

# 苜蓿高频再生体系和转基因体系研究进展

金淑梅<sup>1,2</sup>, 张月学<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086; 2. 东北林业大学, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 苜蓿是世界上重要的豆科牧草, 以其品质好、产量高而被誉为“牧草之王”。结合国内外苜蓿基因工程研究动态, 从基因型、外植体、培养基、培养途径、培养条件对苜蓿再生体系的影响, 乙酰 奎酮(AS)浓度、选择压、受体选择对苜蓿转基因体系的影响两个方面, 综述了苜蓿再生和转基因体系研究的进展。

**关键词:** 苜蓿; 再生体系; 转基因体系

中图分类号: S551<sup>+</sup>.7; Q78      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2008)04-0017-03

## Study Progress on High Frequency Regeneration and Transformation System of Alfalfa

JIN Shu-mei<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-xue<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract:** As “the king of forages”, Alfalfa is the most important Legumes in the world, with good quality, high yield. Combining the domestic and international developments in genetic engineering, the progress of alfalfa regeneration and transgenic system were summarized from genotype, explants media culture means culture conditions on the effect of alfalfa regeneration system, and the acetosyringone (AS) concentration, pressure choice and the choice of receptor on the effect of alfalfa transgenic system.

**Key words:** Alfalfa; regeneration system; transformation system

苜蓿是我国乃至世界范围内最重要的豆科牧草。因为其在畜牧业生产中长期以来发挥着重要作用, 被人们冠以“牧草之王”“维他命饲料”的美誉。利用再生体系技术建立体细胞无性变异系或利用转基因技术在其优质的遗传背景下, 选育出适合某种需要的新品种, 无疑将为我国的牧草生产作出贡献。

Saunders 等<sup>[1]</sup> 从苜蓿未成熟的花药、子房、子叶愈伤组织分化再生植株获得成功, 标志着苜蓿再生体系研究的开始。上海植物生理所杨燮荣<sup>[2]</sup> 利用叶片、叶柄、茎段成功地进行了国内首例紫花苜蓿的再生体系。拉开了我国研究苜蓿再生体系的序幕, 苜蓿的再生体系成功与否和许多因素有关。

### 1 苜蓿再生体系的研究进展

#### 1.1 苜蓿再生体系中基因型的选择

苜蓿再生体系会受到基因型的影响, 基因型不同的苜蓿品种, 其再生能力及特征差别特别大。Song 等<sup>[3]</sup> 认为基因型杂合程度高的, 其体胚形成能力高, 再生能力也高。Sairam 等<sup>[4]</sup> 证明, 苜蓿愈伤组织的再生能力受基因型控制, 并且高度遗传, 可通过轮回选择的方法将植株再生能力提高。

Resch Moltrasio 等<sup>[5]</sup> 利用苜蓿的 15 个品种作为试验材料, 品种 12R 产生愈伤组织率平均为 50%, 而另一个品种 196 不能再生。Brown 和 Atanassov<sup>[6]</sup> 通过试验也得出了苜蓿组培是依赖于基因型的。Iantcheva 等<sup>[7]</sup> 利用 R108 和 Jemalong 两个品种进行再生能力的比较, R108 的再生率为 45%, 而 Jemalong 的再生率只有 1%~2%。

#### 1.2 苜蓿再生体系中外植体的选择

外植体是指从活体植物组织分离下来的用于培养的那一块植物。苜蓿再生体系研究开展 30 年来, 国内外研究报告中所采用的外植体种类繁多, 几乎

收稿日期: 2008-01-12  
基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C200714); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-G06230)  
第一作者简介: 金淑梅(1972-), 女, 黑龙江省明水县人, 博士, 讲师, 主要从事园林植物遗传育种等方面的科研和教学工作。  
Tel: 13159840628; E-mail jinshumei1972@163.com.

所有器官或组织都可以作为外植体,如茎尖、叶片、茎段、幼芽、子叶、下胚轴、上胚轴、花药、花粉、子房、胚珠、根、叶柄等。一般形成胚性愈伤组织时选叶柄、子叶、上胚轴、下胚轴、幼芽等作为外植体,污染小,材料易得、方便。快繁可以选茎段、花茎等作为外植体,操作简单、取材容易。尽管几乎苜蓿所有器官或组织都可以作为外植体,但合适的外植体选择也是决定再生体系成功的一个关键因素。Monteiro<sup>[8]</sup>等在研究 5 个不同品种苜蓿原生质体培养时发现,虽然外植体为子叶或叶片时都能诱导形成愈伤组织,但只有 Rangeland 苜蓿的叶片可以分化出体胚,获得再生植株,Gallego<sup>[9]</sup>利用子叶、下胚轴、叶柄和叶片做外植体,在他的实验条件下,叶柄是最好的外植体,平均产生 18 个体细胞胚,8%的体细胞胚转变为正常的植株。Cuadrado<sup>[10]</sup>也得到了叶柄是最好的外植体同样的结论。Iantcheva A<sup>[11]</sup>利用杂花苜蓿品种 R108 的根做外植体,根先被 1M 蔗糖溶液预处理 48 h 和 72 h 后,在液体培养基中培养。预处理 72 h 的根完成再生所用时间最短(55 d),体细胞胚转化为完整植株的比例最大(70%)。Ziauddin<sup>[12]</sup>利用苜蓿品种 RSY27 茎尖作为外植体,离体培养在添加  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 的 MS 培养基上,植株得到了再生。

### 1.3 苜蓿再生体系中培养基的选择

培养基是活体植物组织体外保存、生长发育的营养来源。苜蓿再生体系中所用培养基较多,随着生物技术的发展,苜蓿再生体系中所用培养基种类越来越多。Shao 等<sup>[13]</sup>在诱导愈伤组织的形成时,采用的培养基为 B<sub>5</sub> 培养基,愈伤组织分化成植株采用 Blaydes 改良培养基,苜蓿外植体直接成苗中采用 MS 和 B<sub>5</sub> 培养基。Bryan 等<sup>[14]</sup>在诱导愈伤组织的形成时,采用的培养基为 SH 培养基,愈伤组织分化成植株采用 Blaydes 改良培养基。Janos 等<sup>[15]</sup>利用添加  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NAA 和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 KT 的 SH 培养基诱导愈伤组织的形成,然后利用常用的 MS 培养基培养悬浮细胞,在诱导苜蓿愈伤组织分化成苗上,MS 优越性更大。进行不同 2,4-D 的处理,用来进行一个新基因的筛选。Winicov 等<sup>[16]</sup>利用在 SH 培养基培养苜蓿的细胞系,进行细胞的抗盐的筛选。再生体系发展方向,很大程度上取决于培养基中植物生长调节物质的种类、浓度及配置组合等。苜蓿再生体系中通常采用的植物生长调节物质主要有植物细胞生长素和植物细胞分裂素二类。主要应用的植物生长素有 2,4-D, NAA 和 IAA,在离体培养中主要诱导愈伤组织形成和根的发育。而细胞分裂素主要应用的则是 KT, ZT, BA,其中生长素和分裂素二者在培养基中比值大小,决

定外植体分化或发育方向;当比值高时,有利于根的诱导,而比值低时则有利于芽的分化。苜蓿再生体系中,外源激素的应用相当普遍且重要,使用的种类、浓度及结构控制着再生方式。在再生程序中,SH 中添加  $2,4\text{-D } 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $\text{KT } 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,可以产生具有高度再生能力的胚性愈伤组织,不添加任何生长调节物质则有利再生,当诱导生根时则应添加  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KT 和  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D。

### 1.4 苜蓿再生体系的途径

苜蓿再生体系的途径分为直接分化再生途径和愈伤组织再生途径两种。激素在两种途径中起到了至关重要的作用。直接分化再生途径即不经过胚性愈伤组织直接发育成体细胞胚的。叶片放在添加  $22.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 和  $4.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Kinetin 的 MS 培养基上,发育成胚性细胞,可以不经过胚性愈伤组织直接发育成体细胞胚。大多数苜蓿再生体系是经过愈伤组织再生途径完成的即经过体细胞先发育成胚性愈伤组织再发育成体细胞胚阶段。在 Davietova 等<sup>[17]</sup>所采用的培养条件下  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 2,4-D 能有效地在愈伤组织中提高细胞分裂,但不能诱导器官发生。具有胚胎发生能力的苜蓿品种(subsp. *Varia* A2)在低浓度( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 2,4-D 存在的情况下,原生质细胞只是增长,然后死亡或者不分化。在高浓度( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 2,4-D 存在的情况下,原生质细胞保持小并且浓的细胞质,能进一步发育成原胚发生细胞簇。

### 1.5 再生体系条件的控制

再生体系中,光照是必需条件之一。一般诱导愈伤组织时光照强度为 800~1 000 lx,诱导分化时则以 1 500~2 000 lx 为宜,光照时间为  $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。光照强度和时间在苜蓿组培中应根据基因型、外植体种类及培养基的灵活应用。20~28℃是苜蓿再生体系温度的基本范围,应用最多的是 23~27℃,过低过高的温度对植株再生都是不利的。

## 2 苜蓿转基因体系研究进展

首例由 Deak 等<sup>[18]</sup>利用农杆菌介导法对苜蓿进行转化获得成功之后,外源基因转入苜蓿的研究陆续见有报道。遗传转化也受到若干因素影响。

### 2.1 乙酰丁香酮(AS)浓度的影响

乙酰丁香酮(AS)是常用的诱导能力最强的酚类化合物,虽然被广泛应用以提高转化率,但在不同植物上应用效果不同,很多实验中都证明其不是决定性因素,只可能在单方面诱导农杆菌的毒性,而农杆菌的毒性是有最高限度的,超过这个限度,乙酰丁香酮就无法进一步提高转化效率甚至是有害的。Ziauddin<sup>[12]</sup>利用农杆菌侵染苜蓿的子叶 15 min(没有使用 AS),共培养 5 d。Mckersie<sup>[19]</sup>利用农杆菌

侵染苜蓿的叶柄, 使用 AS 的浓度为  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 共培养 3 d。Galili<sup>[20]</sup> 等使用的 AS 浓度为  $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 选择压 Kana 的影响

Kana 常常作为转化过程中的筛选标记, 经有效转化的外植体才可以在含有 Kana 的选择培养基上持续生长, 作为进一步转基因植株鉴定的基础。但有的报道中认为, 苜蓿发育的不同时期, 表现不同的 Kana 抗性, 种子的萌发似乎不受 Kana 的影响, 幼苗中也发现了高水平的内源抗性, 对转化体的筛选效率很低。在不同的转化体系中使用的浓度不同, 如 Saruul<sup>[21]</sup> 使用 Kana 浓度为  $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Wini-cov<sup>[16]</sup> 使用 Kana 浓度为  $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而在 Aus-tin<sup>[22]</sup> 和 Dong<sup>[23]</sup> 所用 Kana 浓度却为  $25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 转基因苜蓿受体的选择

转基因苜蓿的手段包括直接转化法和农杆菌介导的基因转化法, 直接转化法是通过物理或化学方法将外源基因导入植物细胞或原生质体, 如 Reich<sup>[24]</sup> 利用显微注射法将 Ti 质粒导入紫花苜蓿原生质体, 得到转化的愈伤组织。农杆菌介导的基因转化是最普遍的, 农杆菌的受体材料广泛, 在基因转化的过程中选择适合的受体系统会收到事半功倍的效果。Anthony<sup>[25]</sup> 等利用发芽的种子及花器官作为转化的受体, 绕开了再生体系程序获得了转化植株。转化率分别为 36.0% 和 9.4%。但使用的材料是特殊品种“Jemalong”, 以后也没有后续的报道。McKersie<sup>[19]</sup> 利用叶柄作为转基因的受体, 在筛选后, 大约 90% 的再生植株是转基因阳性植株。但苜蓿转化多数是以子叶为遗传转化的受体。

一般的转化途径都是先用农杆菌侵染外植体, 然后诱导愈伤、体胚再生途径或直接生芽再生途径。但外植体经农杆菌侵染后要先后经历农杆菌和抗生素的双重伤害, 导致外植体大量死亡, 转化率随之大大下降。在筛选培养基上诱导脱分化困难, 不易于向胚性愈伤方向转变<sup>[26]</sup>。为了提高出胚率, 一般都在筛选一定时间后降低甚至撤除选择压, 如 Trinh<sup>[27]</sup> 首先使用的 Kana 浓度为  $40\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 5 周后撤去了选择压。但这样做需要有丰富的经验掌握得恰到好处。不同的品种, 或同一个品种的不同部位, 甚至同一个品种同一个部位不同发育时期都会造成侵染结果的很大不同。Tian 等<sup>[28]</sup> 以叶片、茎、叶柄作为侵染受体, 外植体胚性发生率分别为 100%、63% 和 69%。因此, 除了提高农杆菌的侵染力, 如何提高受体的敏感性应该是研究的一个重点。相比于叶盘等外植体, 愈伤组织是一种细胞分裂活动活跃的组织, DNA 的合成旺盛, 比较容易接受外

源 DNA 的整合, 转化率高, 扩繁量大, 可获得较多的转化植株, 获得的转化愈伤组织通过继代扩繁培养, 能够分化出更多的转化植株。并且与没有侵染的叶片相比, 形成体细胞胚要延后。Shao 等<sup>[13]</sup> 在实验中发现侵染的叶片与没有侵染的叶片相比, 形成体细胞胚要延后 3~4 周, 并且产生抗性愈伤组织率只有 6%~8%。

参考文献:

[ 1 ] Saunders J W, Bingham E T. Production of alfalfa plants from callus tissue[ J ]. Crop Sci., 1972, 12: 804-808.

[ 2 ] 杨雯荣. 苜蓿再生体系再生植株[ J ]. 植物生理学通讯, 1981, 11(5): 33-35.

[ 3 ] Song J, Sorensen E L, Ling G H. Direct mebyrogenesis from single mesophy protoplast in alfalfa( *Medicago sativa* L. )[ J ]. Plant Cell Rep. 1990(9): 21-25.

[ 4 ] Sairam R V, Franklin G, Hassel R, et al. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodao callus [ J ]. Plant cell tissue organ cult, 2003, 75(1): 79-85.

[ 5 ] Moltrasio R, Claudio G. Alfalfa(*Medicago sativa*)somatic embryogenesis; genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean gemplasm[ J ]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2004, 77: 119-124.

[ 6 ] Brown D, Atanassov E. A Role of genetic background in somatic embryogenesis in medicago[ J ]. Plant cell Tiss Org Cult, 1985, 4: 111-122.

[ 7 ] Iantcheva A, Slavov S, Prinsen E, et al. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment[ J ]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2005, 81: 37-43.

[ 8 ] Monteiro M, Appezzato-da-Glória B, José Carlos V M, et al. Plant regeneration from proroplasts of alfalfa(*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis[ J ]. Scientia Agricola, 2003, 60 (4): . 683-689.

[ 9 ] Gallego P, Hita O, Villalobos N, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago arborea* L. [ J ]. in vitro cellular and development biology-plant, 2001, 37(2): 199-203.

[ 10 ] Cuadrado Y, Guerra H, Martin A B, et al. Differences in invertase activity in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea*[ J ]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2001, 67: 145-151.

[ 11 ] Iantcheva A, Vlahova M, Trinh H, et al. Assessment of poly-somaty, embryogenic potential, embryo fomation and regeneration for various species of diploid annual *Medicago*[ J ]. Plant sci., 2001, 160: 4621-4627.

[ 12 ] Ziauddin A, Lee R W H, Lo R, et al. Transformation of alfalfa with a bacterial fusion gene Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin50-gfp: Response with agrobacterium tumefaciens strains LBA4404 and C58[ J ]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2004, 79: 271-278.

[ 13 ] Shao C Y, Russinova E, Iantcheva A, et al. Rapid transformation and regeneration of alfalfa(*Medicago falcate* L. ) via direct somatic embryogenesis[ J ]. Plant Growth Regulation, 2000, 31: 155-166.

(下转第 21 页)

活率依次为 91.6 %、84.5 %、79.6 %、70.6 %。

表 1 不同等级试管苗移栽的成活率

试管苗 级别	移栽数	成活数	成活率 / %	根长 / cm	根系 状况
合格单株	790	724	91.6	3~4	根数多, 黄白色 新根很多
有根单株	646	514	79.6	3~4	根数多, 黄白色 新根多
一级丛苗	800	676	84.5	2~3	根数一般, 黄 白色新根一般
二级丛苗	640	452	70.6	2~3	根数较少, 黄 白色新根少

薇菜试管苗植株越大, 根系越多, 移栽越易成活。丛株苗带有原叶体。植株生长初期营养来自原叶体, 移栽后 10 d, 原叶体发霉烂死, 小苗的根系不发达, 影响小苗的健壮生长, 丛株移栽的成活率不如单株。

2.2 不同基质的试管苗移栽效果

由表 2 可以看出, 椰茸、母土椰茸混合、母土、母土锯末与煤灰混合的成活率分别是: 93.7 %、89.4 %、86.3 %、54.5 %, 不管是哪一级苗, 椰茸移栽成活率高于其他基质组合, 基质 pH 偏高不适宜试管苗移栽。

表 2 不同基质试管苗移栽的成活率

移栽基质	移栽数	成活数	成活率/ %
母土	980	846	86.3
椰茸	636	596	93.7
母土椰茸混合(1 : 1)	680	608	89.4
母土锯末煤渣灰混合(5 : 3 : 2)	580	316	54.5

3 小结

本试验结果虽以椰茸作为基质移栽薇菜试管苗的成活率最高, 但综合考虑其使用成本和效果, 建议利用母土作移栽基质。用此方法移栽试管苗简便易行, 成本低, 试管苗的生产成本相应较低。薇菜试管苗的移栽以选择大苗单株移栽为好, 用遮阳网+微膜覆盖保湿, 在温度 20 ~ 28 ℃, 湿度 90 % ~ 100 %, 散射光照条件下可获得较好的效果。试验中我们还发现, 薇菜苗期生长以地下部根系生长为主, 地上部叶的生长滞后于根系的生长, 常常是枝叶不繁茂的小苗却有发达的根系。

参考文献:

[ 1] 何义发. 经济蕨类植物紫萁的研究进展与展望[ J] . 湖北农业科学, 2002(6): 101-103.

[ 2] 王谋强, 张朝君. 我国南方薇菜的研究现状及其发展对策[ J] . 贵州农业科学, 2006, 34(4): 135-136.

(上接第 19 页)

[ 14] Bryan D M, Stephen R B, Kim S J. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase[ J] . Plant Physiology, 1999, 119: 839-847.

[ 15] Janos G, Kinga N, Zoltan M. Expression of a novel type small praline-rich protein gene of alfalfa is induced by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in dedifferentiated callus cells[ J] . Plant Molecular Biology, 1997, 34: 593-602.

[ 16] Winicov I, Bastola D R. Transgenic overexpression of the transcription factor alfin1 enhances expression of the endogenous gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants[ J] . Plant Physiol, 1999, 120: 473-480.

[ 17] Davietova S, Meszaros T, Miskoiczi P, et al. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells[ J] . J. Exp. Bot., 2001, 52(355): 215-221.

[ 18] Deak M G, Koncz K. Transformation of Medicago by Agrobacterium mediated gene transfer[ J] . Plant Cell Rep., 1986 5: 97-100.

[ 19] McKersie B D, Jones K S, Bowley S R. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase[ J] . Plant Physiol, 1999, 3: 839-847.

[ 20] Galli S, Guenoune D, Wininger S, et al. Enhanced levels of free and protein-bound threonine in transgenic alfalfa(Medicago sativa L.) expressing a bacterial feedback-insensitive aspartate kinase gene[ J] . Transgenic Res., 2000, 9: 137-144.

[ 21] Sanul P, Friedrich S, Somers D A, et al. Production of a biodegradable plastic polymer, Poly-B- hydroxybutyrate, in transgenic alfalfa[ J] . Crop Sci., 2002, 42: 919-927.

[ 22] Austin S E T, Bingham D E, Mathews M N. Production and field performance of transgenic alfalfa(Medicago sativa L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase[ J] . Euphytica, 1995, 85: 381-393

[ 23] Dong J L, Liang B G, Jin Y S H, et al. Oral immunization with pBsVp6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection[ J] . Virology, 2005, 339: 153-163.

[ 24] Reich T J, Yer V N, Miklb L. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti-plasmids[ J] . Biotechnology, 1986, 4: 1001-1004.

[ 25] Anthony T T, Stephen H B, Kardailsky V, et al. Transformation of Medicago truncatula via infiltration of seedling or flowering plants with Agrobacterium[ J] . Plant J., 2000, 22: 531-541.

[ 26] Duque A S R L A, Araujo S S, Santos D M M F, et al. Optimisation of a selection scheme using kanamycin to improve transformation of Medicago truncatula cv[ J] . Jemalong, Plant Cell Rep., 2003, 19: 97-100.

[ 27] Trinh T H, Ratet R, Rondorosi E, et al. Rapid and efficient transformation of diploid Medicago truncatula and Medicago sativa ssp. falcata lines improved in somatic embryogenesis [ J] . Plant Cell Rep., 1998, 17: 345-355.

[ 28] Tian L, Wang H, Wu K, et al. Efficient recovery of transgenic plants through organogenesis and embryogenesis using a cryptic promoter to drive marker gene expression[ J] . Plant Cell Rep., 2002, 20: 1181-1187.