

# 苜蓿不同品种愈伤组织诱导、分化和再生能力的比较研究

张何, 黄其满

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

**摘要** 以新疆大叶、甘农 1 号、甘农 3 号和陇东 4 个苜蓿品种的下胚轴、子叶和子叶节为外植体, 比较了不同苜蓿品种及外植体愈伤组织诱导、分化及再生能力的差异, 研究了不同浓度及配比的植物生长调节物质对愈伤组织诱导和芽分化再生的影响。结果表明, 4 个苜蓿品种再生能力依次为新疆大叶>甘农 3 号>甘农 1 号>陇东苜蓿, 下胚轴外植体在愈伤诱导培养基 (MS+2 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L ZT) 上出愈率分别为 94%, 83%, 71% 和 58%, 胚性愈伤组织在分化培养基 (MS+0.2 mg/L ZT+50 mg/L 谷氨酰胺) 上分化率分别为 15.8%, 9.2%, 7.1% 和 4.5%; 下胚轴再生能力优于子叶节和子叶; 丛生芽在生根培养基 (1/2 MS) 上生成完整的根; 各品种的再生苜蓿植株均成功移栽到土壤中, 成活率 100%。上述 4 个苜蓿品种分化再生能力的阶段性研究结果为今后通过基因工程方法改良苜蓿奠定了基础。

**关键词** 苜蓿; 愈伤诱导; 分化再生; 组织培养

**中图分类号** S184

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-7857(2008)02-38-04

## Comparative Study on Callus Induction, Differentiation and Regeneration Capacity of Different Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars

ZHANG He, HUANG Qiman

*Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*

**Abstract** In this paper, a comparison is made on callus induction, differentiation and regeneration capacity of cotyledons, cotyledonary nodes and hypocotyls of four alfalfa cultivars: XinjiangDaye, Longdong, Gannong No. 1 and Gannong No. 3. The effects of different combinations and concentrations of plant growth regulators on callus induction and shoot differentiation are studied. The results show that the regeneration capacity of different cultivars is in the following order: XinjiangDaye>Gannong No. 3>Gannong No. 1>Longdong, with hypocotyls being better than cotyledons and cotyledonary nodes. Callus formation frequencies of hypocotyls on MS+2mg/L 2, 4-D+0.2mg/L ZT are, respectively, 94%, 83%, 71% and 58%. Shoot differentiation frequencies on MS+0.2mg/L ZT+50mg/L Glutamine

are, respectively, 15.8%, 9.2%, 7.1% and 4.5%. The regenerating shoots would develop rooting systems, which grow well on 1/2 MS media. All regenerated alfalfa plantlets were successfully transferred into the soil. This study on alfalfa regenerated capacity provides a foundation for further alfalfa improvement through genetic engineering strategies.

**Keywords** alfalfa; callus induction; differentiation and regeneration; tissue culture

### 0 引言

苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是我国也是世界上重要的豆科牧草之一, 在我国已有两千多年的栽培历史, 其营养价值被列在各种牧草的首位, 素有“牧草之王”的美誉<sup>[1]</sup>。但现有的苜蓿品种已经不能满足畜牧业对牧草品质日益提高的需求, 迫切需要培育优质的苜蓿新品种。现代生物技术的迅速发展为苜蓿品种的改良提供了新的手段, 而采用生物技术方法改良苜蓿新品种的前提是要利用植物组织培养技术建立高效的再生系统。

1972 年, Saunders 等<sup>[2]</sup>从苜蓿未成熟的花药、子房、子叶愈伤组织分化再生植株获得成功, 标志着苜蓿组织培养研究的开始。1981 年, 杨燮荣等<sup>[3]</sup>在国内首次报道利用苜蓿叶片、叶柄和茎段为外植体诱导愈伤组织, 共获得 33 株再生植株。

收稿日期: 2007-11-06

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项 (J2002-B-008)

作者简介: 张何, 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院生物技术研究所, E-mail: zhanghe79@hotmail.com; 黄其满 (通讯作者), 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院生物技术研究所, 副研究员, E-mail: huangqiman@hotmail.com

苜蓿再生体系的研究中,国内对新疆大叶、甘农苜蓿等品种的报道不多,马海燕等以新疆大叶苜蓿无菌苗下胚轴为外植体,研究两种诱导培养基对愈伤组织生长的影响以及增殖培养基中附加谷胱甘肽对愈伤组织增殖、分化及再生的影响,筛选出新疆大叶苜蓿具有高分化能力的基因型6个<sup>[9]</sup>。经过多年实验,研究人员发现包括苜蓿叶片、叶柄、子叶、子叶节、胚轴、根等很多部位都可以作为外植体再生植株,其中应用最多的是子叶和下胚轴<sup>[5-9]</sup>。在诱导苜蓿愈伤组织和分化再生时,许多研究者的工作证明2,4-D, ZT, KT, BA等植物激素的合理组合都能成功地诱导植株再生<sup>[10-17]</sup>。Stuart等报道加入氨基酸对紫花苜蓿的体胚形成有一定的影响<sup>[18-19]</sup>。本研究以新疆大叶、甘农1号、甘农3号和陇东苜蓿4个品种的下胚轴、子叶和子叶节为外植体,比较不同苜蓿品种及外植体分化再生能力,研究了不同浓度及配比的植物生长调节物质对愈伤组织诱导和芽分化再生的影响,为下一步进行苜蓿遗传转化研究奠定了重要基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

陇东苜蓿、新疆大叶、甘农1号和甘农3号的苜蓿种子由北京林业大学卢欣石教授赠送。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 种子萌发

将饱满的苜蓿种子在灭菌蒸馏水中浸泡10 min后,用75%酒精处理2 min,然后用0.1%升汞溶液消毒10 min,无菌水洗涤3~5次,接种在1/2 MS培养基上,26℃条件下暗培养2 d,待种子萌发后转为光照培养,光照周期为光照/黑暗=16 h/8 h,培养温度为26℃/21℃。

#### 1.2.2 愈伤组织诱导

待3~4 d子叶完全展开而真叶尚未长出时,切取其下胚轴、子叶和子叶节进行暗培养。所用的愈伤组织诱导培养基以MS为基本培养基<sup>[20]</sup>,分别添加不同浓度的2,4-D, ZT和KT,每隔3周继代一次,培养30 d后统计出愈率并观察生长情况。

#### 1.2.3 愈伤组织分化

外植体在上述培养基上培养生成愈伤组织后,转入以MS为基本培养基并添加不同浓度ZT和谷氨酰胺的分化培养基上光照培养,每隔3周继代一次,培养条件与种子萌发相同。试验筛选出愈伤组织分化频率相对较高的培养基组合并观察后期生长情况。

#### 1.2.4 再生植株获得

将分化得到的不定芽转至1/2 MS生根培养基上进行培养。20 d左右待幼苗长出3~4条根,打开瓶盖炼苗1 d,小心取出幼苗用自来水将根部的培养基洗掉,再移至土壤中(土:草炭:蛭石=3:2:1)培养,以获得再生植株。

## 2 实验结果

### 2.1 不同苜蓿品种及外植体出愈率的比较

在含有1.0 mg/L 2,4-D的MS培养基上,不同苜蓿品种

及相同品种的不同外植体间出愈率差异很大。新疆大叶苜蓿下胚轴の出愈率可以达到91%,而陇东苜蓿出愈率仅为51%。不同苜蓿品种间出愈率差异为:新疆大叶>甘农3号>甘农1号>陇东苜蓿;下胚轴出愈率优于子叶节和子叶(见图1)。因此,选择新疆大叶苜蓿下胚轴为最佳的愈伤诱导外植体。

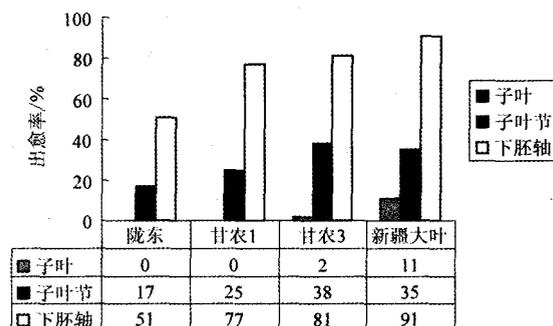


图1 不同苜蓿品种及外植体出愈率的比较

Fig. 1 Comparison of callus formation frequency of different alfalfa cultivars and explants

### 2.2 不同激素配比诱导愈伤及愈伤组织生长情况

将新疆大叶、甘农3号、甘农1号和陇东4个苜蓿品种的下胚轴在含两种不同浓度激素的MS培养基上进行愈伤组织的诱导培养(见表1),观察愈伤组织形成的情况(见图2)。从本实验可知,在2.0 mg/L 2,4-D和0.2 mg/L ZT组合下愈伤组织的诱导能力最强,出愈率达到94%。

表1 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different phytohormone combinations on callus induction

| 激素浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     | 出愈率/% |      |      |      |
|----------------------------|-----|-----|-------|------|------|------|
| 2,4-D                      | KT  | ZT  | 新疆大叶  | 甘农3号 | 甘农1号 | 陇东苜蓿 |
| 1.0                        | 0.1 | 0   | 69    | 57   | 34   | 23   |
| 2.0                        | 0.2 | 0   | 86    | 78   | 63   | 54   |
| 1.0                        | 0   | 0.1 | 72    | 56   | 44   | 42   |
| 2.0                        | 0   | 0.2 | 94    | 83   | 71   | 59   |
| 0                          | 0.1 | 0.1 | 56    | 54   | 48   | 37   |
| 0                          | 0.2 | 0.2 | 79    | 71   | 66   | 41   |

### 2.3 不同植物生长调节剂配比对分化率的影响及分化情况

将新疆大叶、甘农3号、甘农1号、陇东4个苜蓿品种的愈伤组织在含ZT、谷氨酰胺两种植物生长调节物质的MS培养基上进行分化培养(见表2),观察愈伤组织的分化情况(见图3)。从本实验可知,在MS+0.2 mg/L ZT+50 mg/L 谷氨酰胺的培养基中分化能力最强,分化频率达到15.8%。

### 2.4 生根和移栽

将出现分化芽转接到1/2 MS生根培养基上,26℃光照培养3周后根生成。当再生的小植株出现多条健壮根时,经过炼苗,将幼苗从三角瓶中取出并移栽于土壤中,移栽成活率100%(见图4)。



图2 不同品种苜蓿下胚轴在愈伤诱导培养基上形成的愈伤,从左到右依次为新疆大叶,甘农1号,甘农3号和陇东苜蓿4个品种

Fig. 2 Explants were developed into calli on callus-induction media, left to right are XinjiangDaye, Gannong No. 1, Gannong No. 3 and Longdong, respectively

表2 不同植物生长调节剂配比对分化率的影响

Table 2 Effects of different concentrations of plant growth regulators on shoot differentiation

| 植物生长调节剂浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) |     | 分化率/% |      |      |      |
|---------------------------------|-----|-------|------|------|------|
| 谷氨酰胺                            | ZT  | 甘农1号  | 甘农3号 | 新疆大叶 | 陇东苜蓿 |
| 25                              | 0.2 | 2.1   | 9.3  | 10.2 | 1.3  |
| 25                              | 0.5 | 6.2   | 4.6  | 9.1  | 2.4  |
| 25                              | 1.0 | 3.4   | 3.2  | 7.5  | 1.9  |
| 25                              | 2.0 | 3.0   | 4.1  | 6.9  | 1.6  |
| 50                              | 0.2 | 7.1   | 9.2  | 15.8 | 4.5  |
| 50                              | 0.5 | 3.9   | 4.6  | 11.0 | 3.1  |
| 50                              | 1.0 | 2.8   | 3.7  | 5.7  | 2.4  |
| 50                              | 2.0 | 4.1   | 3.9  | 6.8  | 2.9  |



图3 愈伤在分化培养基上形成的再生芽,从左到右依次为新疆大叶、甘农1号、甘农3号和陇东苜蓿4个品种

Fig. 3 Calli were developed into shoots on shoots-differentiation media, left to right are XinjiangDaye, Gannong No. 1, Gannong No. 3 and Longdong, respectively

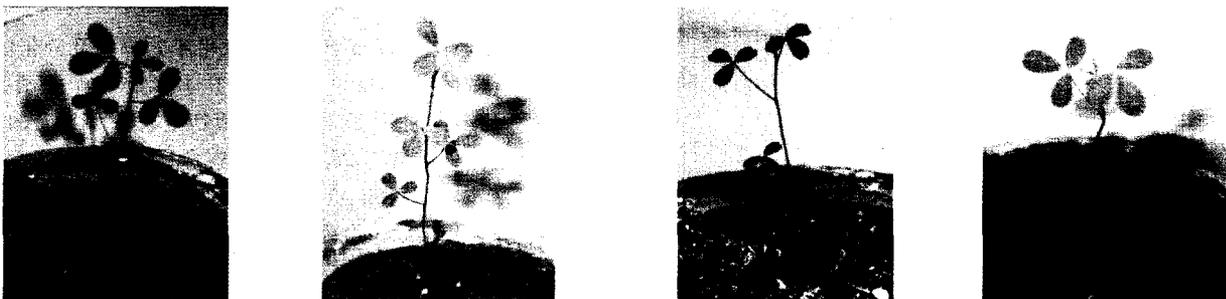


图4 移栽到土壤中的不同品种再生苜蓿植株,从左到右依次为新疆大叶、甘农1号、甘农3号和陇东苜蓿4个品种

Fig. 4 Different regenerating alfalfa plantlets in the soil, left to right are XinjiangDaye, Gannong No. 1, Gannong No. 3 and Longdong, respectively

## 3 讨论

目前, 苜蓿基因转化的受体主要来源于组织培养途径, 作为遗传转化的受体系统, 要求具有较强的再生能力、较高的遗传稳定性、稳定的外植体来源等优点。尽管国内开展苜蓿组织培养及遗传转化的研究工作很多, 但许多再生体系的方案比较脆弱, 即使对同一个品种, 不同的研究者得出的结果也不尽相同。根据国内外文献的报道, 影响苜蓿组织培养效果的因素很多, 品种基因型、外植体类型、培养基种类以及激素浓度配置组合都会影响苜蓿的分化再生。

本研究通过对新疆大叶、甘农 3 号、甘农 1 号和陇东 4 个苜蓿品种分化再生能力进行比较, 发现新疆大叶再生能力优于其他品种。新疆大叶苜蓿是新疆地区培育出的一种地方栽培品种, 具有产量高、抗寒性强等优点, 但对盐碱的耐性弱, 建立新疆大叶苜蓿组织培养再生体系可以为培育耐盐等抗逆苜蓿品种奠定基础。此外, 研究发现相同苜蓿品种的下胚轴、子叶等不同外植体间的愈伤组织诱导率和体胚分化率都表现出很大差异, 下胚轴再生能力最好, 这与梁惠敏、王强龙等报道的结论一致<sup>[6]</sup>。在不同的激素组合培养基的筛选实验中, 最佳愈伤诱导培养基与潘竞丽等报道在 MS+2.0mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT 培养基上得到最好诱导效果的结论不同<sup>[21]</sup>; 在不定芽的分化诱导中, 最佳培养基为 MS+0.2 mg/L ZT+ 50 mg/L 谷氨酰胺, 国内还未见有关谷氨酰胺和 ZT 组合对苜蓿分化再生影响的报道。目前存在的问题是分化频率不高和再生周期长, 在今后的实验中还需要进一步研究添加其他植物生长调节物质对提高分化频率和缩短再生周期的影响。另外, 对再生体系建立过程中一些植物内源激素变化和形成机理的探索也将有助于苜蓿再生体系的深入研究。

从 20 世纪 80 年代后期开始, 国外基因工程中的许多先进技术已被广泛应用于苜蓿研究的各项领域, 并在苜蓿抗性育种、减少臃胀病危害、提高干物质消化率等方面取得了进展。我国在上述方面的研究起步较晚, 研究水平亟待加强。目前, 我国苜蓿种植面积已达约 133.3 万  $\text{hm}^2$ , 专家预计到 2010 年可达约 600 多万  $\text{hm}^2$ 。我们相信, 随着苜蓿种植面积的迅速增加以及苜蓿产品深加工市场将逐步扩展, 苜蓿的经济效益和生态效益将得到更充分的体现<sup>[1]</sup>, 苜蓿组织培养及遗传转化的成果将发挥越来越重要的作用, 这必将对我国草业科学的发展起到重要推动作用。

## 参考文献 (References)

- [1] 黄其满, 俞梅敏. 生物技术与苜蓿品质改良 [J]. 高技术通讯, 2002(3): 101-103.  
Huang Qiman, Yu Meimin. *High Technology Letters*, 2002(3): 101-103.
- [2] Saunders J W, Bingham E T. Production of alfalfa plants from callus tissue[J]. *Crop Science*, 1972, 12: 804-808.
- [3] 杨燮荣, 邵根福, 周荣仁. 苜蓿组织培养及植株的再生[J]. 植物生理学通讯, 1981(5): 33-34.  
Yang Xierong, Tai Genfu, Zhou Rongren. *Plant Physiology Communications*, 1981(5): 33-34.
- [4] 马海燕, 张博, 郝兴明, 等. 新疆苜蓿愈伤组织再生体系建立的研究[J]. 新疆农业科学, 2005, 42(1): 19-23.  
Ma Haiyan, Zhang Bo, Hao Xingming, et al. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2005, 42(1): 19-23.
- [5] 王友生, 李阳春, 梁慧敏, 等. 紫花苜蓿愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 草原与草坪, 2006(4): 55-58.  
Wang Yousheng, Li Yangchun, Liang Huimin, et al. *Grassland and Turf*, 2006(4): 55-58.
- [6] 梁慧敏, 黄剑, 夏阳, 等. 苜蓿外植体再生系统的建立研究[J]. 中国草地, 2003, 25(4): 8-14.  
Liang Huimin, Huang Jian, Xia Yang, et al. *Grassland of China*, 2003, 25(4): 8-14.
- [7] 刘青芳, 步怀宇, 赵宇玮, 等. 紫花苜蓿离体培养植株再生及其 RAPD 分析[J]. 草业学报, 2006, 15(5): 115-121.  
Liu Qingfang, Bu Huaiyu, Zhao Yuwei, et al. *Acta Prataculturae Sinica*, 2006, 15(5): 115-121.
- [8] 王强龙, 王锁民, 张金林, 等. 紫花苜蓿体细胞胚高频再生体系的建立[J]. 草业科学, 2006, 23(11): 21-27.  
Wang Qianglong, Wang Suomin, Zhang Jinlin. *Pratacultural Science*, 2006, 23(11): 21-27.
- [9] 张万军, 王涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因素的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1579-1583.  
Zhang Wanjun, Wang Tao. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(12): 1579-1583.
- [10] 王姝杰, 闫淑珍, 李世访. 紫花苜蓿下胚轴愈伤组织诱导及再生植株的研究[J]. 植物保护, 2005, 31(3): 50-52.  
Wang Shujie, Yan Shuzhen, Li Shifang. *Plant Protection*, 2005, 31(3): 50-52.
- [11] Shao C Y, Russinova E, Iantcheva A, et al. Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago falcata* L.) via direct somatic embryogenesis[J]. *Plant Growth Regulation*, 2000, 31: 155-166.
- [12] Ding Y L, Aldao-Humble G, Ludlow E, et al. Efficient plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species[J]. *Plant Science*, 2003, 165: 1419-1427.
- [13] 金淑梅, 管清杰, 罗秋香, 等. 苜蓿愈伤组织高频再生遗传和转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2006, 4(4): 571-578.  
Jin Shumei, Guan Qingjie, Luo Qiuxiang, et al. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(4): 571-578.
- [14] Barbulova A, Iantcheva A, Zhiponova M, et al. Agrobacterium-mediated transformation for engineering of herbicide-resistance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2002, 16(2): 21-27.
- [15] Lai F M, Senaratna T, McKersie B D. Glutamine enhances storage protein accumulation in *Medicago sativa* L. somatic embryos [J]. *Plant Science*, 1992, 87(1): 69-77.
- [16] Tian L, Brown D C W, Waltson E. Continuous long term somatic embryogenesis in alfalfa [J]. *Vitro Cellular and Developmental Biology*, 2002, 38(3): 279-284.
- [17] 刘振虎, 卢欣石, 葛军. 紫花苜蓿愈伤组织及体细胞胚的细胞学观察[J]. 草业科学, 2005, 22(2): 37-40.  
Liu Zhenhu, Lu Xinsi, Ge Jun. *Pratacultural Science*, 2005, 22(2): 37-40.
- [18] Stuart D A, Strickland S G. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. II. The interaction of amino acids with ammonium[J]. *Plant Science Letters*, 1984, 34(1-2): 175-181.
- [19] Stuart D A, Strickland S G. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium[J]. *Plant Science Letters*, 1984, 34(1-2): 165-174.
- [20] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473-497.
- [21] 潘竞丽, 曾幼玲, 张富春. 新疆大叶紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 子叶、下胚轴、根的植株再生[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 52-56.  
Pan Jingli, Zeng Youling, Zhang Fuchun. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(6): 52-56.

(责任编辑 王芷)