

大豆组培苗水培生根与培养基生根比较研究

胡 凤, 杨万年

(华中师范大学 生命科学院, 湖北 武汉 430079)

摘 要:以自贡冬豆为试材, 采用自来水和固体培养基对大豆组培再生枝进行生根诱导培养, 测定了两种培养条件下的生根速率、根数量、根长度及移栽到土壤后植株的成活率, 以期对组培苗生根方法的改进提供参考。结果表明: 大豆再生枝在自来水培养条件下仅4 d就开始生根, 而在固体培养基中则大约需要7 d才开始生根。培养28 d后, 自来水中再生枝的生根数为 5.26 ± 3.40 条·株⁻¹, 平均根长为 6.29 ± 4.82 cm (n=60); 而固体培养基中再生枝的生根数达 19.54 ± 11.50 条·株⁻¹ (n=60), 但平均根长仅为 1.97 ± 0.82 cm (n=60)。再生植株移栽后, 自来水培养再生苗的成活率明显高于固体培养基, 两种植株成熟后的结荚数及种子质量没有明显差异。由于再生枝在自来水中培养有助于缩短培养周期, 减少污染, 提高生根效率, 降低培养成本, 因此自来水在某些大豆品种的组织培养中可以代替固定的生根培养基。

关键词:大豆; 水培生根; 生根速度; 成活率

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)03-0333-03

Tap Water Can be Used as Medium for Root Induction and Growth during Tissue Culture of Soybean

HU Feng, YANG Wan-nian

(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Root-inducing is the final step for producing regenerated plantlets in the tissue culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Here an easy, efficient root-inducing system for soybean shoots is reported, which is designated as tap-water rooting system, in which tap water is (without autoclaving) used to replace the traditional agar-containing medium for root induction and growth. Taking Zigongdongdou as material, the results demonstrated that the tap-water rooting system was good for shortening culture time, overcoming contamination of bacterium and fungus, increasing the rooting efficiency and decreasing the cost of tissue culture as exemplified by faster root inducing and elongating, and higher plantlet survive ratio of the tap-water system than that of agar-containing medium system. Although the amount of total roots from the tap-water system was less than that from agar plates, the plantlets from tap-water system could grow, flower and produce pods and seeds normally and no significant difference were found between the tap-water system and agar system. Hence, it is suggested that the easy rooting system should be used in the tissue culture of more soybean cultivar.

Key words: Soybean; Rooting in water culture; Growth rate; Survival rate

大豆 (*Glycine max* L. Merrill) 富含蛋白质和植物油, 是我国重要粮食作物之一。转基因大豆已经商业化生产, 但大豆的遗传转化效率不高, 一直是植物基因工程领域的难点之一^[1]。大豆转基因建立在离体再生系统基础之上, 因而高效的大豆组织培养是转基因成功的前提。前人对大豆再生体系进行了大量研究^[2-4], 但对生根阶段的研究相对较少。大豆组培苗生根速度慢, 生出的根不健壮^[5], 会影响组培苗的再生效率及移栽后的生长和发育^[5-8]。在传统组培试验的生根阶段, 密封的容器会抑制再生苗的发根, 导致再生苗生长和生理代谢异常, 并且往往容易使再生苗染菌^[9], 降低试验效

率。在进行大批量大豆遗传转化时发现水培生根法也能够使大豆生根, 且具有生根快、不染菌、使用耗材少等优点。因此, 比较了此方法与传统培养基生根法的生根差异, 旨在为组培苗生根方法的改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆 (*Glycine max* L.) 材料为自贡冬豆, 由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的准备 用70%乙醇浸泡自贡冬豆

收稿日期: 2013-01-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31270316)。

第一作者简介: 胡凤 (1986-), 女, 在读硕士, 主要从事植物发育与分子生物学研究。E-mail: fenger134@126.com。

通讯作者: 杨万年 (1968-) 男, 教授, 主要从事植物发育与逆境适应的分子机理、植物发育的功能基因组学研究。

E-mail: yangwn@mail.ccnu.edu.cn。

种子 2 min,再用 0.1% 升汞灭菌 15 min,之后用无菌水洗 5 次,每次 2 min;再用无菌水浸泡 14 ~ 16 h,培养于 1/2MS 培养基 (1/2MS + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 6 g·L⁻¹ 琼脂;pH5.8 ~ 6.0)。待子叶展开后,下胚轴留 3 ~ 5 mm,余下切除,去除 1/3 子叶,再将子叶从中间切开作为外植体,然后将外植体移栽到加有 1.2 mg·L⁻¹6-BA 和 0.2 mg·L⁻¹ IBA 的 MSB₅ 培养基中进行预培养,预培养 1 d 后转移到生芽培养基 (MSB₅ + 1.0 mg·L⁻¹6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ IBA),待 14 ~ 21 d 后取新芽(约 3 ~ 5 cm)进行生根试验。

1.2.2 试验设计 水培以静置 24 h 的自来水为培养液;培养基生根使用的培养基为 MSB₅ + 2.0 g·L⁻¹ IBA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 6 g·L⁻¹ 琼脂。培养容器为 150 mL 锥形瓶,瓶口用保鲜膜覆盖并固定外植体,每瓶培育 4 株外植体,共 60 株。培养温度控制在 (23 ± 1)℃,光照条件为 16 h 光照/8 h 黑暗,相对湿度为 30%。为防止再生枝水培生根过程中水分散失过快及缺氧导致的茎腐烂,需隔天换水。培养基生根 14 d 换一次培养基。培养 28 d 后用刻度尺测量不同培养

条件下再生枝生根的长度,并统计数量;移栽后待植株长出结荚时,统计结荚数。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 水培培养和培养基培养对大豆生根速率、根数量和根长度的影响

水培培养再生枝的生根速率高于培养基培养。自来水培养条件下再生枝仅 4 d 就开始生根,约 7 d 即可移栽到土中,而在固体培养基中大约 7 d 才开始生根,约 14 ~ 21 d 才能移栽到土中。

水培培养和培养基培养组培苗的生根数分别为 5.26 ± 3.40 条(n = 60)和 19.54 ± 11.50 条(n = 60),平均根长分别为 6.29 ± 4.82 cm(n = 60)和 1.97 ± 0.82 cm(n = 60)。统计分析表明培养基生根数极显著多于水培生根($P < 0.001$),水培生根的根长明显长于培养基生根($P < 0.001$)(表 1)。此外,水培生根的侧根比培养基生根明显(图 1)。

表 1 水培培养和培养基培养组培苗的生根数、生根长度和结荚数的 T 检测

Table 1 The result of T-test of number of rooting, root length and number of legume between rooting under water culture and culture medium

	t 值 t value	自由度 df	平均差 Mean difference	标准误差 Std. error	F 值 F value	显著性 Sig.
生根数 Root number	8.418	57.848	14.280	1.696	38.766***	0.000
生根长度 Root length	14.390	266.022	4.324	0.301	1033.016***	0.000
结荚数 Pod number	0.599	73	0.327	0.547	1.503 ^{ns}	0.551

ns, *** 分别表示差异水平 $P > 0.05$, $P < 0.001$ 。

ns, *** mean significant difference level are $P > 0.05$, $P < 0.001$.



a:培养基生根;b:水培生根。
a: Culture medium; b: Water culture.

图 1 水培培养与培养基培养的生根比较

Fig. 1 Comparison on tissue cultivated soybean root under water culture and culture medium

2.2 水培培养和培养基培养组培苗移栽后的成活率以及结荚数

两种培养条件下的组培苗移栽后,生长状态较为一致。但水培组培苗的成活率为 100%,而培养基组培的苗的成活率为 90%;另外,统计分析表明水培组培苗与培养基组培苗的结荚数没有显著差异($P >$

0.05)(表 1),种子质量也没有明显不同。

3 讨论

不同培养条件下,组培苗的生根会存在一定的差异^[5]。本研究结果显示水培组培苗的根长明显较培

培养基的长,这有利于植物移栽后的生长,但水培组培苗的生根数量较少,这可能是由于自来水中没有激素 IBA,不能有效促进大豆组培苗大量生根^[5],但水培组培苗的侧根较培养基组培苗多,这有利于植株的生长和发育^[5]。

在传统组培的生根阶段,植物生长缓慢,培养和移栽过程中植株的死亡率较高,并且组培苗往往容易染菌。本研究结果显示大豆水培约 4 d 开始生根,生根过程在空气中进行,不会染菌,并且移栽后植株的成活率为 100%;而在培养基中约为 7 d 开始生根,部分植株存在染菌现象,移栽后植株的成活率为 90%。因此水培组培苗较培养基组培苗在生根速率、抗染菌率及移栽后成活率等方面有一定的优势。这一方面可能是因为水培组培苗直接与空气接触,能够促进组培苗的生长和发育,从而使水培中的生根速率较培养基中的生根速率快^[10-11],另一方面,培养基中含有蔗糖,会使培养基易染菌^[9,12]。

因此,水培培养不仅生根快、成活率高,而且容易操作,因而有助于缩短培养周期,减少污染,提高生根效率^[13-14],另外,利用自来水作为培养基质也能降低培养成本。

参考文献

- [1] 刘海坤,卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报,2005,31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2005,31(2):126-134.)
- [2] 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):9-14. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001,20(1):9-14.)
- [3] 王岚, Clemente T, 王连铮,等. 大豆品种的再生性能及对 EHA101 农杆菌的敏感性[J]. 作物学报,2003,29(5):664-669. (Wang L, Clemente T, Wang L Z, et al. Regeneration study of soybean cultivars and their susceptibility to agrobacterium tumefaciens EHA101[J]. Acta Agronomica Sinica,2003,29(5):664-669.)
- [4] Yue S Y, Wada K, Futsuhara Y. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants[J]. Plant Science,1990,72(1):101-108.
- [5] 鲍顺淑,贺冬仙. 可控环境下培养基成分对大豆组培苗生根的影响[J]. 农业生物技术科学,2006,22(11):60-64. (Bao S S, He D X. Effects of medium components on rooting of soybean plantlet under controlled environment[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2006,22(11):60-64.)
- [6] 周耀红. 组培微环境对草莓苗生根阶段及移栽驯化过程中生长和生理特性的影响[D]. 杭州:浙江大学,2003. (Zhou Y H. Effects of micro-environment on growth and physiological characteristics of strawberry during rooting in vitro and acclimatization ex vitro[D]. Hangzhou: Zhejiang University,2003.)
- [7] 李宗菊,周应揆,桂明英,等. 满天星无糖组培快繁技术研究[J]. 云南大学学报,1999,21(2):134-138. (Li Z J, Zhou Y K, Gui M Y, et al. Study on the technology of autotrophic (sugar-free) micropropagation of *Gypsophila paniculata*[J]. Journal of Yunnan University,1999,21(2):134-138.)
- [8] Afreen-Zobayed F, Zobayed S M A, Kubota C, et al. Supporting material affects the growth and development of in vitro sweet potato plantlets cultured photoautotrophically[J]. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,1999,35(6):470-474.
- [9] 曲英华,胡秀婵,吴毅明. 植物组织培养新技术:光独立培养法[J]. 农业工程学报,2001,17(6):90-92. (Qu Y H, Hu X C, Wu Y M. New technique of plant tissue cultivation photoautotrophic micropropagation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2001,17(6):90-92.)
- [10] 杨武振,王荔,侯典云,等. 无糖组织培养技术研究进展[J]. 云南农业大学学报,2004,19(3):239-254. (Yang W Z, Wang L, Hou D Y, et al. The progress and prospect of sugar-free tissue cultivation technology[J]. Journal of Yunnan Agricultural University,2004,19(3):239-254.)
- [11] Kubota C, Kakizaki N, Kozai T, et al. Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation[J]. HortScience,2001,36(1):49-52.
- [12] Zobayed S M A, Afreen-Zobayed F, Kubota C, et al. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under in vitro photoautotrophic condition[J]. Annals of Botany,2000,85(5):587-592.
- [13] 孙旭进. 组培文竹生根试验研究[J]. 安徽农业大学学报,2003,30(3):320-322. (Sun X J. Rooting experiment of tissue cultivated *Asparagus fern*[J]. Journal of Anhui Agricultural University,2003,30(3):320-322.)
- [14] 赵兰枝,王俊霞. 鼠尾掌水生根研究[J]. 山东林业科技,2004(6):24-25. (Zhao L Z, Wang J X. Study on the root-promoting of *Roottail cactus* cultivated in solution(water)[J]. Shandong Forestry Science and Technology,2004(6):24-25.)