

花生不同外植体丛生芽的诱导和植株再生

石文山,滕娜,唐旭日
(滨州职业学院,山东 滨州 256624)

摘要:分别以花生胚轴、子叶、幼叶为外植体,接种于诱导丛生芽培养基上,在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 3500lx 光照条件下培养,就不同外植体、激素配比等对丛生芽诱导的影响及其幼苗的成活率进行了对比研究。

关键词:花生;胚轴;丛生芽;外植体;组织培养;诱导;植株再生

中图分类号:S565.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8581(2007)03-0008-03

Induction and Regeneration of Multiple Buds from Different Explants of Peanut

SHI Wen-shan, TENG Na, TANG Xu-ri

(Binzhou Vocational College, Shandong Province, Binzhou 256624, China)

Abstract: The peanut hypocotyls, cotyledons and young leaves were chosen as the explants to be inoculated on the multiple bud induction culture medium, and cultured under the temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with the illumination condition of 3500lx. The different explants and different ratio of hormone which influenced the induction of multiple buds and the survival and transplanting of the young plants were studied in the paper.

Key words: Peanut; Hypocotyls; Multiple bud; Explants; Tissue culture; Induction; Regeneration

花生是被世界各国广泛种植的经济作物,20世纪80年代以来,我国的花生生产和贸易增长迅速,年产量约占世界总量的 $1/3$ ^[1,2]。但是,其病虫害发生日益频繁和严重,花生的品质和产量均有所下降。因此,改良品质、选育抗病虫花生新品种具有重要的意义。组织培养是花生新品种选育的重要手段,但花生组织培养的植株再生率普遍较低,如何建立高效的花生再生体系是各项研究成功的关键。本试验以成熟花生的不同部位作外植体,通过器官的发生途径来诱导丛生芽,为花生的遗传育种和进一步进行花生的基因工程研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及培养条件 分别选用丰花1号、丰花5号、花育23花生品种成熟的上、下胚轴、全胚轴、子叶、幼叶作外植体。以MS作为基本培养基,附加30%蔗糖和0.55%琼脂,并在此基础上添加不同浓度的BA、NAA、KT、 AgNO_3 等激素。用1mol/L的盐酸或氢氧化钠调节pH值至5.8。培养室内温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度为3500lx、光照时间为16h。

1.2 试验方法 取饱满花生,用无菌水浸泡2h,于超净工作台上,70%乙醇浸1min,无菌水冲洗2次,0.1%~0.15% HgCl_2 灭菌10min,再冲洗5~6次,剥去种皮。

灭好菌的花生接入MS培养基进行无菌发芽,获得无菌苗。培养4~5d,胚轴由黄变绿,分别将上、下胚轴、全胚轴接入诱导培养基,第15d观察到丛生芽点,继续培

养,再待10d左右丛生芽大约1cm长时切下接入伸长培养基,3cm高时就可切下接入生根培养基,待根长出后进行炼苗移栽;灭好菌的花生,将种子延纵向分开,用解剖刀小心切去胚及与子叶相连的胚轴处,切成“V”型,每粒种子可产生2个子叶外植体。将子叶接种在子叶诱导分化培养基上,每15d更换1次培养基;取10d的花生小叶,切去两端,顺着叶脉划出伤口,接入叶片诱导培养基;当观察到丛生芽点后,接种到分化诱导培养基上继续培养,促进芽的形成及伸长,成苗后移至生根培养基中,生根后视情况进行炼苗移栽。

2 结果与分析

2.1 不同外植体成芽能力比较 接种4d后,上胚轴伸长;培养7d,上胚轴切口处出现淡绿色正在分裂、生长的凹凸不平细胞层,靠近培养基的基部膨大,并长出绿色瘤状物,14d左右即有芽点形成。随着时间的推移,基部不断增大,幼芽数逐渐增多(图2);下胚轴则先膨胀,10d左右在与培养基接触部位长出少许愈伤组织,20d左右在形态学上端切口处个别长出芽点,大部分慢慢死亡;全胚轴15d左右,在上胚轴切口处直接长出芽点(图1);子叶先膨胀,约15d左右长出粉白色愈伤组织,接着褐化;幼叶也是先胀大,约30d左右从切口处长出小芽点(图3)。外植体种类对不定芽诱导效果有较大影响,芽诱导率上胚轴为60%、下胚轴为0%、全胚轴70%,子叶为0%,幼叶为30%。结果显示全胚轴出芽率最高,上胚轴其次,子叶和下胚轴最差。

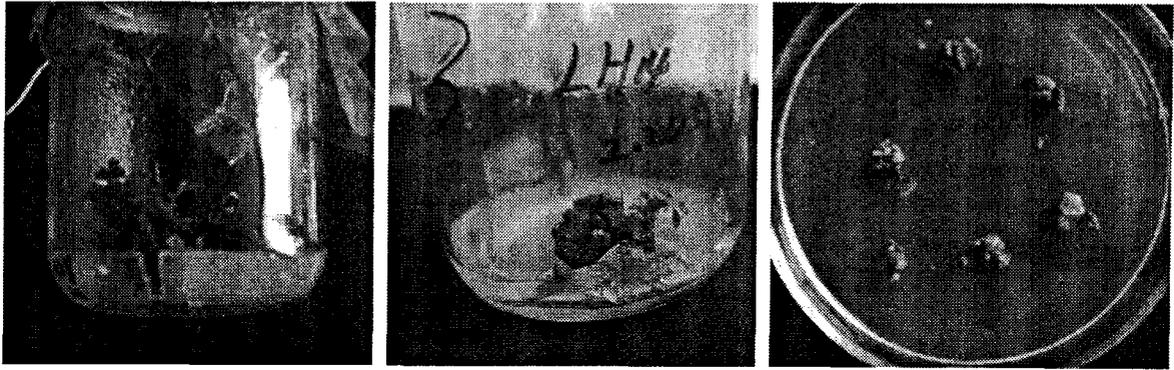
图1 A₂ 诱导产生丛生芽的全胚轴

图2 经诱导产生少数丛生芽的上胚轴

图3 经 E₁ 诱导产生绿色芽点的幼叶

2.2 不同激素配比对丛生芽诱导的影响 每隔 14d 左右,去除底部褐化部分及上部的幼叶,将长出芽点的外植体转至新培养基中。接种后 35d,大多数外植体已出芽,形成了较为整齐一致的丛生芽,最先出芽的嫩梢最长已有 2cm 左右高(图 1)。当 KT 与 BA 混合使用时,能大大地提高外植体的出芽率。由此可见,外源激素是影响花生芽分化的重要因素。在诱导培养基中适当添加 NAA,有助于提高萌动种子胚轴作外植体的植株再生效率(见表 1)。

表 1 不同激素配比对丛生芽的诱导率

处理	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	胚轴接种 数(个)	诱导率 (%)
A ₁	0.8	10	60	17
A ₂	0.7	8	120	72
A ₃	0.6	8	60	67
A ₄	0.6	6	60	33
A ₅	0.6	10	60	28
A ₆	0.4	6	60	32
A ₇	0.8	6	60	17
A ₈	0.6	8 + KT0.02	60	75

结果表明:A₈ 培养基 6 - BA 8mg/L + NAA 0.6mg/L + KT0.02mg/L(单位下同)的胚轴丛生芽诱导率最高,为 75%,该组合最适于丰花 1 号、丰花 5 号、花育 23 花生品种丛生芽的诱导(见表 1);而 E₁ 培养基 MS + AgNO₃ 1.0 + BA 5.0 + NAA 2.5 配比的小叶丛生芽诱导率最高(见表 2)。

表 2 不同激素配比对小叶丛生芽的诱导率

处理	AgNO ₃ (mg/L)	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	小叶接种数 (个)	诱导率 (%)
E ₁	1.0	2.5	5.0	111	43
E ₂	1.5	2.5	5.0	126	24
E ₃	1.0	2.5	7.0	69	16
E ₄	1.0	3.5	7.0	89	10
E ₅	1.0	1.5	7.0	84	8
E ₆	2.0	1.5	8.0	78	5

2.3 不同激素对比对丛生芽伸长及生根的影响 不同激素对丛生芽伸长的影响:经诱导的丛生芽无根苗,从胚

轴上切下单芽接入伸长培养基,2 周后,丛生芽有明显的伸长。以 B₁ 和 B₃ 培养基较为明显。30d 后,不同培养基的伸长效果有显著的差异。从表 3 可以看出,B₂ 的伸长效果最差,应该是由于 GA₃ 在高温灭菌过程中损失很大,应加大用量;B₁ 和 B₃ 的伸长效果没有明显的差异。

表 3 不同激素对伸长的影响

处理	BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	伸长情况
B ₁	2.0	4	伸长很快
B ₂	2.0	2	伸长很慢或几乎不伸长
B ₃	2.5	6	伸长很快,还有小芽萌出

由表 3 可知,以 B₁ 培养基 MS + BA 2.0 + GA₃ 4 配比的伸长最好(见图 4)。

不同激素对生根的影响:经诱导产生的丛生芽无根苗,去掉黄、枯叶切成单芽接入生根培养基,6d 后,部分外植体切口处即有白色根点出现;以 C₂ 和 C₃ 培养基较为明显;15d 后,部分外植体的较粗大的根有细小的支根长出;30d 后,不同培养基的生根率有显著差异。从表 4 可以看出,C₁ 培养基出根率较低,说明在不含激素的条件下,丛生芽基本不长根或长根较少,C₅ 培养基出根率为 34.13%,说明太高浓度的 NAA 不利于根的生长,C₂ 培养基的出根率为 86.1%(见图 5),高于 C₃ 培养基的出根率 80.1%,但根的长势则 C₃ 培养基较好,每个外植体平均含根数为 5 条,多于 C₂,但 C₃ 的支根很少。说明含 1mg/L NAA 的培养基较容易诱导芽出根,而较高浓度的 NAA(2mg/L)不利于侧根生长。

结果表明:以 C₂ 培养基 MS + NAA 1.0 配比的生根最好(见图 5)。

表 4 不同激素对生根的影响

处理	NAA (mg/L)	出根率 (%)	出根情况
C ₁	0	0	无根
C ₂	1.0	86.1	有主根和侧根
C ₃	1.5	80.1	有主根
C ₄	1.8	76.0	有主根,无侧根且根粗大
C ₅	2.0	74.5	有主根,无侧根且根很粗大

2.4 外植体极性及其去除主生长点对丛生芽发生的影响

用医用手术刀将胚芽斜切、横切去除胚根,取完整胚轴、上胚轴、下胚轴按生物学极性方向接种到诱导培养基中,发现下胚轴只发生膨大,有少量愈伤,最后褐化、死亡。上胚轴和完整胚轴,20d 观察到明显的芽点,若极性相反则 25d 左右才能观察到芽点,且芽点均分布在生物学上端极性位置附近。因胚芽较小,有时外植体会带有

胚芽部分,接种 10d 左右,切除此处主生长点,发现外植体丛生芽数量较未切除主生长点的平均增加 8~10 个。

2.5 移栽

待苗高 3~4cm 时,可见发达的主根和大量的须根,将培养瓶移到温室,打开封口膜进行炼苗,一周后将生根的再生植株移至事先经过灭菌的沙土或蛭石中,保持 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 $>80\%$,25d 左右即可将小植株移栽到大田(见图 6)。



图 4 经 B_1 伸长培养基培养的幼苗



图 5 经 C_2 诱导生根的试管苗



图 6 花生组培苗移栽成活的植株

3 讨论

外植体对于建立植物无性繁殖系非常重要,花生上胚轴因有分生组织存在,属于高度再生部位^[1-3]。本试验亦表明,上胚轴虽然属于高度再生部位,但单纯培养上胚轴效果不很理想,出芽率明显减少。对于花生外植体植株再生和丛生芽培养,一般多用低浓度的细胞分裂素和生长素,且设立预培养基进行二次培养,也有利用较高浓度 BA 直接诱导子叶等外植体进行丛生芽培养^[2,3]。试验表明,当 KT 与 BA 协作使用时,能大大提高外植体的出芽率,有利于丛生芽的诱导及扩繁培养。研究表明, AgNO_3 可促进一些再生困难种的形态发生,增加外植体产生不定芽的数目,提高植株再生频率,本研究结果表明, AgNO_3 对花生幼叶丛生芽的发生有明显的促进作用,

不仅提高分化率,而且外植体平均出芽数都有所提高。一些学者认为高浓度 NAA 对花生幼苗生根有利^[4],高浓度的生长素虽然有利于植物生长,但花生生根需要低浓度的生长素。

参考文献:

- [1] 徐平丽,单雷.花生胚轴丛生芽的诱导和植株再生[J].花生科技,1999,(增刊):254~256.
- [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(自然科学版),2003,7:46~49.
- [3] 李爱民,吴琦.花生子叶的芽分化和植株再生[J].植物学通报,1988,5(3):143~145.
- [4] 张鹏.傅爱根. AgNO_3 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J].植物生理学通讯,1997,33(5):376~379.