

# 苜蓿子叶节离体再生体系的建立

麻冬梅<sup>1</sup>, 王 静<sup>2</sup>, 金凤霞<sup>1</sup>, 郭林娜<sup>2</sup>, 许 兴<sup>1,2</sup>

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以苜蓿子叶节为外植体,以 MS 为基本培养基,研究了不同浓度激素对苜蓿离体再生体系中子叶节外植体分化、不定芽诱导、不定芽伸长及生根的影响,以期建立高效的苜蓿子叶节离体再生体系。结果表明:苜蓿子叶节再生最佳萌发培养基为 MS;最佳诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA,诱导时间为 7~10 d;不定芽伸长的最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA;最佳生根培养基为 1/2MS+0.1 mg/L IBA,15 d 即可生根。

**关键词:**苜蓿;子叶节;丛生芽;再生体系

**中图分类号:**S 541<sup>+</sup>.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)14-0104-03

苜蓿(*Medicago sativa*)为世界上分布最广的一种牧草,具有营养丰富、适口性好、蛋白质含量高和易于消化等特点,享有“牧草之王”的美誉<sup>[1]</sup>。作为世界上重要的牧草作物,随着草场的退化和耕地面积的日益减少,不断培育优质、高产、多抗的苜蓿新品种成为国内外苜蓿研究工作者关注的热点问题。就育种而言,除了传统的育种手段,结合基因工程技术来培育新品种能加速育种进程,更有效地选育出目标品种。而苜蓿组织培养是利用基因工程技术进行基因改良的基础,只有建立了稳定、高频的再生体系,才能构建较好的遗传转化体系,提高转化效率,获得转基因植株,进而获得改良新品种。

自豆科植物离体再生体系建立以来,在这方面已有许多研究,其中在大豆方面的研究颇多<sup>[2-5]</sup>,对建立良好的豆科基因转化受体系统、改良植物优良性状起到重要作用。目前,苜蓿离体再生体系研究还不完善。子叶节外植体具有易获得、再生时间短、再生过程简单等优点,是目前豆科组织培养器官发生途径中使用较多的一种外植体<sup>[6-7]</sup>。该研究利用苜蓿子叶节为外植体,使用不同浓度及配比的激素对苜蓿子叶节外植体再生过程中种子萌发、不定芽诱导、伸长和生根的影响进行观察,筛选出最适培养基,以期建立一种高效的苜蓿离体再生

体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为目前常见苜蓿栽培品种:“杰克林”、“阿尔冈金”、“金皇后 a”、“金皇后 b”、“皇后 2000”、“柏拉图”、“三得利”、“中苜 1 号”、“敖汉”和“陇东”,种子均由中国草业公司提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子预处理 选取 10 个品种的苜蓿种子,去掉致病发黑的种子,挑选干净完整健康的种子置于三角瓶中,先用流水冲洗 3~5 次,再次去掉漂浮在水上面的种子,再在 4℃下浸泡苜蓿种子 2 h。

1.2.2 无菌苗的培养 选取预处理后饱满的苜蓿种子,先用 75% 的酒精振荡灭菌 0.5~1 min,再用 0.1% 升汞振荡灭菌 10 min,最后用无菌蒸馏水冲洗 3~5 次,将无菌苜蓿种子接种到 MS 或 1/2MS 培养基上于 25℃ 3 000~4 000 lx 光照或暗培养 7 d,统计苜蓿种子出芽率,比较不同种子萌发培养基和培养条件对种子出芽率的影响。

1.2.3 不定芽的诱导培养 选择在种子萌发培养基上生长 7~8 d 的无菌苗子叶节为外植体,子叶节的切取方式是采用不分开 2 片子叶,去除 2 片子叶的 2/3 并保留 2 mm 下胚轴的方法,将切取好的子叶节外植体以下胚轴的形态学下端竖直向下插入到分别添加不同浓度的 6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)的 MS 培养基中,每种浓度设 10 次重复,每次重复接种 10 个外植体,预培养进行芽启动 7~10 d 诱导不定芽。10 d 后统计不定芽诱导率。

1.2.4 不定芽的伸长培养 在不定芽诱导培养基上培养 15 d 左右后,子叶节部位有大量丛生芽出现,将在不定芽诱导培养基中预培养后的含有大量丛生芽的子

**第一作者简介:**麻冬梅(1978-),女,宁夏银川人,博士,讲师,现主要从事植物抗逆分子生物学研究工作。E-mail:mdm319@tom.com.

**责任作者:**许兴(1959-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事作物逆境生理及生物技术育种等研究工作。

**基金项目:**国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2011BAC07B03);国家“973”资助项目(2012CB114204);宁夏农发办资助项目(NTKJ-2012-12)。

**收稿日期:**2013-03-07

叶节,转入到添加不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)配比的 6-BA MS 培养基上,每种浓度设 10 次重复,每次重复接种 10 个外植体,于 25℃光照培养继续伸长。15 d 后统计芽的分化状况并计算芽的分化率。

1.2.5 不定芽的生根培养 不定芽形成后,待不定芽长至 2~3 cm 高时,取生长良好的不定芽将其从外植体基部切下,接种到添加不同浓度的 IBA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)1/2MS 培养基上进行生根培养,每种浓度设 10 次重复,每次重复接种 10 个外植体,15 d 后统计不定芽的生根率。

1.2.6 再生植株的驯化移栽 在生根培养基中培养 15 d 后再生植株有大量不定根产生,待生根完全后,先打开瓶盖练苗 2~3 d,练苗期间每天添加蒸馏水于培养基上,练苗后待苗完全适应之后进行移栽。将无菌再生小苗用镊子取出,用流水小心冲洗去除根部培养基,放于提前灭好菌的土:营养土=1:1 的花盆中,应注意浇水保湿,置于 25℃,光照 16 h/d 的温室中生长。

### 1.3 项目测定

不定芽诱导率(%)=诱导出不定芽的外植体数/接种外植体总数×100%,不定芽分化率(%)=分化出芽的材料数/接种的材料数×100%,不定芽的生根率(%)=生根的不定芽数/接种的不定芽总数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同种子萌发培养基及培养条件对苜蓿种子出芽率的影响

接种 10 d 后可以清晰的看到子叶节处有大量绿色芽点出现。从表 1 可以看出,同一品种的苜蓿在相同的培养条件下,MS 培养基上的出芽率均高于 1/2MS 培养基,故 MS 为苜蓿种子最佳萌发培养基;同一瓶中苜蓿在同一培养基上,光照培养比暗培养更适宜苜蓿发芽获得无菌苗。10 个品种中,“金皇后 b”无论在光照或黑暗,MS 或 1/2MS 培养基上,其出芽率均为 100%。

表 1 不同种子萌发培养基及培养条件对苜蓿种子出芽率的影响

Table 1 Effect of different SGM and condition of culture on budding rate

品种 Name	MS 培养基出芽率/%		1/2MS 培养基出芽率/%	
	光照培养	暗培养	光照培养	暗培养
“杰克林”	100	95.0	100	90.0
“阿尔冈金”	100	100	100	70.0
“国产”	100	90.0	100	90.0
“金皇后 a”	100	90.0	100	95.0
“金皇后 b”	100	100	100	100
“皇后 2000”	100	90.0	85.0	80.0
“柏拉图”	100	100	100	90.0
“三得利”	100	100	100	97.5
“敖汉”	75.0	50.0	50.0	45.0
“陇东”	87.5	85.0	80.0	70.0

### 2.2 不同浓度 6-BA 对苜蓿不定芽诱导率的影响

将子叶节外植体在无菌条件下接入不定芽诱导培养基中培养 15 d 后,统计株高高于 2 cm 的苗数。由表 2 可以看出,在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时出芽率为 75%,明显高于其它浓度下的出芽率,所以不定芽诱导培养基确定为 MS+1.0 mg/L 6-BA。

表 2 不同浓度 6-BA 对苜蓿不定芽诱导率的影响

Table 2 Effect of different concentrations of 6-BA on adventitious bud induction

6-BA Benzyladenine /mg·L <sup>-1</sup>	出芽外植体数 No. of explants budding/个	接种外植体数 No. of explants inoculated/个	出芽率 Budding rate/%	诱导时间 Induction time/d
0.5	60	100	60	8
1.0	75	100	75	7
1.5	70	100	70	7
2.0	50	100	50	10

### 2.3 不同浓度 6-BA 对苜蓿不定芽伸长的影响

在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的不定芽诱导培养基上培养 15 d 后的子叶节外植体,如果继续添加 1.0 mg/L 6-BA 在培养基中继续伸长,不定芽脆弱易断,生长缓慢容易出现玻璃化现象。从表 3 可以看出,转接到含有 0.5 mg/L 6-BA 的不定芽伸长培养基上,不定芽分化率最高达 70%,不定芽生长健壮,无玻璃化现象,可促进不定芽生长。

表 3 不同浓度 6-BA 对苜蓿不定芽伸长的影响

Table 3 Effect of different concentrations of 6-BA on adventitious bud elongation

6-BA Benzyladenine /mg·L <sup>-1</sup>	出芽外植体数 No. of explants budding/个	接种外植体数 No. of explants inoculated/个	分化率 Differentiation rate/%
0.5	70	100	70
1.0	60	100	60
1.5	50	100	50
2.0	45	100	45

### 2.4 不同浓度 IBA 对苜蓿不定芽生根率的影响

苜蓿在不添加任何激素的培养基上就可以生根,但是为了提高生根率以及缩短生根时间,该试验将分化伸长的不定芽分别转入含有不同浓度 IBA 的 1/2MS 培养基上,结果发现,接种 15 d 左右有不定根长出。从表 4 可以看出,在 IBA 浓度为 1.0 mg/L 时生根率高达 90%,



图 1 苜蓿再生植株的大量须根

Fig. 1 The fibrous roots of the replanted alfalfa

生根所需时间也较短,容易产生大量须根(图 1);在 IBA 浓度为 2.0 mg/L 也可以生根,但是生根率明显下降为 70%,生根时间会有所推迟。因此在生根时选择在 MS 培养基中添加 1.0 mg/L IBA 提高再生植株的生根率。

表 4 不同浓度 IBA 对苜蓿不定芽生根率的影响

Table 4 Effect of different concentrations of IBA on adventitious bud rooting

IBA	出芽外植体数	接种外植体数	生根率	生根时间
Indole-3-Butyric acid/mg · L <sup>-1</sup>	No. of explants budding/个	No. of explants inoculated/个	Rooting rate/%	Rooting time/d
0.5	86	100	86	14
1.0	90	100	90	10
1.5	80	100	80	15
2.0	70	100	70	20

### 3 讨论

在植物的离体器官发生过程中,根据不同的培养条件,不定芽可以不经愈伤组织阶段从外植体上直接分化形成(直接器官发生)<sup>[8-10]</sup>,也可以从外植体脱分化形成的愈伤组织中发生(间接器官发生)<sup>[8]</sup>。该试验就是利用器官发生途径不经愈伤组织直接从子叶节外植体诱导不定芽的产生,再由这些不定芽发育成植株。6-BA 是豆科子叶节丛生芽分化试验的常用植物激素<sup>[11]</sup>,该试验分别采用 10 个苜蓿品种的子叶节作为外植体,根据多次反复的试验比较不同浓度 6-BA 对不定芽诱导及伸长产生的影响,通过器官发生途径建立了高效的苜蓿离体再生体系。筛选出再生能力很强的“金皇后 b”品种,以“金皇后 b”的子叶节作为外植体,在不定芽诱导培养基上添加 1.0 mg/L 6-BA 可以有效抑制顶芽的生长,促进不定芽的形成,而且促使子叶节处膨大,可以得到均匀切分的子叶节外植体,确保每个外植体都能产生不定芽。而在不定芽伸长培养基上将 6-BA 浓度减半有利于不定芽的伸长及健壮,不容易产生玻璃化现象,这与郑宝仁等<sup>[11]</sup>的报道基本一致。在生根培养基中添加 1.0 mg/L IBA 可以提高苜蓿的生根率及成活率,生根率

高达 90%。等到生根完全后,即可再生出完整的再生植株。虽然通过愈伤组织和器官发生途径均可以建立苜蓿再生体系,但通过器官发生途径采用外植体建立再生体系操作简单易行,再生周期明显比愈伤组织缩短,整个过程从种子萌发到驯化移栽仅需要 2 个月时间。

农杆菌介导的苜蓿转基因,一般会直接用外植体,如子叶、下胚轴、子叶节等作为转化受体,操作简单易行,适应性广,是目前应用最多的受体系统之一。该试验研究发现,该方法具有良好的稳定性和重复性,因此选择该方法作为苜蓿组织快繁和遗传转化的基本体系。

### 参考文献

- [1] 黄文惠,刘自学. 概论苜蓿的分布和发展[A]. 耿华珠. 中国苜蓿[M]. 北京:中国农业出版社,1995:2-7.
- [2] Kartha K K, Pahl K, Leung N L, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean[J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1671-1679.
- [3] Yoshida T. Adventitious shoot formation from hypocotyls sections of mature soybean seeds[J]. Breeding Science, 2002, 52: 1-8.
- [4] 潘川芝,李凤,戴良英. 大豆子叶节离体再生体系优化研究[J]. 湖南农业科学, 2006(5): 31-32, 36.
- [5] 张福丽,舒文涛,张怡. 大豆整体子叶节再生体系的建立及应用农杆菌介导遗传转化初探[J]. 大豆科学, 2012, 31(6): 865-868.
- [6] Di R, Purcell V, Collins G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Reports, 1996(15): 746-750.
- [7] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998(18): 180-186.
- [8] 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京:科学出版社,1995:64-70.
- [9] Gaba V, Schlarman E, Elman C, et al. *In vitro* studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons[J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 1999, 35(1): 1-7.
- [10] Colby S M, Juncosa A M, Stma P J A, et al. Developmental anatomy of direct shoot organogenesis from leaf petioles of *Vitis vinifera* (Vitaceae)[J]. Am J Bot, 1991, 78(2): 260-269.
- [11] 郑宝仁,王洪军,卢宝伟,等. 苜蓿子叶节离体培养体系的研究[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(10): 27-32.

## Establishment of Regeneration System *in vitro* from Cotyledonary Nodes of *Medicago sativa* L.

MA Dong-mei<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, JIN Feng-xia<sup>1</sup>, GUO Lin-na<sup>2</sup>, XU Xing<sup>1,2</sup>

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** Taking the cotyledonary nodes of *Medicago sativa* as explants and MS as the basic medium, the effect of different proportion of hormones on explants differentiation, adventitious bud induction, elongation and rooting were studied. The results showed that the optimum medium for alfalfa cotyledon node regeneration: germination medium was MS; the best induction medium was MS+1.0 mg/L 6-BA, with induction time 7 to 10 d; the best adventitious shoot elongation medium was MS+0.5 mg/L 6-BA; the best rooting medium was 1/2MS+0.1 mg/L IBA, root could be formed in 15 days.

**Key words:** *Medicago sativa* L.; cotyledonary node; adventitious shoot; regeneration system