

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2021.06.025

# 红豆草组织培养及植株再生体系的优化

康红霞<sup>#</sup>, 朱永红<sup>#</sup>, 赵 萌, 贾 姝, 伍国强<sup>\*</sup>

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:**以红豆草(*Onobrychis viciifolia* Scop.) 无菌苗的上胚轴、真叶和下胚轴为外植体, 根据正交试验设计方法, 研究不同植物激素对红豆草组织培养及植株再生体系的影响。结果表明: 激素对愈伤诱导的影响程度为萘乙酸(Naphthylacetic acid, NAA) > 玉米素(Zeatin, ZT) > 6-苄氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA), 诱导外植体产生愈伤组织的最佳培养基为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> ZT, 诱导率达 94.5%; 对不定芽分化率的影响程度为 NAA > 6-BA > ZT, 诱导愈伤组织分化不定芽的最佳培养基为 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT, 诱导率达 88.9%; 诱导不定芽生根的最佳培养基为 1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 吲哚丁酸钾(Indole-3-butyric acid potassium, IBA-K), 诱导率高达 45%。

**关键词:** 红豆草; 正交试验法; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: S813.1+2

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2021)06-1336-07

## Optimization of Plant Regeneration System and A Callus Induction of Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.)

KANG Hong-xia<sup>#</sup>, ZHU Yong-hong<sup>#</sup>, ZHAO Meng, JIA Shu, WU Guo-qiang<sup>\*</sup>

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, Gansu Province 730050, China)

**Abstract:** Taking the epicotyl, cotyledon, and hypocotyl of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) seedlings as explants, the effects of different plant hormones on tissue culture and plant regeneration system of sainfoin were studied using orthogonal design method. The results showed that, the influence degree of hormone on callus induction was NAA > ZT > 6-BA, and the best medium for inducing explants to produce callus was MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> ZT with the induction rate of 94.5%; Results of bud differentiation showed that the influence sequence of three factors was NAA > 6-BA > ZT, MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT was the optimum induction medium and adventitious shoots induction rate could reach 88.9%; The optimal medium combination to induce adventitious shoot rooting was 1/2 MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA-K, and the induction rate was up to 45%.

**Key words:** Sainfoin; Orthogonal experimental design; Callus tissue; Plant regeneration

红豆草(*Onobrychis viciifolia* Scop.) 是一种多年生、异花授粉的四倍体豆科牧草, 又名驴食草, 原产于欧洲和前苏联亚洲部分, 在中国新疆天山和阿尔泰山北麓有野生种分布。20 世纪 50 年代以来, 我国先后从前苏联、匈牙利等国家引进红豆草, 最初主要在甘肃省中部干旱半干旱区推广种植, 随后在青海、宁夏等省(区) 也有大量栽培。红豆草根系发达, 根部有根瘤, 有生物固氮能力, 可提高土壤肥力<sup>[1]</sup>; 营养丰富, 含有大量缩合单宁, 牲畜喜食且

不得膨胀病, 被誉为“牧草皇后”<sup>[2]</sup>。但由于红豆草对盐碱环境较为敏感, 其产量和品质无法满足草地畜牧业日益增加的需求<sup>[3-5]</sup>。因此, 需要通过生物技术等手段来改良红豆草的抗逆性。

红豆草组织培养体系的研究开展较早, 上世纪 80 年代张谦和郑国锴<sup>[6]</sup> 以子叶、下胚轴和根为外植体诱导出愈伤组织, 并获得少量再生植株。此后, 国内外学者对红豆草再生体系做了较多的研究<sup>[7-13]</sup>。然而, 由于红豆草外植体(真叶、上胚

收稿日期: 2020-12-08; 修回日期: 2021-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860404) 资助

作者简介: <sup>#</sup> 康红霞(1995-), 女, 甘肃临夏人, 硕士研究生, 主要从事植物抗逆基因工程研究, E-mail: k18394031216@163.com; <sup>#</sup> 朱永红(1992-), 男, 甘肃陇西人, 硕士研究生, 主要从事植物抗逆基因工程研究, E-mail: kanghuanjiayuan@163.com; <sup>\*</sup> 通信作者 Author for correspondence, E-mail: wugq08@126.com

轴、下胚轴等)很难形成愈伤组织,即使少量外植体能形成愈伤组织,也很难分化和生根<sup>[13]</sup>,限制了红豆草的遗传改良和分子育种进程。因此,建立和优化红豆草的高效组织培养及植株再生体系仍具有重要的现实意义。正交设计是一种高效、快速和经济的试验方法<sup>[14]</sup>,不但可以优化培养基,还可以确定再生体系中各阶段的主因素。张龙等<sup>[15]</sup>采用正交试验法对豆科牧草柱花草(*Stylosanthes guianensis*)愈伤组织的诱导和分化培养基进行优化研究,建立了高效的组织培养体系。目前,利用正交设计法建立和优化红豆草的高效组培及植株再生体系却鲜有报道。

因此,本研究采用正交试验设计法,探究不同激素组合的培养基对红豆草愈伤组织诱导及分化的影响,以期建立一种高效的组培及植株再生体系,为红豆草的遗传改良和生物育种奠定可靠基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为‘甘肃’红豆草(*O. vicifolia* Scop. ‘Gansu’),种子购自兰州农丰种苗科技有限公司,产地为甘肃省静宁县,采集时间为2015年8月。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌苗培养** 选取籽粒饱满、大小均匀的种子,剥去种荚后,剔除破损、发霉和发黑的种子,将挑选出的色泽光亮的种子在冰箱4℃冷藏1d。用蒸馏水清洗后,在超净工作台上先用75%乙醇震荡消毒30~60s,再用3%NaClO溶液消毒8~14min,无菌水清洗3~5次;然后用无菌滤纸吸干种子表面残余水分后接种于含有MS培养基的培养瓶中,每

瓶接种7粒种子,在人工气候培养箱中培养,条件为昼夜温度25℃/18℃,光周期16h·d<sup>-1</sup>,光照强度1800Lx,光照培养5~7d,获得无菌苗(图1a)。

**1.2.2 愈伤组织的诱导** 将5~7d龄的红豆草无菌苗外植体(上胚轴、真叶和下胚轴)接种到愈伤组织诱导培养基上。愈伤组织诱导采用3因素5水平的正交试验设计,以MS为基本培养基,添加细胞分裂素6-BA(0,0.2,0.5,1.0和2.5mg·L<sup>-1</sup>)和ZT(0,0.2,0.5,1.0和2.5mg·L<sup>-1</sup>)、生长素NAA(0,0.2,0.5,1.0和2.5mg·L<sup>-1</sup>)各5水平(表1)。共25组实验,每组重复3次,每个培养皿接种7个外植体。愈伤组织诱导率作为评价指标。黑暗培养3~5d,待外植体的切痕边缘出现膨大后开始光照培养(16h·d<sup>-1</sup>,光照强度1800Lx),7d后开始出现愈伤组织(图1b)。每隔14d继代一次,30d后统计愈伤组织诱导率。

$$\text{外植体愈伤组织诱导率(\%)} = \frac{\text{(产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数)}}{\times 100\%}$$

**1.2.3 不定芽诱导** 选择质地松软、生长状况良好的愈伤组织,切成约1cm<sup>3</sup>的小块,然后接种到不同激素配比的分化培养基中。不定芽诱导采用3因素5水平的正交试验设计,以MS为基本培养基,添加6-BA(0,0.2,0.5,1.0和2.5mg·L<sup>-1</sup>)和ZT(0,0.2,0.5,1.0和2.5mg·L<sup>-1</sup>)、NAA(0,0.2,0.5,1.0和2.5mg·L<sup>-1</sup>)各5水平(表1)。共25组实验,每组重复3次,每瓶接种4块愈伤组织。培养10d后在一些组织结构比较松散的愈伤组织上出现较深绿色的突出,继续培养3~5d,这些突出的愈伤组织就会发展成不定芽(图1c-e),然后统计不定芽诱导率。愈伤组织的不定芽诱导率(\%) = (产生不定芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数)×100%。

表1 诱导愈伤组织的正交试验设计因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments on callus induction

| 因子水平 Levels of factors | 因素 Factors                      |                            |                           |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                        | 6-苄氨基嘌呤 6-BA/mg·L <sup>-1</sup> | 萘乙酸 NAA/mg·L <sup>-1</sup> | 玉米素 ZT/mg·L <sup>-1</sup> |
| 1                      | 0.0                             | 0.0                        | 0.0                       |
| 2                      | 0.2                             | 0.2                        | 0.2                       |
| 3                      | 0.5                             | 0.5                        | 0.5                       |
| 4                      | 1.0                             | 1.0                        | 1.0                       |
| 5                      | 2.5                             | 2.5                        | 2.5                       |

**1.2.4 试管苗生根培养** 当不定芽长出3~5片真叶时,将其切下接种到生根培养基中(图1f,g),进行生根诱导。以1/2MS为基本培养基,添加NAA(0,0.5mg·L<sup>-1</sup>)和IBA-K(0,0.2mg·L<sup>-1</sup>)。每个处理30瓶,重复3次,每瓶接种1个不定芽。15

d后观察生根情况,统计生根率。

**1.2.5 炼苗** 幼苗生根后继续培养2周,选取根系完整,株高3~4cm的试管苗(图1h,i),洗净根部残留的培养基,然后移栽到装有已消毒的蛭石和营养土1:1体积比例混合的花盆中,将花

盆用保鲜膜覆盖。花盆装盘,每隔 2 d 浇一次水,保持湿润,置于培养室培养 3 周左右以适应环境,随后逐渐移除保鲜膜直至植株完全暴露到环境中。

### 1.3 数据分析

采用 Excel 软件对所测数据进行统计分析,用平均值和标准误表示测定结果。用 SPSS 17.0 对结果进行方差分析和极差分析。

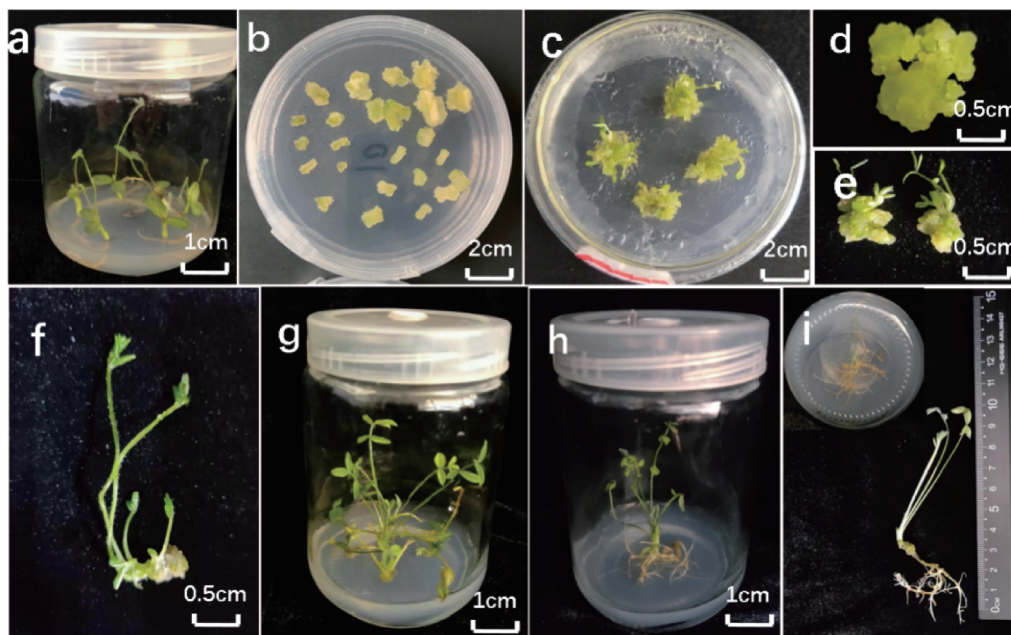


图 1 红豆草愈伤组织诱导、生根及再生苗

Fig.1 Callus induction,rooting culture,and regenerationplant of sainfoin

注:a 表示实生无菌苗;b 表示愈伤组织诱导;c 表示不定芽分化;d 表示继代培养后的愈伤组织;e 表示分离出的长出 2~3 叶的不定芽苗;f 表示生根诱导前生长出 3~5 叶的不定芽;g 表示生根培养;h 表示再生植株;i 表示再生植株的底部视图和长度测量

Note:a is Aseptic seedlings;b is Callus induction;c is Adventitious bud differentiation;d is Isolated Callus after subculture;e is Isolated adventitious shoots with 2~3 leaves;f is Adventitious bud before rooting with 3~5 leaves;g is Rooting culture;h is Regeneration plant;i is Bottom view and length of regenerated plants

## 2 结果与分析

### 2.1 外源激素对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知,25 个实验处理组都成功诱导出愈伤组织,但是诱导率却存在明显差异。在无激素添加的 MS 培养基中愈伤组织诱导率(上胚轴 17.50%、真叶 12.25%和下胚轴 28.00%)明显低于其他添加激素的培养基。其中对红豆草上胚轴愈伤组织诱导效率最高的激素组合是 MS+0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg · L<sup>-1</sup> ZT,诱导效率高达 94.25%;对真叶愈伤组织诱导效率最高的激素组合是 MS+0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg · L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg · L<sup>-1</sup> ZT,诱导率达到 94.5%;对下胚轴愈伤组织诱导效率最高的激素组合是 MS+0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA+2.5 mg · L<sup>-1</sup> ZT,愈伤组织诱导率达 91.75%。

通过方差分析可知(表 3),以上胚轴和下胚轴为外植体诱导愈伤组织时,NAA 对红豆草愈伤组织的诱导作用存在极显著差异( $P < 0.01$ ),其他 2

种激素的影响较小;以真叶为外植体时,NAA 对红豆草愈伤组织的诱导作用存在显著性差异( $P < 0.05$ )。3 个影响因素的主次关系是:NAA>ZT>6-BA。由表 4 可知, $K_n$  为该因素在  $n$  水平下所产生的平均效应值(在此处为愈伤组织的诱导率); $R$  为该因素在不同水平下的极差,即该因素在不同水平下的最大值与最小值之差  $|X_{max} - X_{mix}|$ , $R$  的大小反映了该因素对试验结果的影响大小。极差分析结果表明,3 种植物激素对红豆草上胚轴、真叶和下胚轴 3 种外植体愈伤组织诱导率的作用效果不同,其中 NAA 的影响最大,其次为 ZT 和 6-BA。水平优选后可得出诱导红豆草上胚轴产生愈伤组织的最佳浓度组合为 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg · L<sup>-1</sup> ZT;诱导红豆草真叶产生愈伤组织的最佳浓度组合为 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA+2.5 mg · L<sup>-1</sup> ZT;诱导红豆草下胚轴产生愈伤组织的最佳浓度组合为 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg · L<sup>-1</sup> ZT。

表 2 不同处理对红豆草愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

Table 2 Effects of different hormone treatments on callus induced and induction of adventitious bud in callus of sainfoin

| 培养基<br>Medium | 激素处理 Hormone treatments/mg · L <sup>-1</sup> |     |     | 诱导率 Induction rate/%         |                             |                             |                         |
|---------------|--|-----|-----|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|               | 6-BA   | NAA | ZT  | 上胚轴愈伤组织<br>Epicotyl callus   | 真叶愈伤组织<br>Euphylla callus   | 下胚轴愈伤组织<br>Hypocotyl callus | 不定芽<br>Adventitious bud |
| 1             | 0.0  | 0.0 | 0.0 | 17.50±5.19 <sup>f</sup>      | 12.25±0.75 <sup>e</sup>     | 28.00±8.57 <sup>e</sup>     | 5.76±0.36 <sup>f</sup>  |
| 2             | 0.0  | 0.2 | 0.2 | 69.50±12.79 <sup>abcde</sup> | 71.00±16.54 <sup>abcd</sup> | 87.75±2.32 <sup>a</sup>     | 33.62±0.97 <sup>c</sup> |
| 3             | 0.0  | 0.5 | 0.5 | 87.75±5.11 <sup>abc</sup>    | 69.00±7.76 <sup>abcd</sup>  | 87.00±0.41 <sup>a</sup>     | 11.86±0.48 <sup>e</sup> |
| 4             | 0.0  | 1.0 | 1.0 | 72.25±9.94 <sup>abcde</sup>  | 94.50±3.18 <sup>a</sup>     | 81.00±9.94 <sup>ab</sup>    | 11.07±0.63 <sup>e</sup> |
| 5             | 0.0  | 2.5 | 2.5 | 86.25±8.00 <sup>abc</sup>    | 90.25±3.75 <sup>ab</sup>    | 85.75±6.14 <sup>a</sup>     | 22.12±0.47 <sup>d</sup> |
| 6             | 0.2  | 0.0 | 0.2 | 53.25±12.99 <sup>cde</sup>   | 67.75±19.50 <sup>abcd</sup> | 62.75±9.32 <sup>bcd</sup>   | 22.42±0.60 <sup>d</sup> |
| 7             | 0.2  | 0.2 | 0.5 | 56.75±5.95 <sup>bcde</sup>   | 68.25±11.45 <sup>abcd</sup> | 83.23±5.44 <sup>a</sup>     | 5.58±0.30 <sup>f</sup>  |
| 8             | 0.2  | 0.5 | 1.0 | 80.75±8.25 <sup>abcd</sup>   | 72.50±9.91 <sup>abcd</sup>  | 90.50±3.57 <sup>a</sup>     | 11.50±0.47 <sup>e</sup> |
| 9             | 0.2  | 1.0 | 2.5 | 83.75±2.96 <sup>abc</sup>    | 81.50±10.87 <sup>abcd</sup> | 87.75±5.69 <sup>a</sup>     | 10.98±0.84 <sup>e</sup> |
| 10            | 0.2  | 2.5 | 0.0 | 89.25±3.73 <sup>ab</sup>     | 83.75±2.25 <sup>ab</sup>    | 85.50±7.62 <sup>a</sup>     | 5.80±0.58 <sup>f</sup>  |
| 11            | 0.5  | 0.0 | 0.5 | 44.00±2.45 <sup>ef</sup>     | 54.75±3.88 <sup>cd</sup>    | 50.75±2.25 <sup>d</sup>     | 88.90±0.63 <sup>a</sup> |
| 12            | 0.5  | 0.2 | 1.0 | 61.50±13.72 <sup>abcde</sup> | 53.00±8.26 <sup>d</sup>     | 77.75±10.18 <sup>ab</sup>   | 22.12±0.47 <sup>d</sup> |
| 13            | 0.5  | 0.5 | 2.5 | 63.75±6.70 <sup>abcde</sup>  | 74.25±10.15 <sup>abcd</sup> | 91.75±2.84 <sup>a</sup>     | 33.48±0.54 <sup>c</sup> |
| 14            | 0.5  | 1.0 | 0.0 | 80.75±9.18 <sup>abcd</sup>   | 78.50±6.01 <sup>abcd</sup>  | 91.25±1.25 <sup>a</sup>     | 22.43±0.81 <sup>d</sup> |
| 15            | 0.5  | 2.5 | 0.2 | 94.25±2.25 <sup>a</sup>      | 90.00±1.23 <sup>ab</sup>    | 88.25±1.44 <sup>a</sup>     | 11.50±0.47 <sup>e</sup> |
| 16            | 1.0  | 0.0 | 1.0 | 54.75±15.45 <sup>bcde</sup>  | 75.75±7.08 <sup>abcd</sup>  | 76.00±5.35 <sup>abc</sup>   | 22.13±0.44 <sup>d</sup> |
| 17            | 1.0  | 0.2 | 2.5 | 71.00±11.21 <sup>abcde</sup> | 82.75±6.13 <sup>abc</sup>   | 91.00±0.82 <sup>a</sup>     | 33.47±0.89 <sup>c</sup> |
| 18            | 1.0  | 0.5 | 0.0 | 72.00±7.95 <sup>abcde</sup>  | 69.50±4.27 <sup>abcd</sup>  | 86.75±2.96 <sup>a</sup>     | 22.11±1.08 <sup>d</sup> |
| 19            | 1.0  | 1.0 | 0.2 | 66.75±10.23 <sup>abcde</sup> | 78.75±6.56 <sup>abcd</sup>  | 84.50±4.94 <sup>a</sup>     | 11.27±0.69 <sup>e</sup> |
| 20            | 1.0  | 2.5 | 0.5 | 62.75±15.26 <sup>abcde</sup> | 73.25±8.97 <sup>abcd</sup>  | 84.00±7.04 <sup>a</sup>     | 11.11±0.51 <sup>e</sup> |
| 21            | 2.5  | 0.0 | 2.5 | 46.25±11.09 <sup>def</sup>   | 62.75±4.55 <sup>bcd</sup>   | 57.75±16.50 <sup>cd</sup>   | 55.51±0.43 <sup>b</sup> |
| 22            | 2.5  | 0.2 | 0.0 | 59.00±12.70 <sup>bcde</sup>  | 75.50±7.22 <sup>abcd</sup>  | 78.75±7.80 <sup>ab</sup>    | 21.70±0.67 <sup>d</sup> |
| 23            | 2.5  | 0.5 | 0.2 | 79.50±6.04 <sup>abcd</sup>   | 74.75±6.24 <sup>abcd</sup>  | 90.75±1.25 <sup>a</sup>     | 22.36±2.54 <sup>d</sup> |
| 24            | 2.5  | 1.0 | 0.5 | 78.00±11.34 <sup>abcde</sup> | 67.00±2.83 <sup>abcd</sup>  | 86.00±1.41 <sup>a</sup>     | 11.04±0.85 <sup>e</sup> |
| 25            | 2.5  | 2.5 | 1.0 | 71.75±17.36 <sup>abcde</sup> | 70.75±8.88 <sup>abcd</sup>  | 85.50±2.40 <sup>a</sup>     | 11.37±1.10 <sup>e</sup> |

注: 同列不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different letters represent significant differences at the 0.05 levels in the same column

表 3 红豆草愈伤组织诱导结果方差分析

Table 3 Variance analysis of calls induction results in sainfoin

| 外植体 Explants  | 变量 Variable | 第二类平方和 Type II SS | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F 值 F value | P 值 P value |
|---------------|-------------|-------------------|-----------------------|----------------|-------------|-------------|
| 上胚轴 Epicotyl  | 6-BA        | 0.016             | 4                     | 0.004          | 0.257       | 0.900       |
|               | NAA         | 0.460             | 4                     | 0.115          | 7.495**     | 0.003       |
|               | ZT          | 0.026             | 4                     | 0.006          | 0.421       | 0.791       |
|               | 误差 Error    | 0.460             | 12                    | 0.015          |             |             |
| 真叶 Euphylla   | 6-BA        | 0.026             | 4                     | 0.006          | 0.394       | 0.809       |
|               | NAA         | 0.278             | 4                     | 0.070          | 4.234*      | 0.023       |
|               | ZT          | 0.147             | 4                     | 0.037          | 2.243       | 0.125       |
|               | 误差 Error    | 0.184             | 12                    | 0.016          |             |             |
| 下胚轴 Hypocotyl | 6-BA        | 0.171             | 4                     | 0.008          | 2.193       | 0.364       |
|               | NAA         | 0.209             | 4                     | 0.052          | 2.688**     | 0.000       |
|               | ZT          | 0.152             | 4                     | 0.039          | 1.947       | 0.235       |
|               | 误差 Error    | 0.233             | 12                    | 0.006          |             |             |

注: \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: \*\* means significant correlation at the 0.01 level; \* means significant correlation at the 0.05 level

表 4 红豆草组织培养正交试验结果的极差分析

Table 4 Range analysis of orthogonal test results intissue culture of sainfoin

| Kn                   | 上胚轴 Epicotyl |       |       | 真叶 Euphylla |       |       | 下胚轴 Hypocotyl |       |       | 不定芽 Adventitious |       |       |
|----------------------|--------------|-------|-------|-------------|-------|-------|---------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
|                      | 6-BA         | NAA   | ZT    | 6-BA        | NAA   | ZT    | 6-BA          | NAA   | ZT    | 6-BA             | NAA   | ZT    |
| K <sub>0.0</sub>     | 66.54        | 43.16 | 63.60 | 67.22       | 54.47 | 63.66 | 73.83         | 54.91 | 73.86 | 16.67            | 38.89 | 15.56 |
| K <sub>0.2</sub>     | 72.62        | 63.39 | 72.61 | 74.61       | 69.92 | 76.31 | 81.76         | 83.55 | 82.72 | 11.11            | 23.33 | 20.00 |
| K <sub>0.5</sub>     | 68.87        | 76.59 | 65.85 | 69.91       | 71.95 | 66.15 | 79.86         | 89.14 | 77.87 | 35.56            | 20.00 | 25.56 |
| K <sub>1.0</sub>     | 65.37        | 76.20 | 68.10 | 75.86       | 79.78 | 73.19 | 82.32         | 85.99 | 82.19 | 20.00            | 13.33 | 15.55 |
| K <sub>2.5</sub>     | 66.84        | 80.91 | 70.88 | 69.92       | 81.40 | 78.21 | 79.54         | 85.83 | 82.67 | 24.44            | 12.24 | 31.11 |
| 极差 R                 | 7.29         | 37.35 | 9.01  | 8.64        | 26.93 | 14.55 | 8.49          | 34.23 | 8.86  | 24.45            | 26.65 | 15.56 |
| 因素主次 Factor priority | NAA>ZT>6-BA  |       |       | NAA>ZT>6-BA |       |       | NAA>ZT>6-BA   |       |       | NAA>6-BA>ZT      |       |       |
| 最优方案 Best program    | 0.2          | 2.5   | 1.0   | 1.0         | 2.5   | 2.5   | 1.0           | 0.5   | 0.2   | 0.5              | 0     | 2.5   |

## 2.2 外源激素对愈伤组织分化不定芽的影响

由表 2 可知,不定芽诱导阶段,在没有添加激素的培养基中不定芽分化率仅 5.76%,明显低于添加激素的培养基。方差分析结果表明(表 5),NAA,6-BA 及 ZT 对红豆草不定芽分化率的影响无显著性差异。从表 4 极差分析可知,3 种植物激素对红豆草愈伤组织分化不定芽的诱导

影响大小顺序为 NAA>6-BA>ZT。尽管 NAA 对不定芽的诱导影响最大,但随着 NAA 浓度的增加,不定芽的诱导率反而呈逐渐下降趋势,表明高浓度 NAA 对红豆草不定芽诱导有抑制作用。水平优选后即可得出适宜红豆草不定芽分化的培养基是 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT。

表 5 红豆草不定芽分化结果方差分析

Table 5 Variance analysis of adventitious bud differentiation results in sainfoin

| 变量 Variable | 第二类平方和 Type II SS | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F 值 F value | P 值 P value |
|-------------|-------------------|-----------------------|----------------|-------------|-------------|
| 6-BA        | 0.030             | 4                     | 0.043          | 1.190       | 0.131       |
| NAA         | 0.396             | 4                     | 0.099          | 15.530      | 0.083       |
| ZT          | 0.041             | 4                     | 0.010          | 1.610       | 0.167       |
| 误差 Error    | 0.184             | 12                    | 0.019          |             |             |

## 2.3 不同培养基对生根的影响

愈伤组织分化的不定芽由愈伤组织提供营养物质逐渐长成幼苗,但由于其主要营养物质由愈伤组织提供,故而再生幼苗没有出现根组织。由表 6 可知,不同处理中的生根率存在差异,在没有添加植物激素的 1/2 MS 和 1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 培养基上没有生根。添加 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA-K 的培养

基上虽然有根形成,但是生根率很低(5%)。同时添加低浓度的 NAA (0.5 mg·L<sup>-1</sup>) 和 IBA-K (0.2 mg·L<sup>-1</sup>) 时,培养 10 d 左右即可形成完整根系,且根长而多(图 1 h)。由此可见,本试验中适宜红豆草生根的最佳培养基为 1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA-K,生根率高达 45% (表 6)。

表 6 不同生根培养基上的生根效果

Table 6 Rooting effects on the different rooting media

| 生根培养基 Rooting media  | 生根率 Rooting rate/% | 生长情况 Growing status           |
|--|--------------------|-------------------------------|
| 1/2 MS   | 0                  | 没有根生成 No root generation      |
| 1/2 MS+0.5 mg·L <sup>-1</sup> NAA                              | 0                  | 没有根生成 No root generation      |
| 1/2 MS+0.2 mg·L <sup>-1</sup> IBA-K                            | 5                  | 生根率低 Low rooting rate         |
| 1/2 MS+0.5 mg·L <sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L <sup>-1</sup> IBA-K | 45                 | 生根,生长良好 Rooting, growing well |

## 3 讨论与结论

无菌操作是植物组织培养的基本要求<sup>[16-18]</sup>,对种子消毒可以很大程度上降低其染菌率<sup>[19]</sup>。因此本试验使用乙醇和 NaClO 溶液对红豆草种子消毒,可以保证外植体具有良好的生理状态。在植物组织培养过程中,植物细胞受到生理、生化等多种因素的

影响,其中生长调节剂是最关键的限制因素之一<sup>[32]</sup>。调节激素种类和水平,可以很大程度上优化组培体系。实践证明,将正交设计应用于植物组织培养,一方面能够用最少的处理得到最佳的组合,另一方面可以确定组织培养各个阶段的关键因素<sup>[20]</sup>。本研究采用正交设计试验优化红豆草组织培养最佳条件,试图建立一套高效的组培和植株再生体系。

提高红豆草愈伤组织诱导率是优化其再生体系的第一步。细胞分裂素和生长素是愈伤组织诱导及分化过程中最常用的两种激素。细胞分裂素可使植物细胞分裂并诱导芽的萌发和生长<sup>[21]</sup>;生长素可促进植物细胞伸长和根系分化<sup>[22]</sup>。已有研究表明,NAA和6-BA是诱导红豆草愈伤组织应用最多的外源激素<sup>[10-13]</sup>。在红豆草愈伤组织诱导过程中3种激素对上胚轴、真叶和下胚轴等外植体的愈伤组织诱导影响大小顺序为:NAA > ZT > 6-BA,说明NAA是红豆草愈伤组织诱导阶段最重要的激素,这与李辉<sup>[23]</sup>以红豆草下胚轴为外植体研究结果一致。在本研究中,以下胚轴为外植体时低浓度NAA更利于愈伤组织的诱导,这说明不同外植体对NAA的敏感程度不同。6-BA不是愈伤组织诱导过程中的主要因素,对愈伤组织诱导作用较小,一般与其他生长素配合使用,可以提高愈伤组织的质量和诱导率<sup>[24]</sup>。

愈伤组织只有转入到生长素含量很低或完全没有生长素的培养基上,才能发育为成熟的体细胞胚并形成植株,而细胞分裂素可以促进愈伤组织向再生植株的方向发展<sup>[25-27]</sup>。在本研究中,诱导红豆草愈伤组织再分化为不定芽时,适当浓度6-BA对红豆草不定芽分化有促进作用,这可能是由于6-BA能够改善植物细胞内源性生长素和细胞分裂素的比例,调节细胞生理生化状态,有利于愈伤组织的诱导,从而增加分化频率<sup>[28]</sup>。高浓度ZT使不定芽的诱导率明显提高,与张文学等<sup>[29]</sup>和刘君等<sup>[30]</sup>研究结果一致。本研究结果表明,随着NAA浓度增加,不定芽诱导率呈逐渐下降趋势,这与木台塔尔·阿布力克木和杨苗萌<sup>[11]</sup>对甘肃红豆草组织培养的研究结果一致。在本研究中,红豆草不定芽分化的最佳培养基是MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT。该配方与云雅聪<sup>[31]</sup>研究蒙农红豆草不定芽诱导培养基配方有一定的差异,体现在NAA的用量上,不添加NAA对甘肃红豆草不定芽诱导有利,说明甘肃红豆草和蒙农红豆草在组织培养过程中对激素的适应能力有差别。

植物组织培养技术应用生产中,试管苗的生根质量是影响其移栽成活率的重要因子。在生根培养中合理添加植物生长激素可以促进根的形成,提高组培苗的生根率<sup>[32]</sup>。研究表明,IBA诱导形成的不定根细而长,NAA诱导形成的不定根短而粗<sup>[33-34]</sup>。因此本试验研究了NAA和IBA-K的配合使用对红豆草生根率的影响。结果表明只添加了IBA-K

的培养基中虽然有根生成,但生根率低,仅有5%。只添加了NAA的培养基中没有根生成,这与杨苗萌等<sup>[10]</sup>研究‘顿河’红豆草的结果有一定差异;结论不一致的原因可能是红豆草品种不同,也可能是NAA设置的浓度不同。在本研究中,用1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA-K组合浓度培养的红豆草根系多且发达,与已报道的IBA和NAA能够诱导试管苗生根的结论一致<sup>[35-37]</sup>。

本研究为红豆草愈伤组织诱导和植株再生提供了一个高效方案,即红豆草愈伤组织诱导培养基以MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> ZT为最优;不定芽分化的培养基以MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+2.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT为最优;不定芽转至1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA-K,生根效果最好,生根率为45%。

## 参考文献

- [1] Okcu M, Topaloglu F N. Effect of different gibberellic acid doses treatment on seed germination of wild sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) [J]. Fresenius Environmental Bulletin, 2019, 28: 1062-1068
- [2] Mohajer S, Taha R M, Lay M M, et al. Stimulatory effects of gamma irradiation on phytochemical properties, mitotic behaviour, and nutritional composition of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) [J]. The Scientific World Journal, 2014, 23(7): 1-9
- [3] 伍国强, 李辉, 雷彩荣, 等. 添加KCl对高盐胁迫下红豆草生长及生理特性的影响[J]. 草业学报, 2019, 28(6): 45-55
- [4] 伍国强, 贾妹, 刘海龙, 等. 盐胁迫对红豆草幼苗生长和离子积累及分配的影响[J]. 草业科学, 2017, 34(8): 1661-1668
- [5] Häring D A, Scharenberg A, Heckendorn F, et al. Tanniferous forage plants: Agronomic performance, palatability and efficacy against parasitic nematodes in sheep [J]. Renewable Agriculture and Food Systems, 2008, 23(1): 19-29
- [6] 张谦, 郑国锡. 红豆草的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1985, 2: 44-45
- [7] Garshashi H, Omidi M, Torabi S, et al. The study of phytohormones and explants on callus induction and regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa*) [J]. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 2012, 49(3): 289-292
- [8] Saglam S. Growth Regulators Effects on *in vitro* shoot regeneration of sainfoin (*Onobrychis Sativa* Lam.) [J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2010, 24(4): 2077-2079
- [9] Yildiz M, Ekiz H. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and regeneration capacity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hypocotyl explants [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2014, 94(7): 1161-1164
- [10] 杨苗萌, 古丽尼沙, 木克热木, 等. 顿河红豆草下胚轴培养及其植株再生[J]. 中国草地学报, 1998(5): 18-20, 25

- [11] 木合塔尔·阿布力克木,杨苗萌. NAA, BAP 对甘肃红豆草愈伤组织诱导和体细胞胚发生的影响[J]. 中国草地学报, 2000, 4:28-30
- [12] 张谦, 郑国辑. 不同品种红豆草的组织培养与植株再生[J]. 兰州大学学报, 1995, 31(4):145-149
- [13] 刘瑞凝, 杜中. 红豆草不同外植体愈伤组织的植株再生[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(1):39-43
- [14] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 等. 正交试验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9):52-55
- [15] 张龙, 丁西朋, 严林玲, 等. 8 种柱花草属牧草 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 草业科学, 2014, 31(2):232-232
- [16] Teshome S, Feyissa T. *In vitro* callus induction and shoot regeneration from leaf explants of *Glinus lotoides* (L.) — an important medicinal plant [J]. American Journal of Plant Sciences, 2015(6):1329-1340
- [17] Dang Z, Qin X, Wang Y. Callus induction and proliferation in the endemic recretahalophyte[J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2015, 88(2):267-274
- [18] Seran T H. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through direct organogenesis; a review[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2013, 16(24):1826-1835
- [19] 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
- [20] 赵培霞, 王雷. 野生甘蒙锦鸡儿的组织培养研究[J]. 草地学报, 2019, 27(4):56-62
- [21] 王冬梅, 黄学林. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学报, 1996(5):373-377
- [22] 吕剑, 喻景权. 植物生长素的作用机制[J]. 植物生理学报, 2004, 40(5):624-628
- [23] 李辉. 红豆草耐盐碱性研究及其组培体系的建立[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019:42-43
- [24] 郭伶俐, 刘建文, 麻冬梅, 等. 不同浓度激素配比对高羊茅再生体系建立的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(3):517-525
- [25] Erfani M, Miri M, Imani A. *In vitro* shoot proliferation and rooting of garnem rootstock as influenced by basal media, plant growth regulators and carbon sources[J]. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 2017, 18(3&4):101-109
- [26] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000:1-29, 48-64
- [27] Dudits D, Bogre L, Gyorgye Y. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells[J]. Cell Science, 1991, 99(3):473-482
- [28] 刘莉, 李培英. 应用正交试验法优化新农 1 号狗牙根再生体系[J]. 草地学报, 2017, 25(3):582-589
- [29] 张文学, 印迈, 续晨, 等. 美国山核桃组织培养研究[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(11):22, 43
- [30] 刘君, 蒋鲁亚, 王君雅, 等. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及植株再生体系的优化[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2016, 36(2):59-64
- [31] 云雅聪. 不同红豆草材料愈伤组织诱导及植株再生的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016:32
- [32] 张春梅, 闫芳, 陈修斌, 等. 不同培养基、培养条件和基质对非洲菊组培苗生根及幼苗生长的影响[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2018, 32(4):81-87
- [33] 王哲之, 胡正海. IAA, IBA, NAA 和 2,4-D 对槐树试管苗生根的影响[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1997, 25(2):57-59
- [34] 陈菲, 杨春华, 刘琳, 等. 扁穗牛鞭草再生体系的建立[J]. 草地学报, 2015, 23(2):219-222
- [35] Marcelina K M, Oktawia M. The influence of IBA, IAA and NAA on rooting of *Celosia arcenteavar. cristata* (L.) kuntzein vitro culture[J]. Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis, 2016, 325(37):39-46
- [36] Gopitha K, Bhavani A L, Senthilmanickam J. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane[J]. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2010, 1(3):759-765
- [37] Abbas M S, Taha H S, Aly U I, et al. In vitro propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco) [J]. Journal of Genetic Engineering & Biotechnology, 2011, 9(2):165-172

(责任编辑 刘婷婷)