

小黑豆组织培养的研究^{*}

燕平梅^{1,2} 畅晓晖³ 薛文通² 张 慧² 王玉国⁴

(1. 太原师范学院; 2. 中国农业大学; 3. 北京师范大学; 4. 山西农业大学)

摘要 以应县小黑豆的下胚轴、子叶、小真叶为试验材料, 研究不同培养基对小黑豆愈伤组织诱导和器官分化的影响。结果表明: NAA 和 BA 单独使用不利用小黑豆的离体培养, 细胞分裂素与生长素结合使用有利于小黑豆愈伤组织的诱导和器官分化。下胚轴在 $Ms+BA2mg/L+IAA0.5mg/L$ 、 $Ms+BA1.5mg/L+IAA0.5mg/L$ 、 $Ms+KT2mg/L+NAA0.2mg/L$ 培养基中植株再生频率为 46%、46%、16%, 在前两种培养基中下胚轴外植体分化出丛生芽。小黑豆下胚轴愈伤组织诱导率、再生植株分化率较子叶、小真叶高。

关键词 小黑豆; 组织培养; 愈伤组织; 培养基

中图分类号 S 336 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)01-0012-05

应县小黑豆是半野生型大豆, 植株比较矮小, 呈蔓生状, 种皮黑色, 抗虫能力强, 对大豆孢囊线虫有良好抗性^[1]。是大豆抗孢囊线虫的基因资源之一。黑豆在营养数量与质量上都具有优势, 蛋白质含量高达 49.8%, 与黄豆相比, 黑豆赖氨酸高出 15.5%, 苏氨酸高出 15.3%, 蛋氨酸高出 29%, 黄酮及类黄酮化合物高于普通黄豆 5~7 倍, 硒含量比黄豆高 60.9%^[2], 因此小黑豆又是丰富大豆遗传变异的潜在基因资源。由于应县小黑豆产量低, 限制其在农业生产中的广泛应用。本文进行小黑豆离体培养的研究, 试图建立起高效的增殖体系, 为采用细胞和基因方法改良小黑豆提供一定的技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

应县小黑豆 [国家种质资源库统编号 ZDD2226] 种子经严格精选后, 先用 75% 酒精表面消毒 30 秒, 再用 0.1% 升汞灭菌 8 分钟, 随后用无菌水冲洗 5~6 次, 加入适量灭过菌的水在培养室中萌发培养, 一周后取下胚轴、子叶、小真叶为试验材料。

1.2 实验方法和培养条件

1.2.1 选择适合小黑豆离体培养的基本培养基;

将小黑豆种子的下胚轴切段(约 2mm 薄片)分别接种于 Ms 、 B_5 、Miller 三种基本培养基附加 $KT2mg/L$ (单位下同) + $NAA0.2$ 的培养基中培养, 连续观察, 选出能诱导外植体再分化的基本培养基进行下面激素配比的试验。

1.2.2 不同激素配比对小黑豆愈伤组织的诱导和器官分化影响的试验; 使用 NAA 和 6-BA、IAA 和细胞分裂素(6-BA、KT)、KT 和生长素(IAA、NAA) 三种激素配比的试验。激素浓度见结果分析。

1.2.3 小黑豆不同器官离体培养的试验; 选用小黑豆的下胚轴、子叶、小真叶为外植体, 接种于 $Ms+KT2+NAA0.2$ 的培养基中比较三种外植体再分化的情况。

1.2.4 外植体的培养条件; 实验用的培养基是含琼脂 0.7% 的固体培养基, pH 为 5.8, 经 121℃ 湿热灭菌 20 分钟后接入外植体, 于变温条件下培养, 昼夜温度 25/18℃, 白天用日光灯补充光照 12h, 光强 2000-3000 lx。

2 结果和分析

2.1 不同基本培养基对小黑豆离体培养的影响
在无菌条件下, 将小黑豆下胚轴切段接入附加

* 收稿日期: 2004-06-28

作者简介: 燕平梅(1968-), 女, 讲师, 在职博士, 研究方向食品生物技术。电话: 010-62397696 E-mail: yanpingmei@sohu.com
©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

KT2mg/L(单位下同)+NAA0.2 的不同类型的基本培养基中培养 30 天, 结果见表 1。

表 1 不同基本培养基对下胚轴离体培养的影响
Table 1 The effect of the differente culture medium on hypocotyls explant

基本培养基 Medium	接种数 No. of inoculated explants	诱导率 Rate of inducement	愈伤组织颜色 Color of cullus	分化结果 Differen-tiation
Ms	60	99%	绿色	根
Miller	60	70%	暗绿色	-
B ₅	60	98%	黄绿色	-

实验结果表明, 下胚轴外植体在 Ms, Miller, B₅ 三种培养基均能经激素诱导形成愈伤组织, B₅ 和 Ms 培养基具有较高的诱导率, Miller 培养基中诱导

率较低为 70%。Ms 基本培养基所诱导的愈伤组织生长快, 连续培养三周后从愈伤组织分化出不定芽。B₅ 基本培养基中形成的愈伤组织容易衰老。培养 25 天组织变为褐色。Miller 基本培养基中愈伤组织出现时间比 Ms、B₅ 迟 3-5 天, 且生长不良, 说明小黑豆培养适宜于无机盐浓度高的培养基。最适基本培养基为 Ms。

2. 2 不同激素对比对小黑豆离体培养的影响

2. 2. 1 不同浓度的 6-BA 和 NAA 配合对下胚轴离体培养的影响

无菌条件下, 切取 5mm 左右小黑豆下胚轴切段, 加入附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 Ms 培养基中培养 25 天, 结果见表 2。

表 2 6-BA 和 NAA 不同对比对下胚轴离体培养的影响

Table 2 The effect of the differente concentration of 6-BA and NAA on hypocotyls explant

组号 No.	6-BA	NAA	接种数 No. of inoculated explants	诱导率 Rate of induce-ment	愈伤组织特征 Character of cullus	分化结果 Differen-tiation	组号 No.	6-BA	NAA	接种数 No. of inoculated explants	诱导率 Rate of induce-ment	愈伤组织特征 Character of cullus	分化结果 Differen-tiation
1	0	0	30	0		-	8	0.2	0.1	30	50%	较紧密	-
2	0	0.2	30	0		根	9	0.5	0.2	30	98%	紧密	-
3	0	0.5	30	0		根	10	1.5	0.2	30	100%	紧密	-
4	0.2	0	30	20%	较紧密	-	11	2	0.2	30	100%	极紧密	-
5	0.5	0	30	40%	较紧实	-	12	3	2	30	80%	较疏松	-
6	0.2	0.2	30	45%	疏松	根	13	4	3	30	70%	疏松	-
7	0.2	0.5	30	48%	疏松	根	14	5	0.2	30	50%	极疏松	-

接种于培养基上的下胚轴切段, 除组 1, 组 2, 组 3 外, 其他组别在 5-10 天内陆续出现愈伤组织。一般是切口首先发生不同程度的肿胀, 随后出现乳白色的愈伤组织。随着培养时间的延续, 逐渐转变为黄色、致密的愈伤组织。Ms 基本培养基中单加 6-BA 或同时附加 6-BA 和 NAA 时, 能不同程度诱导外植体脱分化产生愈伤组织。组 6, 组 7 实验结果表明, 培养基中 NAA 浓度高于或等于 6-BA 时, 能形成少量疏松的愈伤组织。组 8 到组 13 实验结果可以看出, 培养基中 6-BA 浓度高于 NAA 时, 有利于愈伤组织的形成; 但二者的绝对浓度和相对浓度都影响愈伤组织的生长。6-BA 在 0.5-3mg/L 范围内, 与低浓度 NAA 配合使用, 有良好的促进作用; 6-BA 大于 5mg/L, 开始表现出一定的抑制作用; 6-BA 小于 0.2mg/L, 表现出用量不足, 愈伤组织生长缓慢。NAA 与 6-BA 配合使用, 二者比值大于或等于 1(组 6, 组 7)时, NAA 相对浓度过大, 对愈伤组织诱导生长不利; 二者比值小于 1 时, NAA

在 0.1-2mg/L 范围, 有较好的促进作用; NAA 大于 2mg/L, 表现出一定抑制作用。NAA 浓度不变(0.2)愈伤组织生长随 6-BA 浓度升高而加快。

上述实验连续培养过程中, 有的培养基中外植体分化出不定根。NAA 与 6-BA 比值高或相等组别(组 6, 组 7)有不定根的分化。NAA 单独附加 Ms 培养基中不通过愈伤组织直接诱导不定根的产生。NAA 与 6-BA 比值低的培养基未见不定根, 说明 6-BA 相对浓度高对根分化有延迟和抑制作用。

2. 2. 2 不同分裂素对下胚轴离体培养的影响

将小黑豆下胚轴切段接入附加不同浓度 6-BA、KT 与 IAA 结果见表 3。

从实验结果可以看出, 不同种类细胞分裂素(6-BA 与 KT)与 IAA 配合均能诱导外植体产生愈伤组织, 诱导率都为 100%。而愈伤组织颜色质地以及增殖速度具有明显差异。生长素(IAA)浓度一样, 6-BA 细胞分裂素所诱导的愈伤组织较 KT 的颜色绿, 说明 6-BA 比 KT 有利于愈伤组织叶绿素的形

成. KT 对愈伤组织增殖作用强于 6 - BA, 且 KT 浓度愈高, 增殖能力愈强, 说明 KT 比 6 - BA 有利于愈伤组织的生长。

表 3 不同细胞分裂素对下胚轴离体培养的影响

Table 3 The effect of the differente cytokinin on hypocotyls explant

细胞分裂素 Cytokinin		IAA 浓度 Concentration	接种数 No. of inoculated explants	诱导率 Rate of inducement	愈伤组 织特征 Character of callus	分化结果 Differen tiation	
种类 Kinds	浓度 Concentration						
6 - BA	2	0.5	60	100	紧密	-	丛生芽
6 - BA	1.5	0.5	60	100	紧密	-	丛生芽
6 - BA	1	0.5	60	100	较紧密	-	-
6 - BA	0.5	0.5	60	100	较紧密	根	-
KT	2	0.5	60	100	疏松	根	-
KT	1.5	0.5	60	100	疏松	根	-
KT	1	0.5	60	100	疏松	根	-
KT	0.5	0.5	60	100	疏松	根	-

诱导培养基不经转移连续培养二周后, KT 与 IAA 组合的培养基中外植体下胚轴先后分化出不定根, 高浓度 KT 培养基中, 根的分化较低浓度 KT 的晚、分化率低, 且 KT 浓度愈低, 不定根的分化率愈高。6 - BA2 + IAA0.5 和 6 - BA1.5 + IAA0.5 培养基培养三周后, 从愈伤组织分化出丛生芽(照片

1), 前者分化率为 63%, 后者为 48%, 在后来生根培养基中, 从愈伤组织基部分化出不定根(照片 2), 而 6 - BA1 + IAA0.5 和 6 - BA0.5 + IAA0.5 培养基中愈伤组织无芽的分化, 有根的分化。说明不定芽的分化不仅与细胞分裂素和生长素种类有关, 而且与它们的浓度比例的大小有关。

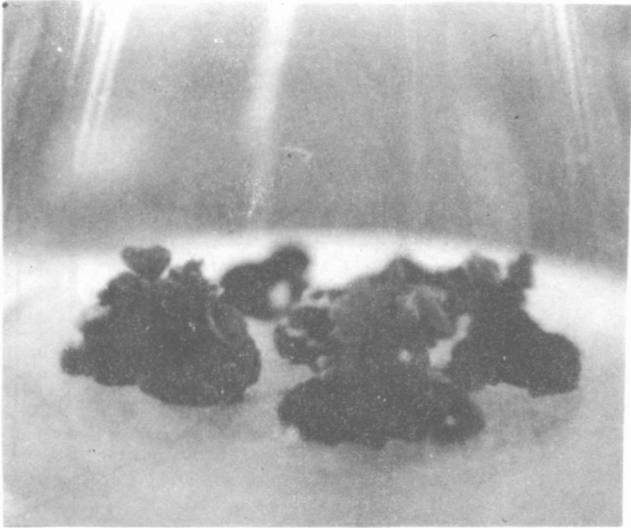


图 1 下胚轴通过愈伤组织形成丛生芽
(培养基为 Ms+BA2+IAA0.5)

Fig. 1 The multiple shoot from callus of hypocotyls(medium Ms+BA2+IAA0.5)

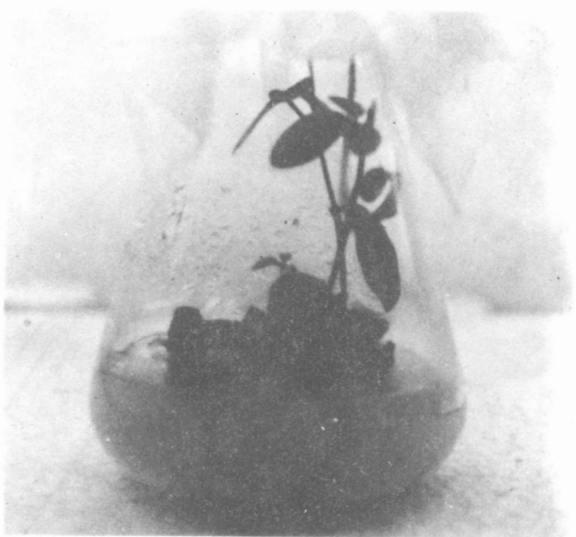


图 2 小黑豆组织培养形成完整植株

Fig. 2 The plantlets regenerated from hypocotyls

2.2.3 不同种类生长素对下胚轴愈伤组织诱导的影响

在 Ms 附加不同生长素(IAA、NAA、2,4-D)与 KT2 的培养基中, 培养小黑豆下胚轴切段 25 天, 结果见表 4。三种生长素与 KT 配比均能诱导下胚轴外植体产生愈伤组织, 诱导率为 100%。而三种生长素对愈伤组织生长的促进作用不同, 2,4-D 作

用最强, NAA 次之, IAA 最弱; 不同种类的生长素对愈伤组织器官分化的作用也不同。IAA 较 NAA 有利于促进根的分化。2,4-D 与 KT 的配比的培养基中愈伤组织上有绿色突起, 转移到相同的培养基中未见器官的分化。培养基 KT2+NAA0.2 培养三周后分化出不定芽(照片 3), 四周后愈伤组织基部分化出不定根。移栽到含有土、砂土、碎石的花

盆中生长成苗(照片 4)。

表 4 不同种类生长素对下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table4 The effect of the differente auxin on hypocotyls explant

生长素及浓度 Auxin concentration	细胞分裂素及浓度 Cytokinin concentration	接种数 No. of inoculated ex plants	诱导率 Rate of inducement	愈伤组组织颜色 Color of cullus	分化结果 Differen tiation	
IAA0.2	KT2	60	100	黄绿	根	-
NAA0.2	KT2	60	100	绿色	根	芽
2.4-D0.2	KT2	60	100	淡黄	-	-

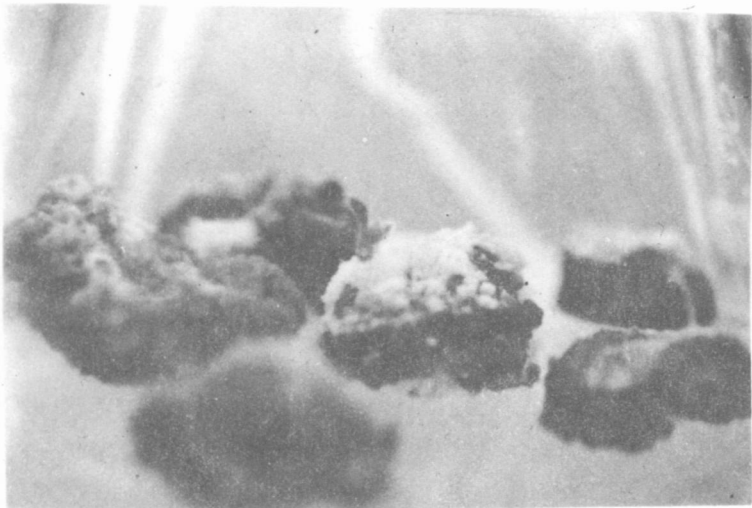


图 3 下胚轴通过愈伤组织形成不定芽(培养基为 Ms+KT2+NAA0.2)

Fig. 3 The shoot from callus of hypocotyls
(medium Ms+ KT2+NAA0.2)

图 4 小黑豆组培植株移入花盆

Fig. 4 The transplanting of Xiaoheidou
plantlet into soil

2.2.4 不同培养基对芽分化率和植株再生率的影响

由上面的实验结果可知下胚轴在三种培养基中有不定芽的分化,分化率如表 5。

将有丛生芽的块在无菌操作下分开单一的芽转

移到生根培养基(Ms+NAA0.1)培养,一周后从愈伤组织的底部分化出不定根(照片 2),统计植株再生频率为 46%,继续培养,促进根系发育,待小苗的根系发育好,已见根毛形成,移栽到含有土、砂土、碎石的花盆中生长成苗。

表 5 不同培养基对下胚轴再生芽的影响

Table 5 The effect of the differente medium on hypocotyls explant

培养基 Medium	接种数 No. of inoculated explants	分化芽的外植体数 No. of differentiated explants	芽分化率(%) Rate of buds	植株再生频率(%) Rate of plant regeneration
Ms+BA2mg/L+IAA0.5mg/L	60	38	63	46
Ms+BA1.5mg/L+IAA0.5mg/L	60	29	48	46
Ms+KT2mg/L+NAA0.2mg/L	60	11	18	16

2.3 小黑豆不同组织器官愈伤组织的诱导和器官分化

取小黑豆的下胚轴、子叶、小真叶为外植体,接种于 Ms+KT2+NAA0.2 的培养基培养 30 天,结果如表 6。

小黑豆不同组织器官为外植体进行诱导时,始愈能力,愈伤组织增殖以及器官的分化明显不同。

表 6 不同外植体愈伤组织的诱导和器官分化
Table 6 The effect of the differente explant on indne
and organogenesis

外植体 Explant	接种数 No. of inoculated explants	诱导率 Rate of inducement	分化结果 Differen tiation	
下胚轴	60	100%	根	芽
子叶	60	93%	根	-
小真叶	60	80%	-	-

下胚轴外植体脱分化形成愈伤组织能力最强,子叶次之,小真叶最弱,这从外植体的始愈期早和诱导率高可以看到。下胚轴外植体形成的愈伤组织增殖最快,子叶次之,小真叶最慢。子叶所形成愈伤组织易分化出根,而下胚轴所形成的愈伤组织易分化出芽。说明适宜于下胚轴的培养基,不适用于子叶、小真叶。表明不同外植体性质,生理状态及内部激素水平不同,所需的外部激素也不同。

3 讨论

大豆组织、细胞培养研究自十九世纪 60 年代以来进行了很多的研究,以下胚轴、上胚轴、叶片、茎尖、未成熟胚、子叶为外植体通过器官发生或胚胎发生以及从原生质体培养再生植株都获得成功。而大豆组织培养技术仍未模式化,主要原因是大豆品种间离体培养的脱分化、再分化表现明显差异^[3]。小黑豆离体培养未见相关报道,本实验选用不同的培养基和不同的外植体等影响植物离体培养的主要因素进行了研究,所选的三种外植体(下胚轴、子叶、小真叶)在相同的培养条件下培养,下胚轴再分化能力强于子叶和小真叶。下胚轴培养在添加不同外源激素的培养基中再分化率不一样,在培养基 $M_s + BA 2mg/L + IAA 0.5mg/L$ 、 $M_s + BA 1.5mg/L +$

$IAA 0.5mg/L$ 和 $M_s + KT 2mg/L + NAA 0.2mg/L$ 的芽再生率分别为 63%、48%、18%,植株再生频率为 46%、46%、16%,前两种培养基的外植体(下胚轴)再生出丛生芽。说明此培养基适用于小黑豆下胚轴的培养,在大豆品种上也有试用价值。

植物组织培养技术的原理是细胞的全能性学说,既构成植物体的每个细胞都具有全套遗传信息并发育成完整植株的能力。根据这一原理,任何物种、任何外植体均能分化出植株,目前有的品种分化容易,有的品种则难分化;同一品种不同基因型甚至同一植株的不同外植体分化难易也是不一样的。究其原因,一是因为外界培养条件不能启动内在的全能性表达机制,另一方面是由于有些细胞对外界培养的适应能力不一样所致。如何摸清植物离体培养的条件,需从有关全能性表达的基因调控方面进行研究。

参 考 文 献

- 1 敬强,程大新.应县小黑豆对大豆孢囊线虫 4 号生理小种抗性的遗传分析[J].中国农学通报,2001,17(6):12-15.
- 2 陆很恒.黑豆蛋白质的营养价值及利用对策[J].中国商办工业,2003,2:40-42.
- 3 程林海,孙毅,刘少翔.基因型和激素浓度对大豆植株再生的影响[J].植物学通报,2001,18(3):367-370.

STUDY ON TISSUE CULTURE OF XIAOHEIDOU ZDD2226

Yan Pingmei^{1,2} Chang Xiaohui³ Xue Wentong² Zang Hui² Wang Yuguo⁴

(1. Taiyuan Teachers College; 2. China Agricultural University; 3. BeiJing Normal University;
4. Shanxi Agricultural University)

Abstract The effect of variant culture medium on callus inducement and shoot differentiated was studied with first lamina, cotyledons, hypocotyls explants of Yingxian Xiaoheidou. The results indicated that BA and NAA had no advantages on tissue culture of Yingxian Xiaoheidou, but combinations of cytokinin and auxin had advantages on callus inducement and organ differentiation. Culture mediums of $M_s + BA 2mg/L + IAA 0.5mg/L$ $M_s + BA 1.5mg/L + IAA 0.5mg/L$ and $M_s + KT 2mg/L + NAA 0.2mg/L$, had different rate of plant regeneration with 46%, 46%, 16% respectively, In the first and second culture medium had got multiple shoot. The rates of callus inducement and plant regeneration of soybean hypocotyls were higher than that of lamina and cotyledons.

Key words Yingxian Xiaoheidou; Tissue culture; Callus; Cculture media