

冀东地区野生大豆愈伤组织诱导及其耐盐性^{*}

乔亚科 李桂兰 高书国 毕艳娟

(河北职业技术师范学院植物细胞工程实验室, 昌黎 066600)

摘要 以冀东沿海及内地不同条件下生长的 14 个野生大豆为试验材料,选取下胚轴和子叶作为外植体,在四种不同成分的培养基上诱导愈伤组织,经继代观察愈伤组织的质量。同时,在含不同浓度 NaCl(0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)的继代培养基上,观察愈伤组织的耐盐性。试验结果表明:诱导野生大豆愈伤组织的适宜培养基为 MS+2,4-D 2.0mg/L+6-BA 0.5 mg/L+蔗糖 5%+琼脂 0.8%;不同材料之间愈伤组织的耐盐性有明显差异,耐盐性强的可在 0.8%NaCl 浓度下生存,低的只能忍耐 0.2%NaCl 含量;本试验确定野生大豆愈伤组织耐盐性鉴定适宜的浓度为 0.6%左右;盐碱条件下生长的野生大豆一般耐盐性较强,非盐碱环境下生长的野生大豆耐盐性也存在着耐盐性较强的类型,说明生长环境与细胞水平的耐盐性之间并没有完全的对应关系。

关键词 野生大豆;愈伤组织;耐盐性

中图分类号 S565.1 S336 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)03-0208-06

我国约有盐碱土壤面积 2600 万公顷,其中盐碱耕地约有 660 万公顷;提高作物的耐盐性是未来农业发展的重要课题。栽培大豆(*Glycine max*)属中度耐盐植物,盐胁迫条件下,产量下降,盐敏感品种较耐盐品种受胁迫的影响更大^[1,2]。利用耐盐性强的野生大豆与栽培大豆有性杂交,结合离体组织培养技术,进行耐盐性突变体、变异体的离体筛选,是提高大豆耐盐性的一种有效的途径。有关大豆不同外植体愈伤组织诱导及植株再生的研究已有较多报道^[3,4,7-9];栽培大豆在盐胁迫下愈伤组织生理变化及植株再生已进行了初步研究^[3-5]。目前,有关野生大豆愈伤组织诱导及其耐盐性研究的报道较少^[6]。本试验利用野生大豆的下胚轴和子叶做外植体,在不同 NaCl 浓度胁迫下研究其耐盐性,旨在筛选出耐盐性较强的野生大豆,并确定细胞水平下耐盐性筛选的含盐量指标。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料采自冀东地区不同生态环境下的野生

大豆,共选取 14 份有代表性的野生大豆(表 1)。

表 1 14 个野生大豆样本的产地和生态环境
Table 1 The original region and ecological environment of 14 wild soybeans

野生大豆 Wild soybean	产地 Original region	生境 Ecological environment
1	黄金海岸路边	公路西侧,潮湿环境,中度盐碱
2	黄金海岸沟边	公路两侧,潮湿环境,中度盐碱
3	昌黎县后刘坨苇塘	村庄旁苇塘,潮湿环境轻度盐碱
4	黄金海岸靶场公路边	公路两侧,潮湿环境,中度盐碱
5	黄金海岸苇塘	苇塘 重盐碱地
6	昌黎县新开口	入海口,海岸边苇塘,重盐碱地
7	昌黎县前刘坨河沟	河岸 潮湿环境,无盐碱
8	迁西县山区	山坡 无盐碱地
9	青龙县山区	山坡及山间小溪边,无盐碱
10	迁安市首钢.村庄附近	村庄附近,轻度盐碱
11	青龙祖山景区(老岭)	山间小溪边,潮湿环境,无盐碱
12	丰润县刘家哨村苇塘边	农家庭院,轻度盐碱
13	昌黎县前刘坨村附近	村旁 轻度盐碱
14	昌黎县原种场	农田旁,轻度盐碱

1.2 试验方法

^{*} 收稿日期:2002-03-11
项目来源:河北省山区开发课题。
作者简介:乔亚科(1964-),男,副教授,从事大豆等遗传资源及育种研究。

1.2.1 无菌苗的获得 将成熟野生大豆种子用小刀破皮后, 用 75 % 酒精消毒 1min, 然后放入 0.1 % 的汞溶液中浸泡 10min, 在超净台上用无菌水冲洗 4 次, 将处理好的种子在种子萌芽培养基上, 在 20℃、弱光条件下培养。

表 2 诱导愈伤组织的培养基
Table 2 The medium of inducing callus

培养基代号 No. of medium	培养基配方 Composition of medium
D ₁	MS+2, 4-D 1.0mg/L+6-BA 0.5 mg/L + 糖 3%+ 琼脂 0.8%
D ₂	MS+2, 4-D 4.0mg/ L+6-BA 0.5 mg/L + 糖 3%+ 琼脂 0.8%
D ₃	MS+2, 4-D 0.5mg/ L+KT 0.5 mg/L + 糖 3%+ 琼脂 0.8%
D ₄	MS+2, 4-D 2.0mg/ L+6-BA 0.5 mg/L + 糖 3%+ 琼脂 0.8%

1.2.3 继代培养 愈伤组织每隔 15—20 天, 重新接种在 D₄ 培养基上, 继代培养四次。

1.2.4 盐胁迫培养 取已获得的愈伤组织接种到不同浓度的盐胁迫培养基上, 选用 D₄ 培养基附加不同浓度的 NaCl, 其浓度依次为 0, 0.2 %, 0.4 %, 0.6 %, 0.8 %, 1.0 %, 共六个处理, 每处理接 50—60 块愈伤组织, 在 23—25℃条件下培养, 调查其耐盐性。

表 3 14 个野生大豆在四种培养基上愈伤组织的表现

Table 3 The callus phenotypes of 14 wild soybeans on 4 kinds of medium

野生大豆 Wild soybean	外植体 Explant	培养基 Medium				野生大豆 Wild soybean	外植体 Explant	培养基 Medium			
		D ₁	D ₂	D ₃	D ₄			D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
1	下胚轴	++	+++	+++	+++	8	下胚轴	+	++	++	++
	子叶	++	++	++	+++		子叶	+	+	++	++
2	下胚轴	++ +	+++	+++	+++	9	下胚轴	+	++	+++	++
	子 叶	++	++	++	++		子叶	+	++	++	++
3	下胚轴	+++	+++	+++	++++	10	下胚轴	+++	++ +	+++	++++
	子叶	++ +	+++	+++	++++		子叶	+++	+++	+++	++++
4	下胚轴	+	+	+	++	11	下胚轴	++	+++	+++	+++
	子叶	+	+	+	+		子叶	++	++	+++	+++
5	下胚轴	+++	++	++	+++	12	下胚轴	+	++	++	+++
	子叶	++	++	+++	+++		子叶	++	++	+++	+++
6	下胚轴	+++	+++	+++	++++	13	下胚轴	+	+	++	+++
	子叶	+++	+++	+++	++++						
7	下胚轴	++	+++	+++	+++	14	下胚轴	+++	+++	+++	+++
	子叶	+	++	++	+++		子叶	+++	+++	+++	++++

注: “++++” 愈伤组织质量最好, 体积大, 新鲜均匀疏松, 黄绿色; “+++” 愈伤组织质量较好, 体积较大, 较新鲜疏松 黄色; “++” 愈伤组织质量较差, 体积较小, 发暗, 较硬, 黄中带褐色; “+” 愈伤组织质量差, 体积小, 老化 致密, 黄褐色。

不同的培养基上, 不同野生大豆出现愈伤组织的时间基本相同, 而同一野生大豆的不同外植体出现愈伤组织的时间却有所不同, 下胚轴和子叶相差一周左右, 说明利用下胚轴作外植体更有利于愈伤组织的诱导(见表 4)。

2.2 不同野生大豆对诱导愈伤组织的影响

1.2.2 愈伤组织的诱导 无菌苗培养一周后, 选取下胚轴和子叶为外植体诱导愈伤组织, 下胚轴剪成 2—4mm 的小段, 剪切子叶, 接种在诱导培养基上, 光照 14 小时, 23—25℃条件下诱导愈伤组织。诱导愈伤组织的培养基如表 2。

2 结果分析

2.1 不同激素对愈伤组织诱导的影响

参考其它学者的研究报道, 本实验选用了 4 种培养基, 其愈伤组织的诱导效果有较大差异, 供试的样本材料在 D₄ 培养基上表现最优(见表 3), 说明 2, 4—D 2.0mg/L 的含量是诱导愈伤组织的适宜浓度。

将愈伤组织在 D₄ 培养基上经过四次继代, 观察不同材料愈伤组织的表现(表 5)。不同野生大豆愈伤组织的表现有一定的差异, 其中 4, 8, 9 与 3, 6, 7, 10, 12, 14 差异非常明显; 4, 8, 9 的愈伤组织在培养过程中表现为深黄色, 致密, 体积小, 后期表面出现褐点; 3, 6, 7, 10, 12, 14 表现为黄绿色, 结构疏松, 体

表 4 各野生大豆出现愈伤组织的天数(接种—出愈伤)
Table 4 The days of forming callus in different wild soybeans

野生大豆 Wild soybean	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledon	野生大豆 Wild soybean	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledon
1	15	21	8	20	21
2	15	21	9	20	21
3	16	21	10	16	21
4	16	21	11	16	21
5	16	21	12	16	21
6	14	21	13	16	——
7	15	20	14	14	19

表 5 14 种野生大豆不同外植体的愈伤组织在继代培养基上的表现
Table 5 The callus phenotypes from different explants of 14 wild soybean on subculture medium

野生大豆 Wild soybean	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	野生大豆 Wild soybean	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon
1	+++	++	8	+	+
2	++	++	9	+	+
3	++++	++++	10	++++	++++
4	++	+	11	+++	++
5	+++	++	12	+++	+++
6	++++	++++	13	++	
7	+++	++++	14	++++	+++

积大,后期表面仍保持潮湿,新鲜,颜色稍微变绿。由此筛选出愈伤组织质量好的材料为3、6、7、10、12、14。同时,实验结果还表明同一材料的不同外植体的愈伤组织的质量也有差异,一般下胚轴的愈伤组织比子叶的愈伤组织好。

2.3 不同野生大豆愈伤组织的耐盐性差异

经过继代的愈伤组织接种在含不同 NaCl 浓度的选择培养基上,发现大多数对照组、含 NaCl 0.2%组和 0.4%组长势较好,0.6%、0.8%组生长较差,开始出现死亡的愈伤组织,1.0%组中的愈伤组织大部分死亡,只有个别存活(表 6)。结果表明,野生大豆的愈伤组织随 NaCl 浓度的升高,生长量逐渐降低,体积减小,颜色加深,由黄绿色变至黑褐色至死亡;一般在 NaCl 浓度为 0.2%时,愈伤组织的表现同 CK 相似,颜色为黄绿色,生长量大,表面新鲜;NaCl 浓度为 0.4%时,愈伤组织的表现略微有所降低,有个别材料愈伤组织的表面出现褐点,有的甚至已死亡;NaCl 浓度为 0.6%时,愈伤组织的表面一般出现褐点,抗盐性差的已经褐化或死亡;NaCl 浓度为 0.8%和 1.0%时,大部分愈伤组织的颜色变为黑褐色,已经死亡。根据本试验的结果,初步确定细胞水平鉴定耐盐性适宜的浓度为 0.6%左

右(表 7)。在细胞水平耐盐性较强的材料为 4、6、7、10、11、12、13、14。在 14 个野生大豆样本中,8 和 9 的愈伤组织质量并不最好,但在盐胁迫的影响下表现却较稳定。8 在 NaCl 浓度为 0.2%和 0.4%时表现相似,最高耐盐浓度为 0.6%;9 在 NaCl 浓度为 0.2%、0.4%、0.6%和 0.8%时表现相似,最高耐盐浓度为 0.8%,它们随 NaCl 浓度的升高却不表现很大的变化。3 的愈伤组织在无盐胁迫的条件下质量非常好,但该材料并不耐盐,NaCl 浓度为 0.4%,就出现了死亡现象。

2.4 不同生态环境来源的野生大豆愈伤组织的耐盐性差异

实验发现野生大豆的生境与愈伤组织的耐盐性并不存在绝对关系(表 6)。在重盐碱环境中生长的野生大豆,其愈伤组织不一定都有强耐盐性,如野生大豆 5 的表现,其本身生长在重盐碱条件下,但是其愈伤组织在 NaCl 浓度为 0.4%时就出现褐化,0.8%时全部死亡。而在无盐碱或中、轻盐碱环境下的野生大豆,有的愈伤组织的耐盐性却较强,如表中 4、7、10、11、12、13、14 所示,在 NaCl 浓度为 0.6%时,愈伤组织表面只出现褐点,NaCl 浓度为 0.8%时仍有个别存活。

表 6 14 个野生大豆在含盐培养基上愈伤组织的表现

Table 6 The callus phenotypes of 14 wild soybean on medium containg NaCl

野生大豆 Wild soybean	外植体 Explants	NaCl(%)					
		0(CK)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
1	下胚轴	+	+	—	—	—	—
	子叶	+	+	—	—	—	—
2	下胚轴	++	+	+	+, 0	0	—
	子叶	++	+	+, 0	+, 0	—	—
3	下胚轴	++++	+++	++	—	—	—
	子叶	++++	+++	0	—	—	—
4	下胚轴	++++	++++	+++	++	—	—
	子叶	++++	++++	++	+	—	—
5	下胚轴	++	+	+	+	—	—
	子叶	++	++	+	+, 0	0	—
6	下胚轴	++++	++++	++++	+++	—	—
	子叶	++++	++++	++++	+++	+, 0	—
7	下胚轴	+++	++++	+++	++	—	—
	子叶	++++	+++	+++	+, 0	—	—
8	下胚轴	+	+	+	0	—	—
	子叶	+	+	+	+, 0	—	—
9	下胚轴	+	+, 0	+, 0	+, 0	+, 0	—
	子叶	+	+	+, 0	+, 0	0	—
10	下胚轴	+++	++ +	+++	+	+, 0	0
	子叶	++++	++++	++++	++	+, 0	0
11	下胚轴	+++	+++	+++	++	+	+, 0
	子叶	+++	+++	+++	+	+, 0	+, 0
12	下胚轴	++++	++++	++++	++	+	—
	子叶	++++	++++	++++	+	+, 0	—
13	下胚轴	++++	++++	++++	+, 0	—	—
	子叶	++++	++++	++	+, 0	—	—

注:“++++”愈伤组织质量最好, 体积大, 新鲜均匀疏松, 黄绿色;“+++”愈伤组织质量较好, 体积较大, 较新鲜疏松, 黄色;“++”愈伤组织质量较差, 体积较小, 发暗, 较硬, 黄中带褐点;“+”愈伤组织质量差, 体积小, 致密, 黄褐色;“0”愈伤组织质量差, 体积小, 褐化;“—”愈伤组织褐色, 死亡;“——”愈伤组织黑褐色, 已枯死。

表 7 不同生态环境来源的野生大豆愈伤组织的耐盐性差异

Table 7 The callus salt-tolerant difference of wild soybeans from different ecological environment

野生大豆 Wild soybeans	生长正常时的耐盐浓度(%) NaCl tolerant concentration under normal growth	最高耐盐极限浓度(%) Highest NaCl-tolerant concentration	生态环境 Ecological environment
1	0.2	0.2	公路两侧, 潮湿环境, 中度盐碱
2	0.2	0.6	公路两侧, 潮湿环境, 中度盐碱
3	0.2	0.4	村庄旁苇塘, 潮湿环境, 轻度盐碱
4	0.4	0.6	公路两侧, 潮湿环境, 中度盐碱
5	0.2	0.4	苇塘, 重盐碱
6	0.4	0.8	入海口, 海岸边苇塘, 重盐碱
7	0.4	0.6	河岸, 潮湿环境, 无盐碱
8	0.4	0.6	山坡, 无盐碱地
9	0.2	0.8	山坡及山间小溪边, 无盐碱
10	0.4	0.8	村庄附近, 轻度盐碱
11	0.4	1.0	山间小溪边潮湿环境, 无盐碱
12	0.4	0.8	农家庭院, 轻度盐碱
13	0.4	0.6	村旁, 轻度盐碱
14	0.4	0.6	农田旁, 轻度盐碱

3 结论与讨论

本试验研究了不同成分的培养基和不同野生大豆的愈伤组织诱导及愈伤组织的耐盐性。

从不同成分的培养基诱导愈伤组织的快慢、质量看, MS+2, 4-D 2.0mg/L+6-BA 0.5 mg/L+糖 3%+琼脂 0.8%是野生大豆适宜的愈伤组织诱导培养基, 这与在栽培大豆上的实验结果较一致^[7,8,9]。

试验表明不同遗传背景的野生大豆产生愈伤组织的质量不同, 在无 NaCl 盐环境下材料 3、6、7、10、11、14 的愈伤质量较好; 进一步研究植株分化可以选用这些材料。

不同野生大豆之间愈伤组织的耐盐性有明显差异, 耐盐性强的可在 0.8%NaCl 浓度下生存, 低的只能忍耐 0.2%NaCl 含量; 试验发现野生大豆 6、7、10、11、12、14 等在细胞水平耐盐性较强; 愈伤组织的生长除在 0.2%NaCl 培养基上与对照相同外, 其余都比对照有所降低, NaCl 浓度越高, 愈伤组织的质量越差, 增殖速度变慢, 体积小, 结构较紧密。本试验初步确定野生大豆愈伤组织耐盐性鉴定适宜的浓度为 0.6%左右。

沿海盐碱环境下来源的野生大豆的愈伤组织一

般耐盐性较强, 内陆地区, 山区(青龙县老岭)不含盐碱环境下来源的野生大豆的愈伤组织的耐盐性也存在高耐盐性类型, 说明非盐碱环境下生存的野生大豆不一定不耐盐。

有关野生大豆愈伤组织分化植株问题, 仍需加强研究。

参 考 文 献

- 1 邵桂花, 常汝镇, 陈一舞. 大豆耐盐性研究进展[J]. 大豆科学, 1993, 12(3): 244—248.
- 2 常汝镇, 陈一舞, 邵桂花, 等. 盐对大豆农艺性状及子粒品质的影响[J]. 大豆科学, 1994, 13(2): 101—105.
- 3 陈云昭. 大豆耐盐离体筛选分化再生植株的初步研究[J]. 大豆科学, 1989, 8(4): 339—342.
- 4 马淑英, 尹田夫, 袁鹰, 等. 盐胁迫对大豆发育子叶愈伤组织的生化影响[J]. 大豆科学, 1997, 16(3): 227—232.
- 5 陈云昭, 王玉国. 在盐胁迫下获得的大豆愈伤组织及再生植株的生化反应[J]. 大豆科学, 1992, 11(1): 70—73.
- 6 邵启全, 蒋兴耀, 周泽其, 等. 野生大豆(*Glycine soja*)细胞系建立的初步研究[J]. 大豆科学, 1983, 2(4): 316—320.
- 7 程林海, 孙毅, 刘少翔. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 2(2): 21—24.
- 8 刘莉, 赵桂兰. 大豆子叶节组织培养再生研究[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(5): 16—19.
- 9 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9—13.

THE STUDY ON SALT-TOLERANCE ABILITY AND INDUCTION OF CALLUS OF WILD SOYBEAN IN EASTERN OF HEBEI PROVINCE

Qiao Yake Li Guilan Gao Shugo Bi Yanjuan

(Hebei Vocation—Technical Teachers College, Changli, 066600)

Abstract The 14 genotypes of wild soybean growing at different conditions in eastern of Hebei province were studied in this paper. Hypocotyls and cotyledon were used as explants, through tissue culture, calli was induced on 4 kinds of medium containing different composition. The calli were subcultured on D4 medium for 4 times. The salt-tolerance of calli was observed on different medium containing 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%NaCl. Ability of salt-tolerance was identified through growth amount, quality, becoming brown and death ratio of calli. The results showed that MS+2, 4-D2.0mg/L+6-BA0.5mg/L+sucrose 5%+agar 0.8% is the best medium for callus induction. Salt-tolerance ability of calli had obvious different among different wild soybean. The stronger salt-tolerance wild soybean could survive at the concentration of 0.8% NaCl. The ability of salt-tolerance of 6、7、10、11、12、14 was stronger, the growth amount and quality of calli descended with the rising of concentration of NaCl. The experiment indicated that screening concentration for salt-tolerance of wild soybean is 0.6%NaCl. Generally, the wild soybeans from saline soil have stronger ability of salt-tolerance, where as the wild soybean from non-saline environment have very strong existing ability in NaCl medium, too. There

was not complete correspondence relation between growth environment and salt—tolerance ability at cell level. The results suggested that the relation of salt—tolerance ability at cell level and plant level should study further.

Key words Wild soybean; Callus; Salt—tolerance

2003 年《中国农业科学》(中、英文版)征订启事

《中国农业科学》中、英文版是中国农业科学院主办的全国性、综合性、学术性期刊。主要刊登农牧业基础科学和应用科学研究论文。主要栏目有作物遗传育种、质资源;植物保护;生理生态、作栽培;土壤肥料、节水灌溉;园艺;贮藏、保鲜、加工;畜牧、兽医;综述与专论;研究简报、快讯等。读者对象主要是国内外农业科学研究所、农业院校,以及综合性大学等有关农业科学研究与管理人员。该刊于 1997~2000 年连续 4 年影响因子、总被引频次两项重要指标均名列全国农业学术期刊最前列和前列;1999 年荣获首届国家期刊奖;从 1999 年起,被评选为国家自然科学基金专项资助期刊;2001 年入选中国期刊方阵最高级别—双高期刊;中国科学院科技期刊研究课题组 2002 年 1 月公布,《中国农业科学》在中国自然科学学术期刊显示度排名表中位居农林科学类期刊第一名;2002 年 6 月在第三届全国农口优秀期刊评比中荣获学术类期刊一等奖第一名。现为全国综合性农业科学类核心期刊。

《中国农业科学》中、英文版 2003 年均均为月刊,大 16 开,120 页,国内外公开发行。中文版国内统一刊号:CN11—1328/S,国际标准刊号:ISSN0578—1752,邮发代号:2—138,国外代号:BM43。定价 22.00 元,全年定价 264.00 元;英文版国内统一刊号:CN11—4720/S,国际标准刊号:ISSN1671—2927。邮发代号 2—851,国外代号:1591M,国内定价 25.00 元,全年 300.00 人民币,国外定价 25.00 美元,全年定价 300.00 美元。广告经营许可证:京海工商广字第 0178 号。编辑部地址:北京中关村南大街 12 号,邮政编码:100081;电话:(010)68919808 68975146 68976244;传真:68976244;电子邮件:zgnykx@mail.caas.net.cn;网址: <http://www.ChinaAgri.Sci.com>