

# 大豆愈伤组织继代培养的最佳条件研究

张郁松,寇炜材

(西安武警工程学院,西安 710086)

**摘要** 探讨基本培养基、培养条件、植物生长调节剂等因素对大豆继代培养的影响。大豆愈伤组织继代培养的最佳条件:以 MS + BA0.5 mg/L + 2,4-D2.0 mg/L 为培养基,pH 在 5.8~6.0 之间,在 1 000~1 500Lx,2 h/d 光照条件下,培养 21 d 后生长较好,愈伤组织生长量和增长倍数可分别达到 11.23 g/瓶和 10.23。

**关键词** 大豆;愈伤组织;继代培养

**中图分类号** S565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0190-04

## RESEARCH ON THE OPTIMUM CONDITIONS FOR SOYBEAN CALLUS SUBCULTURE

ZHANG Yu-song, KOU Wei-cai

(Xi'an Engineering College of Armed Police Force, Xi'an, 710086)

**Abstract** In this paper, the subculture of soybean were studied from the aspects of basic media, culturing conditions, phytohormones etc. The optimum conditions for soybean callus subculture were as follows: Growth status of callus was better on MS medium supplemented with BA0.5 mg/L, 2,4-D2.0 mg/L, the callus yield and increasing times were the highest, it can reached 11.23 g/Flask and 10.23. The suitable pH value of medium was among 5.8~6.0. The callus cultured in light(1000~1500Lx, 12 h/d) for 21d were suitable for the callus growth.

**Key words** Soybean; Callus; Subculture

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 材料 试验所用供试大豆品种中黄 13 由金威特杂交小麦公司提供。

### 1.1.2 仪器与设备

SPX-250-GB 光照培养箱 上海佳胜实验设备有限公司

BSW-1240V 超静工作台 苏州市百神科技网

络系统有限公司

628 型立式压力蒸汽消毒器 辽宁省铁岭市医疗器械厂

FA 2004 型电子天平 上海天平仪器

PP-φ80-280-K 组培容器 北京市振泰园艺设施公司

### 1.2 实验方法

将诱导出来的愈伤组织继代培养,考察影响愈伤组织的生长因素,以下每个处理接种 5 瓶,每瓶接种愈伤组织 4~5 块,鲜重 0.50 g,观察继代后的愈

伤组织颜色、质地及生长势,愈伤组织在生长 24 d 后收获,统计愈伤组织增长量(鲜重)与增长率。

愈伤组织生长量(g/瓶) = 收获量(g/瓶) - 接种量(g/瓶)

愈伤组织增长率 = 生长量(g/瓶)/接种量(g/瓶)

1.2.1 基本培养基种类对愈伤组织生长的影响

采用 MS、B5、N6、1/2MS 四种培养基,进行培养基种类对愈伤组织生长的影响实验,四种培养基均附加 3.0% 蔗糖、0.8% 琼脂、2.0 mg/L2,4 - D、0.5 mg/L6 - BA,100 mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,温度 25 ± 1 ℃,光照培养(1 000 ~ 1 500 Lx,12 h/d)。

1.2.2 激素对愈伤组织生长的影响 以 MS 为基本培养基,添加不同的激素,3.0% 蔗糖、0.8% 琼脂、100 mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,温度 25 ± 1 ℃,光照培养(1 000 ~ 1 500 Lx,12 h/d)观察激素对愈伤组织生长的影响。

1.2.3 接种量对愈伤组织生长的影响 取下胚轴继代培养的愈伤组织,在每个培养瓶中加 50 mL 培养基进行不同接种量对大豆愈伤组织继代培养,培养基为 MS 附加 3.0% 蔗糖、0.8% 琼脂、2.0 mg/L2,4 - D、0.5 mg/L6 - BA,100 mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,温度 25 ± 1 ℃,光照(1 000 ~ 1 500 Lx,12 h/d)。

1.2.4 培养时间对愈伤组织生长的影响 取下胚轴继代培养的愈伤组织接种于含 MS + 2,4 - D1.0 mg/L + 6 - BA0.5 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.8% 固体培养基 50 mL 的培养瓶中,每瓶接种量为 1.00 g,分别置于黑暗和光照(12 h/d)条件下培养,培养温度 25 ± 1 ℃,接种后每隔 3 d 取不同条件下培养的愈伤组织,用滤纸除去附在其上的培养基后称鲜重,以培养时间(Tn)为横坐标,以愈伤组织总鲜重 Wn 为纵坐标,绘出愈伤组织总鲜重生长曲线。实验重复三次,取其平均值。

1.2.5 光照条件对愈伤组织生长的影响 设计连续 24 h、12 h/d 光照培养(1 000 ~ 1 500 Lx)和暗培养三种光照条件,观察其对愈伤组织生长的影响。取下胚轴继代培养的愈伤组织接种于 MS 培养基,附加 2,4 - D2.0 mg/L、BA0.3 mg/L,3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100 mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,每瓶接种量为 1.00 g,培养温度为 25 ± 1 ℃。

1.2.6 培养基 pH 值对愈伤组织生长的影响

设计 5.0,5.4,5.8,6.0,6.5 五种 pH 的培养基,进行培养基 pH 对愈伤组织生长的影响。培养基为 MS + 2,4 - D 2.0 mg/L + BA0.3 mg/L,附加 3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100 mg/L 水解乳蛋白,培养温度为 25 ± 1 ℃。

2 结果与讨论

2.1 基本培养基种类对愈伤组织生长的影响

采用 MS、B5、N6、1/2MS 四种培养基进行愈伤组织生长的影响实验,四种培养基均附加 3.0% 蔗糖、0.8% 琼脂、2.0 mg/L2,4 - D、0.5 mg/L6 - BA。结果如表 1,以下胚轴为外植体诱导出的愈伤组织在各自培养基上继代后,仅 MS 培养基生长好,其次为 1/2MS、B5 培养基,在 N6 培养基中生长缓慢。子叶和下胚轴诱导出的愈伤组织继代培养的表现规律一致,下胚轴诱导的愈伤组织继代后的增长率略高于子叶。

表 1 不同基本培养基对大豆愈伤组织生长的影响

Table1 Effects of different basic media on soybean callus growth

基本培养基 Basic media	愈伤组织增长量(鲜重) (g/瓶) Callus increment (fresh)(g/flask)		愈伤组织增长率(%) Callus increase rate(%)	
	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon
MS	7.36	7.12	1472	1424
B5	4.94	4.53	988	906
N6	3.69	3.62	738	7.24
1/2MS	5.15	5.08	1030	1016

2.2 激素对愈伤组织生长的影响

外源激素的添加对于植物细胞生长代谢调控具有重要作用,过高或过低的浓度激素均不利于愈伤组织的生长,适宜的生长素和细胞分裂素的配比和浓度,能促使细胞保持分裂的状态及一定的分裂频率。由表 2 中大豆愈伤组织增长率结果表明,在附加 6 - BA0.5 mg/L 的 MS 培养基上,高浓度的 2,4 - D(4.0 mg/L)抑制了愈伤组织的生长,而 2,4 - D 浓度在 0.5 ~ 2.0 mg/L 之间时,大豆愈伤组织的增长率逐渐提高,在 2.0 mg/L 时愈伤组织增长率最大。

表2 不同浓度激素对大豆愈伤组织诱导的影响  
Table 2 Effects of hormone on soybean callus induction

激素浓度 hormones concentration	愈伤组织增长 量(鲜重) Callus increment (fresh)(g/flask)	愈伤组织增长率(%) Callus increase rate (%)
0.5 mg/L2,4-D + 0.5 mg/L6-BA	4.89	978
1.0 mg/L2,4-D + 0.5 mg/L6-BA	5.54	110
82.0 mg/L2,4-D + 0.5 mg/L6-BA	7.28	1456
4.0 mg/L2,4-D + 0.5 mg/L6-BA	3.26	652

2.3 接种量对愈伤组织生长的影响

取下胚轴继代培养的愈伤组织,在每个培养瓶中加 50 mL 培养基进行不同接种量对大豆愈伤组织继代培养,培养基为 MS 附加 3.0% 蔗糖、0.8% 琼脂、2.0 mg/L2,4-D、0.5 mg/L6-BA、100 mg/L 水解乳蛋白,pH6.0。由图 1 可知接种量在 0.25 ~ 1.00 g 之间,大豆愈伤组织的生长量随接种量的增加而增加,当接种量超过 1.00 g 后,大豆愈伤组织的生长量开始下降,因此用装 50 mL 培养基的 PP-φ80-280-K 培养瓶中,大豆愈伤组织接种量控制在 1.00 g 左右比较合适。

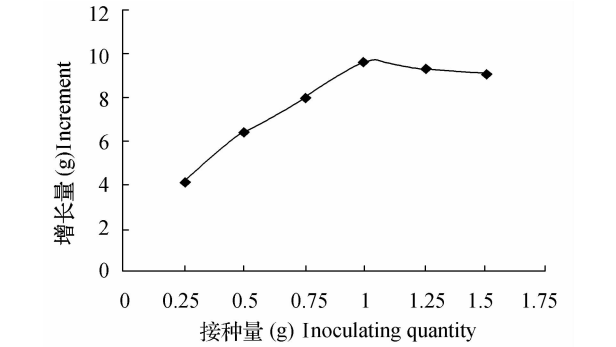


图1 不同接种量对大豆愈伤组织生长的影响  
Fig. 1 Effects of different inoculating quantity on soybean callus growth

2.4 培养时间对愈伤组织生长的影响

取下胚轴继代培养的愈伤组织接种于含 MS + 2,4-D1.0 mg/L + 6-BA0.5 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.8% 固体培养基 50 mL 的培养瓶中,每隔 3 d 取一次样,用滤纸除去附在其上的培养基后称鲜重,以培养时间(Tn)为横坐标,以愈伤组织总鲜重 Wn 为纵坐标,绘出愈伤组织总鲜重生长曲线。

从图 2 看出,两种条件下培养的大豆愈伤组织

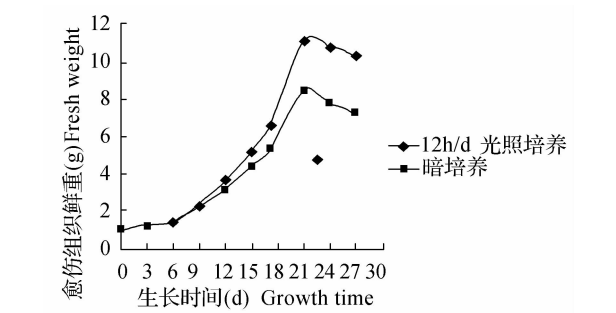


图2 愈伤组织的生长曲线  
Fig. 2 Curve of soybean callus growth

的生长周期均为 24 d,但光照条件下,细胞生长速度较快。在封闭系统,有限营养物质条件下,大豆愈伤组织总鲜重生长曲线均呈“S”形,证明大豆愈伤组织的生长具有生长大周期的特性,即按逻辑生长模型(Logical Growth Model)进行增殖生长,并明显地分为 3 个时期:延滞期、指数期和静止期。

大豆愈伤组织生长速度表现出生长大周期的原因,可从细胞的生长情况分析。在延迟期(0 ~ 6 d)内,培养物增重缓慢,这可能是由于刚接种的愈伤组织需要适应新的环境,并且细胞处于细胞分裂时期,原生质体合成过程较慢,细胞生长较慢;在指数生长期(6 ~ 21 d)内,其中第 12 ~ 15 d 增殖幅度最大,原生质合成过程加快,水分迅速进入,细胞体积迅速加大,培养物鲜重急剧增加;而到了静止期(21 ~ 24 d),鲜重稍有下降,可能是培养基中养分几乎消耗殆尽,并且细胞开始老化,细胞的合成速率低于消耗速率。

2.5 光照条件对愈伤组织生长的影响

表3 光照条件对愈伤组织生长的影响  
Table 3 Effects of light on soybean callus growth

光照条件 Condition of light	连续 24 h 光照 Light	12 h/d 光照 12light + 12dark	连续 24 h 暗光 Dark
愈伤组织增长量(鲜重) (g/瓶)Callus increment (fresh)(g/flask)	7.93	10.05	8.46
愈伤组织增长率/% Callus increase rate/%	793	1005	846
愈伤组织颜色 Appearance of the callus	黄绿色无光泽 Yellow-green fading	黄绿色有光泽 Yellow-green glossy	淡黄色无光泽 Light-yellow fading
继代后生长情况 Subculture growth status	++	++++	+++

在连续 24 h 光照条件下,愈伤组织生长速度缓慢,失去光泽,褐化严重;12 h/d 光照处理的愈伤组织呈黄绿色生长旺盛,富有光泽,继代后生长旺盛;

暗光培养的愈伤组织呈淡黄色,没有光泽,继续继代培养时,生长较慢,转入 12 h/d 光照后,逐渐变得有光泽,生长也比较旺盛。

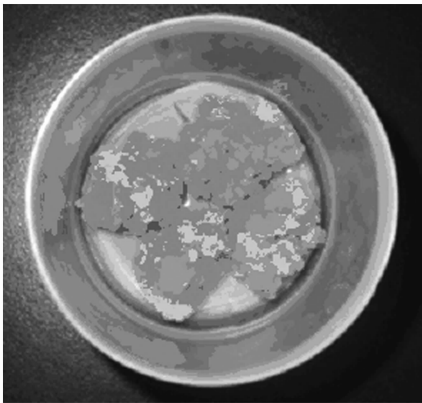


图3 光照 12 h/d 下生长的愈伤组织  
Fig.3 Callus grow up under 12 h/d light



图4 暗光培养下生长的愈伤组织  
Fig.4 Callus grow up in dark

2.6 培养基 pH 值对愈伤组织生长的影响

培养基 pH 是影响愈伤组织生长的重要因素,培养基的 pH 可通过质膜的渗透性影响培养物营养元素的吸收,呼吸代谢,多肽代谢和 DNA 合成,植物激素进出细胞等作用直接或间接地影响愈伤组织的生长及其形态。5 种 pH 的培养基对愈伤组织生长影响不同(表 4):pH5.0~5.4 以下,对愈伤组织

生长有抑制作用;pH5.8~6.0 有一定的缓冲作用,对愈伤组织生长有促进作用,在 pH6.0 时,增长率达到最大,24 d 达 1012%;pH6.5 时,愈伤组织增长率有所下降。

表 4 不同培养基 pH 值对愈伤组织生长的影响

Table 4 Effects of medium pH on soybean callus growth

pH	5.0	5.4	5.8	6.0	6.5
愈伤组织增长量(鲜重)(g/瓶) Callus increment(fresh)(g/flask)	3.68	7.76	10.12	10.23	9.75
愈伤组织增长率/% Callus increase rate/%	368	776	1012	10.23	975

3 结论

以下胚轴为外植体诱导出的愈伤组织在各自培养基上继代培养后,仅 MS 培养基生长好;大豆愈伤组织继代培养最佳激素配比为 6-BA0.5 mg/L,2,4-D2.0 mg/L;在装 50 mL 培养基的 PP-φ80-280-K 培养瓶中,大豆愈伤组织的接种量为 1.00 g 比较合适。

参 考 文 献

[1] 徐刚标,何方,陈良昌. 银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究[J]. 中南林学院学报,1999,19(3):32-36.

[2] 金晓玲,何平. 大叶榉愈伤组织诱导与继代培养的影响因素[J]. 中南林学院学报,2003,23(1):32-36.

[3] 王晓玲,彭定祥,陈小慧. 基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化的影响[J]. 华中农业大学学报,2003,22(5):431-435.

[4] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等. 东北玉米自交系胚性愈伤组织的诱导[J]. 玉米科学,2001,9(1):37-38.

[5] 祁永斌,李和平,高春生,等. 不同小麦品种愈伤组织诱导和再生体系建立[J]. 武汉植物学研究,2005,23(3):227-232.

[6] 张红梅,刘小红,张红伟,等. 不同杂种优势类群玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(1):50-55.