

[文章编号]1000-1832(2008)03-0112-06

高效的苜蓿组织培养再生体系的建立

王涌鑫,关宁,李聪

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,北京 100094)

[摘要] 以保定苜蓿为实验材料,从外植体的基因型、培养基的选择,激素(KT)、水解酪蛋白的浓度等方面探讨了影响保定苜蓿组织培养的因素.结果表明:下胚轴比子叶作为外植体获得的效果更好;改良的SH培养基相对于UM培养基对愈伤组织的诱导更有效;在含有0.2 mg/L KT和2 g/L水解酪蛋白的UM培养基上,得到了最大的胚状体诱导率;水解酪蛋白的加入提高了胚状体的质量和成熟率.

[关键词] 苜蓿;外体;愈伤组织;胚状体;再生;生根

[中图分类号] Q 943.1

[学科代码] 180·5135

[文献标识码] A

苜蓿是世界上最重要的牧草之一.随着畜牧业的发展,传统的育种方式已经不能满足人类对新品种的需求.对于苜蓿更好的品质追求,已成为很多育种学家研究的主要目标.组织培养技术的出现,对于人们的这个需要提供了强有力的支持.据报道,Saunders和Bingham等最早开展了苜蓿的组织培养研究^[1],通过器官形成和体胚愈伤组织发育两条途径,最终分化出完整的植株.在国内,最早的报道是杨燮荣在1981年利用紫花苜蓿的叶片、叶柄、茎段作为外植体,诱导出愈伤组织,并成功分化出苗.从苜蓿的外植体能够诱导获得胚性愈伤组织,进而再生出植株已经得到了很多实验的证实^[2-5].随着研究的开展,苜蓿组织培养系统得到了巨大的发展,已经成功地在固体培养基和悬浮培养基中诱导分化出了苜蓿的胚性愈伤组织^[1].用包括叶子、叶柄、下胚轴和原生质体在内的不同的材料作为外植体,进行组织培养实验的过程已获得成功^[6-8].1983年,D. Y. LU等曾对紫花苜蓿的叶片、幼苗子叶和幼苗根原生质体在组织培养过程中表现出来的形态发生能力进行了比较^[9];而很多的实验,研究者采用最多的外植

体是子叶和下胚轴^[10-14].一个有效地从胚状体再生出植株的系统是组织培养的关键.综合现阶段对于苜蓿再生体系的研究,目前仍存在以下几个问题:(1)再生效率不是很稳定,可重复性差;(2)再生周期长;(3)受基因型影响大^[15].现在还没有一种“万能”的培养基可以用于每一个苜蓿品种的组织培养,所以,对于苜蓿组织培养体系的改良是非常重要的.

本研究以保定苜蓿作为实验材料,探讨了外植体的选择、不同培养基对愈伤组织诱导的影响、不同浓度的激素(kinetin,KT)对胚状体分化和成熟的影响、水解酪蛋白对胚状体成熟的影响,目的是要建立一个高效的保定苜蓿组织培养体系,从而为以后进行的苜蓿遗传转化研究提供一个坚实的基础.

1 材料和方法

1.1 实验材料

选取籽粒饱满、有光泽的保定苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Baoding)种子.种子由本实验室储

[收稿日期] 2008-05-19

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAD01A19);新疆草地资源与生态重点实验室开放课题资助项目(XJDX0201-2005-03).

[作者简介] 王涌鑫(1979—),男,博士研究生;李聪(1958—),男,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事牧草遗传育种研究.

存及提供.

1.2 实验方法

1.2.1 种子灭菌及无菌苗的培养

将种子放于70%的酒精中消毒30 s,随后向体系内加入0.1%的升汞和SDS浸泡8~10 min,期间摇晃数次;倒掉消毒液,用无菌水冲洗5次,最后用灭过菌的滤纸将水吸干.处理好的种子在无菌条件下放于无生长调节剂的1/2 MS (medium of Murashige and Skoog, 1962)培养基上,置于培养间内.1/2 MS培养基包括MS培养基^[8]中一半的大量元素,其余的与MS培养基相同(0.8%琼脂粉,15 g/L蔗糖,pH=5.8).

1.2.2 外植体准备

将4~5 d大小的子叶和下胚轴用小刀从无菌苗上切下,切成3~4 mm长的小块.将这些小块作为外植体放于愈伤组织诱导培养基上.

1.2.3 培养条件

光周期为12 h,光强度为3 000 lx,温度为(24±1)℃.

1.2.4 愈伤组织的诱导,胚状体的诱导,植株的再生

本实验中各培养阶段培养基的成分因实验目的的不同做了相应的调整,各培养基都包括0.8%琼脂粉,灭菌前调pH值到5.8,所用的培养基都在120℃灭菌20 min.

实验一:设计两种培养基用于愈伤组织诱导能力的比较.(1)改良的SH (medium of Schenk and Hildebrandt, 1972)培养基:SH培养基^[9]的大量元素,MS培养基的微量元素,9.9 mg/L VB₁,9.5 mg/L VB₆,4.5 mg/L 烟酸,30 g/L 蔗糖,2 mg/L 2,4-D,0.2 mg/L KT;(2)UM (medium of Uchimiya H. and Murashige T.)培养基:MS培养基的基本盐,10 mg/L VB₁,10 mg/L VB₆,2 mg/L 甘氨酸,100 mg/L 肌醇,5 mg/L 烟酸,30 g/L 蔗糖,2 g/L 水解酪蛋白,2 mg/L 2,4-D,0.2 mg/L KT.

将外植体在无菌条件下放在愈伤组织诱导培养基上,每个平板放20个外植体,设5个重复,总共100个外植体.在培养间内培养20 d以后,计数两种培养基上愈伤组织的数量,并将愈伤组织转移到分化培养基上诱导胚性愈伤组织.

实验二:以UM培养基+2 g/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖为胚性愈伤组织诱导培养基,分别附加0,0.2,0.4,0.6 mg/L KT,研究不同浓度的KT对胚状体的发生与成熟的影响.培养20 d以

后,计数生出胚状体的胚性愈伤组织的数目.

实验三:研究水解酪蛋白对于胚状体成熟的影响.分别以如下的培养基为基础:(1)改良的SH培养基;(2)含有2 g/L 水解酪蛋白的改良SH培养基;(3)UM培养基;(4)含有2 g/L 水解酪蛋白的UM培养基.培养15 d后,计数胚性愈伤组织的数量;培养30 d后,计数长出成熟胚状体的胚性愈伤组织数量.

胚状体在UM培养基+2 g/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+0.2 mg/L KT上培养30 d以后,将成熟的胚状体和再生的植株在无菌条件下转移到不含任何生长激素的1/2 MS培养基+15 g/L 蔗糖上,完成生根.

2 结果与分析

2.1 不同培养基对于愈伤组织诱导的影响

愈伤组织的产生分为两个阶段:起始发生阶段和发育成熟阶段.在起始阶段,当外植体被放在愈伤组织诱导培养基上2 d以后,可明显地观察到外植体开始膨胀.在第7天的时候,愈伤组织的量达到最大,此时,全部的愈伤组织进入到发育阶段.培养20 d后,比较两种培养基上愈伤组织的数量(见表1)可见:在改良的SH培养基上,所有的外植体均可以生出愈伤组织,但是在UM培养基上,大约只有93%的外植体产生了愈伤组织,诱导率明显低于改良的SH培养基.这个时候愈伤组织的正常状态是:颜色白中略带黄且质地不是很软(见图1-a).从外植体被放到培养基上到获得成熟的愈伤组织,总共大约需要20 d,之后即可将成熟的愈伤组织转移到分化(胚状体诱导)培养基上.

表1 不同的培养基(改良的SH培养基和UM培养基)对愈伤组织诱导的影响

培养基类型	外植体数 ^a /个	愈伤组织数/个	转化率/%
改良的SH培养基	100	100	100
UM培养基	100	93	93

^a下胚轴作为外植体.

2.2 外植体的选择

选择两种外植体:子叶和下胚轴,用以研究外植体类型对愈伤组织诱导率的影响.结果表明:培养20 d以后,在改良的SH培养基和UM培养基上,所有的下胚轴都可以产生出愈伤组织;但是在这两种培养基上的子叶却分别只有96%和91%的愈伤组织诱导率(见表2).

表2 不同的外植体对愈伤组织诱导的影响

培养基类型	外植体数/个		愈伤组织数/个		愈伤组织诱导率/%	
	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
改良的 SH 培养基	60	40	58	40	96	100
UM 培养基	60	40	55	40	91	100

2.3 不同浓度的 KT 对胚状体诱导起始和成熟的影响

研究中发现,KT 的质量浓度显著地影响胚性愈伤组织的诱导率.以含有 2 g/L 水解酪蛋白的 UM 培养基为基础培养基,在 KT 质量浓度为

0.2 mg/L 时,得到了最大的胚性愈伤组织分化率,大约为 90%;在 KT 质量浓度为 0.4 和 0.6 mg/L 时,所得到的分化率分别为 40% 和 20%.在不含 KT 的 UM 培养基上没有得到胚状体(见表 3).

表3 不同的 KT 浓度对于胚状体发生和发育的影响

KT 质量浓度/(mg/L)	愈伤组织数量 ^a /个	胚性愈伤组织数量 ^b /个	分化率/%
0	50	0	0
0.2	50	45	90
0.4	50	20	40
0.6	50	10	20

a 所用的愈伤组织大小相近,直径为 3~4 mm;b 胚性愈伤组织的数量是在培养 30 d 的时候统计的.

2.4 水解酪蛋白对于胚状体成熟的影响

在分化诱导胚状体的初期,水解酪蛋白对于胚性愈伤组织的诱导并不起作用(见表 4).愈伤组织在 UM 培养基上比在改良的 SH 培养基上能更好地被诱导分化成胚性愈伤组织.分别在每种培养基上放 50 个愈伤组织块,培养 15 d 后,在两种 UM 培养基上,分别有 46 个和 41 个愈伤组织分化出了胚性愈伤组织.但是在两种改良的 SH 培养基上,就没有得到相似的结果,分别只有 27 个和

23 个愈伤组织分化出了胚性愈伤组织.两种 UM 培养基胚性愈伤组织的分化率大约是两种改良的 SH 培养基分化率的 2 倍.培养 30 d 后,胚性愈伤组织在没有水解酪蛋白的培养基上很难成熟,有些会发生萎缩甚至消失,在含有 2 g/L 水解酪蛋白的 UM 培养基上,大约有 90% 的愈伤组织产生了成熟的胚状体(见图 1-d).但是在其他类型的培养基上,成熟胚状体的分化率却只有 14%,12% 和 10%.

表4 水解酪蛋白对于胚状体成熟的影响

培养基类型	愈伤组织数/个	胚性愈伤组织数 ^a /个	成熟胚状体的胚性	分化率/%
			愈伤组织数 ^b /个	
改良的 SH 培养基	50	23	5	10
改良的 SH 培养基 + 水解酪蛋白	50	27	6	12
UM 培养基	50	41	7	14
UM 培养基 + 水解酪蛋白	50	46	45	90

注:所有的培养基都含有 0.2 mg/L KT;a 表示 15 d 时计数的胚性愈伤组织数;b 表示培养 30 d 后,统计的成熟胚状体数.

2.5 植株的再生

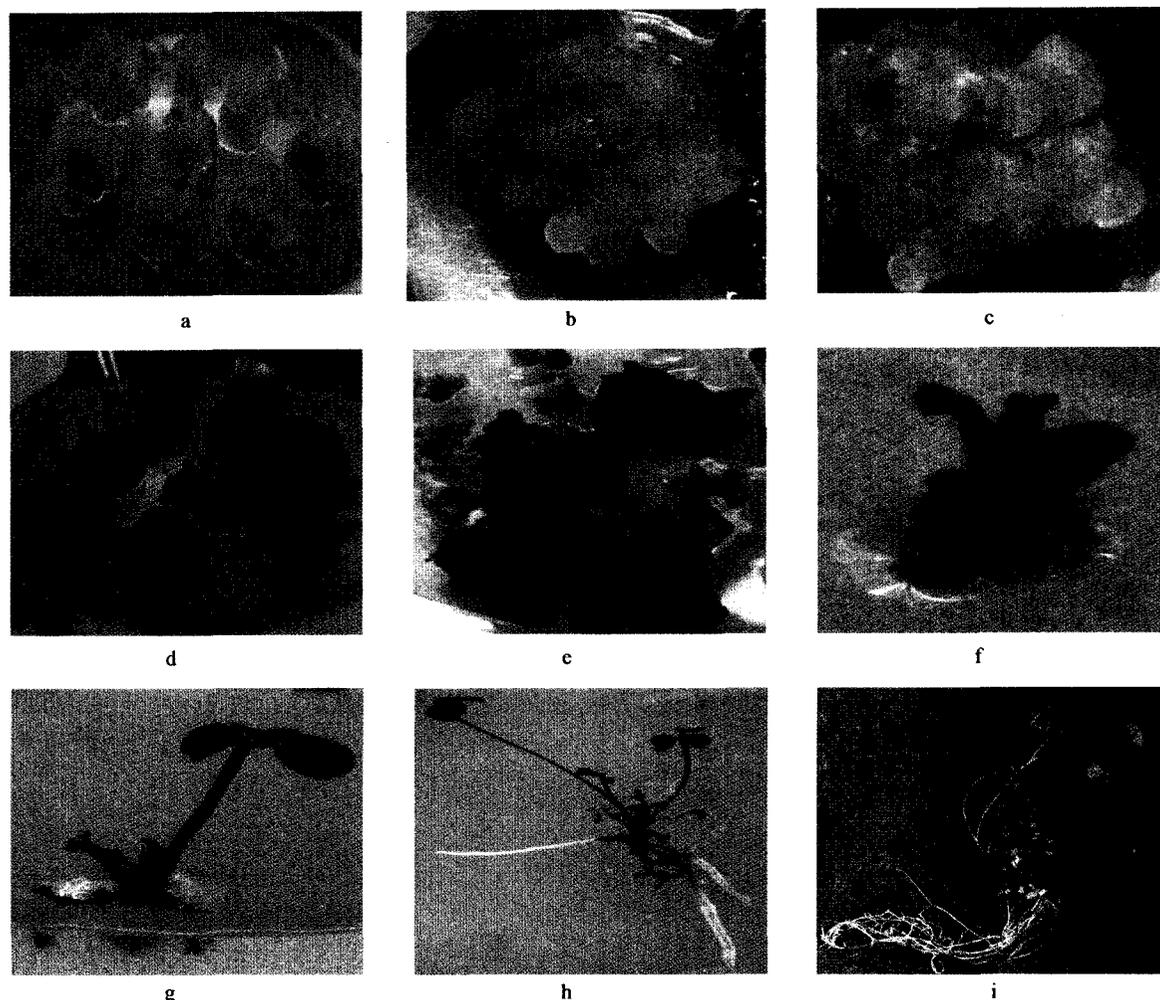
在胚状体诱导培养基上培养 30 d 后,一些胚状体已经分化成了小植株(见图 1-f, g),但是生长速度明显减慢.只有将这些成熟的胚状体和小植株转移到含有 15 g/L 蔗糖而不含生长激素的 1/2MS 培养基上之后,它们的生长才可以继续,并最终完成生根(见图 1-h, i).

也是多年来苜蓿转基因研究一直停滞在实验室而未能走向市场的症结所在.为此,有必要筛选出多种体细胞胚分化率较高的苜蓿品种,进一步完善受体再生系统,使该系统具备重复性强、操作简便、培养周期短、再生率高和遗传性稳定的特点^[18].

从我们的实验结果可以看出,愈伤组织的诱导是受外植体的类型影响的.子叶和下胚轴作为外植体都可以再生出植株,但是下胚轴比子叶具有更好的再生能力,因为其具有更短的愈伤组织诱导时间、更高的诱导率和更高的胚状体分化率,这与大部分研究者得到的结论相一致^[11,14];下胚轴是苜蓿组织培养首选的外植体.

3 讨论

作为基因转化的受体,苜蓿本身还存在着体细胞胚分化困难、分化率低、重复性差等问题.这些都制约了苜蓿转基因研究工作的进一步开展,



a, b:愈伤组织;c:胚性愈伤组织;d:成熟的胚状体;e:坚实的愈伤组织;f, g:小植株;h, i:再生的完整植株

图1 外植体再生过程中经历的不同阶段

实验中发现,20 d的愈伤组织培养时间是足够的.在含有2 mg/L 2,4-D和0.2 mg/L KT的改良SH培养基上,如果将愈伤组织放在培养基上培养的时间太长(多于40 d),它会变得很软,成为水性,以至于最后失去它原有的结构.这是因为愈伤组织的细胞吸收了太多的水.将这种吸收了过多水分的愈伤组织转移到分化培养基上后,很难分化出胚状体.

在植物组织培养中,外源的生长素和细胞分裂素是细胞离体培养所必需的激素.合适的浓度及两者之间适宜的配比,不但可以诱导细胞分裂和生长,而且还能控制细胞脱分化和形态建成^[15,19].在很多的实验中,2,4-D(质量浓度为1~3 mg/L)被用作牧草类植物进行组织培养时的生长素^[20-22].Kirsten(1993)也发现,当只有生长素而没有细胞分裂素存在的条件下,胚状体仍然能够发生,但是与KT存在的情况相比,分化率会明显下降^[23].越来越多的实验结果显示,低浓

度的细胞分裂素,能够提高愈伤组织的诱导率^[22,24-27].我们的研究也得到了类似的结果:在愈伤组织培养阶段,2,4-D起到了主要的作用,KT能辅助2,4-D发挥更好的效能;但是在胚状体诱导阶段,KT可以单独发挥作用,可不需要2,4-D.

在研究不同浓度的KT对胚状体诱导和成熟的影响时发现,0.2 mg/L是KT对胚状体诱导和成熟的最适浓度.高浓度的KT(0.4,0.6 mg/L)会显著降低胚状体的诱导率.在胚状体诱导阶段,愈伤组织逐渐呈现出绿色,形成胚性愈伤组织(见图1-b);随着进一步的培养,胚状体会从这些绿色的部分分化出来(见图1-c).在含有0.4 mg/L和0.6 mg/L KT的UM培养基上,愈伤组织在培养的初期与含有0.2 mg/L KT的UM培养基上的愈伤组织的状态相似,但是随着培养时间的延长,含有高浓度KT的UM培养基上的胚性愈伤组织会由于分裂的过快,导致愈伤组织过硬过大,

从而失去分化出胚状体的能力(见图 1-e). 这说明,KT 的浓度能影响胚状体的诱导,在 KT 质量浓度为 0.2 mg/L 时,可得到最大的诱导率,高浓度的 KT 会大大降低胚状体的诱导率.

通常情况下,水解酪蛋白的加入可以提高胚状体的产生和成熟^[8]. 在胚性愈伤组织诱导阶段,无论是否有水解酪蛋白的存在,UM 培养基上的愈伤组织明显比改良的 SH 培养基上的愈伤组织具有更高的胚性愈伤组织分化率,水解酪蛋白对于胚性愈伤组织的诱导并不起明显的作用. 但是在胚状体发育阶段,在不含水解酪蛋白的 UM 培养基和两种改良的 SH 培养基上,胚状体的分化率和成熟率都显著下降. 这说明水解酪蛋白对于胚性愈伤组织的诱导不是必须的,而对于胚状体的成熟却是不可缺少的. 从中也可以看出,UM 培养基比改良的 SH 培养基对胚性愈伤组织的诱导和胚状体的成熟具有更好的效果,水解酪蛋白的加入能显著提高胚状体的数量和质量,但是其作用只限于胚状体成熟阶段.

愈伤组织和胚状体的诱导对物质成分的需求是不同的,在愈伤组织诱导阶段,改良的 SH 培养

基优于 UM 培养基,但是在胚性愈伤组织和胚状体诱导、成熟阶段,含有 0.2 mg/L KT 和 2 g/L 水解酪蛋白的 UM 培养基要优于改良的 SH 培养基.

蔗糖的浓度显著影响胚状体的诱导和植株的再生^[8,28]. 高浓度蔗糖有助于愈伤组织和胚状体的诱导、成熟,但其对生根是不利的. 所以在愈伤组织和胚状体的诱导、成熟阶段,可使用 30 g/L 的蔗糖,但是在生根阶段,1/2 MS 培养基内应使用 15 g/L 的蔗糖.

关于苜蓿的再生,目前的研究认为,大部分再生过程都需要 3~5 个月^[15]. 但是在本实验中,整个再生过程大约需要 80 d 就可以完成. 将外植体放到含有 2 mg/L 2,4-D 和 0.2 mg/L KT 的改良 SH 培养基上诱导产生愈伤组织;培养 20 d 后,将诱导产生的愈伤组织转移到含有 0.2 mg/L KT 和 2 g/L 水解酪蛋白的 UM 培养基上,诱导产生胚状体;胚状体成熟以后(约 30 d),即可将胚状体移植到不含任何生长调节剂的 1/2 MS 培养基上,诱导生根,从而完成植株的再生.

[参 考 文 献]

- [1] SAUNDERS J M, CINGHAM E T. Production of alfalfa plants from tissue culture[J]. *Crop Sci*, 1972(12):804-809.
- [2] LUPOTTO E. The use of single somatic embryo culture in propagating and regeneration *Lucerne (Medicago sativa L)* [J]. *Ann Bot*, 1986, 57:19-24.
- [3] GALLEGO P, HITTA O, VILLALBOBS N, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration with *Medicago arborea L* [J]. *Plantlets In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2001, 37:199-203.
- [4] EHSANPOUR A A, FATAHIAN N. Effects of salt and praline on *Medicago sativa* callus [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73:53-56.
- [5] ANELIA IANTCHEVA, SLAVCHO SLAVOV. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 81:37-43.
- [6] PLAMEN D DENCHEV, ALEXANDER I KUKLIN, ATANAS I ATANASSOV, et al. Kinetic studies of embryo development and nutrient utilization in an alfalfa direct somatic embryogenic system [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 33:67-73.
- [7] DENCHEV P D, VELCHEVA M R, DRAGIJSKA R, et al. Somatic embryogenesis in *Medicago* [J]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 1990(4):66-70.
- [8] OSCAR HITTA, PIEDAD GALLEGO, NIEVES VILLALOBOS, et al. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 72:13-18.
- [9] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体胚发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000:1-29.
- [10] 李聪, 熊德部, 耿华珠. 苜蓿愈伤组织再生植株的研究 [J]. *中国草地*, 1989, 6(6):51-56.
- [11] 危晓薇, 蔡丽娟, 李仁敬. 紫花苜蓿组织培养及其再生植株 [J]. *新疆农业科学*, 1999(2):73-75.
- [12] 刘淑兰, 罗松, 王天原, 等. 苜蓿组织培养及不定根芽分化蛋白质的研究 [J]. *北京农业大学学报*, 1993 (7):35-39.
- [13] 刘明志. 大叶紫花苜蓿愈伤组织原生质体再生植株 [J]. *武汉植物学研究*, 1996, 14(4):329-333.
- [14] 舒文华, 耿华珠, 阎伦兴. 紫花苜蓿胚轴愈伤组织培养与植株再生 [J]. *草业科学*, 1993, 10(3):65-67.
- [15] 葛军, 刘振虎, 卢欣石. 紫花苜蓿再生体系研究进展 [J]. *中国草地*, 2004, 2(26):63-67.
- [16] MURASHIGE T, SHOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497.

- [17] SCHENK R V, HILDEBRANDT A C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture[J]. Can J Bot, 1972, 50: 199-204.
- [18] 李望丰, 吕德扬, 刘艳芝, 等. 诱导首蓿胚性愈伤组织分化和再生[J]. 吉林农业科学, 2002, 27(2): 15-19.
- [19] 刘海学, 王罡, 季静. 向日葵未成熟胚体细胞胚胎发生的研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2007, 39(1): 91-96.
- [20] R M BI, M KOU, L G CHEN, et al. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum* [J]. Plant Breeding, 2007, 126: 9-12.
- [21] BHASKARAN S, SMITH R H. Regeneration in cereal tissue culture[J]. Crop Sci, 1990, 30: 1328-1336.
- [22] CHAUDHURY A, QU R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 60: 113-120.
- [23] KIRSTEN FINSTAD, DANIEL C W BRON. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 34: 125-132.
- [24] ALTPETER F, POSSELT U K. Improved plant regeneration from cell suspensions of commercial cultivars, breeding- and inbred lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. Plant Physiol, 2000, 156: 790-796.
- [25] BAI Y, QU R. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) [J]. Plant Breeding, 2001, 120: 239-242.
- [26] 刘铁燕, 刘昕, 赵彩凤, 等. 东北红豆杉愈伤组织诱导及组织培养研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2002, 34(2): 67-71.
- [27] BRADLEY D E, BRUNEAU A H, QU R. Effect of cultivar, explant treatment, and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass[J]. Turfgrass Soc Res J, 2001a(9): 152-156.
- [28] ZHANG BH, LIU F, YAO C B. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton[J]. Plant Cell Tiss, Org Cult, 2000, 60: 89-94.

An effective method of embryo induction and regeneration in *Medicago sativa* L. cv. Baoding

WANG Yong-xin, GUAN Ning, LI Cong

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China)

Abstract: *Medicago sativa* L. cv. Baoding was used as material. The present study was included to identify the genotype of explant, the choice of media, endocrine and casein hydrolysate, petiole was better than cotyledon as explants. The improved SH medium was a better effective medium for the callus induction compared to UM medium. The maximal percent of the somatic embryo per callus was observed on UM medium with 0.2 mg/L KT and 2 g/L casein hydrolysate. Treatment with casein hydrolysate improved the quality and maturation of the embryo.

Keywords: alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Baoding); callus; somatic embryo; regeneration; rooting

(责任编辑:方林)