

文章编号: 1003-8701(2008)04-0007-04

花生体细胞胚发生及植株再生

刘艳芝, 韦正乙, 谭 化, 高 明

(吉林省农业科学院生物技术中心, 长春 130033)

摘 要: 以花生优良品种四粒红成熟种子胚轴为外植体, 诱导体细胞胚发生并获得了再生植株。将胚轴切成小段, 接种于附加 40 mg/L 的 MS 培养基上诱导胚性愈伤组织, 愈伤组织转移至 2, 4-D 20 mg/L 的 MS 培养基上形成体细胞胚。体细胞胚发生率达到 66.67%; 体细胞胚在 BA 浓度逐渐降低的 MS 培养基上培养, 发育成完整植株。

关键词: 花生; 愈伤组织; 体细胞胚发生

中图分类号: S665.203.53

文献标识码: A

Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in Peanut

LIU Yan-zhi, WEI Zheng-yi, TAN Hua, GAO Ming

(Biotechnology Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130124, China)

Abstract: The hypocotyls of mature seed of an eminent cultivar of peanut, 'Hongshili' were used for explants for somatic embryogenesis induction and, the regenerated plants were obtained. The hypocotyls were cut into segments and were placed on the MS medium contained 40mg/L 2,4-D to induce callus. The calli were transferred to MS medium with 20 mg/L 2,4-D for somatic embryo formation, the ratio of embryogenesis is 66.67% and the somatic embryos developed into wholly plants on the MS medium with gradually lowered concentration of BA.

Key words: Peanut; Callus; Somatic embryogenesis

花生是一种重要的油料作物, 在我国花生产量约占油料作物总产量的 1/2。福建、广东、广西等为花生主产区, 但是由于这些地区高温、高湿及生长后期常遇干旱等气候因素, 使得花生黄曲霉病等病害日益严重。近年来花生产区已经逐渐向北方转移, 吉林省气温温差大, 冬季寒冷, 夏秋季日照丰富, 出产的花生油脂含量高, 味道香, 在生长和贮存时, 无黄曲霉病发生。

利用基因工程技术将外源基因导入花生, 可以获得相应的目标性状, 高效的花生组培再生体系是遗传转化的基础。在花生组织培养过程中, 不

同外植体经激素诱导, 均可通过器官或体细胞胚发生途径再生植株, 但花生基因型对再生能力和再生率影响较大, 植株再生率也较低^[1-4], 因此建立花生主栽品种的组织培养再生体系具有重要意义。

吉林省是花生优良品种四粒红的生产基地, 种植的花生 95%以上是这个品种, 经过 20 多年的种植, 品种性状退化已经十分严重, 急需进行遗传改良。本研究以四粒红为供体材料, 通过体细胞胚发生途径获得了再生植株, 对其进一步通过基因工程改良研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为花生品种四粒红。

收稿日期: 2008-05-23

作者简介: 刘艳芝(1964-), 女, 副研究员, 主要从事牧草等作物转基因研究。

将成熟荚果去果皮，先后浸于 75%的酒精中 1 min, 0.1% HgCl_2 溶液中 10 min，进行表面消毒，之后用无菌水漂洗 4 次，用无菌水浸泡 6 h 后取出种子，接种于 MSO 培养基。

1.2 培养基

花生无菌苗生长，体细胞胚发生及植株再生所用培养基见表 1。

表 1 花生体细胞胚发生培养基

培养基	成 分 (pH5.8)
MSO 培养基	MS+3%蔗糖+0.8%琼脂
诱导培养基 H1	MS+2, 4- D40mg/L+KT0.5mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
诱导培养基 H2	MS+2, 4- D20mg/L+KT0.5mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
分化培养基 H3	MS+BA5mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
分化培养基 H4	MS+BA2mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
分化培养基 H5	MS+BA1mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
分化培养基 H6	MS+BA0.5mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
分化培养基 H7	MS+BA0.1mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂
生根培养基 H8	MS+IBA0.2mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂

1.3 体细胞胚发生

在 MSO 培养基上培养 2 d 的种子，切掉 2 个子叶，将胚轴切成约 2 mm 大小切段，接种于 H1 培养基诱导胚性愈伤组织。培养温度 24~26℃，暗培养 3 周。将诱导形成的胚性愈伤组织转移至 H2 培养基继代培养，诱导体细胞胚发生。培养温度 24~26℃，每天 16 h 光照，光强度为 3 000 lx。

1.4 体细胞胚分化及萌发

将诱导出体细胞胚的愈伤组织转至 H3 培养基分化培养，2 周后转至 H4 培养基继代培养。没有形成体细胞胚的愈伤组织仍然用 H2 培养基继代培养。在 H4 培养基上体细胞胚逐渐长大，形成体细胞胚丛，2 周后将体细胞胚丛剥离下来转移至 H5 培养基培养，2 周再转至 H6 培养基培养。

1.5 植株再生

体细胞胚丛在 H6 培养基上，逐渐有独立的体细胞胚脱离下来，将这些独立的体细胞胚转至 H7 培养基，体细胞胚萌发。长出真叶的小苗转至 H8 培养基上，1 周左右生根，发育成完整植株。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对体细胞胚发生的影响

表 2 不同激素组合培养基对花生体细胞胚诱导的影响

培养基	接种外植体数(块)	诱导出体细胞胚外植体数(块)	体细胞胚诱导率(%)
1	36	30	83.33
2	36	27	75.00
3	36	24	66.67
4	36	24	66.67
5	36	15	41.67

试验用 5 种培养基，组成 (MS 基本培养基 +

蔗糖 5% + 琼脂 0.8%, pH5. 8) 如下:

2, 4- D 80 mg/L; 2, 4- D 40 mg/L; MS +2, 4- D 40 mg/L+ KT 0.1mg/L; 2, 4- D 40 mg/L+ KT 0.5 mg/L; 2, 4- D 40 mg/L+ KT 1.0 mg/L。

试验结果见表 2，可以看出 5 种激素组合的培养基都可以诱导体细胞胚的生成，体细胞胚的诱导需要较高水平的生长素，附加 2, 4- D 40 mg/L 和 80 mg/L 的培养基都可以获得高效率体细胞胚发生，并且附加 2, 4- D 80 mg/L 的培养基体细胞胚发生率较高，但是诱导形成的体细胞胚生长发育较慢，转到 H2 培养基上继代培养后体细胞胚膨大，只有较少部分能正常发育，分析出现这一结果是由于 2, 4- D 浓度过高所致。2, 4- D 诱导体细胞胚发生，但抑制体细胞胚发育已为胡萝卜、枸杞、三叶草，芹菜等许多植物体胚发生所证实^[5-6]。

在 2, 4- D 40 mg/L 浓度不变的前提下，体细胞胚诱导率随着 KT 浓度的增加而降低，但是诱导形成的体细胞胚质量差别较大，以附加 KT 0.5 mg/L 的培养基上体细胞胚质量最好，且每块愈伤组织上的体细胞胚数量也多。

2.2 诱导体细胞胚发生

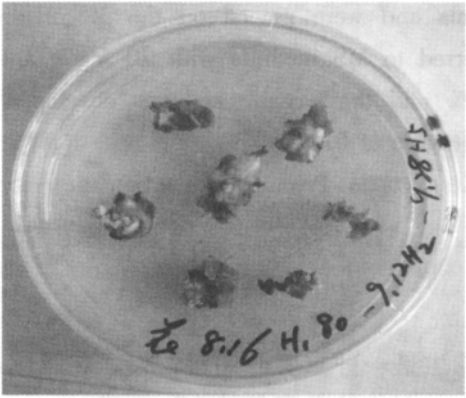


图 1 愈伤组织体细胞胚发生

外植体接种于 H1 培养基，1 周左右即有少量黄白色愈伤组织出现，3 周左右整个外植体都形成暗黄色、松软的愈伤组织，一部分愈伤组织上出现黄色体细胞胚 (图 1)。选择胚性愈伤组织转入 H2 培养基光下培养，已出现的体细胞胚生长并逐渐变绿，同时有新的体细胞胚形成。没有转入 H2 培养基的愈伤组织，颜色逐渐变成黄褐色，已出现的体细胞胚也可以继续生长，但是生长缓慢，没有新的体细胞胚形成。大多数学者认为，在植物体细胞胚发生过程中，2, 4- D 的作用十分微妙。一方面，它对诱导胚性愈伤组织的形成必不可少；另一方面，在胚性愈伤组织形成之后，又抑制体细胞胚

进一步发育。本实验 H2 培养基中 2, 4-D 浓度的降低, 可能部分解除了高浓度 2, 4-D 对体细胞胚发生的抑制, 导致愈伤组织还可以诱导形成新的体细胞胚。

2.3 体细胞胚分化

诱导形成体细胞胚的愈伤组织转入 H3 培养基, 2 周后需要转移至 H4 培养基培养, 体细胞胚才可以正常生长发育。如果继续用 H3 培养基继代培养, 愈伤组织逐渐变成墨绿色、瘤状, 体细胞胚玻璃化, 生长点不生长, 只分化出叶状物, 无法再生植株。BA 是植物组织培养中培养物玻璃化的主要原因之一, 因此我们采取了分化培养基中逐步降低 BA 浓度的方法, 经过 BA 从 5mg/L 降低至 0.5 mg/L 的分化培养, 获得了正常生长发育的体细胞胚。

2.4 体细胞胚萌发再生植株

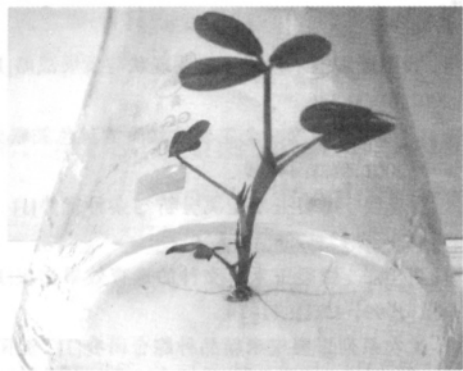


图 2 体细胞胚萌发再生植株

发育正常的体细胞胚在 H7 培养基中萌发成完整植株(图 2), 萌发率在 93%以上。而将体细胞胚单独剥离下来转移至不添加激素的 MS 培养基上培养, 未见体细胞胚萌发。这可能说明体细胞胚萌发培养基中 BA 的逐渐降低, 符合体细胞胚萌发的植物激素需要, 而突然去除植物激素会使其内源激素不平衡, 导致萌发停止。实验结果表明, 在分化阶段能够正常生长发育的体细胞胚, 也容易萌发再生植株。

3 讨 论

体细胞胚发生分为胚性愈伤组织诱导和体细胞胚形成及发育两个阶段, 应用植物激素是成功诱导体细胞胚发生的决定因素。周容等^[7]研究表明, 植物生长素 2, 4-D 浓度为 20 mg/L 对诱导花生体细胞胚发生作用明显。李丽等^[8]的实验结果是低浓度 2, 4-D 对花生脱分化有利, 较高浓度 2, 4-D 对再分化有利, 10 mg/L 和 15 mg/L 的

2, 4-D 诱导效果均较好。庄伟建等^[9]在附加 20、40 和 60 mg/L 的 2, 4-D 培养基上, 一些花生品种成熟胚轴体细胞胚发生率达到了 100%, 附加 40 mg/L 的 2, 4-D 培养基每个外植体平均诱导体细胞胚数量最多。本试验选用 40 mg/L 的 2, 4-D 诱导培养 3 周, 然后降低 2, 4-D 浓度到 20 mg/L, 胚性愈伤组织持续形成体细胞胚, 结果表明 40 mg/L 的 2, 4-D 诱导四粒红花花生体细胞胚的效果也较好。实验中还发现高浓度的 2, 4-D 使愈伤组织褐化, 从而降低体细胞胚发生率。李丽等^[8]也发现培养基中 2, 4-D 浓度在 1~20 mg/L 范围内, 随浓度的升高, 愈伤组织褐化率逐渐升高, 但是 2, 4-D 浓度太低又不利于愈伤组织向体细胞胚方向发展。我们在实验中采用缩短 40 mg/L 的 2, 4-D 诱导时间, 随之将 2, 4-D 降低到 20 mg/L, 既减少了愈伤组织褐化率又保持了较高的体细胞胚诱导率。

体细胞胚形成和发育阶段, 细胞分裂素必不可少。李美芹等^[10]采用诱导阶段和分化阶段均添加较高浓度 BAP, 花生幼叶体细胞胚发生率达到 87%~100%, 体细胞胚可正常再生植株。我们在实验中添加 5 mg/L 的 BA, 结果是已经诱导出体细胞胚的愈伤组织变成瘤状, 颜色变墨绿, 不能继续诱导体细胞胚发生, 并且使体细胞胚玻璃化不能发育成植株, 采用逐渐降低 BA 浓度的方法, 诱导形成的体细胞胚正常萌发再生植株。细胞分裂素对花生体细胞胚形成和发育的影响效果不一致, 可能与基因型的差异有关, 还有待于进一步试验研究。

参考文献:

- [1] 邓向阳, 卫志明. 幼胚长度, 2, 4-D 浓度, 光强度等对花生体细胞胚发生的影响[J]. 植物生理学报, 2000, 26 (6): 525-531.
- [2] 何红卫, 宾金华. 花生上胚轴的丛生芽诱导和植株再生[J]. 华南农业大学学报, 2003, 24 (3): 46-49.
- [3] Erika M, HebeY R, Ana M G, et al. Thidiazuron promotes in vitro plant regeneration of *A. rachis correntina* (L. leguminosae) via organogenesis [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2004, 23 (2): 129-134.
- [4] 梁丽琨, 林荣双, 由翠荣, 等. 不同激素对花生离体分化的影响[J]. 植物研究, 2004, 24 (2): 187-191.
- [5] Nadel B L, Altman A, Liv M. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension: Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1990, 20: 119-124.
- [6] Parrott W A. A auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover [J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 17-21.

[7] 周 蓉, 廖伯寿, 陈小媚, 等. 影响花生体细胞胚发生因素的研究[J]. 花生学报, 2001, 30(3): 9-12.

[8] 李 丽, 万勇善, 刘风珍. 2, 4-D 浓度对花生体细胞胚发生的影响[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 77-79.

(上接第 6 页)单株穗重呈显著正相关, 植株高度与穗粗、穗长、单株粒重呈显著负相关。从产量与主要性状之间的相关分析可知, 产量与千粒重、单株粒重、单株穗重、穗长间呈显著正相关, 因此, 在后代选择上, 在不降低膨爆性能的基础上, 应注重千粒重、穗长和单株粒重高、茎秆坚韧、株高较低的材料。

2.2 产量与主要数量性状之间灰色关联度分析

表 3 产量与各性状的关联度及排序

项目	X ₁ 株高(cm)	X ₂ 穗粗(cm)	X ₃ 穗长(cm)	X ₄ 行粒数	X ₅ 秃尖(cm)	X ₆ 千粒重(g)	X ₇ 单株粒重(g)	X ₈ 单株穗重(g)	X ₉ 出子率(%)
r _i	0.587 7	0.605 9	0.739 7	0.659 8	0.533 2	0.683 9	0.551 4	0.607 3	0.646 9
位序	7	6	1	3	9	2	8	5	4

爆裂玉米主要数量性状与产量之间的关联度第一位是穗长, 其次千粒重、行粒数、出子率、单株穗重、株高、穗粗、再其次株高、单株粒重、秃尖长。说明穗长、千粒重、单株穗重对产量的影响较大, 这与前面相关分析结果是一致的。

3 讨 论

通过对爆裂玉米主要数量性状及产量的关系的研究表明: 千粒重、穗长、单株粒重、单株穗重的影响较大, 因此, 在选择上应注重这几种性状, 将其作为主要指标, 从分析中可知, 单株粒重与千粒重、穗粗呈极显著正相关, 与株高呈显著负相关, 所以在选取大穗的同时, 选中矮秆材料, 提高抗倒伏能力, 这与生产实际也是相一致的。目前玉米生产上存在的主要问题是倒伏和病虫害, 它已成为爆裂玉米高产的限制因素, 选育抗倒伏、抗病品种是解决问题的根本, 但并不是越矮越好, 也需要考虑到生物学产量^[10]。在选择中应注意考虑到茎秆的质量, 选择坚实粗壮、韧性好的茎秆。

在后代选择上, 应选择中秆、中穗型材料, 在此基础上, 在不降低膨爆特性的前提下, 对千粒

[9] 庄伟建, 张书标, 刘思衡. 花生体细胞胚的诱导及其植株再生[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(2): 153-158.

[10] 李美芹, 王晶珊, 孙世孟. 花生幼叶组织培养及有效植株再生[J]. 花生学报, 2004, 33(3): 10-14.

爆裂玉米产量是许多性状控制的, 按灰色系统要求, 将参试杂交种的产量及 9 个性状视为一个整体, 即灰色系统。设产量为参考数列 X₀, 植株高度、穗粗、穗长、行粒数、秃尖长、千粒重、单株粒重、单株穗重、出子率分别为比较数列 X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉, 用灰色关联度对各性状与产量间的关系进行分析。产量与各性状关联系数见表 3。

重、穗长加以重点选择。减少盲目性, 提高预见性。

参考文献:

[1] 史振声. 我国爆裂玉米科研和产业现状与发展战略[J]. 玉米科学, 2002, 10(3):3-6.

[2] 王立秋. 北方早熟玉米 9 个主要性状间的灰色关联分析[J]. 玉米科学, 2001, 9(2): 44-46.

[3] 王玉兰, 乔春贵. 爆裂玉米距离分析与杂种优势[J]. 作物学报, 1994, 20(2): 223-228.

[4] 李玉玲, 胡学安. 爆裂玉米单交种的选育效果初报[J]. 中国农学通报, 1999, 15(1): 11-14.

[5] 史振声. 沈农系列爆裂玉米新品种综合研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1992, 23 (3):65-69.

[6] 邓聚龙. 灰色预测与决策[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1986, 103-108.

[7] 武兰芳. 玉米主要性状的灰色关联分析 [J]. 玉米科学, 1997, 5(1): 72-75.

[8] 曾三省. 爆裂玉米的开发利用[J]. 农业科技通讯, 北京: 1987 (9):12-13.

[9] 曾三省. 爆裂玉米的品质及其选育 [J]. 玉米科学, 1999: 20 (2): 14-17.

[10] 包和平, 张 君, 赵立之, 等. 春玉米自交系穗部性状的途径分析[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(1): 16-18.

2009 年《中国农业科技导报》征订启事

本刊于 1999 年 6 月创刊, 彩色封面, 大 16 开本, 双月刊, 逢双月中旬出版, 国内外公开发行人。自 2009 年起将扩版至 144 页, 采用铜版纸 4 色印刷, 每册定价 22.00 元, 全年定价 132.00 元。可通过邮局或与编辑部联系订阅, 免费邮寄。国内统一刊号: CN11- 3900/S; 国际统一刊号: ISSN 1008- 0864。广告经营许可证号: 京西工商广字 0058 号。邮发代号: 82- 245。

地 址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院生物技术研究所《中国农业科技导报》编辑部
邮 编: 100081 联系人: 蔡晶晶, 徐妙云, 孙丽萍 电 话: 010- 82106118
E- mail: nykjdb@163.com nkdb@caas.net.cn 网 址: www.nkdb.net