

不同激素对比对矩镰荚苜蓿4种外植体愈伤组织诱导的影响

贾秀秀,李永强,刘艳,王霞,杨艳丽,方强恩*

(甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】筛选出矩镰荚苜蓿(*Medicago archiducis-nicolai*)最佳外植体及最佳再生条件。【方法】以矩镰荚苜蓿种子为材料,选择MS(含0.8%琼脂+3%蔗糖)为基本培养基,添加不同种类及浓度配比生长调节剂对矩镰荚苜蓿子叶、叶柄、茎、叶片进行诱导愈伤和愈伤再分化。【结果】外植体诱导率由高到低依次为:茎>叶柄>真叶>子叶,外植体褐化率由高到低依次为:茎<真叶<叶柄<子叶;在1.5 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖条件下最适合真叶诱导愈伤,诱导率为78%,褐化率为8%;1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖最适合子叶、叶柄、茎诱导愈伤,在此培养基中,茎的出愈率为96%,褐化率为0,叶柄的出愈率最高,为92%,褐化率为2%,子叶的出愈率为60%,褐化率为4%;在0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖条件下最适合子叶、叶柄诱导胚性愈伤;在0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖条件下最适合真叶诱导胚性愈伤;在0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖条件下最适合茎诱导胚性愈伤。【结论】4种外植体均产生愈伤组织,且进一步诱导愈伤组织可分化形成体细胞胚。4种外植体中,茎的愈伤诱导率最高,褐化率最低,为最佳外植体。

关键词:矩镰荚苜蓿;生长调节剂;外植体;诱导愈伤

中图分类号:S541 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)04-0173-09

DOI:10.13817/j.cnki.cyyep.2024.04.019



矩镰荚苜蓿(*Medicago archiducis-nicolai*)又称藏青胡卢巴^[1]、青藏扁蓿豆^[2],其叶多枝细,粗纤维含量少,蛋白含量高,营养丰富,能在高寒地区寒旱条件下自然越冬,抗旱、耐寒的优良性状突出^[3-4],具有丰富的抗性基因,是一种品质优良的多年生豆科牧草^[5-7]。但是,在自然状态下,矩镰荚苜蓿种子落粒性强,萌发率低,且种子难以收集,需要寻找一种高效的无性繁育手段来保存优良种质资源。

植物组织培养技术在短时间内能实现高效繁殖,且保持植物遗传特性不变,是一种经济有效的种质保存方法^[8]。植物组织培养最初的环节是外植体的选择^[9],供选择的外植体类型繁多,常见的外植体包括下胚轴、子叶、茎、叶片、花药等^[10]。其中,下胚轴因出愈时间短,诱导率高,被许多研究认为是组织培养的首选外植体类型^[11]。姜柳^[12]对下胚轴、根、子叶、叶片进行了愈伤组织诱导,发现下胚轴诱导效率最高。但是也有研究认为,叶柄在诱导胚性愈伤组织的过程中体细胞的发生率更高,分化成再生植株的能力更强^[13]。李进军等^[14]用苜蓿的下胚轴和子叶进行转基因再生试验,发现子叶转化率更高,下胚轴容易褐化死亡。总的来说,不同外植体在组织培养中会表现出差异,对于某一目标植物再生体系的建立,选择诱导力、分化力强的外植体是必要的。此外,在组织培养的实际

收稿日期:2022-11-03;**修回日期:**2023-03-23

基金资助:国家自然科学基金项目(32360341);甘肃省高校老师创新基金(2023A-49)

作者简介:贾秀秀(1998-),女,甘肃嘉峪关人,硕士研究生。E-mail:1432751759@qq.com

*通信作者。E-mail:fangqen@163.com

操作过程中,植物生长调节剂的种类、浓度和配比都会影响外植体的诱导效果^[15]。苏玉春等^[16]研究表明2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA是公农1号紫花苜蓿(*Medicago sativa* cv. Gongnong No. 1)最佳诱导愈伤激素浓度。谷蕊等^[17]研究表明1.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT是草原4号紫花苜蓿(*M. sativa* cv. Caoyuan No. 4)最佳诱导愈伤激素浓度。说明不同的苜蓿品种的最佳诱导愈伤条件也存在差异。因此,探究诱导愈伤和愈伤再分化的植物生长调节剂种类及浓度,对目标植物再生体系的建立具有非常重要的意义。

基于上述分析,本试验选取矩镰苜蓿的子叶、叶片、叶柄、茎为外植体,研究不同外植体诱导愈伤的最佳植物生长调节剂配比,观察不同外植体愈伤组织生长特性,并进行初步再分化试验,拟筛选出适合各个外植体诱导愈伤的最佳激素配比,为矩镰苜蓿组织培养体系建立和种质改良研究提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

野生矩镰苜蓿种子采自甘肃省武威市天祝藏族自治县祁连山禁牧草地。

1.2 培养基成分、制备以及培养条件

本试验培育无菌苗的培养基为1/2 MS培养基,

添加15 g/L蔗糖和8 g/L琼脂。诱导愈伤组织的基本培养基为MS培养基添加30 g/L蔗糖和8 g/L琼脂。将培养基pH值调到5.8,装入玻璃容器封口,在高压灭菌锅中121℃灭菌26 min,完成灭菌后取出放入超净工作台中,添加配置好的激素贮备液。

生长素2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA (1-Naphthaleneacetic acid, α -萘乙酸)使用少量95%的酒精完全溶解,蒸馏水定容。细胞分裂素6-BA (6-Benzylaminopurine, 6-苄基腺嘌呤)、KT (Kinetin, 激动素)使用少量1.0 mol/L NaOH溶液完全溶解,蒸馏水定容。将激素分别配制成1.0 mg/mL的贮备液,将贮备液置于超净工作台中,使用滤嘴进行过滤灭菌,灭菌后的贮备液于4℃保存。

1.3 外植体的准备

选出发育健康、色泽鲜亮、饱满的野生矩镰苜蓿种子。将挑选好的种子放入少量浓硫酸中浸泡15 min,冲洗干净,放入55℃无菌热水中浸泡6 h(热水自然冷却至室温),用无菌滤纸吸干种子表面水分,接种于1/2MS(含0.8%琼脂、3%蔗糖)固体培养基上,放置于恒温人工培养箱。培养条件:25℃,光照/黑暗(16 h/8 h)交替培养,光照强度2 000 lx。

选取无菌苗子叶、叶片、叶柄和茎(图1-A、1-B、1-C、1-D)做为外植体。

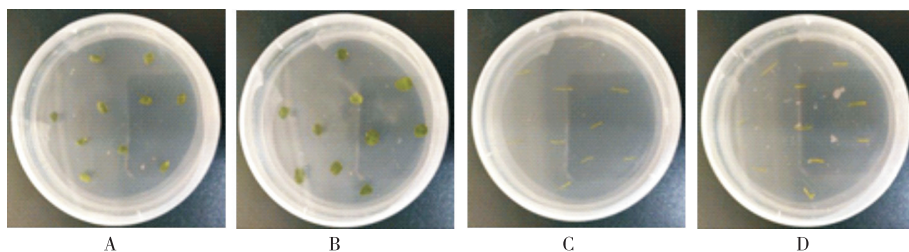


图1 矩镰苜蓿外植体

Fig. 2 The explants of *Medicago archiducis-nicolai*

注:A:子叶;B:真叶;C:叶柄;D:茎。

1.4 愈伤组织诱导

MS培养基无机盐含量高,无需添加更多的有机附加物质^[17],因此本试验选择了MS为基本培养基。并参照豆科牧草^[18-19]愈伤组织诱导常用的外源激素种类和激素浓度,选择2,4-D与6-BA、KT,将其两两配合使用,设置了不同浓度梯度,共设计了10种培养基(表1)。将准备好的子叶、叶片、叶柄、茎分别接种于10种培养基上,共40个处理,每个处理5个重复,每

个培养基接种10块外植体。放置于恒温人工培养箱。培养条件:25℃,黑暗培养。15 d继代1次(将外植体移入相同成分培养基上)。第30 d统计愈伤组织诱导率、褐化率。

诱导率(%) = 愈伤组织数/接种外植体数 × 100%

褐化率(%) = 褐化愈伤组织数/愈伤组织数 × 100%。

表 1 诱导愈伤组织培养基
Table 1 Callus induction medium

培养基编号	培养基成分
A1	MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT
A2	MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT
A3	MS+1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT
A4	MS+1.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT
A5	MS+1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT
A6	MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA
A7	MS+1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA
A8	MS+1.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L 6-BA
A9	MS+1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA
A10	MS+1.5 mg/L 2,4-D+3.0 mg/L 6-BA

1.5 愈伤组织再分化试验

将子叶、叶片、叶柄、茎的愈伤组织分别接种于表 2 所示培养基上,共 24 个处理,每个处理 3 个重复,每个培养基接种 5 块外植体。放置于恒温人工培养箱。培养条件:25℃,光暗 8 h 光/16 h 暗交替培养。20 d 继代 1 次(将外植体移入相同成分培养基上)。第 40 天统计胚性愈伤组织分化率、褐化率。

分化率(%)=胚性愈伤组织数/接种外植体数 $\times 100\%$

褐化率(%)=褐化愈伤组织数/接种愈伤组织数 $\times 100\%$ 。

表 2 分化培养基
Table 2 Differentiation medium

培养基编号	培养基成分
B1	MS+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA
B2	MS+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA
B3	MS+0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA
B4	MS+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L KT
B5	MS+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L KT
B6	MS+0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L KT

将子叶、叶片、叶柄、茎的愈伤组织分别接种于表 3 所示培养基上,共 16 个处理,每个处理 3 个重复,每个培养基接种 5 块外植体。放置于恒温人工培养箱。培养条件:25℃,8 h 光/16 h 暗交替培养。20 d 继代 1 次(将外植体移入相同成分培养基上)。第 40 d 统计不定芽分化率、胚性愈伤组织褐化率。

分化率(%)=胚性愈伤组织数/接种外植体数 $\times 100\%$

褐化率(%)=褐化胚性愈伤组织数/接种胚性愈伤组织数 $\times 100\%$ 。

表 3 生根培养基
Table 3 Rooting medium

培养基编号	培养基成分
C1	1/2MS
C2	1/2 MS++0.5 mg/L NAA
C3	1/2 MS+1.0 mg/L NAA
C4	1/2 MS 0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA

1.6 数据统计

Excel 统计数据,SPSS 22.0 统计软件对结果进行方差分析和 Duncan 多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同外植体愈伤组织的生长状况比较

将矩镰茛苳蓿的子叶、真叶、叶柄、茎接种于诱导培养基上,均可以产生愈伤组织,但是不同类型的外植体,愈伤组织的出愈时间和生长状况存在差异。子叶在接种在 A3:1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+MS 培养基上第 7 天开始产生白绿色愈伤组织,但是出现的愈伤组织较少,经过继代后,愈伤组织开始膨大,质地变的坚硬,部分愈伤组织呈向内卷曲状(图 2-A、图 2-B),也有部分组织褐化或是变干;真叶在接种在 A1:1.5 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT+MS 培养基上第 10 d 开始产生愈伤组织,随着时间推移,产生愈伤组织的部位不断膨大,质地松软,表面平滑无突起,部分愈伤组织呈扁平状(图 2-C、图 2-D),未产生愈伤组织的部位失绿发黄;叶柄接种在 A3:1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+MS 培养基上第 5 天,两端切口开始膨大,然后蔓延至整个外植体。叶柄产生的愈伤组织质地松软,含水量较高,微粘,部分愈伤组织一端开始膨大,另一端发黄,或出现两端膨大中间发黄的现象(图 2-E、图 2-F);茎在接种在 A3:1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+MS 培养基上第 3 d,外植体很快开始膨大形成愈伤组织,产生的愈伤组织呈浅黄色,有不规则凸起,表面呈颗粒状,结构致密(图 2-G、图 2-H)。

2.2 不同外植体愈伤组织诱导率、褐化率比较分析

统计 4 种外植体接种在 10 个培养基上(A1—A10)的全部愈伤组织诱导率和褐化率,数据分析表

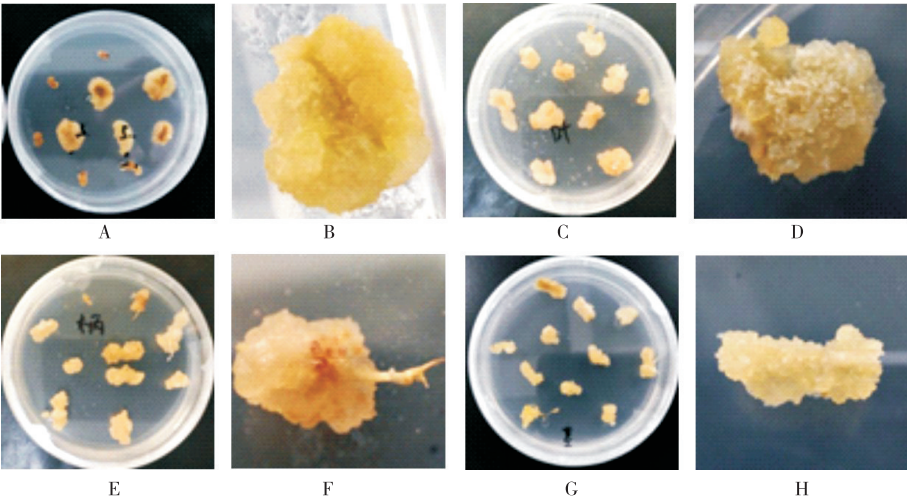


图2 矩镰荚苜蓿子叶、真叶、叶柄、茎的愈伤组织

Fig. 2 Callus from cotyledons, true leaves, petioles and stems of *Medicago archiducis-nicolai*

注: A、B: 子叶; C、D: 真叶; E、F: 叶柄; G、H: 茎。

明,矩镰荚苜蓿的子叶、真叶、叶柄、茎诱导愈伤组织的能力不同,4种外植体诱导率平均值分别为47.8%、53.2%、67.4%、70.8%,愈伤组织褐化率平均值为17.6%、7.6%、10.6%、1.04%(表4)。叶柄和茎的愈伤组织诱导率显著高于子叶和真叶($P<0.05$),茎的褐化率显著低于子叶、真叶、叶柄($P<0.05$)。因此茎在这4种外植体中,愈伤组织诱导效果最好,平均诱导率最高,褐化率最低。愈伤组织诱导率由高到低依次为:茎>叶柄>真叶>子叶。愈伤组织褐化率由低到高依次为:茎<真叶<叶柄<子叶。

表4 矩镰荚苜蓿不同外植体对愈伤组织诱导影响

Table 4 Effect of different explants on callus induction of *Medicago archiducis-nicolai*

外植体	接种外植体数/个	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织褐化率/%
子叶	500	47.8±2.89 ^a	17.6±2.15 ^c
真叶	500	53.2±3.54 ^a	7.6±1.36 ^b
叶柄	500	67.4±2.78 ^b	10.6±1.55 ^b
茎	500	70.8±3.24 ^b	1.04±0.19 ^a

注:同列不同小写字母数值间差异显著($P<0.05$),相同小写字母数值间差异不显著($P<0.05$),下同。

2.3 激素种类及浓度配比对不同外植体诱导愈伤的影响

在各激素配比下矩镰荚苜蓿的子叶、真叶、叶柄、茎均产生愈伤组织,激素浓度及种类对外植体愈伤组织的诱导均有影响。

对于子叶来说,A2、A3、A5培养基中愈伤组织诱

导率显著高于A6、A9($P<0.05$),其他培养基与A6、A9相比诱导率差异不显著($P>0.05$)(表5)。A3培养基中愈伤组织褐化率显著低于A9($P<0.05$),A9培养基愈伤组织褐化率与其他培养基差异不显著($P>0.05$)。在A3(1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT)培养基当中子叶诱导效果最好,是矩镰荚苜蓿子叶适宜的激素配比条件,出愈率较高,达到60%,褐化率最低,仅有4%(表6)。

真叶在A1培养基中愈伤组织诱导率显著高于A6、A7、A8、A9、A10($P<0.05$),A1培养基中真叶的褐化率与其他几种培养基相比差异不显著($P>0.05$)。A1(1.5 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT)是诱导矩镰荚苜蓿真叶愈伤组织的最佳培养基,在该培养基中愈伤诱导率为78%,褐化率为8%。

在A3培养基中,叶柄愈伤组织诱导率显著高于A1、A3、A4、A5、A7、A8、A9、A10($P<0.05$),叶柄愈伤组织在A3培养基中褐化率显著低于A6、A7、A9、A10($P<0.05$)。所以A3的培养基成分最适合叶柄愈伤组织的诱导,愈伤诱导率最高,达到92%,褐化率仅为2%。

茎在A1、A2、A3激素条件下诱导率高,显著高于除A4以外的其他培养基($P<0.05$),A1、A2、A3茎的愈伤组织褐化率显著低于A8、A9、A10($P<0.05$),A1、A2、A3对茎的愈伤组织都有较高的诱导率和较低的褐化率,相比之下,由于在A3条件下愈伤诱导率最高,达到96%,而且没有发生褐化,因此,A3的培养基

成分最适合茎愈伤组织的诱导。

综上所述,4 种外植体在 1.5 mg/L 2,4-D 配合 KT、6-BA 的诱导作用下,均产生了愈伤组织,KT 较 6-

BA 诱导出的愈伤组织更多,说明 KT 更适宜矩镰荚苜蓿愈伤组织的诱导,较低浓度的 KT 对子叶、真叶、叶柄、茎的愈伤组织诱导效果更好。

表 5 外源激素对矩镰荚苜蓿外植体愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of exogenous hormones on callus induction of *Medicago archiducis-nicolaicallus*

培养基	接种外植体数	子叶愈伤诱导率/%	真叶愈伤诱导率/%	叶柄愈伤诱导率/%	茎愈伤诱导率/%
A1	50	50±16 ^{ab}	78±23 ^f	90±10 ^{de}	96±5 ^e
A2	50	68±13 ^b	66±11 ^{def}	74±18 ^{cd}	92±4 ^e
A3	50	60±10 ^b	70±7 ^{ef}	92±8 ^e	96±5 ^e
A4	50	52±18 ^{ab}	70±23 ^{ef}	64±15 ^{bc}	86±21 ^{de}
A5	50	58±34 ^b	68±16 ^{ef}	66±5 ^{bc}	62±8 ^{bc}
A6	50	30±16 ^a	54±17 ^{cde}	80±16 ^{cde}	70±10 ^{cd}
A7	50	42±13 ^{ab}	44±15 ^{bcd}	64±11 ^{bc}	60±19 ^{bc}
A8	50	42±20 ^{ab}	40±22 ^{bc}	44±11 ^a	56±15 ^{abc}
A9	50	26±15 ^a	26±11 ^{ab}	50±14 ^{ab}	50±20 ^{ab}
A10	50	50±10 ^{ab}	16±9 ^a	50±12 ^{ab}	40±10 ^a

注:表中同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

表 6 外源激素对矩镰荚苜蓿愈伤组织褐化的影响

Table 6 Effect of exogenous hormones on browning of *Medicago archiducis-nicolai callus*

培养基	接种外植体数	子叶褐化率/%	真叶褐化率/%	叶柄褐化率/%	茎褐化率/%
A1	50	16±13 ^{ab}	8±8 ^{abc}	0±0 ^a	6±9 ^a
A2	50	12±16 ^{ab}	10±10 ^{abc}	6±5 ^{ab}	2±4 ^a
A3	50	4±5 ^a	4±5 ^{ab}	2±4 ^a	0±0 ^a
A4	50	16±17 ^{ab}	18±15 ^c	2±4 ^a	12±16 ^{ab}
A5	50	18±8 ^{ab}	16±11 ^{bc}	10±10 ^{ab}	8±13 ^{ab}
A6	50	10±0 ^{ab}	2±4 ^a	24±5 ^d	2±4 ^a
A7	50	16±18 ^{ab}	6±9 ^{abc}	22±13 ^{cd}	2±4 ^a
A8	50	16±5 ^{ab}	2±4 ^a	4±5 ^a	20±16 ^{bc}
A9	50	24±17 ^b	2±4 ^a	14±9 ^{bc}	32±8 ^c
A10	50	44±9 ^c	8±8 ^{abc}	22±4 ^{cd}	20±7 ^{bc}

2.4 激素种类及浓度配比对不同外植体愈伤组织再分化的影响

将前期诱导出的愈伤组织转移到再分化培养基中诱导 40 d,结果显示,4 种外植体均分化出胚性愈伤组织。其中叶柄胚性愈伤组织在 MS+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA 培养条件下分化出了不定芽,真叶愈伤组织在 MS+0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 培养条件下分化出了不定芽,其余胚性愈伤组织都未分化出不定芽和不定根。

在不同激素种类及其浓度配比条件下,子叶和叶柄胚性愈伤组织在 B6(0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L KT)培养基中分化率最高,分别为 60%,80%(表 7),褐化率低于其他培养基(表 8),可见 B6 是诱导矩镰荚苜蓿子叶和叶柄胚性愈伤组织的最佳培养基;真叶胚性愈伤组织在 B3(0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA)培养基中分化率显著高于 B1、B2、B4、B5(表 7)($P<0.05$),褐化率显著低于 B1、B2、B4、B5、B6(表 8)($P<0.05$),可见 B3 是诱导矩镰荚苜蓿子叶胚性愈伤组织

的最佳培养基;茎胚性愈伤组织在 B5(0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L KT)培养基条件下平均分化率最高,褐化率最低,分别为 75.56%,24.44%。

将胚性愈伤组织转入生根培养基中,在 1/2 MS+1.0 mg/L NAA 培养基条件下叶柄和茎的胚性愈伤组织产生不定芽;在未添加激素的 1/2 MS 培养

基中叶柄的胚性愈伤组织产生了不定芽,真叶的胚性愈伤产生了不定根;在 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IAA 培养基中,茎的胚性愈伤产生了不定芽;但不定芽和不定根的分化率极低。其余胚性愈伤组织在生根培养基中不再进一步发生分化,或褐化坏死。

表 7 外源激素对矩镰荚苜蓿胚性愈伤组织分化的影响
Table 7 Effects of exogenous hormones on embryogenic callus differentiation of *Medicago archiducis-nicolai*

培养基	接种愈伤组织数	子叶分化率/%	真叶分化率/%	叶柄分化率/%	茎分化率/%
B1	50	47±7 ^{bc}	9.33±4 ^a	35.11±10 ^{ab}	44.44±4 ^{ab}
B2	50	30±4 ^{ab}	25.24±5 ^{ab}	58.57±7 ^{bc}	61.67±12 ^{ab}
B3	50	32±7 ^{ab}	52±11 ^c	56.76±8 ^{abc}	67.26±15 ^{ab}
B4	50	26±5 ^a	4.86±3 ^a	32.54±6 ^a	40±10 ^a
B5	50	36±6 ^{ab}	25.24±7 ^{ab}	39.36±8 ^{ab}	75.56±7 ^b
B6	50	60±6 ^c	35.71±7 ^{bc}	80±9 ^c	71.07±9 ^{ab}

表 8 外源激素对矩镰荚苜蓿胚性愈伤组织褐化的影响
Tab. 8 Effects of exogenous hormones on the browning of embryogenic calli of *Medicago archiducis-nicolai*

培养基	接种愈伤组织数	子叶褐化率/%	真叶褐化率/%	叶柄褐化率/%	茎褐化率/%
B1	50	51±7 ^{abc}	70±10 ^{bc}	64.81±10 ^{cd}	55.56±4 ^b
B2	50	35.43±7 ^{ab}	67.43±6 ^{bc}	35.72±6 ^{ab}	25±2 ^a
B3	50	58±12 ^{bc}	30±8 ^a	42.07±8 ^{bc}	28.57±10 ^a
B4	50	72±7 ^c	89.81±3 ^c	67.46±6 ^d	56.67±14 ^b
B5	50	30±8 ^a	74.76±7 ^{bc}	61.11±11 ^{cd}	24.44±7 ^a
B6	50	32±8 ^{ab}	56.29±10 ^b	13.33±4 ^a	28.93±16 ^a

3 讨论

3.1 外植体类型对矩镰荚苜蓿诱导愈伤的影响

外植体的选择是组织培养试验能否成功的关键。研究表明,苜蓿几乎所有器官或组织均可作为外植体^[20],但不同器官和部位之间的生理状态和再生能力存在差别,这显著影响着供试材料愈伤组织的形成和发育^[21],如熊丽丽^[22]、孙艳香等^[23]对紫花苜蓿愈伤组织的诱导试验,结果均发现在相同培养条件下,苜蓿叶片、根、子叶、下胚轴愈伤组织诱导率差异显著,这与本试验研究结果一致。本试验选取矩镰荚苜蓿的茎、叶柄、叶片、子叶为外植体,在相同的培养基及培养条件下诱导愈伤组织,发现茎、叶柄、真叶、子叶平均出愈率不同,分别为 70.8%、67.4%、53.2%、

47.8%,茎和叶柄的愈伤组织诱导能力优于叶片和子叶。赵晓倩等^[24]诱导甘农 4 号紫花苜蓿(*M. sativa* cv. Gannong No. 4)愈伤组织,以及王立爽等^[25]诱导龙牧 806 紫花苜蓿(*M. sativa* cv. Longmu No. 806)愈伤组织,都获得了与本研究相似的结果。吴丽芳等^[26]对盛世紫花苜蓿(*M. sativa* cv. Shengshi)的愈伤组织诱导试验,结果却发现子叶诱导效果优于叶柄和叶片,这说明种质、基因型不同也是影响愈伤组织诱导效果差异的重要原因。

3.2 激素对比对矩镰荚苜蓿诱导愈伤的影响

植物生长调节剂种类及其浓度均显著影响供试材料愈伤组织的诱导^[27]。诱导愈伤组织最常用的植物激素有两类,一类是生长素,常见的有 2,4-D、NAA,一类是细胞分裂素 KT、6-BA^[28]。2,4-D 能诱

导愈伤组织生长,6-BA和KT能促进细胞分裂、诱导植物组织分化,6-BA与KT作用相似但活性高于KT^[29]。只添加2,4-D诱导效果较差,若在添加2,4-D的基础上,再配合细胞分裂素的使用,愈伤组织会出现加倍的诱导效果,且愈伤组织生长状况会更好^[30]。

在苜蓿愈伤组织诱导过程中,对KT、6-BA两种激素的看法褒贬不一。李顺^[31]使用2,4-D配合KT、6-BA诱导54Q53紫花苜蓿愈伤组织,发现6-BA较KT更适宜愈伤组织的诱导。姜柳^[12]比较了2,4-D配合6-BA和KT诱导龙牧806紫花苜蓿品种愈伤组织形成的效果,结果显示2.0 mg/L 2,4-D配合0.25 mg/L KT可以获得更多愈伤组织。李玉珠等^[32]研究了2,4-D配合6-BA或KT不同浓度对比对9个苜蓿品种(Spred 3、皇冠、维多利亚、阿尔冈金、Landmark、雷达克之星、CW787、甘农3号、甘农4号)下胚轴诱导的影响,结果表明在含KT的处理中各品种愈伤组织较含6-BA的处理中愈伤组织质地偏硬,认为6-BA更适宜诱导愈伤组织。张彦艳^[33]研究认为KT对扁蓿豆(*Medicago ruthenica*)愈伤组织诱导率不高,但在诱导培养基中添加KT可以改善愈伤组织的质量,而6-BA是一种活性较强的细胞分裂素,在愈伤组织形成过程中起主导作用。在参考以往研究文献的基础上,本试验将KT、6-BA分别设置5个浓度处理,配合1.5 mg/L 2,4-D诱导愈伤组织,结果发现KT较6-BA更适合诱导矩镰荚苜蓿的愈伤组织,主要表现为KT诱导出的愈伤组织出愈率高,褐化率低。

在苜蓿再生体系建立的过程中,激素水平对愈伤组织的出现也起到关键性作用^[34]。在苜蓿诱导愈伤的过程中最常用的生长素为2,4-D,其浓度一般控制在1.0~4.0 mg/L。而细胞分裂素浓度在0.1~0.5 mg/L之间,愈伤率较高且愈伤组织长势较好^[35-36]。靳慧卿^[21]诱导6种豆科牧草的不同外植体发现高浓度的细胞分裂素反而会降低愈伤组织诱导率,本试验也得到相似结果,随着KT浓度的升高,愈伤组织的诱导率反而会降低,且KT浓度在0.1~1.0 mg/L效果最好。

将矩镰荚苜蓿4种外植体的愈伤组织分别接入再分化培养基当中,愈伤组织再分化为绿色的胚性愈伤组织,没有诱导出预期的不定芽或不定根,将胚性愈

伤组织移入培养基当中,有不定芽和不定根的分化。矩镰荚苜蓿的真叶、叶柄、茎在本试验设计的培养基条件下,存在一定的再分化作用,但分化率极低,可以进一步细化激素种类组合、培养基蔗糖含量、有机添加物、培养条件优化等进行进一步的再生分化试验^[37-38]。

4 结论

矩镰荚苜蓿子叶、真叶、叶柄、茎均可产生愈伤组织,但是不同类型外植体愈伤组织的诱导能力存在差异。4种外植体中,愈伤组织诱导率由高到低依次为:茎>叶柄>真叶>子叶,愈伤组织褐化率由低到高依次为:茎<真叶<叶柄<子叶,茎的愈伤组织诱导效果最好。茎和子叶、叶柄的最优愈伤诱导培养基为1.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖,真叶的最优愈伤诱导培养基为1.5 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖。子叶、叶柄的最优胚性愈伤组织诱导培养基为0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖,真叶的最优胚性愈伤组织诱导培养基为0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖,茎的最优胚性愈伤组织诱导培养基为0.3 mg/L NAA+mg/L KT+MS+0.8%琼脂+3%蔗糖。叶柄的胚性愈伤组织在1/2MS+1.0 mg/L NAA和未添加激素的1/2MS培养基培养基条件下产生了不定芽,茎的胚性愈伤在1/2MS+1.0 mg/L NAA和1/2MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IAA培养基中产生了不定芽,真叶的胚性愈伤在未添加激素的1/2MS培养基中产生了不定根。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物专编辑委员会. 中国植物志(第42卷第2分册)[M]. 北京:科学出版社,1998:317-321.
- [2] 黄迎新,周道玮,岳秀泉,等. 扁蓿豆研究进展[J]. 草业科学,2007,74(12):34-39.
- [3] 魏甲科,杨小霞,方强恩. 切段长度、种植深度和覆草对矩镰荚苜蓿根茎出芽和成苗生长的影响[J]. 草原与草坪,2022,42(4):31-38.
- [4] Vir R, Kumar V, Akagi H, et al. Role of plant tissue culture in improvement of horticultural crops[J]. Annals of Horticulture, 2021, 14(1):1-6.

- [5] Xiaopei W, Demei L, GulzarK, *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Medicago ruthenica* (Fabaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau based on nuclear ITS and chloroplast markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 69: 204-212.
- [6] 颜家全, 魏甲科, 齐帅, 等. 切段长度、种植深度和覆草厚度对矩镰芡苜蓿地下茎扩展能力的影响[J]. *草原与草坪*, 2021, 41(5): 139-147.
- [7] 王俊杰. 中国黄花苜蓿野生种质资源研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [8] Bijalwan P, Shilpa, Ashmore S E, *et al.* Plant tissue culture -A new tool for vegetable improvement (Indian scenario): A review[J]. *Agricultural Reviews*, 2021, 42(2).
- [9] 唐链, 田爽琪. 植物组织培养技术的应用进展[J]. *现代园艺*, 2022, 45(18): 24-26.
- [10] 侯永霞, 王俊杰, 赵彦, 等. 野生黄花苜蓿组织培养及再生体系研究[J]. *草地学报*, 2012, 20(3): 524-529.
- [11] 赵骄阳, 李小艳, 朱慧森, 等. 偏关苜蓿种子萌发及植株再生体系优化[J]. *草地学报*, 2020, 28(4): 947-955.
- [12] 姜柳. 紫花苜蓿植株再生体系的建立[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [13] 史毅, 马晕玲. 三个苜蓿品种植株高频再生体系的研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2014, 49(2): 125-132.
- [14] 李进军. 紫花苜蓿转基因体系的建立及转柠檬酸合酶基因对其细胞耐铝性的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [15] Orouzi O, Hesami M, Pepe M, *et al.* In vitro plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. [J] *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 1-11.
- [16] 苏玉春, 韩微微, 陈光. 紫花苜蓿组织培养再生体系的建立[J]. *中国草地学报*, 2008, (2): 43-46+53.
- [17] 董文科. 农杆菌介导的BAN基因在紫花苜蓿中的转化和表达的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [18] 谷蕊, 苏德毕力格, 徐舶, 等. 草原4号紫花苜蓿两种再生分化途径的建立和比较[J]. *中国草地学报*, 2022, 44(5): 114-120.
- [19] 侯永霞. 黄花苜蓿组织培养再生体系建立及品质改良转基因研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [20] 刘芳, 王玉祥, 陈爱萍, 等. 新疆野生黄花苜蓿愈伤诱导及分化的研究[J]. *草地学报*, 2012, 20(4): 741-746.
- [21] 靳慧卿, 米福贵, 闫利军, 等. 不同外植体及植物生长调节剂对几种豆科牧草体细胞胚诱导的影响[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(12): 2169-2174.
- [22] 熊丽丽, 李萍, 杨国柱, 等. 青大1号紫花苜蓿愈伤组织的诱导[J]. *青海大学学报*, 2018, 36(1): 28-33+53.
- [23] 孙艳香, 杨红梅, 尹军, 等. 紫花苜蓿高频体细胞胚与次生胚再生体系的建立[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2007(4): 1-6.
- [24] 赵晓倩. 甘农四号紫花苜蓿愈伤组织诱导研究[J]. *甘肃联合大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(5): 61-63.
- [25] 王立爽, 孟令媛, 王沛奎, 等. 不同激素对比对紫花苜蓿幼苗4种外植体愈伤组织诱导效果的影响[J]. *高师理科学刊*, 2020, 40(1): 51-53+76.
- [26] 吴丽芳, 丁伟. 不同激素对比对紫花苜蓿不同外植体愈伤组织诱导的影响[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(2): 620-621+628.
- [27] 赵丽君, 王雪芳, 张金林, 等. 植物组织培养及其在草类植物中的研究和应用[J]. *草业科学*, 2011, 28(6): 1140-1148.
- [28] 张彦艳, 王照兰, 刘国栋, 等. 扁蓿豆愈伤组织诱导和分化条件的研究[J]. *中国草地学报*, 2009, 31(4): 74-79.
- [29] 谷蕊, 苏德毕力格, 徐舶, 等. 草原4号紫花苜蓿两种再生分化途径的建立和比较[J]. *中国草地学报*, 2022, 44(5): 114-120.
- [30] 刘青青. 紫花苜蓿NFF2高效组织培养再生体系的建立[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [31] 李顺, 王国良, 贾春林, 等. 54Q53紫花苜蓿愈伤组织诱导及再生初探[J]. *草业科学*, 2011, 28(5): 763-768.
- [32] 李玉珠, 李巧璐, 范艳红, 等. 苜蓿下胚轴愈伤组织诱导和体细胞胚的发生与观察[J]. *中国草地学报*, 2014, 36(6): 97-102.
- [33] 张彦艳. 扁蓿豆新品系组培快繁、种子产量构成因子及施肥效应研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [34] 许来俊, 王成章, 严学兵, 等. 苜蓿植株再生体系研究进展[J]. *草业科学*, 2012, 29(8): 1294-1301.
- [35] 赵骄阳, 李小艳, 朱慧森, 等. 偏关苜蓿种子萌发及植株再生体系优化[J]. *草地学报*, 2020, 28(4): 947-955.
- [36] 靳慧卿. 豆科牧草体细胞胚再生体系构建及其差异性比较研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.

Effects of different hormone ratios on callus induction of four explants of *Medicago archiducis-nicolai*

JIA Xiu-xiu, LI Yong-qiang, LIU Yan, WANG Xia, YANG Yan-li, FANG Qiang-en*
(College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou, 730070, China)

Abstract: 【Objective】 To identify the optimal regeneration conditions for different explants of *Medicago archiducis-nicolai*. 【Method】 Seeds of *M. archiducis-nicolai* were used as the starting materials. MS medium (0.8% agar+3% sucrose) was selected as the basic medium for the experiment. Callus induction and redifferentiation were tested on cotyledons, petioles, stems and leaves using various types and concentrations of growth regulators. 【Result】 The induction rate of explants, from highest to lowest was as follows: stem>petiole>leaf>cotyledon. The browning rate of explants, from highest to lowest was as follows: stem<leaf<petiole<cotyledon. The most suitable condition for callus induction in true leaves was 1.5 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT+MS+0.8% agar+3% sucrose, with the induction rate of 78% and the browning rate of 8%. The best condition for callus induction in cotyledons, petiole and stem was 1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+MS+0.8% agar+3% sucrose, with the stem showing the highest callus rate at 96% and no browning, petioles with a callus rate of 92% and a browning rate of 2%, and cotyledons with a callus rate of 60% and a browning rate of 4%. The condition of 0.3 mg/L NAA+mg/L KT+MS+0.8% agar+3% sucrose was the most suitable for inducing embryogenic callus from cotyledons and petioles. For true leaves, the best condition was 0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+MS+0.8% agar+3% sucrose, while for stem, it was 0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L KT+MS+0.8% agar+3% sucrose. 【Conclusion】 All four types of explants were capable of producing callus, which could then be induced to differentiate into somatic embryos. Among the four explants, stems had the highest callus induction rate and the lowest Browning rate, making them the most suitable explants for regeneration.

Key words: *Medicago archiducis-nicolai*; plant growth regulators; explant; callus induction

(责任编辑 靳奇峰)