

可控环境下培养基成分对大豆组培苗生根的影响

鲍顺淑, 贺冬仙

(中国农业大学农业部设施农业生物环境工程重点开放实验室, 北京 100083)

摘要:在植物组织培养过程中, 温度、湿度、光照强度、CO₂ 浓度等组培物理微环境对组培苗的生长发育有较大的影响。探讨在组培微环境控制的条件下, 培养基成分对大豆 (*Glycine.max* L.) 组培苗生根的影响以促进其生根并完善大豆再生体系。大豆外植体选用鲜重约 85 mg 的大豆组培单茎节移栽到添加了 70 ml 培养基的方型培养容器中。培养容器的容积为 380 ml, 其顶部留 2 个直径为 10 mm 的圆孔并覆盖高分子透气膜用来与容器外进行气体交换。试验区根据 MS 培养基中有糖、无糖和植物生长激素 NAA 与 IBA 的不同浓度设置了 6 组, 培育环境控制在温度 23±1℃、湿度 65±5%、光合有效光量子束密度 70±9 μmol/(m²·s)、光周期 16 h/d, CO₂ 浓度未控制。在该可控环境下培育 21d 后, 试验区 S20-IBA1.0 的大豆组培苗生根较好, 净光合速率较高, 显示出良好的生长趋势。试验表明: 在该可控环境条件下利用添加 20 g/L 蔗糖和 1.0 mg/L IBA 的 MS 培养基有利于大豆组培苗生根, 同时控制 CO₂ 浓度可期待大豆无糖组培生根能取得更好效果。

关键词:培养基成分; 光合作用; 光独立组培; 大豆 (*Glycine.max* L.)

中图分类号: S52

文献标识码: A

Effects of Medium Components on Rooting of Soybean Plantlet under Controlled Environment

Bao Shunshu, He Dongxian

(Key Lab of Agricultural Bio-environment Engineering of Ministry of Agriculture,
China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: Micro culture environmental factors such as temperature, relative humidity, light intensity, and CO₂ concentration are important to growth and development of plantlets *in vitro*. The aim of this study was to establish a culture process for soybean plantlet rooting under controlled environment. Single nodal soybean (*Glycine max* L.) explants each with 85 mg fresh mass were planted at two gas-permeable filtered culture vessels containing 70 ml medium and cultured at air temperature of 23±1℃, relative humidity of 65±5%, photosynthetic photon flux of 70±9 μmol/(m²·s), photoperiod of 16 h/d, and without CO₂ control for 21 days. The medium components were MS basic ingredient and B5 medium vitamins appending six combinations of sugar (0, 20 g/L) and hormone (0.5 and 1.0 mg/L IBA; 0.5 and 1.0 mg/L NAA). The thickset rooting and growth of soybean plantlets were shown in all treatments and the treatment with 20 g/L sugar and 1.0 mg/L IBA showed greater growth variables and net photosynthetic rate than other treatments. The culture process using photoautotrophic micropropagation could be superior for soybean plantlet rooting compared to conventional tissue culture process.

Key words: Medium components, Photosynthesis, Photoautotrophic micropropagation, Soybean (*Glycine max* L.)

项目基金: 北京市教育委员会共建项目建设计划 (XK100190550) 和中国农业大学科研启动基金 (2004017)。

第一作者简介: 鲍顺淑, 女, 1979 年生, 在读博士, 主要从事设施园艺环境科学与工程。通信地址: 100083 中国农业大学东校区 195 号信箱, Tel: 62736776, E-mail: bao.tracy@gmail.com。

通讯作者: 贺冬仙, 女, 副教授, 中国农业大学农业部设施农业生物环境工程重点开放实验室。Tel: 010-62737550, E-mail: he_dongxian@hotmail.com

收稿日期: 2006-07-16, 修回日期: 2006-07-18。

组织培养微环境主要包括温度、湿度、光照强度、气体浓度、培养基成分等。长期以来,组培研究多注重培养基成分,特别是激素配比^[1],以期获得理想的繁殖效率,较忽视温/湿度等物理环境要素对组培苗生长发育的影响。传统组培中,由于培养容器密闭,容器内外几乎没有气体交换,造成容器内相对湿度高(通常96%以上)和CO₂浓度低等异常环境。此外,培养基中含糖容易导致污染降低了繁殖效率,操作需要异常小心^[2]。这种异常的组培微环境容易导致组培苗生理和形态发育异常、品质差、驯化及移栽成活率低、操作复杂等一系列问题。光独立组培技术的研究表明,去除培养基中的糖,通过培养容器内外的气体交换和扩散可以有效地调节培养容器内的温度、湿度、CO₂浓度等组培微环境,促进组培苗的生长和发育,还可减少污染几率、简化操作工序,从而降低组培成本^[3-15]。

大豆(*Glycine max* L.)富含蛋白质和植物油,是世界上最主要的农作物之一。中国大豆年需求量达4000万吨左右,但年产量还不到2000万吨,短缺部分依赖进口^[16]。因此,在不可能增加耕地面积的情况下,加强遗传转化研究,培育耐盐抗旱品种以增产增收具有重要意义。但是,大豆的再生繁殖困难、再生效率低,不同品种间的再生能力和繁殖方法有较大差异,严重地影响了大豆高效再生体系的建立。大豆再生体系一般包括种子萌芽、不定芽诱导、组培苗伸长和生根四个阶段,各阶段需要不同的培养条件。大豆再生体系的研究主要集中于前三个阶段^[18-23],对生根阶段的研究较少,组培微环境变化对其影响的文献也少见报道。大豆组培苗生根较难,根系不健壮是造成其再生效率低的主要原因之一;组培苗根系健壮不仅能提高再生效率,还能促进其移栽后的生长和发育^[3,7,9-11]。因此,笔者利用光独立组培技术探讨在可控环境下有糖、无糖和添加不同激素的培养基成分对大豆组培苗生根过程的影响。

1 材料和方法

1.1 外植体的准备

栽培大豆种子(*Glycine max* L. 中黄13)在70%酒精中浸泡灭菌30秒后用无菌水冲洗4次,接着浸泡在0.1%升汞溶液中灭菌5min后用无菌水冲洗5次,然后在无菌水中浸泡12h后培养于MS培养基。MS培养基添加了20 g/L蔗糖和8 g/L琼脂,pH值调节在5.8~5.9之间,无激素添加。种子培育第7天子叶已展开,切开子叶节作为外植体移植到添加0.25 mg/L 6BA和0.5 mg/L IBA的MS培养基进行诱导。子叶节在新培养基上培养2周后被诱导出新芽,切取3 cm高、鲜

重约85 mg的单茎节新芽作为本实验用外植体。

1.2 试验区设置

大豆组培苗生根培养基为改良的MS培养基,即把MS培养基中的维生素替换为B5培养基中的维生素成分,并添加8 g/L琼脂。根据MS培养基中有糖、无糖,及NAA与IBA激素的不同浓度设置了六个试验区(表1)。培养容器的容积为380 ml,在其顶盖留两个10 mm直径的圆孔,覆盖高分子透气膜(Milliseal with pore diameter of 0.5 μ m, Millipore, Japan)。每个培养容器内分装70 ml培养基,移植2棵大豆外植体。每个试验区设置10个培养容器并培育3周,试验重复3次进行。

1.3 环境控制

组培间内物理环境控制在温度(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、相对湿度65 $\pm$ 5%、光合有效光子束密度(70 $\pm$ 9) μ mol/(m²·s)、光周期16 h/d。光照期内组培间的CO₂浓度未控制,约为480 μ mol/mol。为避免外植体移植后过量的水分散失,大豆外植体移植第一天进行暗期处理。

表1 大豆组培苗生根培养基的试验区设置

试验区	蔗糖 (g/L)	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)
S0-H0	0.0	0.0	0.0
S20-H0	20.0	0.0	0.0
S20-IBA0.5	20.0	0.5	0.0
S20-IBA1.0	20.0	1.0	0.0
S20-NAA0.5	20.0	0.0	0.5
S20-NAA1.0	20.0	0.0	1.0

注: S代表蔗糖; H代表激素。

1.4 参数测量

生根培养第21天,测量各试验区中大豆组培苗的株高、叶片数、叶面积、茎叶和根部的鲜/干重、净光合速率、蒸腾速率、气孔导度等形态和生理指标。叶面积测量时先摘取叶片用扫描仪(Scanner 5550T, BenQ Co. Ltd., China)进行图像扫描,然后利用面积计算程序(LIA32 for Windows, K. Yamamoto, Japan)计算叶面积。组培苗的茎叶和根部用天平(BP221S, Sartorius Inc., Germany)测量鲜重后,于80 $^{\circ}$ C的烘箱中烘72h后测量其干重。个叶的净光合速率、蒸腾速率、气孔导度测量采用了便携式光合仪(LI-6400, LI-COR Inc., USA)的拟南芥叶室。

2 结果与分析

2.1 大豆组培苗的生根

试验区S20-IBA0.5和S20-IBA1.0在第5天开始生根,试验区S20-NAA0.5和S20-NAA1.0在第7天开始生根,未添加激素的试验区S20-H0和S0-H0在第10天开始生根。不同试验区的大豆组培苗在培育21d后,其根部在数量、质量和形状方面有明显差异

(图 1)。培养基中 IBA 或 NAA 激素的添加促进了大豆组培苗的根部发育,但 IBA 浓度增加对根部发育影响不显著,根部的鲜/干重随着 NAA 浓度的增加而显著增加(表 2)。试验区 S20-IBA1.0 的大豆组培苗根部发育好,呈浅黄色,有较多的侧根和须根且健壮,鲜/干重达到了 929 mg/73mg。添加了激素 NAA 的试验区的侧根短而粗壮、呈褐色,没有明显的须根,这与大田栽培中大豆的根系有较大区别。一般,缺少须根不利于组培苗对营养矿物质的吸收与利用,对其生长和发育有一定的阻碍。因此,添加激素 IBA 对促进大豆组培生根具有更好的效果。

未添加激素的试验区 S20-H0 和 S0-H0 在培育 21d 后,大豆组培苗的根呈乳白色,侧根与须根的分化明显,但根部发育明显劣势于激素添加的试验区。有糖试验区 S20-H0 的根较健壮,无糖试验区 S0-H0 的侧根和须根较少。蔗糖的添加对根部干/鲜重有显著影响,无糖培养技术的优势未能在本试验中得到体现。

以上结果表明,添加了 0.5 和 1.0 mg/L IBA 激素和 20 g/L 蔗糖的培养基适合于大豆组培苗生根,且 S20-IBA1.0 试验区具有明显的生长优势。因此,在本试验的可控环境条件下,适当浓度的 IBA 激素添加对大豆组培苗生根有促进作用。

2.2 大豆组培苗的茎叶生长

培养基中 IBA 的添加促进了大豆组培苗的茎叶发育,试验区 S20-IBA1.0 的茎叶鲜/干重达到

1259/161 mg,但 IBA 浓度增加对株高、叶片数、叶面积和茎叶鲜重的影响不大(表 2)。试验区 S20-IBA1.0 的茎叶发育呈现出明显的生长优势,这与其根部发育的趋势一致。培养基中 NAA 的添加也促进了大豆组培苗的茎叶发育,试验区 S20-NAA1.0 的茎叶的鲜/干重达到 1150/126 mg。随着 NAA 浓度的增加,大豆组培苗的鲜/干重显著增加,叶面积显著减小,但对株高和叶片数没有影响。未添加激素的有糖试验区 S20-H0 的大豆组培苗的株高、干重、叶面积明显优势于无糖试验区 S0-H0,但茎叶鲜重和叶片数没有显著性差异。

2.3 大豆组培苗的生理特性

试验区 S20-IBA1.0 的大豆组培苗的净光合速率达到 $3.6 \mu \text{molCO}_2/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,试验区 S20-IBA0.5 次之;添加了激素 IBA 的试验区明显优势于未添加激素试验区 S20-H0 和 S0-H0,也明显优势于添加了 NAA 激素的试验区(表 3)。添加了 NAA 激素的试验区 S20-NAA0.5 和 S20-NAA1.0 的净光合速率只有 $1.8 \sim 1.9 \mu \text{molCO}_2/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,与无糖试验区 S0-H0 大致相同,劣势于未添加激素试验区 S20-H0。与净光合速率对比,激素添加对蒸腾速率和气孔导度影响不大;未添加激素的试验区中,有糖试验区 S20-H0 的蒸腾速率明显高于无糖试验区 S0-H0,但气孔导度没有显著性差异。

试验区 S20-IBA1.0 和 S20-IBA0.5 的大豆组培苗的净光合速率的趋势与其茎叶和根部生长发育的趋势

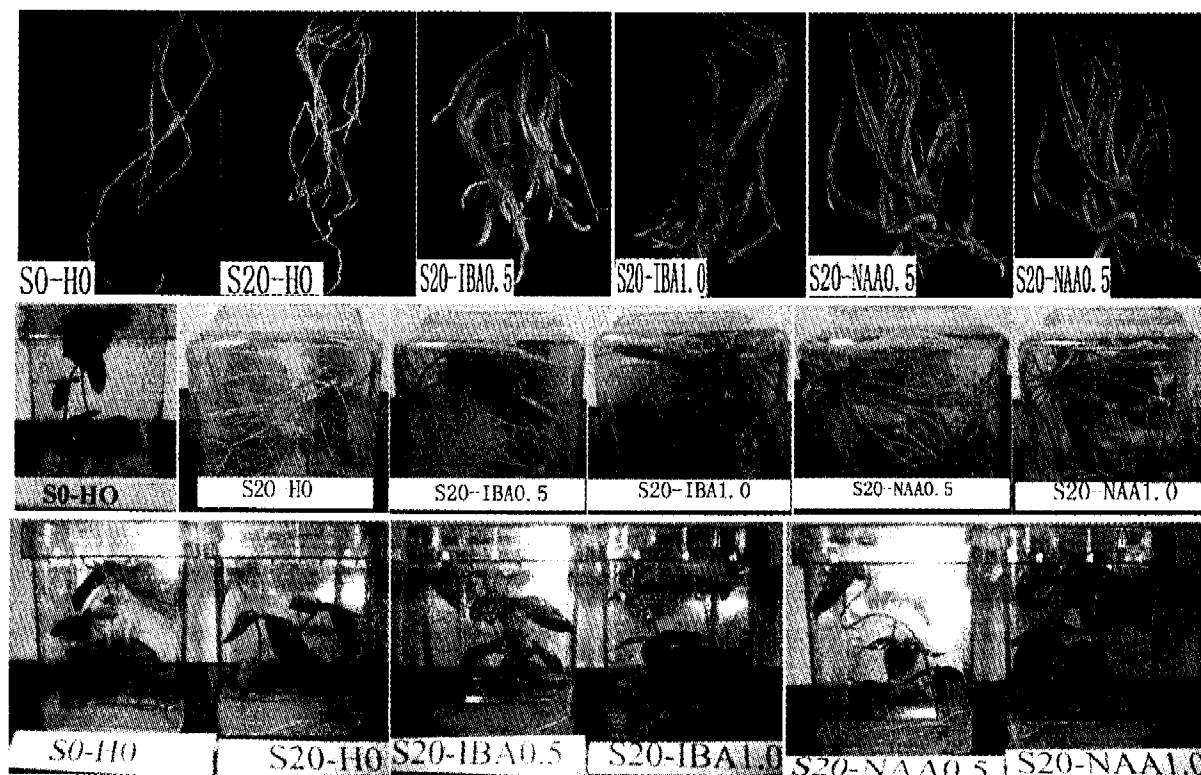


图 1 不同培养基处理的大豆组培苗在可控环境下第 21 天的生长状况

一致。试验区 S20-NAA0.5 和 S20-NAA1.0 的茎叶和根部发育明显优势于未添加激素试验区 S20-H0 和 S0-H0, 但净光合速率却没有表现出优势。无糖试验区 S0-H0 的大豆组培苗虽然在茎叶和根部的生长发育上没有表现出优势, 但个叶的净光合速率却没有劣势。该光合特性表明, 无糖试验区的大豆组培苗还有较大的生长潜力。有糖与无糖试验区的光合差异主要是由于无糖试验区大豆组培苗的光合碳源完全依赖于培养容器中的 CO_2 , 而有糖试验区同时来自于培养基中的蔗糖和培养容器中的 CO_2 。由于组培室内的 CO_2 浓度没有调控, 室内 CO_2 浓度仅维持在 $480 \mu\text{mol/mol}$ 左右的较低水平, 使得无糖试验区大豆组培苗没有足够的碳源进行光合作用。因此, 低浓度 CO_2 环境抑制了光

独立组培的光合活性, 限制了无糖试验区大豆组培苗的茎叶和根部的发育。相反, 有糖试验区 S20-H0 的大豆组培苗利用培养基中的蔗糖作为辅助碳源, 有效地提高了光合效率, 因此其茎叶和根部的生长发育明显优势于无糖试验区 S0-H0。根据该可控环境下各试验区的生理特性可以推论, 提高组培微环境的 CO_2 浓度, 无糖试验区将具有更好的生长潜力, 光独立组培可以有效地促进组培大豆小植株生根。

2.4 环境控制对大豆组培的影响

培养容器顶部有 2 个直径为 10 mm 的高分子透气孔与组培间进行气体交换, 使得培养容器内的相对湿度明显降低、 CO_2 浓度提高, 这可从培养容器的内壁没有凝结水珠和有糖试验区具有相对生长优势得到佐

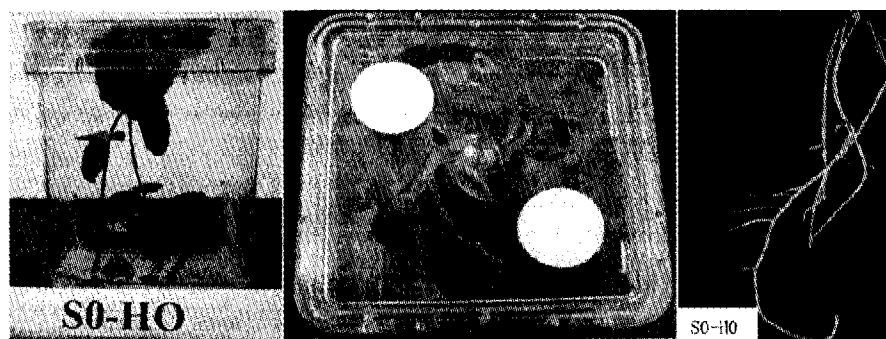


图 2 无糖试验区的大豆组培苗在可控环境下的生长和生根

表 2 不同培养基处理的大豆组培苗在可控环境下培养 21 天后的生长参数

试验区	株高(mm)	鲜重 (mg)		干重 (mg)		叶面积(cm^2)	叶片数(片)
		茎叶	根部	茎叶	根部		
S0-H0 ¹⁾	14±1.7 c ²⁾	537±59 c	221±51 d	70±6 d	10±2 c	28±4 c	12±1.0
S20-H0	20±2.1 a	624±63 c	468±72 c	137±15 b	44±16 b	48±7 ab	14±1.3
S20-IBA0.5	21±1.8 a	1122±133 a	764±96 ab	151±14 ab	56±7 ab	51±4 a	13±1.6
S20-IBA1.0	22±1.6 a	1259±228 a	929±194 a	161±27 a	73±12 a	54±12 a	15±2.0
S20-NAA0.5	17±1.1 b	853±112 b	654±119 b	99±12 c	66±5 b	38±6 b	13±1.2
S20-NAA1.0	16±1.2 bc	1150±111 a	844±104 a	126±13 bc	61±7 ab	28±3 c	12±1.4
ANOVA test							
Source							
Sugar	** ³⁾	NS	**	**	**	**	NS
IBA	NS	**	**	*	*	*	NS
NAA	*	**	**	**	*	**	NS
IBA×NAA	**	**	**	**	**	**	NS

注:¹⁾S 代表蔗糖, H 代表激素;²⁾同列不同英文字母代表 $\alpha=0.01$ 水平的差异显著性, 相同字母表示无显著差异;³⁾*, **, NS 代表在 $\alpha \leq 0.05$ 或 $\alpha \leq 0.01$ 的显著性差异, 或无显著差异。

表 3 不同培养基处理的大豆组培苗在可控环境下培养 21d 后的生理参数

试验区	净光合速率 ($\mu\text{molCO}_2 / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$)	气孔导度 ($\text{molH}_2\text{O} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$)	蒸腾速率 ($\text{mmolH}_2\text{O} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$)
	($\mu\text{molCO}_2 / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$)	($\text{molH}_2\text{O} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$)	($\text{mmolH}_2\text{O} / \text{cm}^2 \cdot \text{s}$)
S0-H0 ¹⁾	2.1±0.5c ²⁾	0.6±0.2a	14.5±3.2b
S20-H0	2.5±0.4b	0.8±0.3a	18.5±4.9a
S20-IBA0.5	2.9±0.5ab	0.8±0.2a	17.9±4.4ab
S20-IBA1.0	3.6±1.1a	0.6±0.2a	17.6±4.1ab
S20-NAA0.5	1.9±0.5c	0.7±0.1a	17.4±4.9ab
S20-NAA1.0	1.8±0.4c	0.8±0.2a	17.8±2.7ab
ANOVA test			
Source			
Sugar	** ³⁾	NS	**
IBA	NS	NS	NS
NAA	NS	NS	NS
IBA×NAA	**	NS	NS

注:¹⁾S 代表蔗糖, H 代表激素;²⁾同列英文字母代表 $\alpha=0.01$ 水平的差异显著性, 含有相同字母的平均值没有显著差异;³⁾*, **, NS 代表在 $\alpha \leq 0.05$ 或 $\alpha \leq 0.01$ 的显著性差异, 或无显著差异。

证(图2)。这种自然换气有效地改善了培养容器内相对湿度高和CO₂浓度低的异常环境,有利于促进大豆组培苗的生长发育,并改善其品质。因此,组培微环境控制对大豆组培生根的促进作用不容忽视。

长期以来,很少有人对大豆组培苗生根所需的温度、湿度、光照强度等环境条件做过系统的研究,对大豆无糖组培生根的研究也未见报道。在可控环境条件下进行大豆组培苗生根试验的结果表明,培养基成分尤其是激素添加对大豆组培苗的生根和生长有显著性影响,但组培微环境对其也有重要影响,其交互作用不容忽视。因此,对组培微环境进行综合调控,尤其是对温度、湿度、光照强度进行优化控制的基础上,提高CO₂浓度将为大豆组培苗的生长提供足够的碳源,同时利用光独立组培技术去除培养基中的蔗糖和激素来发挥其生长潜力,将能有效地促进大豆组培苗的生根、节约组培成本、简化组培工序,从而改善大豆组培高效再生体系。

3 结论与讨论

在温度23±1℃、湿度65±5%、光合有效光量子束密度70±9 μmol/(m²·s),和光周期16 h/d的可控环境下,利用不同生根培养基培育大豆单茎节外植体21d,添加了20 g/L蔗糖和1.0 mg/L IBA的MS培养基有利于大豆组培苗生根,无糖培养具有较大的生长潜力。因此,进一步综合调控组培微环境尤其是CO₂环境,大豆的无糖组培生根可期待取得更好的效果,光独立组培技术可能成为解决大豆组培苗生根问题的有效的解决方案之一。

参考文献

- [1] 梁一池,杨华.植物组织培养技术的研究进展.福建林学院学报,2002,22(1):1~3
- [2] 曲英华,张立力,张光怡,等.植物组织培养新技术:光独立培养法.农业工程学报,2001,17(6):90~92
- [3] 周耀红.组培微环境对草莓苗生根阶段及移栽驯化过程中生长和生理特性的影响.[硕士论文].浙江:浙江大学,2003:2~8
- [4] 杨武振,王荔,侯典云,等.无糖组织培养技术研究进展.云南农业大学学报,2004,19(3):239~254
- [5] 徐志刚,丁为民,丁永前,等.规模化组培育苗设施环境与控制的研究进展.农业机械学报,2002,33(1):106~110
- [6] 何松林,孔德政,杨秋生,等.组织培养容器环境因子调控技术研究进展.河南农业大学学报,2003,37(1):25~32
- [7] 李宗菊,周应揆,桂明英,等.满天星无糖组培快繁技术研究.云南大学学报,1999,21(2):134~138
- [8] Zobayed S M A, Afreen F, Kubota C, et al. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. Annals of Botany, 2000, 85: 587~592
- [9] Zobayed A, Kubota C, Kozai T, et al. Supporting material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. In Vitro Cell, Dev. Biol. Plant, 1999, 35: 470~474
- [10] Kubota C, Kakizaki N, Kozai T, et al., Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. HortScience, 2001, 36: 49~52
- [11] Xiao Y L, Zhao J C, Kozai T. Practical sugar-free micropropagation system using large vessels with forced ventilation. Kubota, C. and C. Chun (eds), Transplant Production in the 21st Century, 2000, 266~273
- [12] Nguyen Q T, Kozai T. Growth of *in vitro* banana shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. In Vitro Cell, Dev. Bio. Plant, 2001, 37: 824~829
- [13] Adelberg J, Fujiwara K, Kirdmanee C, et al., Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. Plant Cell Tissue, 1999, 57 (2): 95~104
- [14] Nguyen Q T, Kozai T, Nguyen U V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999,58:51~57
- [15] Nguyen Q T, Kozai T. Growth of *in vitro* banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. In Vitro Cell, Dev. Bio. -Plant, 2001, 37: 824~829
- [16] 宋翔.中国大豆产业发展的思考.饲料广角,2005,(10):13~15
- [17] 王升吉,吴元华,王洪岩,等.大豆不同外植体组织培养及再生研究.沈阳农业大学学报,1999,30(3):255~259
- [18] Gai J Y, Guo Z B. Efficient plant regeneration through sinatuc embryogenesis from germinated cotyledon of the soybean. Soybean Genetics, Newsletter, 1997, 24 (3):41~44
- [19] Wang L, Clemente T, Wang L Z, et al., Regeneration study of soybean cultivars and their susceptibility to agrobacterium tumifaciens EHA101. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(5):664~669
- [20] Yue S Y, Wada K, Futsuhara Y. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. Plant Science, 1990, 72: 101~108
- [21] Cheng L H, Sun Y, Liu S X. Study on regeneration of different explants of soybean. China oil plants Acta Agronomica Sinica, 1998, 20 (2): 21~24
- [22] 薛仁锦,刘淑兰,韩碧文.大豆再生植株的研究.延边农学院学报, 1994,16(1):1~5
- [23] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等.大豆组织培养再生植株研究.大豆科学, 2001,20(1):9~14

(责任编辑:秦守亮)