

花生上胚轴的丛生芽诱导和植株再生

何红卫¹, 宾金华²

(1 暨南大学 华文学院, 广东 广州 510610; 2 华南师范大学 生命科学院, 广东 广州 510631)

摘要: 用苗龄 10 d 的花生无菌苗的上胚轴为外植体, 置于 MS+TDZ 1 mg/L+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基中, 14 d 左右, 可见丛生芽分化, 45 d 后长出整齐一致的丛生芽, 诱导率达 80.2%, 平均出芽数达 9.1 个。同时添加 YE 与 AD 和适当浓度的 AgNO₃, 外植体的出芽率提高到 90%, 切取诱导芽单芽, 转接至含有 NAA 的根诱导培养基中, 在同样的培养条件下, 30 d 后, G4 号培养基中的外植体出根率达 80%, 且根粗壮, 较长。

关键词: 花生; 丛生芽; 诱导; 植株再生

中图分类号: S565.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0046-04

花生(*Arachis hypogaea* L.)是重要的油料作物和经济作物。关于花生外植体芽诱导再生及丛生芽培养已有许多报道。Atteya 等^[1]用花生子叶切段诱导产生小植株。李爱民等^[2]报道利用高浓度细胞分裂素的诱导分化培养基, 直接诱导花生子叶再生幼芽。瞿桢等^[3]利用花生去子叶幼胚诱导出丛生芽。Ih-son^[4]利用子叶和胚的愈伤组织诱导产生出芽体。张书标等^[5]利用花生幼苗叶节诱导产生大量的丛生芽。徐平丽等^[6]利用成熟花生的胚轴再生植株成功。花生组织培养至今已有 40 多年的历史, 但由于豆科植物的再生难度较大, 还有种属的特性, 研究进展较缓慢。利用广东省花生品种诱导丛生芽的研究鲜见报道, 笔者利用广东品种花生进行再生系统的建立, 以期花生转基因的研究建立稳定的受体系统。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为粤油 79。

1.2 培养基

1.2.1 诱芽培养基 C1: MS+TDZ 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L; C2: MS+TDZ 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L; C3: MS+TDZ 1 mg/L+BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L; C4: MS+TDZ 2 mg/L+BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L; C5: MS+TDZ 1 mg/L+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L; C6: MS+TDZ 2 mg/L+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

1.2.2 丛生芽的扩繁培养基 J1: MS+B5 维生素+BA 3 mg/L+AD 50 mg/L+YE ($\varphi=0.01\%$);

J2: MS+B5 维生素+BA 5 mg/L+AD 50 mg/L+YE ($\varphi=0.01\%$);

J3: MS+B5 维生素+TDZ 1 mg/L+AD 50 mg/L

+YE ($\varphi=0.01\%$);

J4: MS+B5 维生素+TDZ 1 mg/L+AD 50 mg/L+YE ($\varphi=0.01\%$)+AgNO₃ 3 mg/L

1.2.3 根诱导培养基 G1: MS; G2: MS+NAA 0.5 mg/L; G3: MS+NAA 1 mg/L; G4: MS+NAA 2 mg/L;

1.2.1~1.2.3 培养基均附加蔗糖 30 g/L, 琼脂 8 g/L, pH 值为 5.8~6.0, 在 121 °C、105 Kpa 条件下灭菌 20 min。

1.3 方法

选用粒大饱满的花生荚果, 用洗衣粉洗去表面的泥土, 以 $\varphi=2\%$ 次氯酸钠浸泡 0.5 h (内含 $\varphi=0.01\%$ Tween20), 洗净, 无菌条件下剥取花生种子, 用 $\varphi=2\%$ 次氯酸钠浸泡 15 min, 无菌水冲洗 4 次, 将消毒种子接种至 1/2 MS 培养基中培养, (26±2) °C, 光照萌发待用。

1.3.1 不同外植体成芽能力的差异 取 10 d 光照下萌发的无菌苗上胚轴、子叶、下胚轴、幼叶接种于 C3 诱导培养基上, 其中上、下胚轴切为 1 cm 长, 子叶 0.5 cm 长, 幼叶 0.5 cm 长, 子叶和幼叶切去两端留中间部分, 平放于培养基表面。接种后 30 d 调查出芽率。

1.3.2 不同激素水平对上胚轴不定芽的诱导 取 10 d 光照下萌发的花生无菌苗上胚轴切为 1 cm 长, 接种于培养基 C1~C6 中, 光培养 30 d 后, 调查各处理出芽率。

1.3.3 不同基本培养基、糖浓度比较 基本培养基采用 MS、B5、White、MS+B5 维生素; 糖质量分数分别为 2%、3%、4%、5% 进行试验。

1.3.4 不同外源添加剂比较 外源添加剂选用 YE ($\varphi=0.01\%$)+AD 50 mg/L、AgNO₃ (质量浓度分别为

0、1、2、3 mg/L)。所有培养基均采用 MS+B5 维生素培养基。

1.3.5 丛生芽的扩繁培养 将第一次分化的不定芽芽丛按 2~3 个芽一团切为小块, 接于扩繁培养基 J1~J4 中, 光培养, 接种后 30 d 调查芽丛增殖倍数。

1.3.6 根的诱导 当分化至数片真叶后, 切取诱导芽单芽, 转接至 G1~G4 培养基, 以诱导生根。

以上处理培养温度(26±2)℃, 光照 16 h/d。日光灯光源, 光照度约为2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同外植体成芽能力的差异

接种 4 d 后, 上胚轴伸长; 培养 7 d, 上胚轴切口处出现淡绿色正在分裂、生长的凹凸不平细胞层, 靠近培养基的基部膨大, 并长出绿色瘤状物, 14 d 左右即有芽点形成。随着时间的延长, 基部不断增大, 幼芽数逐渐增多; 下胚轴则先膨胀, 10 d 左右在与培养基接触部位长出少许愈伤组织, 20 d 左右在形态学上端切口处个别长出芽点; 子叶先膨胀, 约 15 d 左右长出粉白色愈伤组织, 接着褐化; 幼叶也是先胀大, 约 20 d 左右从切口处长出小芽点。外植体种类对不定芽诱导效果有较大影响, 芽诱导率上胚轴为(70.0±0.4)%; 下胚轴为(18.7±2.5)%; 子叶为 0; 幼叶为(14.3±0.4)%。可见, 上胚轴出芽率最高, 下胚轴次之, 子叶最差。

2.2 不同激素水平对上胚轴不定芽诱导的效应

每隔 14 d 左右, 去除底部褐化部分及上部的幼叶, 将长出芽点的外植体转至新鲜培养基中, 至接种后 45 d, 大多数外植体已出芽, 形成了较为整齐一致的丛生芽, 最先出芽外植体的最长嫩梢已有 2 cm 左右高(图 1a)。当 TDZ 与 BA 协作使用时, 能大大提高外植体的出芽率。由此可见, 合适的激素处理及激素组合是影响花生芽分化的重要因素。在诱导培养基中适当添加 NAA, 有助于提高萌动种子胚轴作外植体的植株再生效率(表 1)。

表 1 不同 TDZ 和 BA 浓度对比对花生上胚轴芽诱导的影响

Tab. 1 Effects of TDZ and BA combinations on shoot induction from epicotyl of peanut			
培养基	外植体数	芽诱导率	平均芽数
medium	of explants	of shoots/ %	shoots/ explant
C1	100	54.4±1.2	3.2±0.4
C2	100	58.9±2.2	5.0±1.4
C3	100	70.0±0.4	6.2±1.0
C4	100	68.3±1.3	5.5±0.3
C5	100	80.2±0.9	9.1±0.8
C6	100	68.5±1.0	5.3±0.4

2.3 不同基本培养基、糖浓度对外植体不定芽形成的影响

从表 2 的结果看, 不同培养基对花生的出芽率有一定的影响, 以 MS+B5 维生素最好, 出芽率较 MS 培养基高, 而 B5 培养影响不大, White 培养基则有所下降, 说明花生的出芽需要高盐和高维生素的作用。随着糖质量分数的升高, 出芽率有所下降, 因而可将粤油 79 糖质量分数定为 3%。

表 2 不同基本培养基和糖浓度对上胚轴不定芽发生的影响
Tab. 2 Effect of different base medium and the concentration of sugar on shoot formation of epicotyl of peanut

培养基	出芽率	w(糖)	出芽率
medium	percentage of shoots / %	sugar) / %	percentage of shoots / %
MS	80.0±0.9	2	75.3±0.8
White	77.4±0.6	3	80.0±0.9
B5	80.0±1.0	4	78.0±0.4
MS+B5Vitamin	84.2±0.4	5	67.0±0.7

2.4 不同外源添加剂对外植体不定芽形成的影响

YE 与 AD 都可提高外植体的出芽率, 并且对出芽数也有促进作用, 从表 3 可以看出, 当单独添加 AD 或 YE 时, 都可以提高外植体的出芽率, 但两者同时添加时, 粤油 79 外植体的出芽率由 80% 提高到 89%。而且平均出芽数成倍增加。显然酵母浸出液(YE)对丛生芽的分化和生长有利, 这可能是由于酵母浸出液中含有细胞分裂素和其他活性物质有关。AD 对丛生芽分化和生长有较明显的正效应, 可能与 AD 是核酸的成分有关。适当浓度的 AgNO₃ 对花生离体培养器官发生有明显的促进作用, 不仅提高分化率, 而且外植体平均含芽数都有所提高。粤油 79 在 AgNO₃ 质量浓度为 3 mg/L 时能较好地提高出芽。

表 3 添加不同浓度 YE 和 AD 或 AgNO₃ 对上胚轴不定芽发生的影响
Tab. 3 Effect of different concentrations of YE and AD or AgNO₃ on shoot formation of epicotyl of peanut

YE+ AD+ AgNO ₃	出芽率	平均芽数
	percentage of shoots/ %	shoots/ explant
0+0+0	80.2±0.9	9.1±0.8
0.01%(♀)+0+0	82.0±0.3	10.2±0.4
0+50 mg/ L+0	81.0±0.6	12.8±0.5
0.01%(♀)+50 mg/ L+0	89.0±0.7	18.0±0.6
0+0+1 mg/ L	82.0±0.4	11.5±0.5
0+0+2 mg/ L	87.3±0.7	13.2±0.2
0+0+3 mg/ L	90.0±0.3	15.0±0.4

2.5 丛生芽的扩繁培养

将第一次分化的不定芽芽丛按 2~3 个芽一团切为小块, 接于扩繁培养基中, 培养 2 周后, 带芽组

组织块开始膨大, 40 d 后, J1 中原先的芽有所生长, 而且基部长出了许多粉白色, 松散的愈伤组织. J3 和 J4 中的组织块长成了密集的嫩绿色芽群(图 1b), 尤其以 J4 中的芽群较粗壮. J2 增殖芽数较 J1 高, 但植株在分化出 1~2 片单叶或复叶后, 叶片迅速增大, 或不断增加小叶片, 而茎始终不伸长. 说明高浓度的 BA (5 mg/L) 有利于丛生芽的诱导扩繁培养, 但会抑制原先芽点的生长及随后新芽的继续分化生长, 使其只停留在芽点状态, 与此相反, 低浓度的 BA (3 mg/L) 对芽点的诱导率虽低, 但有利于原芽点的生长发育, 不会产生抑制作用. 适当浓度的 TDZ (1 mg/L) 有利于芽的扩繁, 适当浓度的 AD、AgNO₃ 及适量 YE 有利于丛生芽的诱导, 明显提高诱导率及平均出芽个数(表 4).

表 4 培养基组成对丛生芽扩繁培养的影响
Tab. 4 Effect of different medium on growth of adventitious shoots

培养基 medium	诱导率 frequency/ %	再生植株 regenerated plant/ 个
J1	32.5±1.2	4.1±0.5
J2	70.4±1.3	9.5±0.3
J3	93.6±1.7	10.7±0.8
J4	98.7±1.4	13.8±0.9

2.6 生根培养基对根的诱导

经诱导的丛生芽无根苗, 去黄枯叶和基部后, 单芽接入诱根培养基, 6 d 后, 部分外植体切口处即有白色根点出现. 以 G3 和 G4 培养基较为明显. 15 d 后, 部分外植体的较粗大的根有细小的支根长出. 30 d 后, 不同培养基的生根率有显著差异. 从表 5 可以看出, G1 号培养基出根率较低, 说明在不含激素的条件下, 丛生芽基本不长根或长根较少, G2 号培养基出根率为 33.3%, 说明太低浓度的 NAA 不利于根的生长, G3 号培养基的出根率为 86.7%, 高于 G4 号培养基的出根率(80.0%), 但根的长势则 G4 号培养基较好, 每个外植体平均含根数为 6.4 条, 多于 G3 号, 且 G4 号培养基中的根较粗壮, 支细根也较多. 说明含 1 mg/L 以上 NAA 的培养基较容易诱导芽出根. 而较高浓度的 NAA (2 mg/L) 有利于侧根生长(图 1c、1d).

表 5 不同培养基 30 d 后对丛生芽根再生的影响
Tab. 5 Effect of different medium on root regeneration of adventitious shoots in 30 days

培养基 medium	出根率 percentage of roots/ %	平均根数 average no. of root/ 条	根的形状 shape of root
G1	6.7±1.6	2.0	细小
G2	33.3±1.2	3.5	细小
G3	86.7±1.8	5.1	细小, 较长
G4	80.0±2.2	6.4	粗壮, 较长

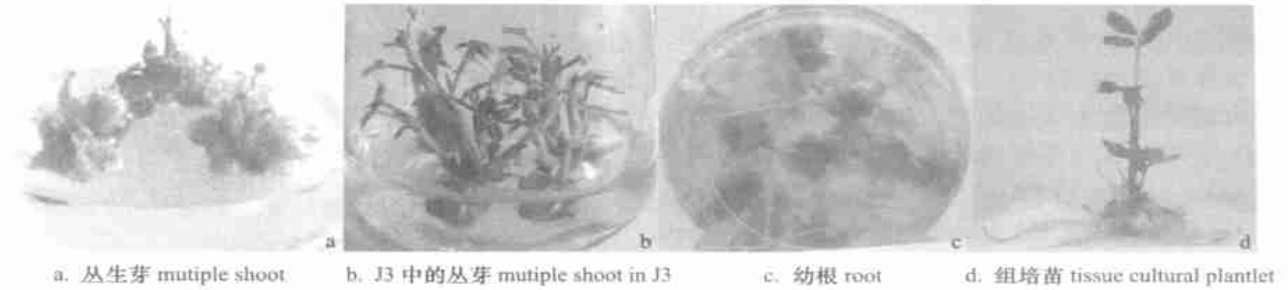


图 1 花生上胚轴的丛生芽和再生植株
Fig. 1 The mutiple shoot and regenerated plant from the epicotyl of peanut

3 讨论

外植体对于建立植物无性繁殖体系非常重要, 一些学者认为, 花生上胚轴因有分生组织存在, 属于高度再生部位^[7]. 本实验亦表明, 上胚轴在分化培养中受到高含量细胞分裂素和低含量生长素的组合作用影响, 均可获得比其他外植体较高的产芽率.

对于花生外植体植株再生和丛生芽培养, 前人多用低浓度的细胞分裂素和生长素, 且设立预培养基进行二次培养^[8~12], 也有学者利用较高浓度 BA

直接诱导子叶等外植体进行丛生芽培养^[13], 本试验证明, 当 TDZ 与 BA 协作使用时, 能大大提高外植体的出芽率. 而附加 $\varphi=0.01\% \text{YE} + \text{AD } 50 \text{ mg/L}$ 的 MS + B5 维生素培养基外植体平均丛生芽数最高, 有利于丛生芽的诱导及扩繁培养. 有研究^[14]表明, AgNO₃ 可促进一些再生困难种的形态发生, 增加外植体产生不定芽的数目, 提高植株再生频率. 本研究结果表明, AgNO₃ 对花生离体培养器官发生有明显的促进作用, 不仅提高分化率, 而且外植体平均出芽数都有所提高.

参考文献:

[1] ATREYA C D, RAO J P, SUBRAH M N C. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L) plantlets from embryo axes and cotyledon segments[J]. *Plant Sci Lett*, 1984, 34: 379—383.

[2] 李爱民, 吴 琦. 花生子叶的芽分化和植株再生[J]. *植物学通报*, 1988, 5(3): 143—145.

[3] 瞿 桢, 廖伯寿, 吴新镛, 等. 花生去子叶幼胚的丛生芽诱导和植株再生[J]. *中国油料*, 1994, 16(4): 28—31.

[4] IHSON I, ROBINA S, MUSRAT J. Plantlet regeneration from mature embryos of peanut (*Arachis hypogaea* L)[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 1995, 27(2): 405—409.

[5] 张书标, 庄伟建, 刘思衡, 等. 花生幼苗叶节丛生芽诱导和植株再生[J]. *福建农业大学学报*, 1998, 27(1): 20—23.

[6] 徐平丽, 单 雷, 王传堂, 等. 花生胚轴丛生芽的诱导和植株再生[J]. *花生科技*, 1999, (增刊): 254—255.

[7] VENKATACHALAM P, SUBRAMANIAMPILLAI A, JAYABACAN N. *In vitro* callus culture and plant regeneration from different explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L)[J]. *Breeding Sci*, 1996, 46(4): 315—320.

[8] 吴 琦, 韩碧文. 花生幼芽的下胚轴培养[J]. *植物生理学通讯*, 1981, (4): 40—45.

[9] 吴爱忠, 甘晓兵, 曹 林, 等. 花生属(*Arachis* L)多年生野生种组织培养研究初报[J]. *上海农学院学报*, 1994, (3): 210—214.

[10] 瞿 桢, 吴新镛, 周 蓉, 等. 花生未成熟胚胎培养与植株再生[J]. *中国油料*, 1993, (4): 15—17.

[11] 封海胜, 徐宣民, 万书波, 等. 花生组织培养[J]. *世界农业*, 1990, (96): 22—25.

[12] BAJAJ Y P S, RAM A K, LABANA K S, et al. Regeneration of genetically variable plants from the anther derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*[J]. *Plant Sci Lett*, 1981, 34: 379—383.

[13] MCKENTLY A H. *In vitro* plant regeneration of peanut from seed explant[J]. *Crop Sci*, 1989, 30: 192—195.

[14] 张 鹏, 傅爱根. AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. *植物生理学通讯*, 1997, 33(5): 376—379.

Adventitious Shoot Induction and Plant Regeneration from the Epicotyl of *Arachis hypogaea*

HE Hong-wei¹, BIN Jin-hua²

(1 College of Chinese Language and Culture of Jinan University, Guangzhou 510610, China
2 College of Life Science of South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Adventitious shoots were induced directly from the epicotyl of peanut (*Arachis hypogaea*) taken from the 10 days old aseptic seedling of peanut. The explants were cultured on media with MS and TDZ 1 mg/L+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L. 14 days later, the adventitious shoots began to differentiate incessantly, and to 45 days, all explants differentiated normal regular. The rate of organogenesis was 80.2%. There was 9.1 shoots per explant in average. The shoots were isolated and the single shoot was taken out and cultured on root induction media with NAA in the same conditions mentioned above and 30 days later, the rooting rate of explants on medium G4 was 80%, and the root was stronger and longer.

Key words: *Arachis hypogaea*; adventitious shoots; induction; plant regeneration

【责任编辑 周志红】