

组培技术在四棱豆矮生种质幼胚挽救中的应用研究

蒋向辉^{1,2}, 陈东明^{1,2}, 余朝文^{1,2}, 彭艳辉¹, 蒋勇¹

(1. 怀化学院生物工程系, 湖南怀化 418008; 2. 怀化市生物育种与加工技术实验室, 湖南怀化 418008)

摘要: 采用正交试验设计探讨不同的灭菌剂和杀菌时间、培养基在四棱豆幼胚挽救中的最佳组合。结果表明, 生长 30 d 左右的四棱豆幼胚先用浓硫酸处理 8 min, 然后用 70% 酒精消毒 60 s, 0.1% 升汞消毒 10 min, 灭菌效果最好。适合幼胚生长的基本培养基为 1/2MS 培养基。在培养基中添加不同激素发现, 单独添加 GA₃ 1.5 mg/L 有促进幼胚直接成苗的效果, 添加 6-BA 和 2,4-D 有利于愈伤组织的分化。培养基 1/2MS + 6-BA 1.25 mg/L + 2,4-D 0.8 mg/L + 蔗糖 25 g/L 适合四棱豆不定芽诱导。

关键词: 组织培养; 四棱豆; 矮生; 种质; 幼胚

中图分类号: S643 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2008)04-0086-03

四棱豆 [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D. C.] 又名翼豆、翅豆、杨桃豆等, 是豆科蝶形花亚科四棱豆属的一年生或多年生草本植物^[1]。四棱豆原产于热带, 近几年来在我国大部分地区, 如云南、广西、广东、海南、湖南、湖北、河南、福建等省(区)均有种植。其根、茎、叶、花、豆荚和种子均含有丰富的营养成分, 是一种食用兼药用的高蛋白作物, 现已成为许多国家争相开发利用的一种植物资源。四棱豆属短日照植物, 对光照和温度特别敏感, 在长日照条件下易引起茎、叶徒长而不能开花结果。在我国华中地区如果遇上 10~11 月阴雨天较多的年份, 经常收不到种子。因此, 选育适合我国长江中下游地区种植的矮生、短生育期四棱豆品种已刻不容缓。

矮生种质是四棱豆矮化育种必不可少的材料。中国农业科学院选育的矮生 96-14-1 是蔓生特异矮秆品种, 它不仅植株矮 (< 50 cm), 生产上不须搭架, 而且其坐荚率比其他品种明显高^[2], 是一种理想的育种材料。本研究借助组培技术探索在气候反常年份进行四棱豆矮生种质保存的有效方法。

1 材料与方法

以花后 30 d 左右的矮生四棱豆幼胚为材料。首先对幼胚进行 3 种前期处理: 去种皮、不去种皮、

浓硫酸处理 8 min。然后用 70% 酒精和 0.1% 升汞进行不同时间的消毒处理。随后接种在大量元素用量各不相同的 3 种 MS 培养基上。以上各种因素和处理水平采用 L₉(3⁴) 正交试验设计方案, 参照钟海雁等^[3]的方法形成正交试验表(表 1), 摸索最佳灭菌方法和适合幼胚生长的最佳培养基。

表 1 幼胚不同处理方法 L₉(3⁴) 正交表

处理号	种皮处理	酒精消毒时间(s)	升汞消毒时间(min)	培养基(MS)
1	剥皮	30	8	1/2
2	剥皮	45	10	1
3	剥皮	60	12	3/2
4	不剥皮	30	10	3/2
5	不剥皮	45	12	1/2
6	不剥皮	60	8	1
7	浓硫酸处理	30	12	1
8	浓硫酸处理	45	8	3/2
9	浓硫酸处理	60	10	1/2

在适合幼胚生长的最佳培养基中添加不同浓度赤霉素(GA₃), GA₃ 设 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 共 5 个浓度梯度, 研究赤霉素处理对幼胚成苗的影响。另外, 以幼胚为外植体, 在不同的 MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA、2,4-D 和蔗糖, 探索四棱豆愈伤分化的最佳条件。培养基中琼脂为 0.7%, pH 值 5.8, 每一处理接种 5 瓶, 每瓶 6 个幼胚。

采用透明玻璃锥形瓶培养, 每瓶含培养基约 25 ml, 培养温度为 (26 ± 2) °C, 光照强度为 30 ~ 40 μmol/(m² · s), 每日 10 h 光照、14 h 黑暗。培养基和接种所需各种器皿均经高压消毒灭菌。四棱豆幼胚接种于培养基 25 d 后统计成苗率和污染率, 并进

收稿日期: 2008-02-19

基金项目: 湖南省科研计划重点资助项目(编号: 05A064)。

作者简介: 蒋向辉(1974—), 男, 湖南安化人, 硕士, 讲师, 主要从事植物遗传与育种研究。E-mail: jxfei789@163.com。

通讯作者: 陈东明(1964—), 男, 湖南浏阳人, 教授, 主要从事特异植物资源研究。

行直观分析。统计方法参照盖钧镒的方法^[4],数据分析用 SAS 软件进行。

2 结果与分析

2.1 离体幼胚无菌培养体系的建立

由表 2 可知,不同的消毒时间和消毒方法对幼胚的消毒效果不同。酒精和升汞消毒时间越长,灭菌效果越好,但对幼胚的毒害作用也越大,尤其以幼胚被剥去种皮后的消毒处理较为明显。升汞处理时间由 8 min 延至 12 min 时,毒害率由 20% 上升为

27.5%,而愈伤组织诱导率比其他两种处理明显高,差异达到极显著水平($P < 0.01$)。灭菌之前种皮不进行任何处理时,污染率明显较高,平均达 35%。对各处理的成苗率进行 F 值测定表明,各处理间差异达极显著水平($F = 6.43 > F_{0.01} = 5.47$),以第 9 号处理效果最好,即在灭菌之前用浓硫酸处理 8 min,不仅可以灭菌而且还有软化种皮的作用,然后用酒精消毒 60 s、升汞消毒 10 min 的灭菌效果最好,且对幼胚毒害较小。幼胚生长的基本培养基以 1/2MS 培养基较为合适。

表 2 不同灭菌方法正交试验的直观分析

处理号	接种数 (个)	成苗数 (个)	成苗率 (%)	污染数 (个)	污染率 (%)	毒害数 (个)	毒害率 (%)	产生愈伤组 织数(个)	产生愈伤 组织率(%)
1	40	16	40	9	22.5	8	20	7	17.5
2	40	18	45	7	17.5	9	22.5	6	15
3	40	16	40	6	15	11	27.5	7	17.5
4	40	14	35	14	35	7	17.5	5	12.5
5	40	15	37.5	11	27.5	9	22.5	5	12.5
6	40	13	32.5	17	42.5	6	15	4	10
7	40	21	52.5	4	10	10	25	5	12.5
8	40	22	55	7	17.5	5	12.5	6	15
9	40	23	57.5	6	15	7	17.5	4	10

2.2 幼胚的无菌萌发

幼胚成苗有两种生长方式,即经过愈伤组织分化成苗与直接发育成苗。接种 20 d 后观察发现,部分幼胚子叶基部产生少量愈伤组织,呈团状,生长致密,浅黄色,随后只有少量芽的分化。大部分子叶是直接产生幼苗,幼苗单生。

2.3 赤霉素处理对幼胚成苗的影响

由表 3 试验数据可以看出,接种后 20 d,在没有添加赤霉素的培养基上,幼胚成苗率明显较低,仅为

56.7%。在添加赤霉素的培养基上幼胚成苗率明显较高, t 测验差异达到显著水平($t = 3.42 > t_{0.05} = 3.18$)。在一定范围内随着赤霉素浓度的增加,幼胚成苗率呈现先上升后下降的趋势,而愈伤组织的诱导率逐渐上升,由此可知适宜的赤霉素浓度(1.5 mg/L)能够促进幼胚的直接成苗。许传俊等^[5]认为其原因可能与 GA 通过影响生长素合成和运输、乙烯合成和反应,从而促进根的形成和细胞的生长有关。

表 3 不同浓度赤霉素对幼胚直接成苗和产生愈伤组织的影响

培养基号	GA ₃ (mg/L)	接种数 (个)	成苗数 (个)	成苗率 (%)	诱导愈伤 组织数(个)	诱导愈伤 组织率(%)	死胚数 (个)	死胚率 (%)
1	0	30	17	56.7	3	10.0	10	33.3
2	0.5	30	19	63.3	5	16.7	6	20
3	1.0	30	20	66.7	7	23.3	3	10
4	1.5	30	22	73.3	7	23.3	1	3.33
5	2.0	30	21	70.0	8	26.7	1	3.33

2.4 6-BA、2,4-D 对幼胚直接成苗和产生愈伤组织的影响

6-BA、2,4-D 对离体胚的直接成苗和愈伤组织的产生并不是必需的,在没有任何激素的情况下,幼胚也可以直接成苗,且有少量的愈伤组织产生。适量的 6-BA、2,4-D 能够促进幼胚的直接成苗和愈伤组织的产生。由表 4 可知,在 MS 培养基中加

入一定浓度的 6-BA 和 2,4-D,能够提高幼胚直接成苗率,不加激素的成苗率最高为 57.5% (表 2),加入激素后成苗率达 100%,并且合适的 6-BA 与 2,4-D 配比可诱导产生不定芽。高浓度的 2,4-D 对愈伤组织的诱导也有明显增强作用,而对丛生芽的诱导有抑制作用,且易导致幼胚的褐化、坏死。金竹萍等^[6]认为,当生长素浓度超过或低于适

宜浓度时,由于外源激素的过量而造成胚体自身激素合成量的降低或内、外源生长素总量的不足,导致幼胚的生长发育受到影响。在组合6中每块愈伤组

织不定芽诱导数达7个,表明培养基1/2MS+6-BA 1.25 mg/L+2,4-D 0.8 mg/L+蔗糖25 g/L有利于四棱豆不定芽诱导。

表4 不同种类、浓度的激素对离体胚直接成苗和产生愈伤组织的影响

培养基号	培养基 (MS)	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	蔗糖 (g/L)	接种数 (个)	死胚数 (个)	诱导愈伤组织数(个)	诱导愈伤组织率(%)	每块愈伤不定芽数(个)
1	1	0.5	0.8	20	30	5	25	83.3	1
2	1	1.0	1.2	25	30	4	26	86.7	3
3	1	1.25	1.5	30	30	3	27	90.0	2
4	1/2	0.5	1.2	30	30	5	25	83.3	1
5	1/2	1.0	1.5	20	30	4	26	86.7	1
6	1/2	1.25	0.8	25	30	3	27	90.0	7
7	3/2	0.5	1.5	25	30	6	24	80.0	1
8	3/2	1.0	0.8	30	30	4	26	86.7	5
9	3/2	1.25	1.2	20	30	3	27	90.0	3

对不同因子处理而诱导产生的不定芽数进行方差分析(表5),6-BA、2,4-D及蔗糖浓度对四棱豆不定芽诱导的影响显著,其中2,4-D和蔗糖浓度对不定芽诱导的影响达极显著水平,而培养基对不定芽分化的影响未达显著水平。多重比较分析认为,在1/2MS培养基中添加6-BA 1.25 mg/L、2,4-D 0.8 mg/L、蔗糖25 g/L对四棱豆不定芽的分化效果最好。

表5 不同因子处理的不定芽数方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值
培养基	0.67	4	0.17	5.58
6-BA	3.18	4	0.80	26.5*
2,4-D	4.67	4	1.17	38.92**
蔗糖	2.00	4	0.50	16.67**
误差	0.11	4	0.03	
总和	12.63			

注:“*”在 $\alpha=0.05$ 水平有显著性差异,“**”在 $\alpha=0.01$ 水平有显著性差异。

3 小结与讨论

生长30 d左右的四棱豆幼胚先用浓硫酸处理8 min,然后用酒精消毒60 s,再用升汞消毒10 min灭菌效果最好。用赤霉素1.5 mg/L对幼胚进行预处理,可以促进幼胚的无菌萌发。适量的6-BA、2,4-D能够促进幼胚的直接成苗和愈伤组织的产生,适合矮生四棱豆种质不定芽诱导的最适培养基为1/2MS+6-BA 1.25 mg/L+2,4-D 0.8 mg/L+蔗糖25 g/L,过高浓度的2,4-D易导致幼胚的褐化、坏死。

幼胚的取材对幼胚挽救成功与否极为重要。李志英等^[7]在对神秘果幼胚离体培养中发现,子叶对幼胚萌发很重要,带子叶的幼芽生长健壮,而不带子叶的幼胚发芽缓慢。本试验中发现有同样的现象,不带子叶的幼胚由于受到损伤而容易产生愈伤组织,直接影响幼胚成苗,其具体机理有待进一步研究。

四棱豆生育期长,一旦在开花后期遇上低温阴雨天气,经常无法收到种子。通过诱导愈伤组织,繁育组育苗的方法保存种质,因为繁育时期长,费用高,组培条件难以控制,在生产中无法实施。运用幼胚挽救技术对未成熟胚进行离体培养,不仅可节省保存种质的时间和费用,更为重要的是每年可赶上到海南加代的季节,加快育种进程。

参考文献:

- [1]全妙华,陈东明. 四棱豆种质资源遗传多样性的RAPD分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2005,29(4):71-73.
- [2]王佩芝,邓淑芳,胥晓. 四棱豆优良品种的引种和良种选育研究[J]. 中国农学通报,2003,19(2):59-62.
- [3]钟海雁,韩军,苏勇,等. 从葛根渣中酶法制备膳食纤维[J]. 作物学报,2005,31(12):1606-1610.
- [4]盖钧镒. 试验统计方法[M]. 1版,北京:中国农业出版社,2000:278-294.
- [5]许传俊,李玲. GA信号转导[J]. 植物生理学通讯,2006,42(5):961-966.
- [6]金竹萍,王永康,郝建平,等. 六月鲜枣的幼胚培养[J]. 生物技术通报,2006(6):108-110.
- [7]李志英,徐立. 神秘果幼胚离体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):501.