

大豆耐盐离体筛选分化再生 植株的初步研究

陈 云 昭

(山 西 农 业 大 学)

提 要

大豆 (*Glycine max*) 小真叶外植体直接接种到含不同浓度 NaCl 的选择培养基中, 愈伤组织诱导率随 NaCl 浓度增高而降低, 获得再生植株的最高 NaCl 浓度为 0.25%。用连续逐级转移愈伤组织不断加强选择压的方法, 可使筛选耐盐再生植株的最高 NaCl 浓度提高到 0.3%。

土壤盐渍化解决的办法有两种, 一是用农业工程与灌溉来解决, 这无疑要花大量的人力、物力与财力; 二是培育耐盐的品种, 这是一种经济可行的办法, 而采用常规育种方法培育耐盐植物, 在短期内不易获得成效。近年来植物组织与细胞培养技术的进展为培育耐盐植物提供了一个新的途径^[1], 在组织培养条件下, 对农作物进行各种抗性育种的离体筛选技术, 具有筛选群体大, 可控程度高, 育种周期短和不受季节限制等特点。国内周荣仁等^[2]已从烟草耐盐细胞系分化出再生植株, 国外 Oono 等 (1978, 1982) 用水稻未经诱发的种子诱发愈伤组织, 在含 1.0% NaCl 培养基中选择培养, 获得了高频率的突变体的再生植株, 其耐盐性能遗传至后代^[3]。采用离体筛选技术进行抗性育种重要的基础是组织培养能够再生植株, 否则, 这项技术就不能用于育种。我们已由大豆小真叶外植体一步培养获得再生植株并移栽成活, 开花结荚得到种子^[4]。为使这项技术成果用于抗性育种, 1987年开始进行大豆耐盐离体筛选试验。

材 料 和 方 法

用大豆 (*Glycine max* (L.) Merr., 品种“晋豆1号”为材料。种子在湿砂中萌发

* 本工作受山西省自然科学基金资助

本文于1988年12月17日收到。

This paper was received Dec. 17, 1988.

后,取未伸出子叶的小真叶,用自来水冲去污物,浸入70%酒精1分钟,再用0.1%昇汞消毒12分钟,随后用无菌水冲洗4—5次。消毒后的小真叶,在无菌条件下用解剖刀切割成直径约2 mm的小块,直接接种到含NaCl的选择培养基上。以适宜诱导大豆小真叶一步培养再生植株的培养基($B_5 + KT1.0\text{mg/L} + \text{NAA}0.2\text{mg/L}$)^[5]为对照,选择培养基为对照培养基中每升分别加入1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 g NaCl。培养物在变温(白天25℃左右,夜晚18℃左右)条件下培养,白天补充光照10小时,光照度为3000 Lux。

结 果 和 讨 论

1. NaCl 浓度与愈伤组织的诱导

小真叶外植体在对照与含各种不同浓度NaCl的选择培养基中,形成愈伤组织的过程基本相同,首先外植体膨大,逐渐在表面和切口处开始愈伤组织化,颜色为淡黄绿色。出愈天数,对照与0.1% NaCl的一致,平均为8天,含NaCl 0.15%以上,随NaCl浓度增高而延长,NaCl浓度0.45%时,出愈时间最长,达17天。出愈率,除0.1% NaCl的与对照接近外,其余都明显比对照降低,NaCl浓度越高,出愈率越低(表1)。愈伤组织出现后的增殖速度,NaCl浓度高的较慢,其体积也较小,但结构较紧密,质地也较坚硬。这与高峰等^[6]在含NaCl培养基中培养华盛顿脐橙胚珠愈伤组织时,NaCl 0.05 M/L(相当于0.29%)条件下,愈伤组织生长明显受抑制;周荣仁等^[7]用NaCl筛选出的烟草耐盐细胞的体积随NaCl浓度的增加而减小有一致性。这可能是因为NaCl浓度增高使培养基渗透势降低,愈伤组织细胞吸水困难,含水量减少所致。

表 1 培养基中不同浓度NaCl对大豆小真叶愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effect of different concentration NaCl in media on callus induction of soybean young true leaves

NaCl 浓度 (%) Concentration of NaCl (%)	接种块数 Number of inoculated mass	平均出愈天数 Average days of emergence callus	愈伤组织数 Number of callus	出愈率 (%) Emergence rate of callus (%)
0.0 (对照)	180	8.5	143	79.9
0.1	196	8.5	154	78.5
0.15	108	9	59	59.6
0.2	97	10	51	52.5
0.25	115	11	47	40.8
0.3	84	12.5	28	33.3
0.35	77	14.5	16	20.7
0.4	70	16	8	11.4
0.45	71	17	5	7.0

2. NaCl 浓度对愈伤组织分化再生植株的影响

在对照和选择培养基中形成的小真叶愈伤组织,10—25天开始有分化,对照多数先

分化芽，后分化根，也有的同时分化出芽和根，再生植株的分化频率为31.6%（再生植株数占愈伤组织数的百分率），在NaCl 0.1、0.15、0.2、0.25%的选择培养基中，再生植株的分化频率分别为27.6、18.1、9.3、4.4%（表2）。由表2看出，NaCl浓度增高，分化频率降低，浓度越高影响越大，筛选耐盐大豆再生植株最高的NaCl浓度为0.25%。含NaCl 0.3、0.35%的有少数愈伤组织分化出芽。

试验还观察到，在选择培养基中愈伤组织顶端表面较易分化芽，有的仅分化出一个芽，有的可分化出3—5个芽的丛状芽，根的分化比较难而且晚，产生的再生植株都较对照株矮、茎粗、叶厚，这与盐生植物的肉质性现象似乎有一致性^[8]。将仅分化芽的愈伤组织转移到含NaCl浓度相同而增加NAA比例的选择培养基中诱导根，能得到完整的再生植株。看来，施加选择因子NaCl有抑制NAA促进分化根的作用。NaCl浓度与NAA比例的关系，尚在研究中。

表 2 大豆小真叶愈伤组织在不同浓度 NaCl 培养基中再生植株的分化频率
Table 2 The differentiation frequency of regenerated plantlet of soybean young true leaves callus in different concentration NaCl media

NaCl 浓度 (%) Concentration of NaCl (%)	愈伤组织数 Number of callus	再生植株数 Number of rege nerated plantlet	分化频率 (%) Frequency of differentiation
0.0 (对照)	136	43	31.6
0.1	130	36	27.6
0.15	55	10	18.1
0.2	43	4	9.3
0.25	45	2	4.4
0.3	23	0	0
0.35	16	0	0
0.4	8	0	0
0.45	5	0	0

3. 连续转移愈伤组织不断加强选择压的作用

为提高筛选耐盐大豆再生植株的NaCl浓度界限，将含NaCl 0.2%选择培养基中获得的小真叶愈伤组织（直径约3—4 mm）切成4块，转移到NaCl 0.25%的选择培养基中，10天后再转移到NaCl 0.3%的选择培养基中，这样逐级连续转移4次，结果在NaCl 0.3%选择培养基中的81块愈伤组织中得到2株再生植株，分化频率为2.5%；NaCl 0.35%选择培养基中的57块愈伤组织中分化出6个芽，分化频率为10.5%，未得到完整的再生植株；NaCl 0.4%的选择培养基中的愈伤组织增大，但逐渐褐化。与上述一步筛选培养相比，通过连续逐级转移愈伤组织不断加强选择压的方法，筛选大豆耐盐再生植株的最高NaCl浓度可由0.25%提高到0.3%，也有可能再提高到0.35%。Nabors等（1975，1980）以NaCl作为选择因子，采取连续不断加强选择压的方法，NaCl浓度由开始的0.16%，在半年内一直提高到0.88%，获得了耐盐的烟草突变细胞系，耐性细胞系在0.64% NaCl的分化培养基中分化出植株^[3]。关于盐分过多的数量

界限很难一概而定,一般当表层土壤中含可溶性盐超过 0.1% 时,对一些作物生长开始有抑制作用;达到 0.2% 时,影响较为明显;当含盐量超过 1—3% 时,一般作物都不能生长,甚至引起作物死亡,颗粒无收^[9]。不同作物的耐盐性有强弱之分,豆类的耐盐性弱^[10]。这可能是本筛选试验中获得再生植株的最高 NaCl 浓度 (0.3%) 较烟草 (0.64%) 低的原因。

以 NaCl 作为选择因子加入培养基中,在提高培养基中可溶性盐含量的同时,也降低了培养基的渗透势,将会使培养物吸水困难,造成生理干旱。因此,在 NaCl 选择压存在下,分化出的再生植株应该既有耐盐性,也有耐旱性。

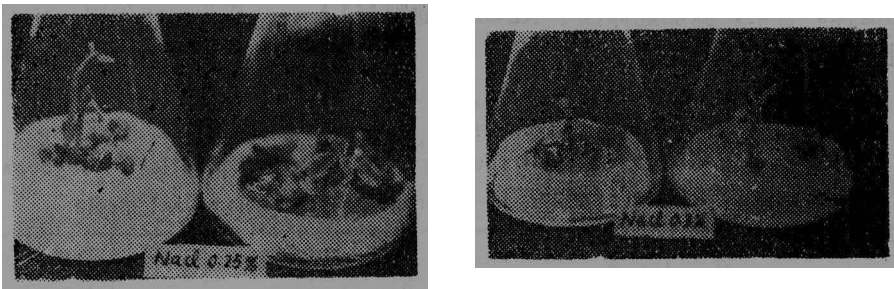


图1 在含 NaCl 选择培养基中分化出的再生植株

Fig. 1 Regenerated plantlet in selection media containing NaCl

目前,初步筛选出的再生植株,部分已移入装有与筛选再生植株相近含盐量土壤(取含 NaCl 为主的自然盐土,经分析全盐量和主要离子含量后,用蛭石调配成需要的含盐量)的塑料盆中,少数已成活。进一步将继续进行大量筛选培养,对筛选出的再生植株的耐盐和耐旱性能进行比较鉴定,并研究这些性能的生理特性及能否遗传至后代的问题。

参 考 文 献

- [1] 罗士书等, 1981, 高等植物体细胞突变体的研究概况 西北植物研究 (1): 72—76
- [2] 周荣仁等, 1984, 烟草耐盐细胞系分化再生植株及耐盐细胞的生理特征 (摘要) 曲阜师院学报植物抗盐生理专刊, 112
- [3] 周荣仁等, 1984, 植物组织培养在选择耐盐植物方面的研究概况 曲阜师院学报植物抗盐生理专刊, 63—83
- [4] 陈云昭等, 1983, 大豆外植体培养再生植株的研究 山西农业大学学报 (1): 41—45
- [5] 陈云昭等, 1984, 激动素和苯乙酸不同浓度对比对大豆组织培养器官分化的影响 大豆科学 (4): 335—343
- [6] 高峰等, 1988, 华盛顿脐橙胚珠愈伤组织的诱导及耐盐性研究 植物生理学通讯 (1): 32—34
- [7] 周荣仁等, 1984, 烟草悬浮培养细胞耐盐性的研究 植物生理学通讯 (5): 13—16
- [8] 李孟扬等, 1984, 鲁北黄河三角洲的盐生植物, 曲阜师院学报植物抗盐生理专刊, 125—133
- [9] 景家骅, 1984, 中国盐碱土概况 曲阜师院学报植物抗盐生理专刊, 134—144
- [10] 周佩珍主编, 1987, 植物生理 安徽科学技术出版社

PRELIMINARY STUDIES ON THE SCREENING OF NaCl-TOLERANTE SOYBEAN PLANTLET REGENERATED FROM TISSUE CULTURE

Chen Yunzhao

(*Shanxi Agricultural University*)

Abstract

The explant of young true leaves of soybean were cultured in the media containing NaCl. The result showed that the rate of callus induction was decreased as the NaCl concentration was increasing. In the media of high NaCl concentration was in creasing. In the media of high NaCl concentration the pullulation rate of callus was slower, the volume smaller. However, the structure became closer, texture harder. Differentiation frequency of the regenerated plantlet was decreased as the NaCl concentration was increasing. The maximum NaCl concentration in which regenerated plantlet could be obtained was 0.25%. Comparing with the control regenerated plantlets, they had short plant, thick stem and thick leaf which seemed consistently to be with succulence of halophyte. The small number of callus obtained in media containing NaCl 0.3% only had differentiation of bud. But by transfer the callus tissues gradually from lower NaCl concentration media to higher concentration regenerated plantlet could differentiate out in the same selection media (NaCl 0.3%). The frequency of differentiation is 2.5%. Small number of callus in media containing more NaCl (0.35%) could differentiate bud as well. It indicates that the maximum NaCl concentration of screening NaCl-tolerante regenerated plantlet can increase to 0.3% then it is possible to reach to 0.35% by constantly enhancing selection pressure.