

# 无糖培养条件下三种大豆组培苗生长差异研究

刘水丽, 杨其长

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

**摘要** 在可控环境下, 以有糖培养为对照, 对中黄 13、中黄 25 和鑫豆 1 号三个大豆品种进行了无糖培养试验, 探讨了三个品种的组培苗的生长差异和根系活力差异。结果表明, 生根培养 21 d 后, 有糖培养处理的大豆组培苗的叶片部分出现黄化现象, 无糖培养条件下三种大豆组培苗生长健康, 叶色浓绿, 生根率均为 100% (高于有糖培养), 中黄 25 的根鲜重与根长指标达到最大值, 分别为 1.02 g 和 481.6 cm, 鑫豆 1 号的根系活力最高, 达到  $78.62 \text{ UTTC} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$ , 中黄 13 与鑫豆 1 号的根系活力与其有糖培养处理相比差异显著。因此, 无糖培养提高了大豆组培苗对环境的适应能力, 促进了组培苗的生长发育。

**关键词** 无糖培养; 大豆; 生根

中图分类号 S565.103.53 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)02-0163-04

## GROWTH DIFFERENCES IN THREE SOYBEAN VARIETIES PLANTLETS UNDER PHOTOAUTOTROPHIC CONDITION

LIU Shui-li, YANG Qi-chang

(*Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

**Abstract** The aim of the study was to take the photoautotrophic culture experiment in three soybean varieties (*Glycine max* L.) Zhonghuang 13, Zhonghuang 25 and Xindou 1 under controlled environment, discuss the growth and root activities differences of them. It was shown that some leaves of the soybean plantlets under conventional culture appeared etiolation, while the tops of the three varieties plantlets were healthy and their leaves were dark green under photoautotrophic environment whose rooting percentages all reached to 100%, the root fresh weight and the root length of Zhonghuang25 achieved the maximum values, which were 1.02 g and 481.6 cm respectively, and the root activity of Xindou 1 was the best, which was  $78.62 \text{ UTTC} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$ . There were significant differences between photoautotrophic and conventional culture in root activity of Zhonghuang 13 and Xindou 1. We can draw a conclusion that photoautotrophic culture enhances the adaptability of soybean plantlets to the natural environment, and improves the growth of them.

**Key words** Sugar free tissue culture; Soybean; Rooting

大豆体组织培养技术对加速良种繁育、优良种质资源保存、有益突变体筛选及大豆遗传操作、幼胚早期离体培养克服种间或远缘杂交的不可亲性以及克服一些常规育种难以解决的困难有着特殊的作用<sup>[2]</sup>。大豆的细胞组织培养研究始于 20 世纪 60 年代,但是与其他农作物相比各种外植体的组织培养、成功率、再生植株方面都十分困难。直到进入 80 年代中后期,大豆的组织培养工作才有了突破性的进展<sup>[3]</sup>。大豆组培苗的生根需要很长的时间,且根系发育不健壮。根是植物生长发育的基础,组培苗根的生长情况大大影响植物的移栽成活,同时对苗的后期生长发育有很大的影响。因此改善大豆组培苗的生根环境对提高组培苗的生长质量、移栽成活率,促进后期生长发育具有重要意义。

无糖组培技术由国家外专局和昆明市科技局 1997 年从日本千叶大学引进<sup>[4]</sup>。它将环境控制原理引入到常规组织培养中,用  $\text{CO}_2$  气体代替培养基中的糖作为组培植株的碳源,采用人工控制的手段,提供适宜不同种类组培植株生长的光、温、水、气、营养等条件,促进植株的光合作用,从而促进植物的生长发育,在短时间和低成本条件下快速繁殖遗传优良、生理一致、发育正常的群体植株,达到快速繁殖优质种苗的目的<sup>[5~7]</sup>。本试验采用无糖培养方法进行大豆组培苗的生长试验,改善大豆组培微环境,探索新的大豆组培苗生根的方法,为大豆良种繁育、耐盐品种的选拔等研究提供试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为中黄 13、中黄 25 和鑫豆 1 号,以茎尖培养而成的组培苗为试验材料,选择生长健壮、叶色浓绿且具 2~3 片叶的组培苗茎段作为外植体进行试验。

### 1.2 无糖培养容器

本研究使用大型无糖培养容器(图 1),其主要特征:材质采用透光率高的进口有机玻璃。容器壁厚为 1.0 cm,容器尺寸为 1 200 mm × 500 mm × 300 mm。该培养容器的体积达到 180 L。容器内安装了采用有机玻璃管制做的  $\text{CO}_2$  释放管,其设计可以保证  $\text{CO}_2$  在箱体内部迅速均匀地分布于培养箱的空间内,减少扩散引起的滞后,提高  $\text{CO}_2$  浓度控制的精度。 $\text{CO}_2$  释放管的直径为 1 cm,长度为 1.25 m。安

装时一端露出 3 cm,连接气源,为进气口;另一端封闭后安装在箱体的内嵌小槽中固定。有机玻璃管的侧面打 2 排孔,孔径为 0.5 mm,按开孔垂直方向两排孔面间呈 120 度夹角,孔间距离为 2 cm。培养箱采用自然通风换气的方式。

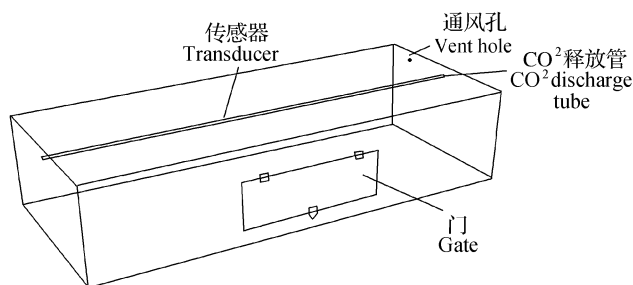


图 1 大型培养容器示意图

Fig. 1 The sketch of the large cultural vessel

### 1.3 方法

在 MS 培养基中用  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6BA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 诱导分化,培养 14 d 后将茎尖转接到激素为  $\text{IBA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的有糖和无糖 MS 培养基中培养,卡拉胶浓度为  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,有糖培养基中蔗糖含量为  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养容器为带有 2 个直径为 10 mm 的透气膜的方盒,容积为 445 mL。三个品种均设有糖培养和无糖培养两种处理,每种处理设置 40 盒,每盒装入培养基 80 mL,每盒接种 1 株外植体。

环境条件:有糖培养容器置于组织培养室的培养架上, $\text{CO}_2$  浓度约为  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,相对湿度 65%~80%。无糖培养试验在无糖培养箱中进行,利用无糖培养环境控制系统,使培养箱中  $\text{CO}_2$  浓度为  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  左右,湿度为 70% 左右。培养箱和培养室的培养架均由普通三基色荧光灯提供光照,PPFD 为  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (培养室的 PPFD 在空的培养架上测量),温度为  $25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,光周期为  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

### 1.3 测定指标及方法

三种大豆组培苗茎段各处理生根培养 21 d 后,测量叶片数、株高、鲜重、干重等形态指标。观测并记录各处理根长度/株、根数/株;

根系活力测定采用 TTC 法测定<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对三种大豆组培苗地上部形态的影响

组培苗的培养方式以及环境因素对组培苗的外

部形态有直接的影响。三种大豆组培苗茎尖培养 21 d 后,不同处理的地上部形态存在一定的差异(图 2)。表 1 所示的是生根培养阶段不同处理的三种大豆组培苗的地上部形态指标。有糖培养条件下,由于组培苗生长在密闭、不通风的微环境中,培养容器内的空气湿度达到饱和状态,致使三种大豆组培苗部分叶片黄化。无糖培养除了使用大型的培养容器以外,还采取在培养箱箱体的侧面设置通风口(多孔梅花状)的措施对无糖培养箱内空气进行自然通风,促进容器内空气的流动,降低空气湿度,给植物提供适宜的生长环境。无糖培养条件下,三种大豆组培苗生长健康,叶色浓绿。无糖培养条件下中黄 25 与鑫豆 1 号的株高、叶片数、地上部鲜重、地上部干重与其有糖培养处理相比差异显著,中黄 13 无糖培养的叶片数显著高于有糖培养。这说明无糖培养环境促进了组

育苗的生长发育,提高苗的质量。

表 1 不同处理对三种大豆组培苗地上部形态的影响  
Table 1 The top morphogenesis of three varieties soybean plantlets under different treatments

品种 Variety	处理 Treatment	株高(mm) Height of plantlet	叶片数 Number of leaf	地上部鲜重 (g) Top fresh weigh	地上部 干重(g) Top dry weight
中黄 13 Zhonghuang13	对照 CK	143b <sup>*</sup>	11.5c	0.9c	0.173c
	无糖培养 Suger-free culture	147b	15b	1.07bc	0.182c
中黄 25 Zhonghuang 25	对照 CK	135c	12.7bc	1.19b	0.221b
	无糖培养 Suger-free culture	160a	18.7a	1.41a	0.287a
鑫豆 1 号 Xindou 1	对照 CK	131c	12.7bc	1.00bc	0.180c
	无糖培养 Suger-free culture	153ab	15b	1.46a	0.267a

a,b,c:表示 LSD 检验显著差异(P<0.05)。下同  
a,b,c:Express significant at P<0.05 by LSD test. The same as below.

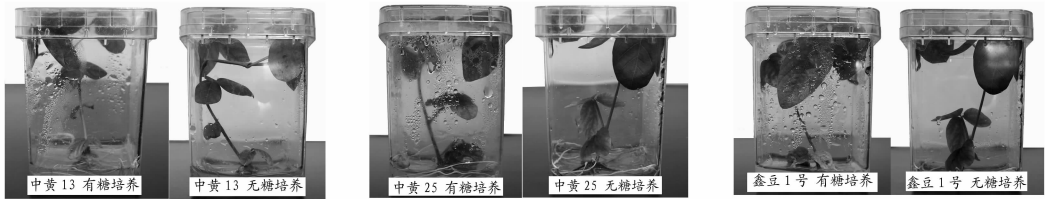


图 2 三种大豆组培苗不同处理的地上部形态差异比较

Fig. 2 Top morphogenesis comparisons of three varieties soybean plantlets under different treatments

2.2 不同处理对三种大豆组培苗根系形态的影响

植物的根系不但起着固定植株的作用,还是植物摄取、运输和贮存碳水化合物和营养物质以及合成一系列有机化合物的器官。因此,植物根系的发达与否直接影响着植物的生长状况。生根培养 21 d 后,三个品种无糖培养处理的组培苗生根率均达到 100%,与有糖培养差异显著(表 2)。无糖培养条件下,三个品种的根鲜重均高于有糖培养指标,而且差异显著。虽然无糖培养中黄 25 和鑫豆 1 号的主根数较有糖培养的少,但是三个品种的侧根数量多,根系发达(图 3)。从根系形态指标之间的对比可知,无糖培养提高了三种大豆组培苗对环境的适应性,促进了组培苗的生长发育,根系较有糖处理发达,生长优势明显。

表 2 不同处理对三种大豆组培苗根系形态的影响  
Table 2 Root morphogenesis of three soybean plantlets under different treatments

品种 Variety	处理 Treatment	生根率 (%) Rooting percentage	根鲜重(g) Root fresh Weight	主根数 Root number per plant	根长 (cm/plant) Root length
中黄 13 Zhonghuang 13	对照 CK	82.5b	0.41c	7.0bc	66.0c
	无糖培养 Suger-free culture	100a	0.68b	9.5b	254.9b
中黄 25 Zhonghuang 25	对照 CK	78.0c	0.65b	8.4b	202.3bc
	无糖培养 Suger-free culture	100a	1.02a	7.7bc	481.6a
鑫豆 1 号 Xindou 1	对照 CK	87.5bc	0.84bc	24.0a	251.1b
	无糖培养 Suger-free culture	100a	1.00a	5.5c	279.6b

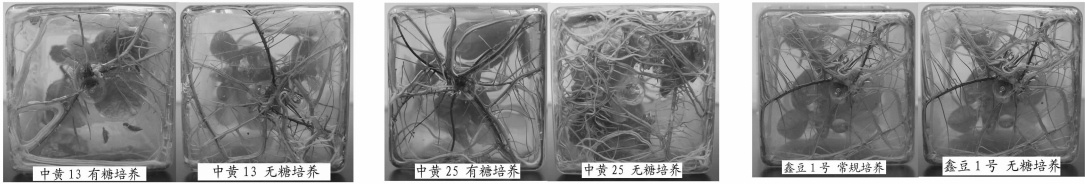


图3 三种大豆组培苗不同处理的根系形态差异比较

Fig. 3 Root morphogenesis comparisons of three soybean plantlets under different treatments

2.3 不同处理对三种大豆组培苗根系活力的影响

植物根系活力反映根系的生长发育状况,是根系生命力的综合指标。根系活力直接影响到植株对矿质营养和水分的吸收利用,从而对整体植株的生长发育起着决定性的作用。三种大豆组培苗的无糖培养处理的根系活力均高于有糖培养处理,其中中黄13和鑫豆1号的无糖培养与有糖培养的根系活力指标差异显著(图4)。无糖培养条件下鑫豆1号无糖培养的根系活力最大,为  $UTTC \cdot g^{-1}FW \cdot h^{-1}$ 。上述结果表明:无糖培养环境通过提高  $CO_2$  浓度和降低空气湿度等措施可以显著提高组培苗的根系活力,促进组培苗的生长发育。

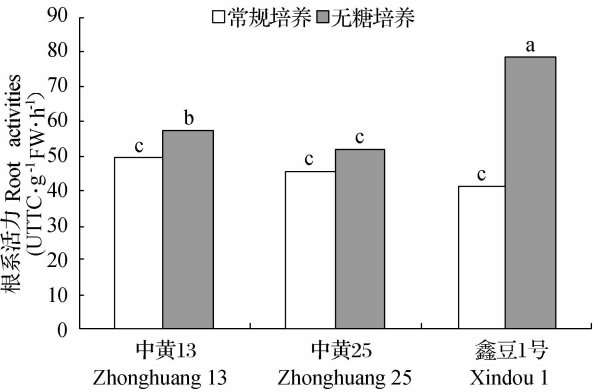


图4 不同处理对三种大豆组培苗茎尖根系活力的影响

Fig. 4 Root activities of three soybean plantlets under different treatments

3 讨论

改善大豆组培微环境是一项解决大豆组培再生问题的有效措施。与常规的组织培养相比,无糖培养具有使组培苗生长健壮、生根快、干物质含量高等优势<sup>[9,11]</sup>。常规组织培养条件下组培苗受到高湿、低  $CO_2$  浓度、气体交换不足、光照不足等环境因素的影响<sup>[12]</sup>,导致苗的生长能力弱甚至不正常生长,组培苗生理状况及品质较差,生根率低,根系活力低,适应能力差,成苗成本过高。无糖培养通过提高  $CO_2$  浓度、增加 PPFD,进行自然通风等措施,改善了大豆组培苗的生长环境,促进组培苗的生长发育,提高组培苗根系活力。

因此,无糖培养代替有糖培养是可行的,这既是

组织培养方式的一大改进,也能够解决大豆组培苗的植株再生问题,为植株进一步的生长奠定了良好的基础。同时,大豆组织培养方法的改进,为大豆耐盐抗旱品种的筛选等研究提供了一种研究方法。与传统的田间自然鉴定法相比,可以大大缩短研究周期,增加筛选结果的可信度。因此,大豆无糖培养技术为今后的相关研究提供了试验基础。

参 考 文 献

[1] 杜娟,田国立,母秋华,等. 大豆体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 吉林农业科学,1995(3):13-14.

[2] 薛仁镐,刘淑兰,韩碧文. 大豆植株再生的研究. 延边农学院学报,1994,3(16) 1:1-5.

[3] 王萍,王翌,吴颖,等. 大豆组织培养的研究进展[J]. 大豆科学,2003,22(2):142-145.

[4] 屈云慧,熊丽,吴丽芳,等. 无糖组培技术的应用及发展前景. 中国种业,2003(2):17-18.

[5] 周炜,曲英华. 无糖组培技术在我国的研究进展[J]. 温室园艺,2005,07:24-25.

[6] T. Kozai, F. Afreen, S. M. A. Zobayed (Eds.), Photoautotrophic (Sugar-free Medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System[M]. Springer Press, 2005.

[7] 管道平,杨其长,刘文科,等. 植物光自养微繁殖技术研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(3):680-686.

[8] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术. TTC法[M]. 北京:高等教育出版社,2001,119-121.

[9] Niu G, Kozai T. Simulation of  $CO_2$  concentration in the culture vessel and growth plantlet in micropropagation[J]. Acta Horticulture, 1998, 456: 37-43.

[10] Mei-lan LIAN, H. N. Murthy, Kee Yoeup Paek. Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of Limonium Misty Blue in vitro [J]. Scientia Horticulturae, 2002, (95): 239-249.

[11] Hirofumi Nagatome, Masak Tsutsumi, Masahiro Kino-oka, et al. Development and characterization of a photoautotrophic cell line of pak-bung hairy roots [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(2): 151-156.

[12] Yoshie Mivasita, Yoshiaki Kitava, Chieri Kubota, et al. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explants leaf area, fresh weight and stem length [J]. Scientia Horticulturae, 1996 (65): 199-202.