

扁蓊豆体细胞胚的诱导和植株再生

黄美娟 黄绍兴 朱 澂

(北京大学生物系, 北京 100871)

摘 要

扁蓊豆实生苗的根、下胚轴、子叶、叶片和叶柄外植体, 在含 2,4-D $2-0.25\text{mg L}^{-1}$ 与 KT $0.25-2\text{mg L}^{-1}$ 及 2,4-D 0.5mg L^{-1} 与 ZT 0.5mg L^{-1} 或 BAP 0.5mg L^{-1} 与 NAA 0.05mg L^{-1} 的 MS 琼脂培养基上均可产生愈伤组织。愈伤组织在含 2,4-D $0.5-0.1\text{mg L}^{-1}$ 与 KT $0.5-0.1\text{mg L}^{-1}$ 或 BAP $0.25+\text{NAA } 0.05\text{mg L}^{-1}$ 的 MS 培养基上可诱导分化出体细胞胚。体细胞胚在无激素的培养基上发育成完整植株。用海藻酸钠包裹体细胞胚制成人工种子, 其发芽率和植株转换率分别为 95% 和 53%。

关键词: 扁蓊豆; 愈伤组织; 体细胞胚; 人工种子; 植株再生

扁蓊豆是一种豆科牧草, 蛋白质含量高, 既耐旱又耐盐碱。主要分布在我国西北和东北干旱和半干旱地区, 是适于干旱和砂地生长的一种优良牧草, 也是很好的经济环改作物。迄今为止, 有关扁蓊豆组织培养和植株再生的实验在国内外尚未见报道。本实验首次报道扁蓊豆组织培养和植株再生的研究, 并对其人工种子进行了初步研究。这一研究结果为扁蓊豆的大量繁殖提供了具有参考价值的基本资料。

材料和方法

植物材料 扁蓊豆 (*Melissitus ruthenica* L.)^{*} 种子由内蒙古大学生物系刘钟龄教授惠赠。

培养方法 将扁蓊豆种子表面消毒后, 播种在无激素的 1/2MS 琼脂培养基上萌发。取不同日龄无菌实生苗的根、下胚轴、子叶、叶片和叶柄 5 种外植体, 切成 3-4mm 的切段, 在附加不同激素和同种激素不同浓度配比的 MS 固体培养基上诱导愈伤组织和体细胞胚。将体细胞胚或芽转移到无激素的 1/2MS 琼脂培养基上再生完整植株。培养条件为 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 1000-2000Lux。

人工种子的制作和萌发 将体细胞胚从愈伤组织上取下, 以 1/2MS 培养基配制的海藻酸钠按我们过去的方法^[1]进行包埋, 以 1/2MS 液体培养基配制的 0.1mol/L CaCl_2 作为固化液。然后用无菌蒸馏水或 1/2MS 液体培养基对包埋的胶粒洗 3 次。所制作的人工种子在无激素的 4 种培养基上进行萌发试验, 这 4 种培养基是: MS 固体培养基、1/2MS 固体培养基、蛭石土 + 1/4MS 液体培养基及滤纸 + 蒸馏水。在常规条件下培养, 15 天后统计发芽率和植株转换率作为人工种子活力的参数。

结果和分析

一、不同激素组合对诱导扁蓊豆的根、下胚轴和子叶愈伤组织的影响

* 此学名现已改用 *Medicago ruthenica* (L.) Trautv. 编者注

扁蓊豆的根、下胚轴和子叶的切段,在含有生长素类和细胞分裂素类的琼脂培养基上均有较高的愈伤组织诱导率(表1)。以根、下胚轴和子叶为外植体,愈伤组织诱导频率分别为61%,84%,35%,以下胚轴的诱导率最高(图版I:1),而且下胚轴愈伤组织出现较早,生长也迅速。子叶愈伤组织出现较晚,生长缓慢、并容易变为黄褐色。就不同激素组合及同种激素不同浓度配比的诱导愈伤组织效应而言,以 0.5mg L^{-1} 2,4-D+ 0.5mg L^{-1} Zeatin的效果最好,这一激素组合对根和下胚轴的愈伤组织诱导率均为100%,子叶的诱导率为52%。2,4-D与KT的组合也产生较好的效果。以 0.25mg L^{-1} 2,4-D+ 0.5mg L^{-1} KT的配比最好,这一激素组合对根、下胚轴和子叶的愈伤组织诱导率分别为98%,100%和49%。

表1 不同激素组合对扁蓊豆实生苗的根、下胚轴和子叶外植体愈伤组织诱导率的影响
Table 1 Effects of different hormone combinations on the callus induction rate of root, hypocotyl and cotyledon explants from seedlings of *Melissitus ruthenica* L.

		根 Root			下胚轴 Hypocotyl			子叶 Cotyledon		
生长素类 Auxins (mg L^{-1})	细胞分裂素类 Cyto-kinins (mg L^{-1})	接种块数 No. of inoculation	出愈伤块数 No. of callus	诱导率 Induction rate (%)	接种块数 No. of inoculation	出愈伤块数 No. of callus	诱导率 Induction rate (%)	接种块数 No. of inoculation	出愈伤块数 No. of callus	诱导率 Induction rate (%)
2,4-D	KT									
2	0	54	5	9	68	39	57	57	12	21
2	0.25	70	48	69	180	180	100	150	36	24
1	0.25	245	144	59	446	394	88	360	163	45
0.5	0.5	248	182	73	281	261	93	428	187	44
0.25	0.5	94	92	98	122	122	100	185	90	49
0	2	50	0	0	50	4	8	150	5	3
	Zeatin									
0.5	0.5	80	80	100	175	175	100	130	68	52
NAA	BAP									
0.05	0.5	50	44	88	50	44	88	50	5	10
0	0	80	0	0	85	0	0	96	0	0
总	数	971	595	61	1457	1219	84	1606	566	35

基本培养基为MS培养基。不同外植体取自5-6日龄的实生苗

The basic medium was MS. Explants were cut from 5 to 6-day-old seedlings.

二、不同激素组合对扁蓊豆叶片及叶柄愈伤组织诱导的影响

取15-20日龄具2-4片真叶的小植株的叶片、叶柄、下胚轴和子叶切段,在含不同激素组合的MS培养基上诱导愈伤组织,结果列于表2。从表2可看出,扁蓊豆的叶片和叶柄在含生长素类和细胞分裂素类的培养基上均获得较高的愈伤组织诱导率。其中叶柄的愈伤细胞生长较快呈白色

疏松状态; 而叶片愈伤细胞出现较晚, 呈白色或淡褐色。

此外我们还观察到, 实生苗的日龄大小对下胚轴和子叶的愈伤组织诱导频率具有很大影响(表未列出), 尤其是对子叶, 15-20日龄的子叶愈伤组织诱导率为5-6日龄的2.8倍。但是, 子叶的愈伤细胞同样出现较晚, 部分切块容易变为黄褐色; 而下胚轴的愈伤细胞生长较快, 呈白色疏松状态。总之, 随着实生苗日龄的增大, 愈伤组织诱导率逐渐提高。

表2 不同激素组合对扁蓊豆的叶片和叶柄外植体愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of different hormone combinations on the callus induction rate of leaf and petiole explants of *Melissitus ruthenica* L.

生长素 Auxins (mg L ⁻¹)	细胞分裂素 Cytokinins (mg L ⁻¹)	叶 片 Leaf			叶 柄 Petiole		
		接种块数 No. of inocu- lation	出愈伤 块 数 No. of callus	诱导率 Induc- tion rate %	接种块数 No. of inocu- lation	出愈伤 块 数 No. of callus	诱导率 Induc- tion rate %
2,4-D	KT						
2	0.25	50	45	90	50	50	100
0.5	0.5	50	50	100	57	57	100
0.5	Zeatin 0.5	57	57	100	51	51	100
NAA 0.05	BAP 0.5	50	50	100	57	57	100
0	0	50	0	0	50	0	0

三、体细胞胚的诱导和植株再生

扁蓊豆的外植体在含3种不同激素组合的培养基上产生的愈伤组织, 在转移到同种或不同种激素配比的分化培养基时能诱导分化出较多的体细胞胚(表3)。从表3可以看出, 子叶的体细胞胚诱导率最高, 平均为7.8%; 其次为下胚轴, 平均为6.4%; 最低为根, 平均为2.3%, 这与愈伤组织诱导率正相反, 说明愈伤组织诱导率与体细胞胚诱导率之间并无直接联系。虽然子叶愈伤组织诱导的效果较差, 但其体细胞胚诱导率较高, 因此子叶是一种获得体细胞胚的很好的外植体来源。下胚轴的愈伤诱导率与体细胞胚诱导率均较高, 因而下胚轴也是一种较好的外植体。15-20日龄的下胚轴和子叶虽然愈伤组织诱导率较高, 但是, 其愈伤在转移到分化培养基后, 不产生体细胞胚; 或个别叶片或叶柄的愈伤组织在同样培养基中产生少量体细胞胚, 这说明外植体日龄及部位对体细胞胚的诱导也具有很大的影响。

外植体在诱导愈伤组织培养基上14-20d后, 转移到分化培养基上诱导体细胞胚胎发生。愈伤组织在分化培养基上7-14d后, 愈伤组织由白色疏松型逐渐变为鲜嫩的淡黄色的粒状光滑型的愈伤组织。由这种愈伤组织分化出绿色的体细胞胚(图版I: 2)部分体细胞为具2片子叶、下胚轴和胚根的小苗(图版I: 3)。这些体细胞胚在无激素的琼脂培养基上发育为完整植株(图版I: 4)。

表3 不同激素组合对扁蓿豆不同外植体诱导体细胞胚频率的影响

Table 3 Effects of different hormone combinations on the induction rate of somatic embryos in different explants of *Melissitus ruthenica* L.

诱导愈伤 组织激素 Hormones of inducing callus tissues (mg L ⁻¹)	诱导体细胞 胚激素的组合 Hormone combinations of inducing somatic embryos (mg L ⁻¹)	体细胞胚的诱导频率 Induction rate of somatic embryo (%)		
		根	下胚轴	子叶
		Root	Hypocotyl	Cotyledon
2,4-D 2	2,4-D 0.5	1.9	7.9	13.2
KT 0.25	KT 0.5			
CH 2000	NAA 0.05	0	6.7	5.0
	BAP 0.25			
2,4-D 0.5	2,4-D 0.5	0	8.5	0
	KT 0.5			
Zeatin 0.5	NAA 0.05	7.5	6.5	11.4
	BAP 0.25			
2,4-D 0.5	2,4-D 0.5			
KT 0.5	KT 0.5	2.0	2.3	9.4
CH 500	CH 500			

每个处理含 100-280 块愈伤组织。

Each treatment contained 100-280 callus tissues.

表4 海藻酸钠包制扁蓿豆体细胞胚的人工种子对发芽率和植株转换率的影响

Table 4 Effects of artificial seeds of somatic embryos of *Melissitus ruthenica* L. encapsulated with alginate on germination and plant conversion rates

	接种粒数 No. of inoculated seed	发芽粒数 No. of germinated seed	植株数 No. of plant	发芽率 Germination rate (%)	植株转换率 conversion rate (%)
未包裹的胚(对照) Uncoated embryos (Control)	110	110	66	100	60
人工种子(Artificial seeds)	100	100	51	100	51

四、用海藻酸钠包制扁蓿豆体细胞胚的人工种子对发芽率和植株转换率的影响

取愈伤组织上的成熟体细胞胚, 用海藻酸钠包埋制作人工种子(图 I: 4)。所制作的人工种子在无激素的固体培养基上萌发(图版 I: 5), 在常规条件下培养, 15 d 后统计发芽率和植株转换率。

从表 4 可以看出, 扁蓿豆体细胞胚经海藻酸钠包埋后, 仍有较高的活力。发芽率为 100%, 与未包裹的胚相一致。但是, 植株转换率较低, 仅为 51%。

讨 论

豆科牧草具有重要的经济意义。在几种重要的豆科牧草中, 红三叶草^[3, 7], 白三叶草^[6], 紫花苜蓿^[2, 8], 红豆草^[6]和百脉根^[4]等均已通过组织培养获得再生植株, 其中, 紫花苜蓿和百脉根还获得了转基因植株^[5, 9, 10]。扁蓿豆作为豆科牧草中的一种, 它的蛋白质含量高, 同时还适宜于干旱和沙地生长, 因而它不仅可以作为牲畜的优良饲料, 而且还可用于黄土高原和沙漠边缘的固沙绿化。随着畜牧业的发展和草原沙漠化的日益严重, 大量扩大扁蓿豆的种植面积具有重要意义。扁蓿豆体细胞胚诱导和植株再生体系的建立, 为扁蓿豆人工种子的研究及快速繁殖该草种提供了基础。

参 考 文 献

- 1 朱崧, 黄美娟等. 胡萝卜体细胞胚在人工种子制作中的分级分选. 植物学报, 1990; 32(11):871-877
- 2 黄绍兴, 吕德杨等. 紫花苜蓿原生质体转基因再生. 科学通报, 1991; 17:1345-1348
- 3 虞剑平, 邵启金. 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的百脉根 (*Lotus corniculatus* L.) 的转化. 中国科学 B 辑, 1990; 3:271-274
- 4 Ahuja P S, Hadiuzzaman S, Davey M R. An assessment of the cultural capabilities of *Trifolium repens* L. (white clover) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (Sainfoin) mesophyll protoplasts. Plant Cell Rep, 1983; 2:269-272
- 5 Ahuja P S, Hadiuzzaman S, Davey M R et al. Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (birds-foot trefoil). Plant Cell Rep, 1983; 2:101-104
- 6 Bingham E R, Hurley L V, Kaatz D M, et al. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop Sci, 1975; 15:719-721
- 7 Kuxhuk N, Komarnitski I, Shakgovsky A et al. Genetic transformation of *Medicago* species by *Agrobacterium tumefaciens* and electroporation of protoplasts. Plant Cell Rep, 1990; 8:660-663
- 8 McCoy T, Walder K. Alfalfa. In: Ammirato P V, Evans D A, Shap W R et al. (Eds) Handbook of Plant Cell Culture, Vol 3, New York, Crop Species, Macmillan, 1986: 171-192
- 9 Phillips G C, Collins G B. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci, 1979; 19:59-64[2]
- 10 Phillips G C, Collins G B, Red clover and other forage legumes. In: Sharp W R et al. (Eds) Handbook of Plant Cell Culture, Vol.2, New York; Crop Species, Macmillan, 1984: 169-210

INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS AND PLANT REGENERATION OF *MELISSITUS RUTHENICA* L.

Huang Meijuan Huang Shaoxing Zhu Cheng

(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

Abstract

Explants of root, hypocotyl, cotyledon, leaf and petiole from seedlings of *Melissitus ruthenica* L. could produce callus tissues when they were cultured on MS agar medium containing 2,4-D $2-0.25\text{mg L}^{-1}$ and KT $0.25-2\text{mg L}^{-1}$, or 2,4-D 0.5mg L^{-1} and ZT 0.5mg L^{-1} , or BAP 0.5mg L^{-1} and NAA 0.05mg L^{-1} . Callus tissues could be induced to differentiate somatic embryos when they were transferred to MS medium containing 2,4-D $0.5-0.1\text{mg L}^{-1}$ and KT $0.5-0.1\text{mg L}^{-1}$, or BAP 0.25mg L^{-1} and NAA 0.05mg L^{-1} . Somatic embryos could develop into whole plants on hormone free MS medium. Somatic embryos were encapsulated by 1.5% alginate to prepare artificial seeds, of which germination rate and plant conversion rate were 95% and 53%, respectively.

Key words: *Melissitus ruthenica* L.; Callus tissue; Somatic embryo; Artificial seed; Plant regeneration

图版说明

1. 扁蓿豆下胚轴的愈伤组织; 2. 扁蓿豆子叶愈伤组织产生的体细胞胚; 3. 具2片子叶的扁蓿豆体细胞胚;
4. 扁蓿豆体细胞胚再生的完整植株; 5. 刚制作的扁蓿豆人工种子; 6. 扁蓿豆人工种子在1/2MS培养基上萌发.

Explanation of plate

1. Callus tissues from hypocotyls of *Melissitus ruthenica* L.;
2. Somatic embryos produced from callus tissues of cotyledons of *M. ruthenica* L.;
3. Somatic embryos of *M. ruthenica* L. with two cotyledons;
4. Whole plants regenerated from somatic embryos of *M. ruthenica* L.;
5. Fresh artificial seeds of *M. ruthenica* L.;
6. Germination of artificial seeds of *M. ruthenica* L. on 1/2 MS medium.