

花生体细胞胚的诱导及其植株再生

庄伟建 张书标 刘思衡 蔡来龙

(福建农业大学作物学院, 福州 350002)

摘要 采用不同成熟度的花生胚轴为外植体进行体细胞胚诱导及植株再生研究, 结果表明, 成熟胚轴在高浓度 2,4-D 的 MS 培养基中, 经过 30 d 左右的培养, 可直接诱导产生出大量的体细胞胚, 含 40 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基中体细胞胚的诱导率达 100%, 平均每个外植体产生 11.58 个体细胞胚。体细胞胚的继代培养需降低 2,4-D 的浓度 ($10-20 \text{ mg L}^{-1}$)。未成熟胚轴的体细胞胚诱导及继代培养的 2, 4-D 浓度宜为 10 mg L^{-1} 。将诱导的体细胞胚转接到含 $5-10 \text{ mg L}^{-1}$ BA 的 MS 培养基中, 体细胞胚能够萌发再生成无根小植株, 将其转接到生根培养基中可获得完整小植株。

关键词 花生; 体细胞胚; 植株再生

中图分类号 S565.20353

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM AXES OF PEANUT EMBRYOS

Zhuang Weijian Zhang Shubiao Liu Siheng Cai Lailong

(College of Crop Science, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002)

Abstract Somatic embryos could be induced from axes of mature peanut embryos cultured on basal MS medium containing high concentration of 2,4-D (40 mg L^{-1}) with 0.5 mg L^{-1} kinetin, 30% sucrose and 0.9% agar for 30 days, the induction rate being 100 percent, and the mean embryo number per explant reaching 11.58. Lower concentrations of 2,4-D ($10-20 \text{ mg L}^{-1}$) were suitable for somatic embryoid differentiation in subculture. However, 10 mg L^{-1} 2,4-D was the optimum concentration for inducing somatic embryos both in primary culture and in subculture by immature embryo axes. Somatic embryos could easily germinate on MS medium with $5-10 \text{ mg L}^{-1}$ BA. The plantlets were obtained after the shoots were transferred to root-inducing medium, MS + 2 mg L^{-1} NAA.

Key words Peanut; Somatic embryos; Plant regeneration

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是我国及世界上重要的油用兼食用作物。通过离体培养产生体细胞胚, 对于花生品种改良, 基因工程研究和人工种子研制等都有重要的意义。花生体细胞胚发生研究起步虽晚, 但近几年关于这方面的研究报道逐渐增多。Sellars^[1] 在 L2 培养基上, 以未成熟胚为外植体, 诱导出体细胞胚。Bansal 等^[2] 在添加 2 mg L^{-1} 2,4-D 的 MS 培养基上诱导出少量的花粉胚, 但未能获得再生植株。Charleen 等^[3] 用改良的 MS 培养基, 幼叶离体培养产生

体细胞胚。George等^[4]和Mckently^[5]报道了不同基因型和来源的外植体对体细胞胚形成的影响,结果认为,基因型和外植体的来源对体细胞胚的形成影响很大。Charleen等^[6]指出2,4-D和NAA都能诱导未成熟子叶产生体细胞胚。也有学者Hazar等^[7]认为NAA对花生体细胞胚的诱导无效。目前,花生体细胞胚发生的研究进展较快,但国内还尚未见报道,国外已报道的体细胞胚的诱导效率还不高,植株再生周期长。为建立更理想的花生体细胞胚高频发生系统,我们对花生体细胞胚诱导,扩繁和植株再生进行了研究。

1 材料和方法

材料 用泉州市农科所选育的泉花10号为材料,取成熟或未成熟(果针入土40 d左右)的花生果用肥皂粉洗净,取出种子在70%酒精中消毒2-3 min,2%次氯酸钠消毒15 min,无菌水冲洗3-5次,在超净工作台上,弃种皮,取胚轴为外植体。

体细胞胚诱导培养基 (1)MS+10 mg L⁻¹(单位下同)2,4-D+0.5 KT;(2)MS+20 2,4-D+0.5 KT;(3)MS+40 2,4-D+0.5 KT;(4)MS+60 2,4-D+0.5 KT。

体细胞胚继代培养基 除(1)、(2)和(3)号培养基外增设(5)MS+5 2,4-D+0.5 KT。

体细胞胚萌发培养基 (6)MS;(7)MS+0.5 2,4-D+0.1 BA;(8)MS+0.1 2,4-D+0.5 BA;(9)MS+2 BA;(10)MS+5 BA;(11)MS+5 BA+1 2,4-D;(12)MS+10 BA。

生根培养基 (13)MS+2 NAA。

以上培养基pH值均为5.8,均加入3%蔗糖和0.9%琼脂。

培养条件及方法 在无菌条件下,把从种子中取出的胚轴迅速接入体细胞胚诱导培养基上,每瓶接4个外植体,置于28±1℃,每天光照14 h,光强1800 lx的条件下培养,40 d后,将诱导的体细胞胚转移到体细胞胚继代培养基上,于同样的条件下培养。将诱导产生的体细胞胚单个接入到萌发培养基上,置于相同的条件下培养。

2 结果与分析

2.1 成熟花生胚轴体细胞胚的诱导及扩繁

2.1.1 体细胞胚诱导

成熟花生胚轴接种到体细胞胚诱导培养基中,2 d后,在各种培养基中的外植体都有不同程度的膨大,一周后,(3)号培养基中胚芽基部的胚轴周围有白色的瘤状物突出,18 d后,可很清楚地看到各种培养基上都有体细胞胚长出,此外在胚轴与培养基接触的周围有不同程度水渍状的愈伤组织。30 d后,可见胚轴的周围有大量的体细胞胚(图版I:1)。

组织细胞学观察表明,花生胚轴周围的表皮细胞被诱导形成胚性细胞团突起,图版I:2显示出直接发生于胚轴外植体的体细胞胚。它显示出典型的球型胚的结构,其内的胚性细胞具有较大的细胞核,细胞质浓。在适当的条件下(下述),这种球型胚发育成熟并萌发,最后发育成具有叶原基的体细胞胚(图版I:3)。

由表1可知,不同浓度的2,4-D(10-60 mg L⁻¹)都能够诱导外植体产生体细胞胚,但其诱导效果不一样,含10 mg L⁻¹ 2,4-D的培养基,体细胞胚的诱导率只有62.5%,其他浓度的培养基体细胞胚的诱导率都为100%。虽然这些培养基的体细胞胚诱导率都一样,但

它们各自的诱导数量不一样。30 d 后, (3) 号培养基每个外植体平均诱导体细胞胚数量最多, 为 11.58 个; 低浓度 2,4-D (10 mg L^{-1}) 的 (1) 号培养基对体细胞胚诱导的效果最差, 平均每个外植体只诱导 1.5 个胚。(3) 号培养基中的外植体水渍状的愈伤组织较其他培养基要少。在同一种培养基上, 诱导体细胞胚少的外植体或没有诱导体细胞胚的外植体, 有较多水渍状愈伤组织, 诱导体细胞胚数目很多的外植体不出现水渍状的愈伤组织或仅有少量的水渍状愈伤组织。培养后期体细胞胚的颜色变绿并有次生体细胞胚的分化。

表 1 不同培养基对细胞胚发生的影响

Table 1 Effect of MS with 2,4-D and KT on the induction of primary somatic embryogenesis

生长调节剂 Growth regulators (mg L^{-1})		外植体总数 No. of explants	诱导数 No. of induced explants	诱导率 Induction rate (%)	每个外植体胚数目 Mean embryo no. per explant
2,4-D	KT				
10	0.5	32	20	62.5	1.5
20	0.5	40	40	100	6.50
40	0.5	36	36	100	11.58
60	0.5	37	37	100	5.71

为培养 30 d 观察的结果 Results from culture for 30 days.

2.1.2 体细胞胚继代培养

将诱导的带有体细胞胚的组织块转植到 4 种继代培养基中, 置于相同条件下继代培养。14 d 后, 在 (1)、(2) 号培养基中, 大部分外植体都有疏松, 白色的愈伤组织出现, (3) 号培养基中只有少数外植体有白色的愈伤组织, (5) 号培养基中的外植体颜色变得更绿, 体积增大。30 d 后, (1)、(2)、(3) 号培养基中都有新的体细胞胚产生。

由表 2 可知, 浓度为 20 mg L^{-1} 2,4-D 对于继代体细胞胚的繁殖效率最高, 为 68.00%, 其次为 10 mg L^{-1} 2,4-D, 最差的为 5 mg L^{-1} 2,4-D, 未能产生新的体细胞胚。(2) 号培养基继代体细胞胚的繁殖效率高于 (1) 号, 但 (1) 号培养基的体细胞胚长得比 (2) 号大, 且大小比较均匀一致, 平均每个外植体繁殖的体细胞胚数目也高于 (2) 号。

表 2 不同培养基对体细胞胚继代的影响

Table 2 Effect of MS with 2,4-D and KT on the subculture of somatic embryos

生长调节剂 Growth regulators (mg L^{-1})		外植体总数 No. of explants	繁殖数 No. of explants with somatic embryos	繁殖效率 Reproduction rate (%)	每个外植体繁殖的体细胞胚数 Embryo no. per explant
2,4-D	KT				
10	0.5	28	15	53.57	5.63
20	0.5	25	17	68.00	5.00
40	0.5	28	6	21.43	2.20
5	0.5	30	0	0	0

为培养 30 d 观察的结果 Results from subculture for 30 days.

2.2 未成熟花生胚轴体细胞胚的诱导及扩增

未成熟花生胚轴在 (1)、(2) 和 (3) 号培养基中培养, 5 d 后, 三种培养基中的外植

体都有不同程度的膨大。25 d后, 各种培养基中都诱导出体细胞胚。由表3可知, 低浓度2,4-D对花生未成熟胚轴的体细胞胚诱导效果好于高浓度2,4-D。30 d后, (1)号培养基体细胞胚的诱导率为61.1%, 平均每个外植体诱导出3.5个体细胞胚, 多的可达20多个。随着2,4-D浓度的升高, 体细胞胚的诱导率和体细胞胚数都下降。

将上述诱导的体细胞胚转接到(1)、(2)、(3)号三种培养基上继代培养, 10 d后, 各种培养基中的外植体都有不同程度白色疏松的愈伤组织出现, 以(3)号培养基为多。由表3可知, 30 d后, 各种培养基都可产生出新的体细胞胚, 但以10 mg L⁻¹ 2,4-D的效果最好, 繁殖效率为87.5%, 平均每个外植体繁殖体细胞胚5.1个。40 mg L⁻¹ 2,4-D的效果最差, 仅为54.2%, 增殖的体细胞胚数也少, 只有3.0个。

表3 不同培养基对未成熟胚轴体细胞胚发生的影响

Table 3 Effect of 2,4-D and KT on induction of somatic embryogenesis from immature embryo axes

	生长调节剂 Growth regulators (mg L ⁻¹)		外植体总数 No. of explants	诱导数 No. of induced explants	诱导率 Induction rate (%)	每个外植体体细胞胚数目 Mean embryo no. per explant
	2,4-D	KT				
初培养 Culture	10	0.5	36	22	61.1	3.5
	20	0.5	36	19	52.8	3.0
	40	0.5	36	12	33.3	2.2
继代培养 Subculture	10	0.5	24	21	87.5	5.1
	20	0.5	24	18	75.0	4.5
	40	0.5	24	13	54.2	3.0

为培养30 d观察的结果 Results from culture or subculture for 30 days.

2.3 体细胞胚的萌发及植株再生

将诱导的体细胞胚转移到含BA (2-10 mg L⁻¹)的培养基中(表4), 15 d后就有少数的体细胞胚萌发生成无根的小植株。25 d后, 带两片子叶的正常体细胞胚, 带一片子叶的体细胞胚, 及其他一些类型的体细胞胚都能萌发生成小植株(图版I:4)。花生体细胞胚萌发的最佳BA浓度为5-10 mg L⁻¹, 低浓度的BA不利于体细胞胚萌发。

表4还显示, 在没有BA而含有2,4-D的培养基中, 体细胞胚都不能萌发。2,4-D使体细胞胚停止了成熟和萌发, 并能使其转而产生无序的白色愈伤组织, 培养基中BA浓度高于2,4-D时, 体细胞胚可以有所生长, 但不会萌发, 且有少量白色的愈伤组织出现。2,4-D浓度高于BA时, 体细胞胚则完全不生长, 转而产生大量白色疏松的愈伤组织。

表4 不同培养基对体细胞胚萌发的影响

Table 4 Effect of 2,4-D and BA on germination of somatic embryos

生长调节剂 Growth regulators (mg L ⁻¹)		移植体胚数 No. of explants	萌发的体胚数 No. of germinated embryos	萌发率 Germination rate (%)
2,4-D	BA			
0	0	40		
0.5	0.1	40		
0.1	0.5	40		
0	2	40	7	17.5
0	5	41	13	32.5
1	5	40	1	2.5
0	10	40	14	35.0

为培养25 d观察的结果 Results from culture for 25 days.

将萌发的无根小植株, 转移到生根培养基中(2 mg L^{-1} NAA), 15 d后诱导出根(图版 I:5)。

3 讨论

本研究表明高浓度($10-60 \text{ mg L}^{-1}$)的2,4-D都能够诱导花生成熟胚轴产生体细胞胚, 以 40 mg L^{-1} 为佳, 而未成熟花生胚轴体细胞胚诱导的最适2,4-D浓度比成熟胚轴低(为 10 mg L^{-1}), 且适合两种不同成熟度外植体诱导产生体细胞胚继代培养的2,4-D浓度也不一样。Sellars等^[1]在含 5 mg L^{-1} 2,4-D的L2培养基中使未成熟的合子胚形成体细胞胚。Charleen等^[3]用高浓度(40 mg L^{-1})的2,4-D培养叶片得到大量的体细胞胚。Charleen等^[6]在含 20 mg L^{-1} 2,4-D改良的MS与B5培养基上诱导花生未成熟子叶产生体细胞胚。由此可推论, 2,4-D可以诱导花生不同外植体产生体细胞胚, 其最适培养浓度是随着外植体的分化程度而提高的。

长期以来都认为2,4-D诱导时间过久会使体细胞胚顶端分生组织发育不良, 高浓度的2,4-D能降低许多其他作物的体细胞胚的诱导效果^[8,9]。Cruz等^[10]报道低浓度2,4-D($0.5-1 \text{ mg L}^{-1}$)诱导*Feijou sellowiana* Berg体细胞胚的效率大大高于高浓度的2,4-D(5 mg L^{-1})。这显然与花生的研究结果相悖。说明体细胞胚培养时, 2,4-D的适宜使用浓度还因作物种类而异; 不同作物体细胞胚产生的条件是不同的。

体细胞胚常常能在原来的培养基上, 或无任何激素的培养基上萌发^[11]。本研究表明, 花生体细胞胚不能在原先的培养基及无激素的培养基上萌发。Tulecke等^[12]统计, 木本植物已有81种可以诱导体细胞胚发生, 但只有31种获得田间苗, 其成苗率很低。关于花生体细胞胚萌发的研究还很少, Sellars等^[1]在添加NAA的培养基, 经长达150 d的培养才使体细胞胚萌发生成小植株。但本研究则表明, 基本培养基(MS)添加适当浓度的BA能够使体细胞胚在较短的时间内(25 d)萌发。

参考文献

- 1 Sellars R M, Southward G C, Phillips G C. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. *Crop Sci*, 1990, 30:408-414
- 2 Bansal U K, Bassi G, Gosal S S. Induction of pollen embryogenesis and cytological variability in *Arachis hypogaea* L. through anther culture. *Indian J Genet*, 1991, 51(1):125-129
- 3 Charleen M B, Wetzstein H Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Cell Rep*, 1992, 11:71-75
- 4 George L, Eapen S. Influence of genotype and explant source on somatic embryogenesis in peanut. *Oleagineux*, 1993, 48(8-9):361-364
- 5 Mckently A H. Effect of genotype on somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 42:251-254
- 6 Charleen M B, Wetzstein H Y. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, 36:361-368
- 7 Hazra S, Soothage S S, Mascarenhas A F. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Bio Tech*, 1989, 7:949-951

- 8 Bano Z, Rajarachnam S, Mohanty B D. Somatic embryogenesis in cotyledon culture of Tea (*Thea sinensis* L.). *J Hort Sci*, 1991, 66:465-470
- 9 Fitch M M M, Manshardt R M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Rep*, 1990, 9:320-324
- 10 Cruz G S, Canhoto J M, Abrea M V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Bery. *Plant Sci*, 1990, 66:263-270
- 11 李浚明. 植物组织培养教程. 北京: 中国农业出版社, 1992, 105
- 12 Tulecke W, Bonga J M, Dunan D J. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. vol. 2. Bordrecht: Martinus Nijhofs Publisher, 1987, 61

图版说明

1. 大量体细胞胚的产生; 2. 球形胚, $\times 400$; 3. 具有叶原基的体细胞胚, $\times 100$; 4. 体细胞胚的萌发; 5. 体细胞胚萌发的植株诱导生根。

Explanation of plate

1. A mass of somatic embryos from embryo axes; 2. Globular embroid, $\times 400$; 3. Embroid with leaf primordia, $\times 100$; 4. Somatic embryos developed into plantlets; 5. Rooting of plantlet germinated from somatic embryos.