

网络出版日期:2017-06-05
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170605.1728.022.html

紫花苜蓿高频体胚发生及萌发成苗技术与转基因应用

温之雨¹,董福双¹,张华宁¹,杨瑞娟^{1,2},张艳敏¹

(1. 河北省农林科学院 遗传生理研究所,河北省植物转基因中心,石家庄 050051;
2. 河北师范大学 生命科学学院,石家庄 050024)

摘 要 以紫花苜蓿的子叶或叶片为外植体,建立高频体胚发生及成苗技术体系,为苜蓿耐逆性状的遗传改良提供技术支撑。在愈伤诱导、体胚诱导、体胚成熟与萌发等几个关键环节,分析比较培养基组分对培养效果的影响。建立在 SHDK 培养基上诱导愈伤、MB(-/+)+ABA 0.4 mg/L+PEG-6000 50 g/L+蔗糖 50 g/L 培养基上诱导体胚、Bio2Y 培养基上促体胚发育成熟、1/2 MS(或 SH)培养基上体胚萌发成苗的高频再生技术体系。最适条件下,每克胚性愈伤组织可产生 77.9 个正常萌发成苗的健康体胚。再生植株在生长箱内经过 2 周 20 ℃、16 h/d 的光照培养后移栽温室,成活率达 90% 以上。利用该离体再生技术成功地将凝集素基因 PPA 导入苜蓿中,获得抗蚜转基因苜蓿。

关键词 紫花苜蓿;体胚发生;离体再生;转基因

中图分类号 S512.1⁺2 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)06-0882-08

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是重要的豆科牧草,营养丰富,蛋白质质量分数占其干物质的 17%~20%,被誉为“牧草之王”。种植苜蓿对改良土壤、保持水土及保护环境亦大有益处。中国人口众多,保障粮食生产的任务艰巨;为保证粮食生产的耕地面积,发展苜蓿必须向盐碱滩涂要空间。虽然苜蓿表现出一定的耐盐性,可在轻度盐碱土壤上生存,但尚缺乏可耐中重度盐碱的种质资源。培育强耐盐苜蓿新品种对开发利用盐碱滩涂地及增加苜蓿生物产量具有重要作用。

耐盐苜蓿资源短缺,再加上苜蓿杂交育种困难,利用转基因技术改良苜蓿的耐盐性是加快苜蓿新品种选育的有效途径。苜蓿转基因植株的获得主要由农杆菌介导法^[1-5]。大多数的转化技术依赖于苜蓿的组织培养和离体再生,极少利用茎尖建立的 in planta 转化方法^[6]。盛慧等^[7]的报道虽然没有经过愈伤诱导过程,但用子叶节为受体通过丛生芽发生途径也没有摆脱组织培养的束缚。因此,建立高效的苜蓿离体再生技术体系是苜蓿遗传转化的重要组成部分。苜蓿的离体再生途径包括器官发生和体胚发生 2 种途径^[8]。其

中,体胚发生再生途径因胚状体起源于单细胞,具有嵌合体少、遗传背景一致的优点;胚状体具有的双极性使其可发育成同时具有芽和根的完整植株,避开不定芽发育中的生根困难问题。遗传转化体通过体胚发生途径直接成苗可降低转化细胞的无性变异风险及非转化细胞的逃逸选择风险^[9]。但体细胞胚胎再生途径存在培养周期长、分化频率偏低、组织培养条件要求严格等弊端,这些因素限制紫花苜蓿遗传转化效率的提高。王成龙等^[10]探索紫花苜蓿的丛生芽再生系统,使其再生频率比体胚再生系统提高 1 倍,进一步分析发现,丛生芽再生系统与体胚再生系统的芽分化率相差不大(分别为 70.4%和 67.1%),差别主要是单个外植体分化的芽数,前者为 8.11,后者为 2.83。虽然该系统可在相对较短的时间内获得大量的丛生芽,但其存在的高畸形芽率也不容小觑。

植物细胞全能性赋予每个细胞发育成完整植株的可能性,但实际上并非每一个细胞都能被有效诱导发育成小植株,它与细胞的组织来源及生理状态等有关。在小麦、玉米、大豆、棉花等多种作物上都报道组织培养的基因型依赖性^[11-15]。在

收稿日期:2016-03-18 修回日期:2016-04-19
基金项目:河北省自然科学基金(C2013301033)。
第一作者:温之雨,男,副研究员,主要从事农作物资源创新研究。E-mail: wzy1800@126.com
通信作者:张艳敏,女,研究员,主要从事组织培养与转基因技术研究。E-mail: zhy63@163.com

苜蓿上也有基因型影响紫花苜蓿愈伤组织和体胚形成的报道^[16-17]。克服这一困难的方法之一是选择再生频率高的基因型,但由此产生的问题是影响转基因作物的实用性或延迟转基因作物的生产应用。本研究以生产用苜蓿品种为材料,从愈伤诱导、体胚诱导、体胚成熟与萌发等几个关键环节入手,进行较为系统的研究,旨在解决苜蓿体胚诱导效率及萌发效率的双低问题,从而建立紫花苜蓿高频体胚发生的离体再生技术,为苜蓿的遗传转化提供良好的受体转化系统。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为紫花苜蓿品种‘三得利’的无菌苗。

1.2 外植体准备

先将苜蓿种子用 $\varphi=70\%$ 的乙醇消毒 1~2 min,再用 1 g/L 的氯化汞消毒 10~12 min,无菌水充分冲洗 3~4 遍。将种子放到铺有灭菌滤纸的平皿内,用镊子转接到 1/2 MS 培养基上。在 25 ℃、16 h/8 h 光暗周期、2 000 lx 光照强度下培养 7~10 d。然后将外植体按子叶、叶柄、茎段和下胚轴等分开,每一外植体约 3 mm 大小。

1.3 所用培养基及培养条件

以 SH^[18]、MS^[19] 及 Bio2Y^[20] 等为基础培养基,附加不同种类及浓度的激素分别用于愈伤诱导、体胚诱导与成熟及体胚萌发成苗。各阶段所用培养基的组分详见表 1;培养基的 pH 用 KOH 调节到 5.8。所有培养物都在 (25±2) ℃ 的培养室内进行培养,除愈伤诱导阶段无光照外,其他各阶段维持 16 h/d 的光照条件。

表 1 苜蓿体胚诱导各阶段所用的培养基
Table 1 Media used in different periods during embryo induction and maturation

培养基 Medium	简称 Abbreviation	培养基组份 Medium ingredient
愈伤诱导培养基 Callus induction	SHDK	SH+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.2 mg/L+Sucrose 30 g/L+Agar 4.5 g/L
体胚诱导培养基 Embryo induction	MB(—)	MS salt(1/2 NH ₄ NO ₃)+B ₅ vitamines+Sucrose 50 g/L+Agar 4.5 g/L
	MB(—/+)	MS salt(1/2 NH ₄ NO ₃ ,2×KNO ₃)+B ₅ vitamine+Sucrose 50 g/L+Agar 4.5 g/L
	MSBN	MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+Sucrose 50 g/L+Agar 4.5 g/L
	MS0	MS+Sucrose 50 g/L+Agar 4.5 g/L
体胚成熟培养基 Embryo maturation	Bio2Y	Bio2Y+Sucrose 50 g/L+Agar 4.5 g/L
体胚萌发培养基 Shoot promotion	1/2 MS	1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+Sucrose 20 g/L+Agar 4.5 g/L
	1/2 SH	1/2 SH macro+MS micro+Ferrous salt+VB ₁ 10 mg/L+VB ₆ 10 mg/L+Nia-cin 4.5 mg/L+6-BA 0.1 mg/L+Sucrose 20 g/L+Agar 4.5 g/L

1.4 正交试验优化体胚诱导培养基

以 MB(—/+)为基础培养基,以 ABA、Ag-NO₃ 和 PEG-6000 为效应因子,进行 L₉(3⁴)正交设计。上述 3 因子的试验水平分别为 0、0.2 和 0.4 mg/L;0、10 和 20 mg/L;0、25 和 50 g/L。将 SHDK 培养基上诱导的胚性愈伤转移到上述相应培养基上,每处理 1 瓶,5 次重复。用接种后的(瓶+愈伤)质量减去接种前的瓶质量得到每瓶的愈伤质量。20 d 后将体胚转移到 1/2 SH 或 1/2 MS 培养基上,2 周后调查芽和根发育健全、可正常萌发成苗的体胚数,计算各处理每克愈伤组织形成可正常萌发的体胚数。

1.5 凝集素基因 PPA 转化苜蓿

1.5.1 转基因植株的获得 外植体为生产用苜

蓿品种‘三得利’的无菌苗子叶,农杆菌株为携带抗蚜 PPA 基因的 EHA105。抗蚜基因 PPA 来源于掌叶半夏,构建在带有卡那霉素抗性标记的 PBI121 质粒载体上,并由 35S 启动子控制。遗传转化采用外植体预培养和共培养各为 3 d 的方式^[21]。共培养结束后,将外植体转移到恢复培养基(SHDK+头孢噻肟钠 500 mg/L)上暗培养 7 d。然后转入筛选培养基(成分同恢复培养基,添加卡那霉素 30 mg/L),经过 2~3 次继代培养获得抗性愈伤组织。将浅黄绿色、粘稠并带有颗粒状结构物的愈伤组织转移到附加有 ABA 0.4 mg/L 和 PEG-6000 50 g/L 的体胚诱导培养基 MB(—/+)上诱导体胚形成;在 Bio2Y+50 g/L 蔗糖培养基上促体胚发育成熟;在 MS 或 1/2 MS

培养基上促体胚萌发成苗。再生植株在光照培养箱内经过 2 周 25 ℃、16 h/d 的光照培养后移栽温室。

1.5.2 PCR、RT-PCR 和 PCR-Southern 检测
植物基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法。植物总 RNA 提取用上海华尧/华舜公司的 RNArose。PCR 扩增 *PPA* 基因的上游引物序列为:5'-AT-GGCCTCCAAGCTCCTCCTC-3',下游序列为:5'-CTACGCGGCAATTGGGCGCTT-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应所用 TAQ 酶、dNTP 等试剂购自北京天根生化公司,RT-PCR 反应所用试剂为 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0。Southern blot 采用 ROCHI 公司生产的 Dig High Prime Labeling and Detection Starter Kit I,根据产品说明书进行操作。

2 结果与分析

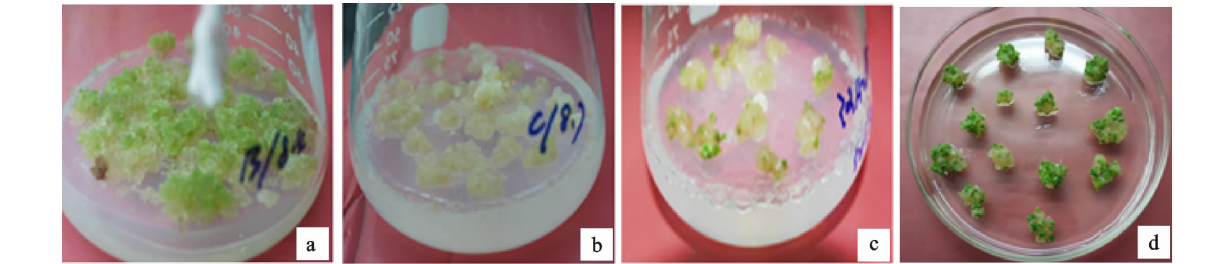
2.1 外植体来源对愈伤状态的影响

子叶、叶柄、茎段、下胚轴等 4 种外植体在 SHDK 培养基上的愈伤诱导率差异不大,均可达到 95%以上;但不同外植体对愈伤诱导表现出不同的时间响应和质量效果。下胚轴切段最先愈伤化,其次是叶柄、子叶,茎段反应最慢。在愈伤继

代过程中,茎段来源愈伤最易褐化死亡,淘汰率最高,其次是下胚轴来源愈伤,子叶和叶柄来源的愈伤状态最好。下胚轴来源愈伤增殖速度较快,颜色较浅,分散性较强,不易分化体胚;子叶来源愈伤较易形成浅黄绿色、粘稠糊状并嵌有颗粒状物的胚性愈伤组织,体胚分化率较高,是比较理想的外植体来源。

2.2 培养基对体胚诱导效果的影响

挑选在 SHDK 培养基上获得的浅黄绿色、粘稠并有颗粒状结构物的愈伤组织转移到体胚诱导培养基上,培养 1 周后,在 MSBN 培养基上的愈伤组织表面就陆续出现绿色的球状突起,并很快形成较硬的“盖”覆盖愈伤,没有体胚发生(图 1-a)。在 MS0 和 MB(-)培养基上的愈伤组织,在培养 2~3 周后,肉眼可观察到有体胚发生。MB(-)培养基的体胚诱导效果好于 MS0(图 1-b,1-c)。MS0 培养基上体胚数量较少,不仅发生体胚的愈伤块数少,每块愈伤上面形成的体胚数也少。MB(-/+)培养基[在 MB(-)基础上 KNO₃ 加倍]的体胚诱导效果较好,每一块愈伤组织都有体胚形成,且愈伤组织内部到后期亦有体胚形成;体胚数量也较其他 3 个处理明显增加(图 1-d),每克愈伤组织形成的体胚数平均为 39.5±6.2。



a. MSBN 培养基 MSDN medium; b. MS0 培养基 MS0 medium; c. MB(-)培养基 MB(-) medium; d. MB(-/+)培养基 MB(-/+) medium

图 1 不同培养基上的体胚诱导效果

Fig. 1 Somatic embryo induction on different media

2.3 体胚成熟与萌发

将子叶型胚直接转移到 MS0 或 1/2 MS 培养基上后,大部分体胚不能正常萌发成苗。部分胚状体子叶异常膨大后停止生长,或出现连体的子叶,或出现试管苗的玻璃化,或出现大量次级体胚,不能发育成完整的植株;有的胚状体膨大后出现脱分化重新愈伤化现象。据 2 个批次试验的调查统计,体胚正常萌发成苗的比率仅为 5.8%(表 2)。

针对苜蓿体胚在 MS0 或 1/2 MS 培养基上发生的玻璃化现象,采取将三角瓶放入光照培养箱以增加光强,提高琼脂质量浓度以提高培养基渗透压、降低容器湿度,使用透气透光好的封口膜降低 NH₄⁺ 浓度,添加活性炭等措施,但效果均不明显。

为此,借鉴黎茵等^[22]的方法,添加一个体胚成熟的液体培养过程,即将获得的体胚放入促进体胚成熟的液体培养基(SH 基本盐+L-Proline 3.45 g/L+(NH₄)₂SO₄ 1.65 g/L+蔗糖 20 g/L)

中,100 r/min 震荡培养 5~7 d,然后挑选发育正常的体胚转移到 1/2 MS 或 1/2 SH 固体培养基上进行萌发培养,2 周后调查体胚萌发率。由表 3

可见,增加这一促体胚成熟的液体培养过程,对提高体胚的正常萌发率效果并不明显。

表 2 未经体胚成熟培养过程的体胚发育情况

		Table 2 Development of somatic embryos without maturity promotion treatment			
		转移体胚总数 Transferred embryos	愈伤化体胚数 Dedifferentiated embryos	成苗体胚数 Shoot-developed embryos	成苗率/% Shoot percentage
批次 1	Exp. 1	199	100	18	9.1
批次 2	Exp. 2	39	39	1	2.6
合计	Total	238	139	19	5.8±4.6*

注: * 数据为 2 批次试验“平均数±标准差”。
Note: Data marked with * represents average value and stand division of shoot percentage for Exp. 1 and Exp. 2.

表 3 经过液体体胚成熟培养过程的体胚萌发情况

Table 3 Development of somatic embryos after maturity promotion in liquid medium			
萌发培养基 Medium	转移体胚总数 Embryos transferred	成苗数 Shoot number	成苗率/% Shoot percentage
1/2 MS	85	2	2.35
1/2 SH	304	35	11.50

因此,本研究又以 ABA、AgNO₃ 和 PEG-6000 为效应因子进行 L₉ (3⁴) 正交试验优化体胚诱导条件。结果表明,在体胚诱导培养基中添加 AgNO₃、PEG、ABA 等对以后体胚萌发的影响效果不同(表 4)。PEG-6000 的效应值最大,硝酸银为负效应。最后确定合适的体胚诱导培养基为 MB(-/+)+ABA 0.4 mg/L+PEG-6000 50 g/L+蔗糖 50 g/L+琼脂 4.5 g/L,pH 5.8。最适条件下,每克胚性愈伤组织可产生 77.9 个正常(或健康)体胚。

培养基上时间太长引发的球形胚重愈伤化现象,而进一步提高体胚的正常萌发率。最终建立体胚高频发生、正常萌发的苜蓿离体再生技术体系,即:SHDK 培养基上诱导愈伤,MB(-/+)+ABA 0.4 mg/L+PEG-6000 50 g/L+蔗糖 50 g/L培养基上诱导体胚,Bio2Y 培养基上促体胚发育成熟,1/2 MS(或 SH)培养基上体胚萌发成苗。再生植株在光照培养箱内经过 2 周 20℃、16 h/d 的光照培养后移栽温室,成活率 90%以上。体胚萌发、再生植株移栽前炼苗及温室移栽情况见图 2。

将诱导的体胚适时转移到 Bio2Y 培养基上进行 10~14 d 的促发育培养,可减少 MB(-)培

表 4 AgNO₃、PEG 和 ABA 对苜蓿健康体胚诱导的效应比较[L₉ (3⁴)]

Table 4 Effect of AgNO ₃ , PEG and ABA on the induction of somatic embryos in alfalfa			
效应因子 Factor	效应因子水平/(mg/L) Level of factor	效应值(正常萌发的体胚数) Effect size(No of healthy embryos per gram of callus)	
ABA	0	29.5	随效应因子水平提高,效应值增加,△k=22.7 Value increase with the increment of level
	0.2	51.9	
	0.4	52.2	
AgNO ₃	0	60.5	随效应因子水平提高,效应值递减,△k=-35.3 Value decrease with the increment of level
	10	49	
	20	25.2	
PEG-6000	0	24.1	随效应因子水平提高,效应值增加,△k=55.4 Value increase with the increment of level
	25 000	31.1	
	50 000	79.5	



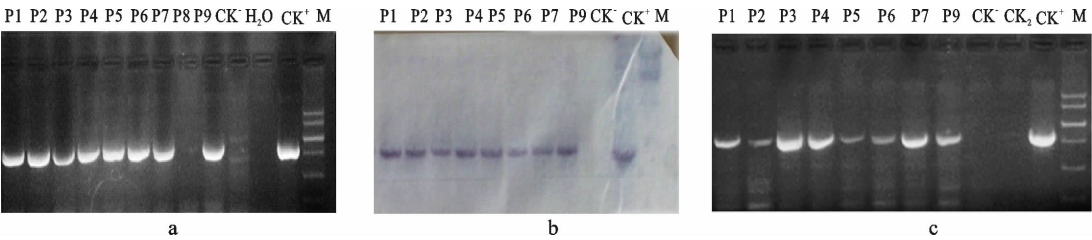
a. 培养基上体胚萌发情况 Embryo germination on medium; b. 光照培养箱内炼苗 Plantlets acclimatization in growth cabinet; c. 温室内移栽成活 Plantlets grown in soil

图 2 再生植株的成苗与移栽
Fig. 2 Formation and transplanting of plantlets

2.4 PPA 抗蚜基因转化苜蓿

共侵染经预培养 3 d 的子叶 50 枚,在含有 30 mg/L 卡那霉素的 SHDK 培养基上获得抗性愈伤组织 23 块,抗性愈伤获得率为 46%。抗性愈伤在含有 15 mg/L 卡那霉素的体胚诱导及体胚萌发培养基上培养后获得 16 个再生植株。再生

植株经练苗后移栽温室成活 9 株。经 PCR(图 3-a)、PCR-Southern(图 3-b)鉴定 8 株为阳性,表明外源 PPA 基因已整合进苜蓿基因组。RT-PCR 结果表明,外源 PPA 基因可在转录水平正常表达(图 3-c)。



a. 转 PPA 基因苜蓿的 PCR 方法检测 Detection of PPA gene in transgenic alfalfa by PCR method; b. 转 PPA 基因苜蓿的 PCR-Southern 鉴定 Identification of PPA gene in transgenic alfalfa by PCR-Southern method; c. 转 PPA 基因苜蓿在转录水平的表达检测 Detection of PPA gene expression at the transcription level in transgenic alfalfa.

P1~P9. 转化再生植株 Plantlets regenerated from transformation; CK⁻. 阴性对照 Negative control without transformation; CK⁺. 阳性对照 Positive control plant; CK₂. P9 植株经 DNase I 消化后的 RNA 样品,以排除样品未消化干净的 DNA 样品干扰 RNA sample from plant P9 digested with DNase I to verify if the DNA contamination was eliminated.

图 3 转 PPA 基因苜蓿的分子鉴定

Fig. 3 The identification of PPA transgenic alfalfa by PCR,PCR-Southern and RT-PCR methods

3 讨论

紫花苜蓿的愈伤诱导多以 MS、UM、SH 等为基础培养基附加不同种类和浓度的植物激素^[10, 23-24]。激素中 2,4-D 作用最为显著,其单独使用或与其他细胞分裂素组合,都能成功地诱导出愈伤组织。不同的 2,4-D 浓度,诱导的愈伤组织结构形态差异很大,不同外植体来源的愈伤组织生长所需的激素种类和浓度也不同^[25]。本研究采用 SH 为基础培养基,比较容易地诱导出呈粘稠、微黄绿色、具结构性内容物的胚性愈伤组织。困难的是体胚,特别是“健康”体胚的诱导和

成熟。只有“健康”的体胚才可最终发育成完整的植株。

体胚的诱导受多种因素的影响,首先是氮源的类型。张万军等^[26]认为影响苜蓿愈伤组织形成和分化的可能是氮的总量而不是氮的类型。Walker 等^[27]认为培养基中 NH₄⁺ 对苜蓿体细胞胚的产生起关键作用,SH 培养基中 NH₄⁺ 浓度为 12.5 mmol/L 时对体细胞胚诱导最为适宜。这说明氮源的类型和数量均影响体胚的诱导效果。王海波^[28]研究认为,NH₄⁺、NO₃⁻ 除作为氮素的营养源外,还对愈伤组织的生长和质量具调节控制作用;对 NH₄⁺ 非敏感的培养物,NH₄⁺ 具有促进

细胞分裂和愈伤组织生长的作用,而 NO_3^- 对大多数培养有抑制细胞分裂和愈伤组织生长、促进细胞和愈伤组织分化的作用。根据这一理论,本研究采用在体胚诱导培养基中降 NH_4^+ 增 NO_3^- 的氮源调整策略显著提高苜蓿体胚的诱导率。适度的渗透胁迫利于体胚的诱导和成熟^[29]。杨国锋等^[24]在杂花苜蓿的体胚诱导培养基中添加 60 g/L 的 PEG-6000 使体胚的诱导从 33.9% 增至 44.0%。本研究正交试验结果表明,在培养基中添加 50 g/L 的 PEG-6000 能够改善体胚的诱导效果,与不添加 PEG-6000 的处理相比,效应值 Δk 达到 55.4。蔗糖质量浓度对体胚的发生数量和质量亦有较大影响,本研究结果表明,将体胚成熟培养基中的蔗糖质量浓度从 30 g/L 提高到 50 g/L 后,胚状体重新愈伤化现象明显减轻,蔗糖的作用可能更多地源于渗透调节。将体胚诱导培养基的蔗糖质量浓度从愈伤诱导阶段的 30 g/L 提高到体胚诱导阶段的 50 g/L 是比较普遍的做法^[30-32]。

体胚诱导的另一重要影响因素是植物激素。许多文献报道在苜蓿体胚诱导环节利用细胞分裂素,常见的有 6-BA 和 KT^[10,24]。但本研究结果表明,在体胚诱导培养基中添加细胞分裂素 6-BA 的 MSBN 处理,极易造成在愈伤组织表面形成绿色的硬壳而不是形成体细胞胚,当然,不排除该处理可能存在激素配比不合适,或 6-BA 质量浓度过高的问题。可见,激素的配伍与平衡是体胚诱导成功的关键。本研究探索苜蓿体胚诱导的另一种途径,即体胚诱导过程中不添加植物激素,仅通过调节培养基的氮源及渗透压来实现健康体胚的诱导和成熟。根据王海波^[28]报道双子叶植物的分化可以在无激素或低浓度激素存在条件下通过相继的 MB(-)、MB(-/+)培养基来实现的原理,以 MB 为基础培养基,调整 NH_4NO_3 和 KNO_3 用量分别为原来的 1/2 和 2 倍,以期降低 NH_4^+ 离子对细胞的毒害作用和增强 NO_3^- 对细胞分化的促进作用,实现培养条件从利于愈伤向利于分化的转变,从而大大提高体胚的诱导率,每克愈伤组织可产生约 40 个体胚。通过正交试验设计进一步优化培养基组分,在培养基中添加 0.4 mg/L ABA 和 50 g/LPEG-6000 改善体胚的质量,提高萌发率,每克胚性愈伤组织可产生 77.9 个可正常萌发的体胚。

4 结 论

紫花苜蓿子叶在 SHDK 培养基上可诱导形成浅黄绿色、粘稠糊状并嵌有颗粒状内容物的胚性愈伤组织。然后以 MB 为基础培养基,对培养基组分进行降 NH_4^+ 、增 NO_3^- 调节使培养物向利于分化的方向发展;通过在培养基中添加 0.4 mg/L ABA 和 50 g/L PEG-6000 适度调节培养基渗透压,从而提高健康体胚的诱导率;将体胚转移到 Bio2Y 培养基上进行 10~14 d 的培养,促体胚发育成熟后,在 1/2 MS(或 SH)培养基上萌发成苗。再生植株在光照培养箱内经过 2 周 20 ℃、16 h/d 的光照培养后移栽温室,成活率 90% 以上。该离体再生技术可成功地应用于苜蓿转基因研究。

参考文献 Reference:

- [1] 梁慧敏,夏 阳,孙仲序,等.根瘤农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立[J].农业生物技术学报,2005,13(2):152-156.
LIANG H M, XIA Y, SUN ZH X, *et al.* Establishment of genetic transformation system of *Medicago sativa* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(2): 152-156 (in Chinese with English abstract).
- [2] ZHANG H, HUANG Q M, SU J. Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(2): 170-178.
- [3] 王庭辉,马晖玲,史 毅,等.基于漩涡振荡茎尖生长点转化法的 *Lyz-GFP* 二元基因在“陇东苜蓿”中的转化和表达[J].甘肃农业大学学报,2012,47(5):109-114.
WANG T H, MA H L, SHI Y, *et al.* Transformation and expression of the dual genes of *Lyz-GFP* gens in alfalfa ('Long Dong') based on the method of vortex concussion growing point of stem tip [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2012, 47(5): 109-114 (in Chinese with English abstract).
- [4] 魏正巍,朱延明,化 烨,等.转 *GsPPCK1* 基因苜蓿植株的获得及其耐碱性分析[J].作物学报,2013,39(1):68-75.
WEI ZH W, ZHU Y M, HUA Y, *et al.* Transgenic alfalfa with *GsPPCK1* and its alkaline tolerance analysis [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(1): 68-75 (in Chinese with English abstract).
- [5] 吴 婧,才 华,柏 锡,等.转 *GsGST13/SCMRP* 基因双价苜蓿的耐盐性分析[J].草业学报,2014,23(1):257-265.
WU J, CAI H, BAI X, *et al.* An analysis of salt tolerance of transgenic alfalfa with the *GsGST13/SCMRP* gene [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(1): 257-265 (in Chinese with English abstract).
- [6] WEEKS J T, YE J, ROMMENS C M. Development of an in planta method for transformation of alfalfa(*Medicago sati-*

- va) [J]. *Transgenic Research*, 2008, 17(4): 587-597.
- [7] 盛 慧, 朱延明, 李 杰, 等. *DREB2A* 基因对苜蓿遗传转化的研究[J]. 草业科学, 2007, 24(3): 40-45.
- SHEN H, ZHU Y M, LI J, *et al.* Genetic transformation of *DREB2A* gene into alfalfa [J]. *Pratacultural Science*, 2007, 24(3): 40-45 (in Chinese with English abstract).
- [8] 葛 军, 刘振虎, 卢欣石. 紫花苜蓿再生体系研究进展[J]. 中国草地, 2004, 26(2): 63-68.
- GE J, LIU ZH H, LU X SH. Review on the research progress of regeneration system of alfalfa [J]. *Grassland of China*, 2004, 26(2): 63-68 (in Chinese with English abstract).
- [9] UZELAC B, NINKOVI S, SMIGOCKI A, *et al.* Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa* [J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(1): 1-6.
- [10] 王成龙, 周明亮, 董雪妮, 等. 紫花苜蓿两种再生体系的优化及比较[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(4): 53-61.
- WANG CH L, ZHOU M L, DONG X N *et al.* Optimization and comparison of two regeneration system of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(4): 53-61 (in Chinese with English abstract).
- [11] GONZALEZ J M, FRIERO E, JOUVE N. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. cultivars [J]. *Plant Breeding*, 2001, 120(6): 513-517.
- [12] ZALE J M, BORCHARDT-WIER H, KIDWELL K K, *et al.* Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 76(3): 277-281.
- [13] JIN S, ZHANG X, NIE Y, *et al.* Identification of a novel elite genotype for in vitro culture and genetic transformation of cotton [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(4): 519-524.
- [14] PARROTT W A, WILLIAMS E G, HILDEBRAND D F, *et al.* Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1989, 16(1): 15-21.
- [15] 郭新梅, 张晓东, 韩立新, 等. 不同基因型玉米幼胚愈伤组织的培养特性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(4): 68-72.
- GUO X M, ZHANG X D, HAN L X, *et al.* Characteristic of callus induced from immature embryo among different maize inbreds [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2007, 35(4): 68-72 (in Chinese with English abstract).
- [16] CHEN T H H, MAROWITCH J, THOMPSON B G. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, 8(1): 73-81.
- [17] DU S, ERICKSON L, BOWLEY S. Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(6): 330-334.
- [18] SCHENK R U, HILDEBRANDT A C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1972, 50(1): 199-204.
- [19] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures [J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497.
- [20] ATANASSOV A, BROWN D C W. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1984, 3(2): 149-162.
- [21] LIU Z H, ZHANG H M, LI G L, *et al.* Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase [J]. *Euphytica*, 2011, 178(3): 363-372.
- [22] 黎 茵, 黄学林, 肖洁凝, 等. 根癌农杆菌介导苜蓿体胚转化及转基因植株再生[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(4): 79-81.
- LI Y, HUANG X L, XIAO J N, *et al.* Regeneration of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) by *Agrobacterium-mediated transformation* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004, 43(4): 79-81 (in Chinese with English abstract).
- [23] 张 丽, 甘晓燕, 王敬东, 等. 6 个紫花苜蓿栽培品种高效再生体系的建立[J]. 西北农业学报, 2013, 22(8): 72-77.
- ZHANG L, GAN X Y, WANG J D, *et al.* Efficient regeneration system of six cultivars in *Medicago sativa* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2013, 22(8): 72-77 (in Chinese with English abstract).
- [24] 杨国锋, 毛雅妮, 孙 娟, 等. 聚乙二醇 6000 对杂花苜蓿体胚发生的影响及体胚的细胞学观察[J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 63-66.
- YANG G F, MAO Y N, SUN J, *et al.* Effects of PEG 6000 on somatic embryogenesis of variegated alfalfa and cytological observation of somatic embryo [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(18): 63-66 (in Chinese with English abstract).
- [25] 肖荷霞, 王 瑛, 高峰, 等. 外植体及激素对 SANDITI 紫花苜蓿愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(4): 47-52.
- XIAO H X, WANG Y, GAO F, *et al.* Induction and regeneration of callus of *Medicago sativa* L. 'SANDITI' [J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2003, 26(4): 47-52 (in Chinese with English abstract).
- [26] 张万军, 王 涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因子的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1579-1583.
- ZHANG W J, WANG T. Construction the system of high frequency regeneration from callus of alfalfa and study on the effect factors [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002,

35(12);1579-1583(in Chinese with English abstract).

[27] WALKER K A,SATOS J. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1981,1(1):109-121.

[28] 王海波. 植物组织与细胞培养通用分析模式的探讨[D]. 北京:中国农业科学院,1994.

WANG H B. Studies on common analytical formular for plant in vitro culture [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 1994 (in Chinese with English abstract).

[29] ATTREE S M,MOORE D,SAWHNEY V K,*et al.* Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: effects of a non plasmolysing water stress and abscisic acid [J]. *Annals of Botany*, 1991,68(6):519-525.

[30] PARROTT W A,BAILEY M A. Characterization of re-current somatic embryogenesis of alfalfa on auxin-free medium [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993,32(1):69-76.

[31] DAS NEVES L O,DUQUE S R L,DE ALMEIDA J S,*et al.* Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn cv. 'Jemalong' [J]. *Plant Cell Reports*, 1999,18(5):398-405.

[32] 沈海龙,高翔翔,杨玲. 甘露醇、蔗糖和低温预处理对花楸体细胞胚诱导的影响[J]. 植物生理学通讯, 2008,44(4):677-681.

CHEN H L,GAO X X,YANG L. Effects of mannitol, sucrose and cold pretreatment on somatic embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl [J]. *Plant Physiology Communications*, 2008,44(4):677-681 (in Chinese with English abstract).

High Frequency of Embryogenesis and Germination to Seedling in Alfalfa and Its Application in Transgenic Research

WEN Zhiyu¹,DONG Fushuang¹,ZHANG Huaning¹,
YANG Ruijuan^{1,2} and ZHANG Yanmin¹

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China; 2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract The objective of this study was to establish the technique for high efficient embryogenesis and seedling development using cotyledons or leaves from aseptic seedlings as explants, which will provide a technical support for genetic improvement of tolerance to abiotic stresses in alfalfa (*Medicago sativa*). The effects of different medium ingredients on callus induction, embryogenetic induction, maturation, and germination were compared. The technique for high-frequency of embryogenesis included induction of callus on SHDK medium, induction of embryos on MB(−/+)+0.4 mg/L ABA+50 g/L PEG-6000+50 g/L sucrose, growth of embryos on Bio2Y medium, and development of seedling on 1/2 MS(or SH) medium. Under the optimal conditions, about 77.9 healthy embryos that formed seedlings were produced per gram of callus. The seedlings regenerated were grown in a growth chamber at 20 °C with a photoperiod of 16 h light and 8 h dark for two weeks prior to transplanting to a greenhouse, and the survival rate was over 90%. This technique was successfully used in the transformation of *PPA* gene into alfalfa and the transgenic alfalfa with resistance to aphid was obtained.

Key words *Medicago sativa* L; Somatic embryogenesis; In vitro regeneration; Transgene

Received 2016-03-18 **Returned** 2016-04-19

Foundation item The Natural Science Foundation of Hebei Province, China(No. C2013301033).

First author WEN Zhiyu, male, associate research fellow. Research area: crop resources innovation. E-mail: wzy1800@126.com

Corresponding author ZHANG Yanmin, female, research fellow. Research area: tissue culture and transgenic technology. E-mail: zhym63@163.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor:GU Yulan)