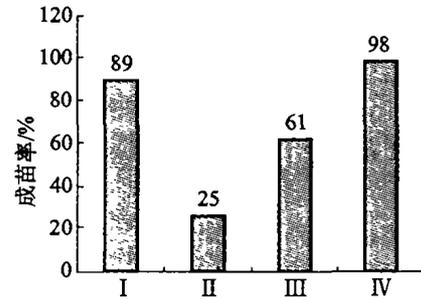


图 13 不同培养程序对成苗率的影响

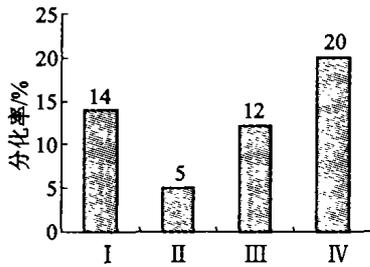


图 12 不同培养程序对分化率的影响

3) 高频再生体系的建立。将表现上佳的中苜一号,草原 2 号和保定苜蓿胚状体形成的植株叶片按 SHK - MSO - MSO 培养程序进行多轮诱导分化,统计结果表明,其出愈率,分化率和出苗率均达 80% 以上,从而得以建立苜蓿组织培养高频再生体系。

表 5 不同基因型对出愈率,分化率和成苗率的影响

基因型	接种数	愈伤块数	分化愈伤块数	成苗数	出愈率/%	分化率/%	成苗率/%
中苜一号	600	526	100	87	88	19.0	87
草原 2 号	600	533	132	111	89	25.0	84
阿尔冈金	600	481	28	23	80	5.8	82
WL232	600	488	27	22	81	5.5	81
WL323	600	504	24	21	84	4.8	88
DEFI	600	503	16	13	84	3.2	81
Sitel	600	494	17	14	82	3.4	82
保定苜蓿	600	534	187	155	89	35.0	83

### 3 讨论

#### 3.1 关于胚性愈伤组织的诱导

植物的不同外植体,不同基因型对胚性愈伤组织的形成都会产生一定的影响<sup>[5]</sup>。本实验采用的 8 个苜蓿品种在诱导愈伤时差异不大,而各品种间,同一品种内,子叶和下胚轴的胚性愈伤组织诱导率都表现出了差异。子叶相对于下胚轴作为外植体出愈率要高一些,虽然在愈伤组织的形成速度上,下胚轴要快于子叶,但子叶形成的愈伤组织分化率要高于下胚轴形成的愈伤组织。

在实验过程中,根据质地色泽的不同,会出现 4 种愈伤组织类型:( I )质地结实,呈浅黄绿色;( II )质地疏松,呈黄白色;( III )质地疏松,呈浅黄色;( IV )呈暗白色水浸状。其中( II ),( IV )型最后将褐化,( III )型继续继代培养会转化为( I )型,( I )型为生长正常的愈伤组织,很少变褐,为胚性愈伤组织。此外,继代培养在一定程度上可防止愈伤组织褐化。

#### 3.2 关于胚状体分化的诱导

在诱导胚状体分化上,不同培养基和基因型差异

比较明显,MSO 和 SHK 培养基诱导的中苜一号,草原 2 号和保定苜蓿表现较佳。

在实验中,将胚性愈伤组织转接到胚状体诱导培养基上培养一段时间后,会出现浆糊状浅黄色的胚状体,其上镶嵌着许多绿色小颗粒,将来会发育成单个的植株。当成团状的胚状体长得较大时,可将其分割培养,有利于体胚分化,同时不断继代,防止褐化。

#### 3.3 关于植株再生

当体胚分化到一定程度时,需将其转接到成苗培养基上,进一步诱导茎和根的分化。不同培养基和基因型对成苗率的影响有一定差异,MSO 培养基可直接诱导体胚生根,是较理想的成苗培养基。

#### 3.4 关于高频再生体系的建立

紫花苜蓿的组织培养存在着体细胞胚分化困难,分化率低,重复性差等问题<sup>[6]</sup>。作为基因转化的受体,必须克服这些缺点才能使通过基因转化途径改良苜蓿性状取得实质性进展。因此,迫切需要建立苜蓿组织培养高频再生体系<sup>[7-8]</sup>。

实验结果表明,在组织培养时,采取 SHK - MSO - MSO 培养程序,利用胚状体分化率和成苗率均较高的

中苜一号,草原2号或保定苜蓿的胚状体形成的植株叶片,进行多轮组培,同时,在诱导愈伤时,挑选质地结实,呈浅黄绿色的胚性愈伤,并不断继代,防止褐化,最终筛选到了出愈率,分化率和成苗率均高于80%的高频再生培养体系,为下一步苜蓿转基因工作打下了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李望丰. 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.
- [2] 黄远新. 南方紫花苜蓿不同外植体离体培养的研究[J]. 中国草地, 2003, 25(3): 42-47.
- [3] 黄绍兴, 吕德扬. 紫花苜蓿原生质体转基因植株再生[J]. 科学通报, 1991, 36(17): 1345-1348.
- [4] 危晓薇. 紫花苜蓿组织培养及其再生植株[J]. 新疆农业科学, 1999, 26(4): 71-78.
- [5] 杨青川. 苜蓿生产与管理指南[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003. 251-252.
- [6] 耿华珠. 中国苜蓿[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 163-164.
- [7] ARCIONI S, DAMIANI F, PEZZOTI M, et al. Alfalfa Lucerne (*Medicago spp*) [A]. Bajaj Y. Biotechnology in Agriculture and Forestry[C]. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1990. 197-241.
- [8] SAUNDERS J W, BINGHAM E T. Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue[J]. Crop Sci, 1972, 12: 804-808.

## Establishment of High-frequency Regeneration System of Explants of Alfalfa

WANG Ping-qing<sup>1</sup>, ZHOU Xing-long<sup>1</sup>, YANG Qing-chuan<sup>2</sup>, WU Ming-sheng<sup>1</sup>, XIE Wei-wei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering Under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The cotyledon and hypocotyl of eight varieties of alfalfa (*Medicago sativa L.*) are used to study the effect of different cultivation procedures and genotypes on embryogenic callus and embryoid induction, plant development and transplant of alfalfa. The varieties of alfalfa with high embryoid induction rate and high differentiation rate are screened. A high frequency regeneration system for alfalfa tissue culture is established; which is beneficial to the gene transformation of alfalfa.

**Key words:** alfalfa; tissue culture; callus; embryoid

(编辑 李胜春)