

苜蓿(*Medicago sativa* L.)体胚发生 及成苗的研究*

I. 增加健康体胚数量及提高其成苗率

孙景欣 傅家瑞 黄学林 黄上志
(生物学系)

摘 要

盆栽苜蓿第三叶柄和无菌苗下胚轴在附加2,4-D及KT的B₅h固体培养基上均能诱导出较多胚性愈伤组织,再经附加2,4-D的B₅g液体培养基诱导,在加入L-脯氨酸、(NH₄)₂SO₄及KNO₃的液体培养基中摇床培养,则形成大量比较健康的体胚。用这类体胚接种于不含任何激素,但附加维生素C和干酵母粉,并用2%麦芽糖代替3%蔗糖的 $\frac{1}{2}$ SH固体培养基上,20天后,96%体胚长成完整的小苗。这些小苗移至盆栽,移植后14天,成活率达80%。

关键词 苜蓿,体胚发生,转化

1958年,Steward^[1]首次通过组织培养技术成功地培育出胡萝卜的体胚。七十年代初Murashige等^[2]就提出了利用体胚作为栽培植物一种繁殖体系的可能性,并在1977年正式提出了人工种子的概念。无法用种子繁殖的名贵的突变材料,生物工程植株和无病毒植株等都可通过此途径大量繁殖^[3,4]。Walker等^[5]、Stuart等^[6]先后研究了苜蓿的体胚发生及其影响因素;Redenbaugh^[7,8]等初步建立起苜蓿体胚大量诱导及同步化筛选技术。

但是,晋南苜蓿的体胚发生及其成苗的研究仅仅开始^[3]。本文着重研究增加苜蓿健康体胚发生的有效培养基,以及提高这类体胚成苗率的适宜条件,为晋南苜蓿人工种子的研究提供有关技术依据。

1 材料与方 法

晋南苜蓿种子(由山西省畜牧兽医科学研究所提供)为试验材料。

1.1 愈伤组织来源

愈伤组织由两个途径来源:①选用饱满的种子,播于盛有壤土的盆里上层,30天后,幼苗高11~13cm时,剪取其第三叶柄0.8~1cm切段作为外植体,以75%乙醇消毒5秒钟,继用7.5%(v/v)次氯酸钠溶液消毒5分钟,无菌水冲洗5次,在超净台里接入附

本文1991年1月4日收到

• 国家'863'高技术计划资助项目

加KT 0.1mg/L, 2,4-D 1mg/L的B₅h(Cecilio Gregario, 1986)琼脂固体培养基上。20天后, 可诱导出大量愈伤组织; ②选用饱满的种子, 经消毒(步骤、消毒液浓度等与盆栽叶柄同)后, 在无菌条件下接于无激素的1/2 SH(Gamborg, 村茂等, 1976)固体培养基上萌发。6~7天后, 从无菌苗下胚轴切取0.8~1cm切段作为外植体, 在超净台里接入附加KT 0.1mg/L, 2,4-D 1mg/L的B₅h琼脂固体培养基上, 20天后, 可诱导出大量的愈伤组织。

1.2 体胚诱导

在无菌条件下, 分别取上述两条途径获得的愈伤组织, 接种于已经高温高压消毒的内装25ml培养液的三角瓶中。培养液基本成分为B₅培养基, 附加2,4-D 1mg/L、NAA 0.1mg/L。接种材料在水平摇床上, 摇速为每分钟100次, 悬浮培养7天(诱导)。

1.3 体胚产生及发育

在超净台里(无菌条件下), 先以20目滤网过滤上述经悬浮培养的愈伤组织, 其滤液连同脱落在滤液里的培养物, 再以60目滤网过滤, 紧接着以无激素的SH培养液将滤网上的培养物(细胞或较小的细胞团)充分洗净后, 移至不加任何激素, 但附加L-脯氨酸2.7g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.22g/L及KNO₃ 1.25g/L的SH(Gamborg, 村茂等, 1976)液体培养基中, 培养材料在摇速每分钟100次的水平摇床上培养20天, 则出现大量各类型体胚。

1.4 体胚转化成再生小苗

挑选比较健康的子叶型体胚转移至不加任何激素, 但附加维生素C 0.3mg/L、干酵母粉2g/L, 并以2%麦芽糖代替3%蔗糖的1/2SH琼脂固体培养基上, 18至20天, 则获得完整的小植株。

愈伤组织诱导和体胚诱导、发生、发育以及体胚转化为完整小植株的培养室条件均为恒温25℃, 每日光照16h, 光强1400~1600Lux。

1.5 体胚转化成的小苗移至盆栽

将体胚转化成的小苗(苗龄30天)移至基质为塘泥、河沙、珍珠岩(1:1:1)的盆中, 放置于上述培养室里栽培。移植后14天, 统计其成活率。

2 结果与讨论

2.1 外植体来源对愈伤组织形态、质地及数量的影响

一般接种4~5天后, 肉眼可见外植体两端膨大, 一周后切口处形成明显的愈伤组织, 以后逐渐扩大到整个外植体。但是, 在愈伤组织的生长速度、形态、色泽及质地方面, 则因为外植体的来源不同而有明显的差异。从表1可以看出, 来源于无菌苗下胚轴的愈伤组织启动、生长都较快, 而来源于盆栽苗第三叶柄的相对较慢。从形态、色泽及质地看, 来源于无菌苗的细胞较大而松散, 颜色多数为淡黄绿色或乳白色, 容易褐化, 较快枯萎。而来源于盆栽苗的细胞较小, 质地软而紧密, 色泽鲜艳, 淡黄绿或浅绿色, 有生气, 不易褐化。因此, 来源于后者的愈伤组织易于悬浮培养。

表1 不同外植体对愈伤组织形状、大小、色泽、质地及数量的影响*

Tab. 1 The influences of different explant on shapes, sizes, colours, structure and yield of the callus

培养基	外植体	接种后天数 (天)						
		4	5	10	15	20	25	30
B ₅ h + KT0.2 + 2,4-D1 (单位: mg/L, 以下同)	无菌苗			△△	△△△	△△△△	△△△△	△△△△
	下胚轴	△	△	淡黄绿色, 少数乳白色	淡黄绿色, 细胞较大, 松散	浅黄绿色, 细胞大, 水分多, 松散	浅黄绿色, 大部分浅黄褐色, 细胞大, 松散	愈伤组织变褐而死
	盆栽苗			△△	△△	△△△	△△△△	△△△△
	第三叶柄	—	△	淡黄绿色	浅绿色, 细胞较小, 软而紧密	淡黄绿色, 有生气, 细胞小, 软而紧密	淡黄褐色, 少数浅黄绿色, 细胞小而紧密	大部分变褐色, 少数黄褐色, 细胞萎缩

● 每组处理为20瓶。△ 表示肉眼可见愈伤组织, △△ 切口处均出现愈伤组织, 外植体呈腰鼓形, △△△ 愈伤组织为外植体体积3倍以上, △△△△ 愈伤组织体积为外植体5倍以上

2.2 愈伤组织质地对形成健康体胚^[10]的影响

愈伤组织质地对形成健康体胚的数量有一定的影响, 从表2可以看出, 细胞小而均一、质地松软而紧密的愈伤组织, 诱导形成健康体胚的数量多。这可能与该类愈伤组织含胚性细胞较多有关。

表2 不同愈伤组织对健康体胚的影响*

Tab.2 Effects of the different the callus on healthy somatic embryo

代号	质地	未成体胚 (即细胞团)	球形	心形	鱼雷型	子叶型	备注
I	细胞大, 不均一, 松散	多	+++	++	++	+	形状不规则的多
II	细胞小, 均一, 松软而紧密	少	++	++	+++	+++	

● ① I 表示外植体来源于无菌苗下胚轴; II 表示外植体来源于盆栽苗 (苗龄4周) 的第三叶柄。
 ② 每个处理4瓶。每瓶培养液为25ml, 愈伤组织(过滤网后)鲜重0.5g。每个处理重复3次。
 ③ + 表示每瓶中体胚数量; + 50个以下; ++ 50~150个; +++ 150~250个; ++++ 250个以上

2.3 盆栽苜蓿叶柄所形成的愈伤组织及其诱导产生的体胚数量与播种季节的关系

6月底至7月下旬播种, 1个月后取其第三叶柄作外植体的, 21天后其愈伤组织淡绿色、细胞均匀、较小、很“健康”, 体积约为外植体的8倍。取其作悬浮材料, 以诱导体胚, 则产生体胚数量多。

8月中、下旬播种的, 植株虽然生长较快, 但从其取材所形成的愈伤组织松散、较易变成褐色、老化。

9月下旬至12月上旬播种的, 植株生长逐渐减慢, 从其取材形成的愈伤组织, 细胞较小而紧密, 但长到一定量时, 则部分出现浅黄褐色, 老化。

1月至3月播种的, 长得很慢, 较难控制取材时间, 形成体胚数量最少。

4月至5月播种的, 污染比较严重。

因此, 从周年播种试验来看(见表3), 以6月底至7月中旬播种, 取其叶柄为材料者为佳。

表3 播种季节对叶柄诱导产生体胚的影响

Tab. 3 Effects of different sowing seasons on the somatic embryos induced from petiole

外植体	培养基	1~3月	4~5月	6月底至7月下旬	8月中、下旬	9月下旬至12月上旬
盆栽苜蓿第三叶柄	B ₅ h + KT0.2 + 2.4-D1	淡绿色, 细胞较小。接种后20天, 体积仅为外植体的3倍。 ++	污染较重, 接种后7天约有1/4污染。愈伤组织浅绿色, 细胞较小, 胞间积液较多, 细胞粘连。 +++	淡绿色, 细胞较小、均一, 很健康, 接种后20天, 体积约为外植体的8倍。接种后22天, 仍保持浅黄绿色。 ++++	淡绿色, 细胞较大, 松散, 接种后20天约为外植体的8倍。但接种后18天, 则有约1/4出现浅黄褐色。 +++	浅绿色, 细胞较小而紧密, 较均匀, 接种后26天体积约为外植体的9倍。但接种16天后, 则有约1/3出现浅黄褐色。 +++

- ① +表示每瓶中体胚数量(与表2同);
- ② 每个季节接种10瓶, 上述体胚数量为10瓶的平均数。每瓶培养液为25ml, 愈伤组织(过滤网后)鲜重0.5g

2.4 附加物对健康体胚数量的影响

从表4看出, 胚性细胞或细胞团的形成, 所用的培养基里必须含有生长素类物质, 主要是2,4-D^[8,9,10]。NAA(萘乙酸)虽然有一些作用^[9], 但是, 细胞分裂素类物质, 如6BA(6-苄基氨基嘌呤)在本实验中不仅没有诱导作用, 而且对已完成诱导的(愈伤组织中)胚状体的发生还有抑制作用。这与Matsuoka和Hinata(1979年)以矮牵牛和茄子所作的实验结果是一致的。培养基中含有还原态的氮(NH₄⁺)是胚状体发生和健康体胚数量增加的重要条件之一。从表4又可明显地看出, 培养基中附加(NH₄)₂SO₄的组合, 不仅体胚总数最多, 而且鱼雷型和子叶型的数量亦增多, 畸形体胚数明显下降; 附加2,4-D和NAA的组合, 效果次之, 附加2,4-D、NAA和BA的组合, 无论从体胚总数及健康程度来看, 都不理想。在体胚产生和发育阶段加入KNO₃(1250mg/L),

从减少畸形体胚来看,效果很好。

表4 附加物对健康体胚数量的影响

Tab. 4 Effects of the additional substances of the medium on the number of the healthy somatic embryo

基本培养基	附加物(mg/L)	体胚总数(个)		球形		心形		鱼雷型		子叶型		畸形		统计瓶数
		个	%	个	%	个	%	个	%	个	%			
B ₅	2,4-D1+NAA0.1	1240	24	1.94	92	7.42	347	27.98	768	61.94	9	0.72	5	
	2,4-D1+NAA0.1 +BA0.2	318	54	16.98	48	15.09	51	16.04	134	42.14	31	9.75	5	
	2,4-D1+NAA0.1 +BA0.2 +(NH ₄) ₂ SO ₄ 1250	1381	22	1.59	95	6.88	233	16.87	1026	74.29	5	0.37	5	

注:① 每瓶培养液为25ml,愈伤组织(过滤网后)细胞或较小的细胞团,鲜重0.5g;
 ② 各类型体胚数量是在本表各处理诱导7天后,转入无激素而添加L-脯氨酸2.7g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.22g/L及KNO₃ 1250mg/L的SH培养液中摇床培养21天统计;
 ③ 从愈伤组织悬浮培养体胚统计共28天

2.5 2,4-D浓度对体胚数量和质量的影响

在愈伤组织进行体胚诱导阶段,2,4-D有显著的影响。图1所示:①2,4-D浓度在1~8 mg/L范围内,诱导体胚的数量随着浓度的增大而增多。但当浓度超过8mg/L时诱导体胚的数量则逐渐减少,这与叶克难和张兰英等的实验结果相似^[3,10];②2,4-D浓度在1~4 mg/L范围内,诱导健康体胚数量则随着浓度的增大而增加,但当浓度超过4 mg/L以后,健康体胚数量明显下降。

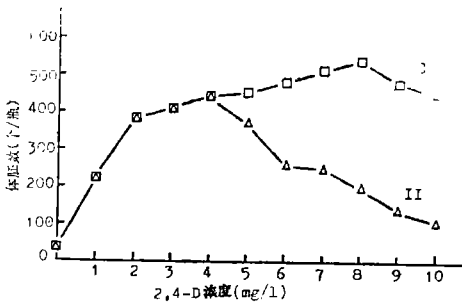


图1 2,4-D浓度对体胚发生的诱导作用
 Fig. 1 Induction of 2,4-D concentration on somatic embryogenesis
 I. 体胚总数量,
 II. 成熟健康体胚数量
 (每个处理4瓶,重复三次。图中体胚数为12瓶的平均值)

我们认为,这有可能由于2,4-D浓度过高而使愈伤组织失去分化成胚的能力,尤其是妨碍了健康体胚的形成及发育。

2.6 体胚转化成再生小植株

从表5中可看出,实验的三种基质均能使健康体胚再生为小苗。但是,以1/2SH加维生素C再加干酵母粉的组合为基质最好,其转化率高达96%。我们认为,这是因维生素C及干酵母粉促进体胚转化为小苗,同时能提供转化时所需的某些物质。

表5 维生素C和干酵母粉对成熟体胚转变成苗的作用
 Tab. 5 The influence of vitamin C and dried yeast on the transfer of the matura somatic embryo to plantlet

基 质	实验用体胚数量(个)	成苗数(株)	转化率(%)
二层湿滤纸	100	56	56
$\frac{1}{2}$ SH	100	90	90
$\frac{1}{2}$ SH+维生素C +干酵母粉	100	96	96

● 接种经过挑选的较健康的体胚, 接种8周后统计

2.7 体胚小苗移至盆栽

将体胚转化成的小苗(苗龄30天)移至盆栽。移植后14天, 成活率达80%。



图版 I 苜蓿体胚发生和成苗各阶段的照片

Plate I Somatic embryogenesis of alfalfa and the growth of their plantlets

1. 叶柄接种5天后, 切口处出现明显的愈伤组织;
2. 叶柄接种21天后, 愈伤组织增殖情况;
3. 经一次筛选的培养物(细胞或较小的细胞团), 摇床诱导培养20天所形成的大量体胚;
4. 经一次筛选后成熟胚的同步化程度;
5. 体胚转化成的小苗;
6. 健康体胚的成苗情况;
7. 体胚转化成的小植株移至盆栽2天的情况;
8. 小植株盆栽14天的情况;

参 考 文 献

- [1] Steward F C et al., *Amer. J. Bot.*, 45 (1958), 705~708
 [2] Murashige T, *Acta. Hort.*, 78 (1977), 17~30
 [3] 叶克难等, 中山大学学报(自然科学)论丛, 8(1989), 4, 81~90
 [4] 李宝健等, 人工种子(陈正华等主编), 高等教育出版社, 1990, 145~161
 [5] Walker K et al., *Plant Cell Tiss. Org Cult.*, 1 (1981), 109~121
 [6] stuart D et al., *Plant sci Lett.*, 34 (1984), 165~174
 [7] Redanbeugh K et al., *Proceedings of the V International Congress of Plant Cell and Tissue Culture*, 1987
 [8] 李宝健等, 人工种子(陈正华等主编), 高等教育出版社, 1990, 28~44
 [9] 周俊彦, 植物生理学报, 8 (1982), 1, 91~99
 [10] 张兰英等, 植物学报, 30 (1988), 2, 134~139

The Study on the Somatic Embryogenesis and Plantlet Formation of *Medicago sativa* L.

1. Increase of healthy somatic embryos and plantlet formation

Sun Jingxin* Fu Jiarui Huang Xuelin Huang Shangzhi

Abstract

Abundant embryogenic callus were induced when the third petioles of alfalfa plants grown in soil or hypocotyls of sterile alfalfa seedlings were cultured on solid B₅h medium with 2,4-D and KT. The callus were induced to form somatic embryos in liquid B₅g medium with 2,4-D. After subcultured in liquid B₅g medium with L-proline, (NH₄)₂SO₄ and KNO₃, a large number of healthy somatic embryos were obtained. Somatic embryos were cultured on solid 1/2 SH medium containing vitamin c and yeast extract with 2% maltose (substituted for 3% sucrose) and without addition hormone after incubating for 20 days, 96% of them developed into plantlets. 80% plantlets survived after transplanting to soil for 14 days.

Keywords: *Medicago sativa* L., somatic embryogenesis, transfer

* Department of Biology