

文章编号: 1003-8701(1999)05-0016-04

大豆子叶节组织培养再生研究

刘 莉, 赵桂兰

(吉林省农科院农业生物技术重点开放实验室, 吉林 公主岭 136100)

摘 要: 本研究以合丰 25 号为材料, 子叶节为外植体诱导丛生芽, 再生完整植株。重点研究了 B5-1 培养时间及 B5-2 液体培养时间对培养物的影响, 同时也对玻璃化苗的转化进行了研究。

关键词: 大豆; 子叶节; 再生; 玻璃化苗

中图分类号: S 565.103.53

文献标识码: A

有关大豆组织培养诱导植株虽有许多实例报道, 但大多数存在一定程度的偶然性, 随着基因转移工作的开展, 子叶节组培再生体系逐渐成为常用的组培体系之一。本研究仅以组培再生能力强的合丰 25 号为供体材料, 重点对子叶节组培过程中诱导芽玻璃化这一问题进行了研究。芽玻璃化后难以长高, 最终导致再生频率下降, 影响其成为基因转化受体的效果。同时也对 6-BA 和 TDZ 两种细胞分裂素对诱导芽的效果进行了比较研究, 期望能进一步提高大豆组织培养的成功率。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为合丰 25 号大豆种子。

1.2 实验方法

1.2.1 种子消毒

用 70% 的酒精表面消毒 1 min, 再用 0.1% 氯化汞消毒 7 min, 然后再用无菌水冲洗 5 次, 最后倒入 60 mL 无菌水浸泡过夜。

1.2.2 预培养

将浸泡过夜的种子剥去种皮接种到 $1/2$ B5 ($1/2$ B5 无机 + B5 有机 + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值为 6.0) 培养基 1~2 d。接种到 $1/2$ B5 前剥去种皮可以使种子的萌发时间缩短 2~3 d, 有利于后期的芽分化。

1.2.3 芽的诱导

将已萌发的种子取出, 切下长出下胚轴的子叶节区, 留下胚轴 4 mm, 再从子叶中间纵切保留子叶, 子叶近轴面向上植入 B5-1。培养基为 B5 + 6-BA 9.9 mg/L + IBA 0.2 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值为 5.5。也可以在培养基中加入 TDZ, 浓度为 0.1 mg/L。在 $1/2$ B5-1 中培养 2~3 周。

收稿日期: 1999-04-21

作者简介: 刘莉(1977-), 女, 吉林省公主岭市人, 大专, 从事大豆花药培养及遗传转化研究。

1.2.4 液体培养

将B5-1中的培养物转入B5-2液体培养基,150 r/min,温度 $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,培养3 d,然后转入B5-2固体培养基(B5液体培养基+BA 1.1 mg/L+IBA 0.2 mg/L+3%蔗糖+0.7%琼脂,pH值为5.7)。

1.2.5 苗的分化

转入固体B5-2培养基中,每10 d转换1次新鲜培养基,转换2次后将子叶丢弃,保留外植体再转换上述培养基培养2周,直至出苗,再转入生根培养基B5-3($1/2$ B5+IBA 2.0 mg/L+0.7%琼脂,pH值为5.8)。

2 结果与分析

2.1 6-BA 与 TDZ 对芽分化的影响

TDZ近年来才被认为是一种特殊类型的细胞分裂素,在组织培养研究中表明它具有多种细胞分裂素的活性,而且比细胞分裂素的活性高得多,还可以调节植物的生长和发育,因此在本系统中加入了TDZ。

据文献报道,TDZ的作用是6-BA的100倍,在B5-1中植物激素的浓度设置为6-BA 9.9 mg/L,TDZ 0.1 mg/L,并对它们进行芽分化诱导的对比试验。

2.1.1 BA 与 TDZ 对诱导芽的作用

在附加BA或TDZ的B5-1培养基上,外植体的子叶生长情况差别不明显,但附加BA的B5-1培养基上的外植体的子叶节和下胚轴比附加TDZ的培养基的子叶节和下胚轴粗一些。附加BA的B5-1培养基上的子叶节处有丛生芽长出,而且丛生芽数平均每个外植体上有2~4个;而附加TDZ的B5-1培养基上的外植体则只有少数外植体有丛生芽长出,芽数很少,大部分的外植体只有侧芽长出。在B5-1芽诱导过程中BA的诱导率高于TDZ(图1~2)。

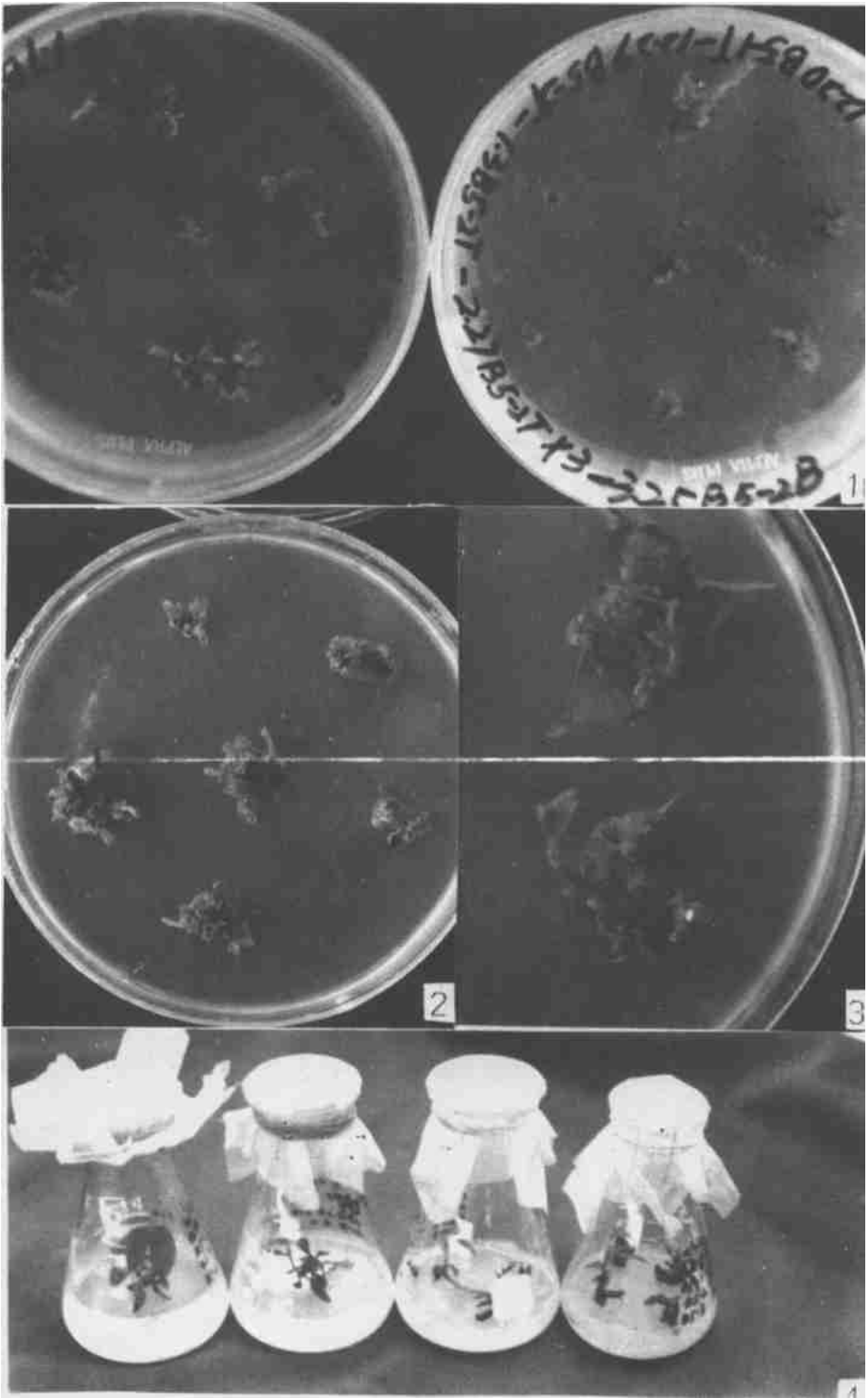
2.1.2 BA 与 TDZ 对芽分化的作用

在B5-2液体培养基悬浮培养后,附加TDZ的B5-2液体培养基中外植体玻璃化现象要比附加BA的培养基中外植体的玻璃化现象轻,但在转入B5-2固体培养基后,附加TDZ的培养基上的外植体在以后的继代培养中不再有芽产生,并在子叶节及下胚轴上长出白色的、质地较硬的愈伤,而且原有的芽也慢慢变褐,直至最后死掉。附加BA的B5-2培养基上的外植体经过多次继代,玻璃化现象逐步减轻,并且丛生芽的分化能力仍然较强,在后期的成苗率也比较高。

虽然TDZ在本系统中的表现不好,但TDZ在我们研究的大豆花药培养中的作用却很突出,所以在本试验中选择TDZ与BA做对比试验;visser等用天竺葵下胚轴作外植体,培养在含TDZ或6-BA的培养基中,TDZ的效果比6-BA的效果好的多。因此,TDZ在其它组培系统中的作用是不可忽视的。

2.2 B5-1 诱导及 B5-2 液体培养时间对外植体的影响

据文献报道,将顶芽在液体培养基里预培养5~6 d后转移到含1.5%琼脂的培养基上,对繁殖效率和苗的正常发育产生较好效果。本试验对B5-1诱导时间及B5-2液体培养时间对外植体的影响作了研究,B5-1培养诱导时间为3、5、7、10、15、20和25 d,B5-2液体培养时间为15、10、7、5、3、1和0 d。将外植体转至B5-2固体培养基10 d后,对外植体玻璃化及芽数进行了统计(表1)。



1. 6BA、TDZ 诱导芽不同效果
2. 诱导形成的玻璃化芽

3. 玻璃化芽转化成正常芽
4. 子叶节组培再生植株

表 1 B5-1 诱导及 B5-2 液体培养
时间对外植体的影响

B5-1 诱导 时间(d)	B5-2 液体培 养时间(d)	芽 数 (个)	玻璃化 程 度
3	15	8	++++
5	10	12	+++
7	7	10	++
10	5	14	++
15	3	28	+
20	1	26	+
25	0	18	-

注:玻璃化程度:一无;+较轻;++重;+++较重;
++++最重。

2.3.1 琼脂对芽玻璃化的影响

增加培养基中琼脂的含量可以提高正常苗与玻璃苗的比率,因此在试验中将 B5-2 固体培养基中琼脂含量由 0.7% 升至 2.5%。将在 B5-2 液体培养基中培养 24 h 的外植体转至固体培养基中,第 1 天玻璃化现象加重,第 5 天开始逐渐减轻,10 天后外植体的子叶节和叶片开始由水浸状的翠绿色转变成绿色,叶片上的茸毛可用肉眼看到。继代 3 次后,玻璃化现象开始逐渐消失,并且从子叶节处诱导出大量丛生芽,并且分化成苗(图片 2~3)。

2.3.2 蔗糖对芽玻璃化的影响

Debergh 等认为,在培养基中加入蔗糖提高培养基的渗透势之后,并不影响玻璃苗的比例。因此,在试验中将 B5-2 固体培养基中的蔗糖含量由 3% 降至 1.5%。在 B5-2 液体培养基中培养 24 h 的外植体转至固体培养基,第 1 天开始玻璃化现象加重,第 10 天时外植体的子叶、子叶节、叶片已成半透明状,叶片皱缩卷曲,脆弱易破碎,已有玻璃化苗的明显特征。后虽经多次继代玻璃化的症状有所减轻,但是子叶节不再产生大量丛生芽,子叶节变褐色,产生的丛生芽比较柔弱,不易成苗,成苗后苗细弱。出现这种现象可能是长期缺乏碳源,影响了子叶节及小植株的光合作用。研究表明,降低蔗糖浓度不能减轻玻璃化苗的比例,而且长期缺乏碳源对芽的伤害也比较大(图片 4)。

虽然本项研究以合丰 25 号大豆的子叶节为外植体诱导丛生芽,最后获得较高频率地再生植株,但尚需进一步扩展基因型,建立起一个完善的大豆子叶节组培体系,为更深一步的工作打下基础。

参 考 文 献

- [1] 周俊彦,马 惠,郭扶兴,等. TDZ 对乌菟莓的体细胞胚发生的作用[J]. 植物学通报,1992,9(增刊):48.
- [2] 周俊彦,郭扶兴. 苯基脲衍生物的细胞分裂素活性[J]. 植物生理学通讯,1990(4):7.
- [3] 卫志明,许智宏. 大豆顶芽组织培养植株再生的研究[J]. 植物生理学通讯,1988(3):17-20.
- [4] 何卓培,徐淑平. 大豆组织培养再生植株(简报).1991,3:67-69.
- [5] 周俊彦,郭扶兴. 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚发生中的作用[J]. 植物生理学通讯,1996,32(4):247-253.
- [6] Debergh P, Hargaoui Y and Lemeur R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynar a scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential[J]. *Physiol Plant*, 1981, 53:181-187.

在本试验体系中,在 B5-1 培养基诱导 15~20 d,在 B5-2 液体培养基培养 1~3d,诱导效果最为突出;在 B5-2 液体培养基中 1 d 外植体玻璃化程度最轻,在 B5-1 培养基中诱导 15 d 外植体丛生芽最多。所以在 B5-1 培养基诱导 15 d, B5-2 液体培养基培养 24 h 以内,玻璃化现象发生的概率最低,对芽的伤害最小,而且对以后丛生芽的产生伤害也最小,为最佳培养时间。

2.3 琼脂和蔗糖对芽玻璃化的影响