

花生幼叶丛生芽成苗高频再生体系的建立

苗利娟,黄冰艳,张新友*,陈占宽,严玫,易明林

(河南省农作物新品种重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要:以花生品种豫花 14 号 4 d 苗龄的幼叶诱导的丛生芽为研究对象,对丛生芽的伸长和植株再生进行了研究。分别将丛生芽继代到 4 种不同的培养基上促进芽伸长,其中,以继代培养基 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.4 mg/L+AgNO₃ 2 mg/L 植株再生率最高。当丛生芽长至 3 cm 左右时,移入生根培养基诱导生根,获得完整的再生植株。

关键词:花生;丛生芽;组织培养;植株再生

中图分类号:A565.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-3268(2008)08-0046-03

Construction of Higher Efficient Peanut Regeneration System from the Growth of Leaflet

MIAO Li-juan, HUANG Bing-yan, ZHANG Xin-you*,

CHEN Zhan-kuan, YAN Mei, YI Ming-lin,

(Henan Provincial Key Laboratory for Crop Improvement, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Genetic engineering was an effective way to develop peanut variety. Plant regeneration were studied with the induced proliferation buds of 4 d seedling leaflet of peanut variety Yuhua No. 14. Proliferation buds were planted on 4 subculture. Result showed that subculture medium MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.4 mg/L+AgNO₃ 2 mg/L had the highest rate of plant regeneration. Regeneration plant could be get by transplanted the 3 cm long proliferation buds into the rooting medium.

Key words: Peanut; Cluster shoots; Tissue culture; Regeneration

花生是我国主要油料作物和经济作物之一,可直接作为食品或用于食用油的生产。花生组织培养对花生的品种改良、新品种繁殖、遗传转化、种质保存和抗性突变体的筛选等具有重要意义^[1~3]。采用基因工程技术改良花生的遗传特性,提高抗病性、抗逆性是提高花生产量和质量的有效途径,而建立花生高效再生体系则是花生基因工程研究的关键^[4~6]。近年来,国内外许多学者对花生通过体胚诱导和丛生芽诱导途径获得再生植株进行了研

究^[7~9],通过器官发生和体细胞胚发生途径,成功的获得了再生植株,但普遍存在植株再生频率低、体细胞胚畸形等问题,其中影响因素很多,如花生品种、外植体类型、苗龄、诱导培养基、继代培养基等等。以往,以花生幼叶为外植体,进行了高频不定芽诱导,并获得了高效诱导的丛生芽^[10]。本试验主要针对丛生芽转化成完整植株这一阶段进行研究,探讨花生幼叶丛生芽伸长和植株再生存在的问题,分析诱导培养基和继代培养基对丛生芽成苗的影响,建

收稿日期:2008-02-15

基金项目:国家转基因专项(JY04-B-01)

作者简介:苗利娟(1981-),女,河南安阳人,研究实习生,主要从事植物基因工程研究。

通讯作者:张新友(1963-),男,河南太康人,研究员,博士,主要从事花生遗传育种工作。

立高频再生体系,为花生的遗传育种和进行花生基因工程研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试花生品种豫花 14 号,由河南省农业科学院经济作物研究所提供。

1.1.2 植物激素及化学试剂 6-苄基嘌呤(6-BA), α -萘乙酸(NAA),以及其他常用化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

1.1.3.1 诱导培养基

Y1: MS + 6-BA 8 mg/L + NAA 1 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

Y2: MS + 6-BA 8 mg/L + NAA 1 mg/L + ABA 1 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

Y3: MS + TDZ 0.3 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

Y4: MS + TDZ 0.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

Y5: MS + TDZ 0.05 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

1.1.3.2 分化培养基 MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 2 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

1.1.3.3 丛生芽伸长继代培养基

① MS + AgNO₃ 2 mg/L

② MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

③ MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.4 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

④ MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

1.1.3.4 生根培养基 1/2 MS + NAA 0.8 mg/L + AgNO₃ 2 mg/L

1.2 试验方法

将 4 d 苗龄的花生幼叶横切平均一分为三,接种到诱导培养基上进行培养,诱导丛生芽的形成,2 周左右,有绿色芽点出现,之后将芽点转到分化培养基上促进芽的进一步分化,3 周后出现绿色的丛生芽,将丛生芽切成几份,每份 2~3 个芽点,将这些芽丛分别转至芽伸长继代培养基上,促进丛生芽的进一步发育,3 周继代一次,当芽长至 3 cm 左右时,将其切下转至生根培养基上,发育成完整植株。

2 结果与分析

2.1 诱导培养基对丛生芽伸长的影响

本试验主要观察诱导培养基中的 ABA 和 TDZ 对后期丛生芽伸长的影响。由表 1 可以看出,在没有添加 ABA 的诱导培养基上,丛生芽的伸长率明显高于添加 1 mg/L ABA 的诱导培养基的伸长率,说明 1 mg/L 的 ABA 不利于丛生芽的伸长。表 2 结果表明,在 TDZ 浓度为 0.05 mg/L 时,丛生芽的伸长率最高,比 TDZ 浓度为 0.2 mg/L, 0.3 mg/L 的伸长率高,由此说明,低浓度的 TDZ 有利于丛生芽的伸长。

表 1 诱导培养基中 ABA 对丛生芽伸长的影响

诱导培养基 (mg/L)			继代培养基 (mg/L)		丛生芽的 外植体数	形成植株 的外植体数	伸长率 (%)
6-BA	NAA	ABA	6-BA	NAA			
8	1	0	0	0	55	2	3.64
			0.5	0.4	37	10	27.03
			1	0.4	46	20	43.48
			2	0.4	34	28	82.35
8	1	1	0	0	77	6	7.79
			0.5	0.4	59	13	22.03
			1	0.4	65	15	23.08
			2	0.4	61	18	29.51

注:伸长率=丛生芽的外植体数/形成植株的外植体数×100%。
下同

表 2 诱导培养基中 TDZ 对丛生芽伸长的影响

诱导培养基 (mg/L)			继代培养基 (mg/L)		丛生芽的 外植体数	形成植株 的外植 体数	伸长率 (%)
6-BA	NAA	TDZ	6-BA	NAA			
0.5	0.4	0.3	0	0	30	4	13.33
			0.5	0.4	31	6	19.35
			1	0.4	45	20	44.44
			2	0.4	50	34	68.00
0.5	0.4	0.2	0	0	36	7	19.44
			0.5	0.4	50	23	46.00
			1	0.4	65	45	69.23
			2	0.4	50	35	70.00
0.5	0.4	0.05	0	0	30	12	40.00
			0.5	0.4	60	28	46.67
			1	0.4	50	48	96.00
			2	0.4	61	61	100

2.2 不同继代培养基对丛生芽伸长的影响

将诱导分化的丛生芽分别转移到 4 种不同的继代培养基以促进丛生芽的伸长。据观察,并由表 1、表 2 可知,丛生芽转移至不添加激素的 MS 培养基上继代培养,伸长不明显,且生长速度慢;转移至添加 2 mg/L 6-BA 和 0.4 mg/L NAA 的 MS 继代培养基上,伸长速度快,且伸长率较高。植株再生培养基中添加激素对丛生芽成苗有显著影响,并且植株再生率因培养基中添加激素的浓度而异。

2.3 试管苗的形成与移栽

待苗长至 3 cm, 把丛生苗分离, 转入生根培养基 3 周左右, 可形成发达的根系。把生根健壮的组培苗从光照培养室移出, 炼苗 3~5 d, 然后把瓶口封口膜去掉, 再放置 3 d 左右, 然后将小植株轻轻取出, 取时避免伤根, 用自来水冲净根系上附着的培养基, 若不好冲洗, 可以用毛笔轻轻刷掉, 然后移栽到装有经过高压灭菌的混合土壤(沙土和草炭)的花盆内, 浇透水覆盖薄膜加以保湿, 3 d 后, 白天可以打开薄膜, 晚上覆盖, 1 周后, 可以完全去掉薄膜, 2 周后可以长出新叶, 表明移栽成活, 成活率达到 90% 以上。

3 结论与讨论

3.1 诱导培养基对丛生芽伸长的影响

不同的诱导培养基对芽的伸长也存在一些差异, 诱导培养基中添加的激素种类、浓度及其组合明显影响丛生芽的伸长, 在添加了 1 mg/L ABA 的诱导培养基上伸长率降低, 说明 1 mg/L ABA 不利于芽的伸长, 这与李美芹^[11]结果一致。在添加了 0.05~0.3 mg/L TDZ 的诱导培养基上伸长率较高, 但 0.05 mg/L TDZ 的诱导培养基上丛生芽伸长率最高, 成苗数最多。Huetteman 和 Preece^[12]曾报道, TDZ 可能抑制芽的伸长。但从本试验结果看, 低浓度的 TDZ 有利于丛生芽的伸长。

3.2 继代培养基对丛生芽伸长的影响

丛生芽伸长成丛生苗, 继代培养基非常关键, 培养基如果不适合将造成丛生芽无法伸长。试验表明, 在 MS+AgNO₃ 2 mg/L 上丛生芽伸长率普遍都很低, 而在 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.4 mg/L+AgNO₃ 2 mg/L 伸长率最高。由此可以看出, 不添加激素的 MS 培养基不利于芽的进一步伸长, 在植株再生培养基中添加激素对丛生芽伸长有显著影响, 并且植株再生率因培养基中添加激素的浓度而

异。这与林双荣^[13]的结果不一致。可能是由于品种和诱导培养条件不同造成的。

参考文献:

- [1] 张斌, 范仲学, 柳絮, 等. 花生再生体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(15): 3590—3592.
- [2] 李春娟, 单世华, 万书波. 花生胚小叶外植体再生影响因素研究简报[J]. 花生学报, 2005, 34(3): 36—38.
- [3] 郑奕雄, 周敏, 庄东红. 花生幼叶芽诱导和植株再生研究[J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(3): 13—15.
- [4] 梁丽琨, 由翠荣, 林荣双, 等. 花生基因工程[J]. 生物学通报, 2005, 40(10): 3—5.
- [5] 陈占宽, 张新友, 苗利娟, 等. 花生 Δ^{12} -脂肪酸去饱和酶基因 RNAi 表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 9—12.
- [6] 余云芳, 姚伟, 李红梅, 等. 黑花生再生体系和遗传转化的初步研究[J]. 河南农业科学, 2006(3): 38—42.
- [7] Li Z, Jarret R L, Demski J W. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic peanut expressing the viral nucleocapsid gene[J]. Transgenic Research, 1997(6): 297—305.
- [8] 窦秉德, 何晔, 王芳, 等. 花生不同外植体愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2007, 6(2): 164—167.
- [9] 李艳, 李少雄, 周桂元, 等. 花生幼叶丛生芽的诱导和高效再生体系的建立[J]. 广东农业科学, 2006(6): 14—16.
- [10] 苗利娟, 黄冰艳, 张新友, 等. 花生幼叶丛生芽高效诱导的制约因素研究[J]. 河南农业科学, 2008(1): 40—44.
- [11] 李美芹, 王晶珊, 孙世孟, 等. 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.
- [12] Huetteman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1993, 33: 105—119.
- [13] 林荣双, 梁丽琨, 肖显华, 等. 花生幼叶为外植体的植株再生系统的建立[J]. 植物学通报, 2003, 20(3): 307—312.

(上接第 22 页)

- [17] 王成章, 杨雨鑫, 胡喜峰, 等. 不同苜蓿草粉水平对产蛋鸡蛋黄胆固醇含量影响的研究[J]. 草业学报, 2005, 14(2): 78—85.
- [18] Kindschy R R. Alfalfa in crested wheatgrass seedings[J]. Rangelands, 1991, 13(5): 244—246.
- [19] Ponte P I, Mendes I, Quaresma M. Cholesterol levels and sensory characteristics of meat from broilers consuming moderate to high levels of Medicago sativa

- [J]. Poultry Science, 2004, 83(5): 810—815.
- [20] 郑文明. 苜蓿草粉日粮中添加纤维素复合酶对肉仔鸡生长和饲料利用率的影响[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2006, 34(1): 34—36.
- [21] 冯焱, 刘平, 佟建明. 添加不同剂量苜蓿草粉对肉仔鸡生长性能的影响[J]. 饲料博览, 2007(1): 41—43.
- [22] 陈宏明, 居勇, 吴信生, 等. 苜蓿草粉对新西兰白兔生长的影响[J]. 中国养兔杂志, 2007(1): 18—22.