

# 花生幼叶丛生芽高效诱导的制约因素研究

苗利娟,黄冰艳,张新友\*,梁会娟,易明林,陈占宽  
(河南省农作物新品种重点实验室,河南 郑州 450002)

**摘要:**以花生品种豫花 14 号 4d 苗龄的幼叶为外植体,对花生幼叶高频不定芽诱导进行研究。在 MS 培养基的基础上,添加了芽诱导常用的细胞分裂素 6-BA、生长素 NAA 及两种不太常用的脱落酸(ABA)、噻重氮苯基脲(TDZ),结果表明,单独使用 6-BA, NAA 或 TDZ,不定芽诱导率较低;采用较高浓度的 6-BA(8mg/L)、较低浓度的 NAA(1mg/L),添加低浓度的 ABA(1mg/L),不定芽诱导率可达 80%以上。最佳诱导培养基为 MS+6-BA 8mg/L+NAA 1mg/L+ABA 1mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L,从整体上观察,最佳继代培养基为 MS+6-BA 5mg/L+NAA 2mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L。同时研究发现,花生幼叶近叶柄基部切口处不定芽诱导率较高,是较理想的不定芽诱导部位。

**关键词:**花生;组织培养;不定芽诱导;植株再生

**中图分类号:** S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)01-0040-05

## The Restrictive Factors for Efficient Induction of Adventitious Buds from Peanut Leaflet *in vitro*

MIAO Li-juan, HUANG Bing-yan, ZHANG Xin-you\*

LIANG Hui-juan, YI Ming-lin, CHEN Zhan-kuan

(Henan Provincial Key Laboratory for Crop Improvement, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The efficiency of adventitious bud induction from leaflet were investigated using the 4-day seedlings of peanut variety Yuhua 14. The MS medium was added with commonly-used kinin 6-BA, kinetin NAA, and uncommonly-used ABA and thiadiazole Diazo phenyl urea TDZ. Results showed that the adventitious bud induction rate was low in the MS added with only 6-BA, NAA and TDZ, but reached to 80% in the MS added with high concentrations of 6-BA (8 mg/L), low concentrations of NAA (1 mg/L) and low concentrations ABA (1 mg/L), indicating that the MS medium+8 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+1 mg/L ABA+2 mg/L AgNO<sub>3</sub> had the best result for inducing the adventitious buds. The best medium for subculture was MS+5 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+2 mg/L AgNO<sub>3</sub>. It was also observed that the underside cut near the petiole presented a higher rate of adventitious buds, so was the ideological explant for adventitious bud induction.

**Key words:** Peanut; Tissue culture; Adventitious buds induction; Regeneration

花生是重要的油料和经济作物,在世界油脂生产中的提高、种植业结构的调整和对外贸易的扩大,根据产中占有举足轻重的地位。随着我国人民生活水平不同的市场需要,农业生产上对花生品种的需求也

收稿日期:2007-08-20

基金项目:国家转基因专项(JY04-B-01)

作者简介:苗利娟(1981-),女,河南安阳人,研究实习员,主要从事植物基因工程研究。

通讯作者:张新友(1963-),男,河南太康人,研究员,博士,主要从事花生遗传育种研究。

向多元化和专用型发展,选育不同脂肪酸含量和比例的加工型(高硬脂酸含量)、保健型(高多不饱和脂肪酸)、出口型(高 O/L 比)花生新种质是花生新品种选育的重要目标<sup>[1]</sup>。实践证明,利用基因工程技术进行油料作物脂肪酸含量和组分调控是种质创新的有效途径<sup>[2~4]</sup>。花生组织培养及高效植株再生体系的建立是基因转化及外源基因利用的基础,但目前花生的组培植株再生体系不够理想,成为基因转化的限制因素之一<sup>[5]</sup>。为此,选用河南省大面积推广的花生品种豫花 14 号的幼叶作外植体,采用不同激素配比的诱导培养基进行了高效丛生芽诱导和植株再生体系研究,旨在为进一步研究基因转化和脂肪酸调控奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 豫花 14 号花生品种,亚油酸含量 42%,系河南省农业科学院经济作物研究所培育的高亚油酸品种,由河南省农业科学院经济作物研究所提供。

1.1.2 外植体 分别采用萌发 4 d 的幼叶为外植体。

1.1.3 植物激素 N-苯基-N'-1,2,3-噁二唑-5-脲(噁重氮苯基脲, TDZ); 6-苄基嘌呤(6-BA); a-萘乙酸(NAA); 脱落酸(ABA)以及其他常用化学试剂,均为国产分析纯。

1.1.4 培养基 种子预培养培养基为 MS 培养基。诱导培养基:

Y1: MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y2: MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 1 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y3: MS + 6-BA 8 mg/L + NAA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y4: MS + 6-BA 8 mg/L + NAA 1 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y5: MS + TDZ 0.2 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y6: MS + 6-BA 8 mg/L + NAA 1 mg/L + ABA 1 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y7: MS + TDZ 0.3 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y8: MS + TDZ 0.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

Y9: MS + TDZ 0.05 mg/L + NAA 0.4 mg/L

+ 6-BA 0.5 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

继代培养基:

F1: MS + 6-BA 3 mg/L + NAA 1 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

F2: MS + 6-BA 3 mg/L + NAA 2 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

F3: MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 1 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

F4: MS + 6-BA 5 mg/L + NAA 2 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2 mg/L

ABA, TDZ 宜过滤灭菌。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子预培养 选取颗粒饱满、较大、表面无裂痕、没有出胚芽的花生种子,用镊子加入无菌三角瓶中,先用 70% 乙醇浸泡 30 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒 8 min,用无菌水冲洗 5~6 次,然后在无菌水中浸泡 2~3 h,待花生种皮舒展之后,用镊子在超净工作台上将花生种皮去掉,再去掉一片子叶,将剩下带有胚芽的另一半子叶接种于装有 MS 培养基的无菌罐头瓶中。接种时种子不宜插入过深,插入太深种子变黄不能正常出芽。置光照培养室中,在 25~26℃,光照 14 h/d 条件下培养。

1.2.2 外植体制备 制备预培养 4 d 的幼叶外植体:用镊子将花生的子叶掰掉,之后夹紧胚轴,再用无菌刀片将花生幼叶从基部切下,将幼叶横切平均一分为三或从近叶柄部 1/3 处一分为二,切时应注意将顶端的芽点去除,4 d 苗龄的花生幼叶较小,尚未展开,操作时一定要先用镊子将子叶去掉,用镊子夹叶片时一定要轻,否则会将材料夹伤,影响诱导率。

1.2.3 不定芽的诱导和分化 将外植体分别接种在诱导培养基上,置光照培养室 25~26℃、光照 14 h/d 条件下培养,两周后,分别转到继代培养基上使芽点进一步分化,再培养 3 周后统计诱导率。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽高诱导率外植体部位选择

外植体部位不同可能会导致诱导率不同,本试验采用两种不同切法的外植体进行比较,用无菌刀片将花生幼叶横切平均一分为三作为幼叶外植体 1;将花生幼叶从近叶柄部 1/3 处一分为二作为幼叶外植体 2,接种于两种不同诱导培养基 Y1 和 Y3 上。

从表 1 可以看出,幼叶外植体 2 的不定芽诱导率高于外植体 1,而且,从不定芽的发生部位看

(图 1),不定芽大都在近叶基部切口叶脉处形成,幼叶切得过小不利于不定芽的形成。后续试验均采用幼叶外植体 2。

表 1 幼叶外植体不同部位的不定芽诱导率

幼叶外植体	培养基	接种外植体块数(个)	产生不定芽的外植体块数(个)	诱导率(%)
1	Y1	1042	162	15.5
	Y3	552	102	18.5
2	Y1	316	126	39.9
	Y3	251	147	58.6



图 1 花生幼叶诱导产生的不定芽点

2.2 不同诱导培养基对花生幼叶芽诱导的影响

幼叶接种于诱导培养基,4d 后叶片开始膨大,10d 后有绿色小突起出现,逐渐长大形成丛生芽(图 1),丛生芽形成频率及快慢因培养基而不同。在诱导培养基 Y6(MS+6-BA 8mg/L+NAA 1mg/L+ABA 1mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L)上的外植体膨大不太明显,但切口处大部分都能出现丛生芽点,且形成速度比较快。

2.2.1 不同细胞分裂素与生长素配比对芽诱导的影响 从图 2 可以看出,不同浓度的 NAA 和 6-BA 配比对不定芽诱导率影响较大,诱导率从 39.9% 到 58.6%,以 Y3 培养基(MS+6-BA 8mg/L+NAA 0.5mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L)的不定芽诱导率最高。

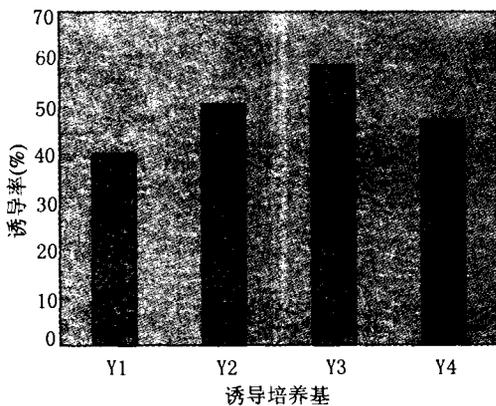


图 2 不同浓度的 NAA 和 6-BA 配比对芽诱导的影响

2.2.2 ABA 对芽诱导的影响 从培养效果看,Y6 培养基的叶片膨大不太明显,而且叶片颜色发黄,而其他培养基的叶片膨大较明显,颜色浓绿。但 Y6 培养基的叶片切口处大部分都有绿色的丛生芽点出现。由图 3 可看出,Y6(MS+6-BA 8mg/L+NAA 1mg/L+ABA 1mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L)培养基的诱导率比 Y4(MS+6-BA 8mg/L+NAA 1mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L)高出 26 个百分点,而 Y6 只比 Y4 增加了 1mg/L ABA,而且 Y6 比只使用生长素和细胞分裂素的 Y3 培养基(6-BA 8mg/L+NAA 0.5mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2mg/L)的诱导率也提高 14 个百分点,可见,ABA 与适当的 6-BA 与 NAA 配合,对幼叶的不定芽分化有明显促进作用。

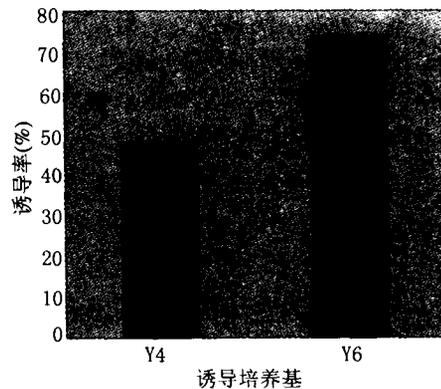


图 3 ABA 对芽诱导的影响

2.2.3 TDZ 对芽诱导的影响 单独使用 TDZ 0.2mg/L 时(Y5 培养基),不定芽的诱导率只有 27%,而 TDZ 与 6-BA,NAA 结合使用时,诱导率提高到 52%,可见 TDZ 与 6-BA,NAA 配合使用比单独使用时效果明显(图 4)。当 6-BA,NAA 浓度相同时,不定芽诱导率则随着 TDZ 浓度的降低而升高,表明低浓度的 TDZ 有助于花生丛生芽的形成。

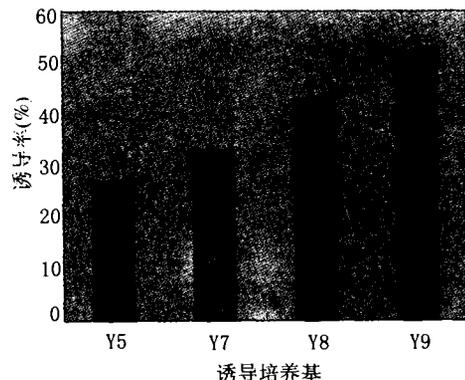


图 4 TDZ 对芽诱导的影响

2.3 丛生芽的继代培养

将诱导所产生的具芽点外植体分别继代于 4 种

继代培养基,不同继代培养基的平均分化率从 43% 到 57%,变幅不大(图 5),但从表 2 可以看出,继代培养基与诱导培养基互作明显,Y6 诱导培养基与 F1 继代培养基组合的不定芽诱导率达 83.9%,而继代于 F3 培养基诱导率只有 50.8%;相反,Y7 诱导培养基与 F1 继代培养基配合,诱导率仅 19.5%,但与 F3 继代培养基配合,诱导率提高至 43.6%。诱导培养基与继代培养基的不同组合诱导率差异很大,从表 2 可以看出,最佳组合是 Y6 与 F1,诱导率达 83.9%。

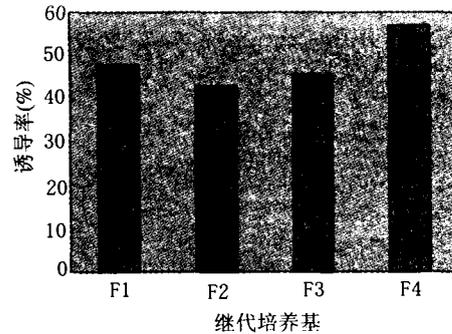


图 5 不同继代培养基的不定芽诱导率

表 2 不同诱导培养基与继代培养基组合的不定芽诱导效果

诱导培养基	继代培养基											
	F1			F2			F3			F4		
	继代外植体数	产生芽点外植体数	诱导率 (%)									
Y1	116	41	35.3	105	29	27.6	59	30	50.8	36	26	72.2
Y2	66	25	37.9	66	44	66.7	75	31	41.3	94	52	55.3
Y3	74	40	54.1	83	46	55.4	54	37	68.5	40	24	60.0
Y4	77	45	58.4	79	21	26.6	122	59	48.4	77	43	55.8
Y5	57	24	42.1	64	16	25.0	55	18	32.7	58	17	29.3
Y6	56	47	83.9	78	61	78.2	61	31	50.8	75	57	76.0
Y7	41	8	19.5	38	9	23.7	39	17	43.6	36	12	33.3
Y8	37	16	43.2	39	13	33.3	37	12	32.4	44	27	61.4
Y9	39	25	64.1	39	16	41.0	40	12	30.0	40	29	72.5

### 3 结论与讨论

#### 3.1 外植体及不定芽高诱导率部位

本研究在以往对不同外植体不定芽诱导率研究的基础上<sup>[6~9]</sup>,进一步研究发现,花生幼叶的不同部位不定芽诱导频率明显不同。幼叶近叶柄基部切口不定芽诱导率较高,是较理想的不定芽诱导部位。

#### 3.2 诱导培养基及继代培养基的培养时间

在一定激素配比的培养基上培养的时间长短,对于芽分化也非常重要。丛生芽到丛生苗是决定最终成苗数量的一个关键步骤,有时丛生芽的状态很好,如果所继代的培养基不适合或者时间不合适,则会造成丛生芽不伸长,或者出现扁化苗、畸形苗等情况。我们除了采用常规激素外,主要观察 ABA 和 TDZ 的作用效果,ABA 与 TDZ 对丛生芽的诱导效果不错,但是通过观察发现,在含有 ABA 培养基上的丛生芽两周后有变黄现象,也许丛生芽在含有 ABA 培养基上时间过长会影响丛生芽的生长发育,这些问题有待进一步研究。因此本次我们采用较短的诱导时间,诱导两周后及时转至细胞分裂素浓度较低的继代培养基上,以促进丛生芽点进一步分化。诱导培养基采用较高浓度的细胞分裂素,两周后转

至较低浓度细胞分裂素的继代培养基,可获得较高的不定芽诱导率。

#### 3.3 ABA 与 TDZ 的作用

本试验结果表明,以幼叶诱导不定芽,较低浓度的生长素和较高浓度的细胞分裂素配合另添加低浓度的 ABA 效果较好。ABA 是一种具有倍半萜结构的植物激素,是一种较强的生长抑制剂,可抑制整株植物或离体器官的生长,很少有报道 ABA 诱导丛生芽的。本试验在 6-BA 与 NAA 浓度不变的条件下,加入 1mg/L ABA 不定芽诱导率显著提高,可见 ABA 可以促进花生幼叶丛生芽的分化。

TDZ 是一种苯基脲衍生物,具有很强的细胞分裂素活性,已被用于组织培养<sup>[10,11]</sup>,本试验中,TDZ 对诱导丛生芽的作用表现出一定的规律,较低的浓度能促进不定芽产生,但对不定芽进一步分化的影响有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 董文召,汤丰收.我国花生优质育种的研究进展及育种策略探讨[J].中国农学通报,2002,18(2):77-79.
- [2] 石东乔,周奕华,陈正华.植物脂肪酸调控基因工程研究[J].生命科学,2002,14(5):291-295.

# 气象因素对黄淮海夏大豆脂肪含量的影响

曲 杰,海亚耕,庞建新,谷传彦

(山东省菏泽市农业科学院,山东 菏泽 274000)

**摘要:** 运用多种数理统计方法,对 1998~2003 年黄淮海夏大豆区试南组各试点参试品种的大豆脂肪含量与平行观测的气象资料进行分析。结果表明:在黄淮海夏大豆区影响脂肪含量的综合气候关键期为 9 月上、中旬(鼓粒中后期),主导气象因子为日照时数,气温日较差对其也有重要影响。

**关键词:** 气象因素;大豆;脂肪

**中图分类号:** S565. 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)01-0044-03

脂肪含量是检验大豆品质的重要指标之一。大豆脂肪含量除受品种遗传特性、栽培措施<sup>[1]</sup>等因素影响外,还受气象条件<sup>[2]</sup>的制约。研究表明,纬度、海拔、播期等条件的改变是通过光、温、水等气象因子的变化而影响脂肪含量的。同一地点多年种植同一品种,脂肪含量的变化主要是由气象条件的改变引起的。本研究根据 1998~2003 年黄淮海夏大豆区域试验南组各试点参试品种的大豆脂肪含量及其对应试点的气象资料,定性并半定量分析大豆脂肪含量与气象条件的关系,旨在为生产上改进栽培措施,提高大豆品质提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 资料来源

以 1998~2003 年黄淮海区试南组郑州、徐州、菏泽、济宁、临沂 5 个试点 21 个品种(系)的脂肪含量及各试点同期气象资料(生育期间浇水 1 次,灌溉

量按 50 mm 计)为分析数据。

### 1.2 脂肪含量测定方法

脂肪含量测定采用 GB2902-82 索氏提取法,以占干物质重量的百分率表示。

### 1.3 数据分析方法

各试点大豆一般于 6 月下旬播种,7 月下旬开花,8 月下旬进入鼓粒盛期,9 月底成熟。对各试点自 7 月下旬(开花期)至 9 月下旬(成熟期)按旬统计的平均气温  $T(^{\circ}\text{C})$ 、温度日较差  $D(^{\circ}\text{C})$ 、降水量  $R(\text{mm})$  和日照时数  $S(\text{h})$ ,与对应试点的脂肪含量进行分析。各试点每年的大豆脂肪含量均取供试品种的平均值。

运用相关分析方法确定大豆脂肪含量与各时段气象因素的相关系数;利用积分回归分析中的偏回归系数  $A(t)$  值反映气象要素对脂肪含量的影响;用主成分分析法决定综合气候关键期;通过计算积分回归中偏回归系数  $A(t)$  值的相对变差确定主导气象因素。

收稿日期:2007-07-26

作者简介:曲 杰(1969-),男,山东荣成人,农艺师,主要从事作物育种、设施栽培和科研管理工作。

- .....
- [3] Liu Q, Singh S P, Brubaker C L, *et al.* High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hpRNA-mediated posttranscriptional gene silencing [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1732-1743.
  - [4] Kinney A J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications [J]. *Journal of Food Lipids*, 1996, 3: 273-292.
  - [5] 袁美,李双玲,李海渤,等.农杆菌介导的花生遗传转化现状与分析[J]. *花生学报*, 2003, 32(增刊): 285-290.
  - [6] 方小平,许泽永,张宗义.花生小叶片外植体植株再生及农杆菌介导的基因遗传转化[J]. *中国油料*, 1996, 16(4): 52-56.
  - [7] 瞿楨,廖伯寿,吴新镛.花生去子叶幼胚的丛生芽诱导和植株再生[J]. *中国油料*, 1994, 14(4): 28-31.
  - [8] 李春娟,单世华,万书波,等.花生胚小叶片外植体再生影响因素研究简报[J]. *花生学报*, 2005, 34(3): 36-38.
  - [9] 徐平丽,单雷,王传堂,等.花生胚轴丛生芽诱导和植株再生[J]. *花生科技*, 1999(增刊): 254-256.
  - [10] 林荣双,王庆华,梁丽琨,等. TDZ 诱导花生幼叶的不定芽和体细胞胚发生的组织学观察[J]. *植物研究*, 2003, 23(2): 169-171.
  - [11] 王关林,方宏筠,那杰.高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. *植物学通报*, 1997, 14(3): 47-53.