

## 陇东地区野生紫花苜蓿植株再生体系的建立

王娟<sup>1</sup>, 李玉珠<sup>1</sup>, 陶茸<sup>1</sup>, 赵小强<sup>2</sup>, 师尚礼<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州 730070, <sup>2</sup>中国农业大学生物学院, 北京 100193

**摘要:**以陇东地区野生紫花苜蓿无菌苗的下胚轴、子叶、叶片和叶柄为外植体, MS为基本培养基, 研究划破种皮以及不同生长调节物质种类与对比对愈伤组织诱导和分化影响的结果表明:划破种皮可提高种子发芽率;在外植体中下胚轴的愈伤组织诱导率最高, 达92.2%;最佳愈伤组织诱导培养基为MS+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>(单位下同)+NAA 1.0+2.5%蔗糖+0.6%琼脂, 最佳分化诱导培养基为MS+KT 0.5+NAA 0.3+2.5%蔗糖+0.6%琼脂, 成苗培养基为1/2MS+NAA 0.1+1%蔗糖+0.6%琼脂。

**关键词:**陇东地区野生紫花苜蓿; 胚性愈伤组织; 诱导; 再生

## Establishment of Plant Regeneration System from *Medicago sativa* L. in Longdong Region

WANG Juan<sup>1</sup>, LI Yu-Zhu<sup>1</sup>, TAO Rong<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-Qiang<sup>2</sup>, SHI Shang-Li<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education/Sino-U.S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; <sup>2</sup>College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Hypocotyls, cotyledons, leaves and petioles from aseptic seedlings of *Medicago sativa* L. in Longdong region were used as explants in this study. The basic medium was MS solid medium. The effects of seed coat scratching as well as different growth regulators and their combinations on induction and differentiation of embryogenic callus were observed. The result indicated that seed coat scratching had remarkable influence on seeds germination ratio. The downside of hypocotyl possessed the highest callus induction ratio of 92.2% among all materials. The optimal callus induction medium was MS+2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>(same hereinbelow)+NAA 1.0+2.5% sucrose+0.6% agar, the optimal differentiation induction medium was MS+KT 0.5+NAA 0.3+2.5% sucrose+0.6% agar, and the optimal seedling formation medium was 1/2MS+NAA 0.1+1% sucrose +0.6% agar.

**Key words:** *Medicago sativa* L. in Longdong region; embryogenic callus; induction; regeneration

野生苜蓿相对于栽培苜蓿而言, 具有更强的抗逆性和适应性, 是改良苜蓿种质的重要遗传资源。但野生苜蓿比较少见, 至今通过品种登记的只有黄花苜蓿(*M. falcate*)和阿勒仄杂花苜蓿(*M. aleze*) (刘英俊等2004)。由甘肃天水清水县和定西安定区发现的陇东野生紫花苜蓿与栽培苜蓿相比, 根系强大, 茎细而硬, 抗寒抗旱, 耐牧性强, 固土护坡、保持水土能力强(王亚玲等2008), 可为改良苜蓿耐牧品质、创造生态型种质提供新的遗传材料。

但野生紫花苜蓿种子发芽率低, 硬实率高, 生长速度慢, 采用传统育种方式改良品种有一定的困难。本文以陇东地区野生紫花苜蓿为材料, 研究提高其种子发芽率的因素, 以及不同外植体、不同生长调节物质组合和浓度配比对其愈伤组织诱导、

分化及成苗的影响。建立陇东地区野生紫花苜蓿高效再生体系, 以期为此种质资源的遗传转化和开发利用提供参考。

### 材料与方 法

收集陇东地区野生紫花苜蓿(*Medicago sativa* L. in Longdong region)种子。选择籽粒饱满、有光泽的种子, 用自来水冲洗40 min, 在70%酒精中浸泡1~3 min, 用无菌水洗涤5~6次; 转入0.1%升

收稿 2009-09-21 修定 2009-11-05

资助 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD52B06; 2006BAD01A19-6)和国家牧草产业技术体系项目(2008)。

\* 通讯作者(E-mail: tshishl@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7632493)。

汞中浸泡 10 min, 无菌水洗涤 5~6 次, 洗涤过程中不断搅动种子, 以清除种子表面残留的升汞, 最后用无菌滤纸吸干, 备用。

将上述部分种子用手术刀划破种皮后与未处理的种子分别接种到 MS+2.5% 蔗糖+0.6% 琼脂和 1/2MS+1% 蔗糖+0.6% 琼脂的基本培养基上, 每个广口瓶中接种 40 粒, 重复 3 次。观察和记录发芽与生长情况, 统计发芽率。

诱导愈伤组织时, 将萌发 7~10 d 的无菌苗的下胚轴、子叶、叶片和叶柄切成 5 mm 长的小块, 分别接种于 MS+2.5% 蔗糖+0.6% 琼脂+2,4-D 2.0+NAA 1.0 的培养基上, 每个处理 5 皿, 每皿接种 25 个, 20 d 后统计愈伤组织诱导率。在筛选出最佳外植体的基础上, 设立不同的生长调节物质组合与浓度配比。2,4-D 浓度梯度为: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (单位下同); NAA 浓度梯度为: 0.5、1.0、1.5 和 2.0; pH 为 5.8, 每处理重复 4 次。每隔 3 d 观察和记录愈伤组织生长情况, 统计愈伤组织诱导率。培养条件为: 光照时间 16  $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度 15~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度 (25±1)  $^{\circ}\text{C}$ 。

愈伤组织继代根据诱导愈伤组织的生长状态, 3 周后将增殖的愈伤组织转移到继代培养基中, 15 d 继代一次, 培养条件同上。

胚性愈伤组织分化时, 将胚性愈伤组织接种在 KT 0.5+NAA (0.1、0.3、0.5、1.0)+2.5% 蔗糖+0.6% 琼脂的 MS 培养基上, pH 为 5.8, 每处理重复 3 次。定期观察愈伤组织的分化情况并统计分化率。

分化苗生根培养时, 将分化得到的无根苗自茎的基部切下, 分别接种到 MS+2.5% 蔗糖+0.6% 琼脂、1/2MS+1% 蔗糖+0.6% 琼脂和 1/2MS+NAA 0.1+1% 蔗糖+0.6% 琼脂的培养基上。培养 20 d 观

察生根成苗情况。

按下列公式计算各种指标: 发芽率(%)=种子出苗数/接种的种子总数×100%; 愈伤组织诱导率(%)=诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数×100%; 芽的分化率(%)=分化出芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数×100%; 生根率(%)=生根的幼苗数/接种的幼苗总数×100%。

## 结果与讨论

### 1 种皮划破和培养基种类对种子发芽率的影响

野生紫花苜蓿种子硬实率高, 萌发缓慢, 因此提高发芽率对其萌发齐苗十分重要。我们用手术刀划破种皮的方法(专利申请号 200910157755.1)提高苜蓿发芽率的研究结果表明: 划破种皮可提高陇东地区野生紫花苜蓿种子萌发率, 划破种皮是不划破种皮的 2.52 倍, 差异显著 ( $P<0.05$ )。种皮划破后, MS 培养基上的发芽率最高, 达 92.5% (表 1)。

### 2 不同外植体对愈伤组织诱导率的影响

植株不同器官和部位的生理状态和再生能力不一样, 选择不同的外植体可导致愈伤组织及体细胞胚形成和发育能力的差异。结果发现: 接种 4~6 d 后, 野生紫花苜蓿下胚轴即开始膨大, 形成愈伤组织的速度最快, 其次为子叶、叶柄和叶片。下胚轴的愈伤组织诱导率也明显高于其他 3 种外植体, 达 92.2% (图 1)。因此认为, 下胚轴是陇东地区野生紫花苜蓿愈伤组织高效和快速诱导的最适外植体, 这与栽培苜蓿的研究结果一致(Stuart 和 McCall 1992; 徐恒等 2001; 杨广东等 2002)。

### 3 不同生长调节物质组合与浓度对比对愈伤组织诱导的影响

(1) 陇东地区野生紫花苜蓿的下胚轴在只附加不同浓度 2,4-D 的 MS 培养基上, 其愈伤组织诱导率和质量存在很大差异。2,4-D 的最适浓度为 2.0

表 1 种皮划破和不同培养基对陇东地区紫花苜蓿种子发芽率的影响

Table 1 Effects of seed coat-scratching treatment and different medium on germination of seed in *M. sativa* in Longdong region

种皮处理方法	培养基	试验种子数 / 粒	种子萌发数 / 粒	发芽率 / %
不划破	1/2MS	120	42	35.0 <sup>d</sup>
	MS	120	45	37.5 <sup>c</sup>
划破	1/2MS	120	108	90.0 <sup>ab</sup>
	MS	120	111	92.5 <sup>a</sup>

不同字母表示各处理之间差异显著 ( $P<0.05$ , LSD 法), 下同。

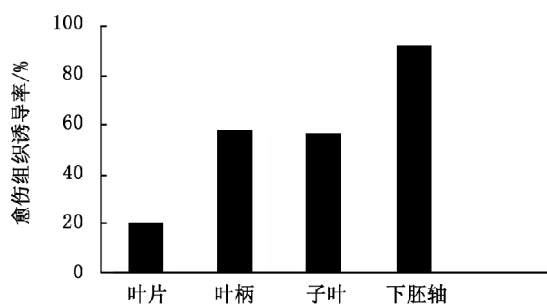


图1 不同外植体对陇东地区野生紫花苜蓿愈伤组织诱导率的影响

Fig.1 Embryogenic callus induction effects of different explants *in vitro* of *M. sativa* in Longdong region

mg·L<sup>-1</sup>, 愈伤组织诱导率最高, 为 95% (表 2), 高出其他处理的 3%~48%。2,4-D 浓度高于 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 时, 对愈伤组织的诱导有抑制作用, 诱导率逐渐下降。(2)在 MS 培养基中附加不同浓度 NAA 与 2,4-D 2.0 的愈伤组织诱导率和质量也有很大的差异。2,4-D 2.0 和 NAA 1.0 下的愈伤组织诱导率最高, 为 88.3% (表 2)。愈伤组织的长势旺盛, 有致密紧实的绿色内核, 不易褐化(图 2-a、b)。因此认为, MS+2,4-D 2.0+NAA 1.0 是陇东地区野生紫花苜蓿的最佳胚性愈伤组织诱导和继代培养基, 可以有效的改善愈伤组织生长条件, 增强其胚性。

表 2 不同生长调节物质及它们的组合对陇东地区野生紫花苜蓿愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different growth regulators and their combinations on embryogenic callus induction of *M. sativa* in Longdong region

不同生长调节物质 /mg·L <sup>-1</sup>	接种总数	诱导率 /%	愈伤组织质量情况
2,4-D 0.5	40	47 <sup>d</sup>	淡黄色, 结构致密, 表面有白色绒毛状物质, 不能继续发育, 最终褐化死亡
2,4-D 1.0	40	51 <sup>d</sup>	淡黄色, 结构致密, 表面有白色绒毛状物质, 不能继续发育, 最终褐化死亡
2,4-D 1.5	40	66 <sup>c</sup>	浅黄绿色, 结构干燥松脆, 能继续生长, 不分化
2,4-D 2.0	40	95 <sup>a</sup>	白色或浅黄色, 表面为细小突出颗粒, 结构松脆, 有光泽, 生长迅速, 容易褐化
2,4-D 2.5	40	92 <sup>a</sup>	浅黄色, 表面有不规则的突起, 结构松脆, 生长迅速, 容易褐化
2,4-D 3.0	40	89 <sup>a</sup>	浅黄色, 结构松脆, 生长较慢, 可分化
2,4-D 3.5	40	81 <sup>b</sup>	浅黄绿色, 表面为细小突出的颗粒, 干燥易碎, 能继续生长, 分化较慢
2,4-D 4.0	40	77 <sup>b</sup>	浅黄绿色, 表面为细小突出的颗粒, 干燥易碎, 能继续生长, 分化慢
2,4-D 2.0+NAA 0.5	40	45.7 <sup>d</sup>	淡黄色, 结构松脆, 表面有不规则的突起, 可生长, 分化慢
2,4-D 2.0+NAA 1.0	40	88.3 <sup>ab</sup>	浅黄色与淡绿色相间, 有致密紧实的绿色内核, 表面有绿色突起; 易分化, 能再生成苗
2,4-D 2.0+NAA 1.5	40	84 <sup>b</sup>	浅黄色, 质地松软、湿润, 有光泽, 易分化, 能再生成苗
2,4-D 2.0+NAA 2.0	40	65 <sup>c</sup>	浅黄绿色, 表面为细小突出的颗粒, 干燥易碎, 能继续生长, 分化慢

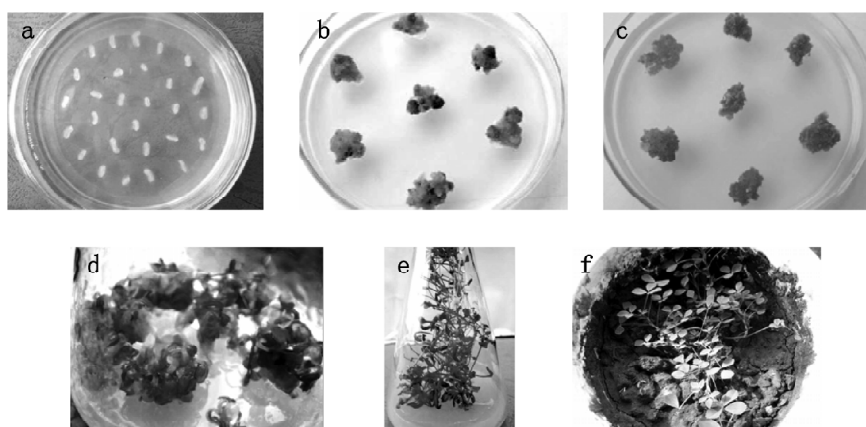


图 2 陇东地区野生紫花苜蓿的再生过程

Fig.2 The regeneration process of *M. sativa* in Longdong region

A: 诱导 3 d 后的愈伤组织; b: 胚性愈伤组织; c: 胚性愈伤组织分化; d: 分化苗; e: 再生植株; f: 移栽后的再生植株。

#### 4 胚性愈伤组织的诱导分化和根的诱导及移栽

自然条件下一些植物细胞再生之所以比较困难是由于植物体内源激素调整缓慢或不平衡, 以及外界条件不易控制等因素所致。在诱导苜蓿愈伤组织分化再生时, 许多研究已证明 2,4-D、KT、BA 等合理组合能成功地诱导植株再生。从表 3 可

知, 不同生长调节物质的组合导致不同的胚性愈伤组织分化率。KT 0.5+NAA 0.3 为胚性愈伤组织分化的最佳生长调节物质组合(图2-c), 分化率达89.7%, 诱导 10 d 后有绿色芽点出现, 培养 30 d 左右即可形成无根苗(图 2-d、e)。而 NAA 超过 0.5 时, 则抑制分化。

表3 KT 和 NAA 的不同浓度对比对胚性愈伤组织分化率的影响

Table 3 Effects of different combinations of KT and NAA on embryogenic callus induction

KT/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	胚性愈伤组织分化数 / 个	愈伤组织分化率 / %
0.5	0.1	11	76.9 <sup>b</sup>
0.5	0.3	12	89.7 <sup>a</sup>
0.5	0.5	11	86.1 <sup>a</sup>
0.5	1.0	10	67.7 <sup>c</sup>

此外, 当分化苗长至 2~3 cm 高时, 将其插入生根培养基中诱导生根的结果表明, 生根效果最好的培养基为 1/2MS+NAA 0.1+1%蔗糖, 生根率达 92.5%, 显著高于不加 NAA 的 1/2MS (表 4); 不添加生长调节物质的 MS 培养基也可以生长出根, 但数量最少,

生根率仅为 72.5%, 显著低于不添加生长调节物质的 1/2MS。可见, 采用低糖和低无机盐的 1/2MS 培养基添加少量 NAA 有利于生根。当分化苗出现 3~4 条根、长约 3 cm 时移栽, 先打开瓶盖进行 3~4 d 的炼苗, 然后移入花中(图 2-f)。

表4 NAA 对陇东地区紫花苜蓿分化苗生根率的影响

Table 4 The effect of NAA on rooting rate of differentiated seedlings of *M. sativa* in Longdong region

接种无根苗数 / 棵	培养基类型	生根苗数 / 个	生根率 / %
40	1/2MS+NAA 0.1	37	92.5 <sup>a</sup>
40	1/2MS	34	83.1 <sup>b</sup>
40	MS	29	72.5 <sup>c</sup>

野生苜蓿因其具有栽培苜蓿品种不具备的优良性状, 在改良苜蓿品质和创造新的基因型中日益受到育种者的关注。本文结果对这方面的研究可能有一定的参考价值, 今后还应进一步研究提高其诱导和分化频率以及缩短再生周期的方法。

#### 参考文献

刘英俊, 云锦凤, 王俊杰, 谢小东(2004). 野生黄花苜蓿栽培驯化

研究. 中国草地, (6): 40~44  
 王亚玲, 师尚礼, 焦亮(2008). 陇东野生紫花苜蓿的生态特征. 草业科学, 1(25): 26~28  
 徐恒, 黎万奎, 谢志健, 吴栋(2001). 苜蓿愈伤组织诱导及 GUS 基因瞬时表达. 四川大学学报(自然科学版), 38 (6): 905~908  
 杨广东, 朱祯, 李燕娥, 朱祝军(2002). 大白菜高效遗传转化体系的建立. 农业生物技术学报, 10 (2): 127~132  
 Stuart DA, McCall CM (1992). Induction of somatic embryogenesis using side chain and ring modified forms of phenoxy acid growth regulators. Plant Physiol, 99: 111~118