

文章编号: 1000-5471(2007)04-0030-03

食荚型豌豆组织培养和植株再生研究^①

苏承刚, 吴学科, 郑占伟, 孙文俊, 肖波, 张兴国

西南大学 园艺园林学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716

摘要: 以豌豆子叶、茎、真叶为材料进行外植体筛选及组织培养研究, 试验结果表明: 豌豆带节茎段是最佳试验材料; 在 MS 附加 1 mg/L BA 和 1 mg/L NAA 培养基中, 愈伤组织诱导率达 100%, 愈伤组织在分化培养基中未分化出芽; 带节茎段在 MS 附加 2~3 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 培养基中, 腋芽和丛生芽产生率达 100%, 芽增殖系数 3 以上; 不定芽在 MS 附加 3 mg/L NAA 上生根率 86%; 试管苗移栽成活率 85% 左右。

关键词: 豌豆; 外植体筛选; 植株再生; 增殖系数

中图分类号: S643.3; S722.3⁺⁷

文献标识码: A

食荚豌豆(*Pisum sativum* L.), 因荚大翠绿, 口感清香脆嫩, 营养丰富, 深受人们喜爱. 对豌豆品种进行改良, 利用常规育种方法周期长, 又达不到预期效果, 而利用转基因工程技术对作物进行品种改良能快速有效, 但必须建立高效的再生繁殖体系, 因此, 我们以食荚型豌豆子叶、茎和真叶为材料进行组织培养及植株再生研究, 为豌豆品种的遗传转化、资源试管保存以及优良品种快繁提供技术参考.

1 材料与方 法

1.1 供试材料

试验材料为食荚型豌豆 1 号(种子从成都市种子总公司购买).

1.2 无菌苗获得

将豌豆种子用洗衣粉溶液浸泡 1 min, 然后用自来水冲洗干净, 在超净台上用 75% 的乙醇表面浸泡 30 s, 转入 0.1% HgCl₂ 溶液中浸泡 8~10 min 后, 无菌水漂洗 4~6 次, 接种于 1/2 MS 培养基中培养生长, 13 d 左右长出幼苗供实验备用.

1.3 外植体的筛选

将无菌苗子叶和真叶切成 0.5 cm 见方小块, 茎带节或不带节切成 0.5 cm 小段分别接种于 MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基中进行外植体筛选试验, 统计外植体愈伤组织诱导率和芽分化率.

1.4 愈伤组织诱导

根据 1.3 筛选出的外植体为材料进行愈伤组织诱导试验, 筛选出最佳的诱导愈伤组织培养基. 基本培养基为 MS, 附加不同浓度配比的激素 BA、NAA 和 2, 4-D 见(表 2).

1.5 芽分化

以 MS 为基本培养基, 添加激素 BA 0.5~3 mg/L、KT 0.5~3 mg/L, 分别与 NAA 0~0.5 mg/L 组合进行芽分化试验. 统计分化率、芽长、增殖系数等指标.

1.6 根诱导

在 MS 培养基中分别附加激素 NAA 0.5, 1, 2, 3 mg/L 进行根的诱导, 统计生根的情况.

以上各项试验处理都为 3 次重复, 培养基中附加 3% 蔗糖和 0.65% 琼脂, pH5.8, 在室温 25±1 °C, 光照为 40 W 日光灯 14 h/d 条件下培养, 每 30 d 观察并记录生长情况.

① 收稿日期: 2006-09-10

作者简介: 苏承刚(1964-), 男, 重庆江津人, 西南大学高级实验师, 从事蔬菜生物技术研究.

通讯作者: 张兴国

表 1 不同外植体培养情况

外植体	接种数/个	愈伤组织诱导率/%	芽分化率/%	腋芽萌发率/%
子叶	45	0	0	0
不带节茎段	47	52	0	0
带节茎段	42	42	0	100
真叶	45	24	0	0

2 结果与分析

2.1 外植体筛选

将子叶、真叶、带节茎段、不带节茎段分别接种于 MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 中进

行外植体筛选试验, 结果表明: 子叶无愈伤组织产生, 逐渐变黄死亡; 真叶在切口处有少量的愈伤组织产生, 绿色呈颗粒状; 不带节茎段和带节茎段愈伤组织诱导率达到 40% 以上, 节上腋芽萌发率达到 100%, 说明带节茎段和不带茎段是组织培养较好的材料, 其次是真叶、子叶效果最差, 不适宜作试验材料培养(见表 1)。

表 2 不同激素配比对豌豆外植体愈伤组织诱导的影响

植物激素/(mg · L ⁻¹)			茎 段			真 叶		
BA	NAA	2,4-D	接种数/个	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织状态	接种数/个	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织状态
0.5	0.5	0	30	40	切口有少量愈伤组织	30	27	切口有少量愈伤组织, 呈颗粒状
1	1	0	31	100	愈伤组织覆盖整个外植体, 淡绿色呈颗粒状, 较紧实	30	94	愈伤组织覆盖外植体, 绿色颗粒状
0	0	0.5	30	100	愈伤组织覆盖外植体, 淡黄色, 疏松	33	100	愈伤组织疏松, 淡黄色

2.2 不同激素配比对豌豆愈伤组织形成的影响

将真叶和茎段分别接种于附加不同浓度的 BA、NAA 和 2,4-D 各处理中, 15 d 左右在切口处开始形成颗粒状愈伤组织, 并逐渐增多覆盖整个外植体, 但各处理之间存在显著差异, 结果表明(表 2): 在 MS + BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L 和 MS + 2,4-D 0.5 mg/L 培养基中, 茎段和真叶愈伤组织诱导率都达到 90% 以上, 但形成愈伤组织的质地不一样, 前者愈伤组织质地较后者紧实, 淡绿色是进行芽分化材料, 而后者愈伤组织疏松, 白色, 不利于分化芽。

2.3 不同激素组合对愈伤组织芽分化

对真叶和茎段产生的愈伤组织进行芽分化试验, 结果表明: 无论真叶, 还是茎段产生的愈伤组织, 在附加不同浓度的 BA、KT 和 NAA 各处理中都尚未分化出芽。

2.4 不同激素组合对带节茎段的腋芽萌发与生长的影响

直接把带节茎段接种于各处理中, 腋芽产生率为 100%, 但芽增殖倍数、芽长呈现一定差异。结果表明(表 3): 当 NAA 浓度固定时, BA 在 1~3 mg/L 范围内, 随着 BA 浓度升高芽增殖倍数增加, 但芽越来越纤细, 说明太高的激素 BA 对芽的增殖有利, 而对培养壮芽不利。当 BA 浓度固定时, 而 NAA 在 0~0.5 mg/L 范围内, 随着 NAA 浓度增加芽增殖倍数呈低—高一低, 说明过高过低的 NAA 都不利于芽分化。过高的 BA、NAA 对芽伸长有抑制作用。根据各项指标进行综合分析, 优化组合筛选出适宜芽分化培养基是 MS + BA 2~3 mg/L + NAA 0.1 mg/L。芽丛生率达 100%, 增殖倍数 3 以上。

表 3 不同激素配比对豌豆带节茎段芽萌发生长影响

植物激素/(mg · L ⁻¹)		接种数	分化芽数	增殖系数	平均芽长/cm	生长情况
BA	NAA					
0.5	0	28	48	1.7	2.8	无愈伤组织产生, 单芽, 纤细
1	0	30	49	1.8	2.6	无愈伤组织, 单芽, 纤细
2	0	29	54	1.9	2.6	无愈伤组织, 一般为双芽, 较纤细
1	0.1	30	60	2.0	2.0	两端有少量愈伤组织, 淡黄色、双芽多、矮小、较粗
2	0.1	30	105	3.5	2.4	有愈伤组织, 淡绿色, 丛生芽
3	0.1	30	115	3.8	2.7	有愈伤组织, 丛生芽较粗壮
1	0.5	32	44	1.4	4.2	有愈伤组织, 呈颗粒状突出, 绿色, 单芽多
2	0.5	28	60	2.1	2.1	有愈伤组织, 双芽, 淡黄色
3	0.5	25	82	3.3	1.7	有少量愈伤组织, 丛生芽, 矮小, 纤细

2.5 试管芽的根诱导

分化的丛生芽生长到 3~5 cm 时, 分别切分后接种于附加 NAA 0.5~3 mg/L 不同浓度的 MS 培养基

上, 15 d 后在芽基部开始有白点突出, 逐渐伸长, 25 d 左右根的长度达到 3 cm 以上. 根的诱导与 NAA 浓度高低有关, 结果表明(表 4): 随着激素 NAA 浓度的升高, 根的诱导率也增加, NAA 为 3 mg/L 时, 诱导率达 86%.

2.6 试管苗移栽

当试管苗的根伸长约 0.5 cm 时, 揭开封口膜在室温下炼苗 7 d 后, 将根部的培养基用自来水冲洗干净, 移栽于营养土中, 浇足水分, 用薄膜罩上, 保持湿度, 成活率达到 85% 以上.

3 讨 论

在组织培养中, 外植体的选择是十分重要的, 它是组织培养能否成功的关键. 因植物不同器官存在着植株再生难易的差异, 所以选择外植体时要根据植物种类, 消毒灭菌难易等因素, 选择适宜的部位或器官作为外植体才能容易再生(1~3). 在豌豆外植体的筛选试验中, 茎是组织培养最佳材料, 易形成愈伤组织, 并且在叶节上产生腋芽或丛生芽; 真叶和子叶不易诱导愈伤组织和植株再生, 逐渐变黄而死亡, 所以不能作为培养材料.

在激素对豌豆茎或真叶诱导愈伤组织及芽分化试验中, 不同浓度的 BA, KT 与 NAA 组合中都没有分化出不定芽, 这可能与激素种类, 浓度配比及培养基的营养素有关, 有待于今后进一步研究.

将豌豆带节茎段接种于附加激素 BA, KT 和 NAA 不同组合的分化培养基中, 20 d 左右直接从节上萌发出多个不定芽(腋芽), 腋芽萌发主要是受外源激素的刺激而产生. 其不定芽形成与分裂素/生长素比值有关, 在一定范围内比值大于 1, 有利于不定芽的形成; 当比值小于 1 时则易形成根, 不定芽的产生受到抑制, 符合植物器官分化与激素之间相关的规律.

豌豆带节茎段是组织培养的最好材料, 在分化培养基上直接萌发出不定芽, 萌芽率达到 100%, 增殖系数 3 以上, 其适宜分化培养基是 MS + BA 2~3 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 不定芽在 MS + NAA 3 mg/L 培养基上, 根诱导率为 86%, 试管苗的移栽成活率达 85%.

参考文献:

- [1] 欧阳丽莹, 唐章林, 殷家明, 等. 甘蓝型黄籽油菜下胚再生体系的初步研究[J]. 西南农业大学学报, 2004, 26(5): 525 - 528.
- [2] 燕平梅, 畅晓晖, 薛文通, 等. 小黑豆组织培养的研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(1): 12 - 16.
- [3] 袁 鹰, 刘 德, 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 - 13.

Study on Tissue Culture and Plant Regeneration of Pea (*Pisum sativum* L)

SU Cheng-gang, WU Xue-ke, ZHENG Zhan-wei,
SUN Wen-jun, XIAO Bo, ZHANG Xin-guo

Key Laboratory of Olericulture of Chongqing, College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: The cotyledon, stem and leaf of pea were cultured for selection of the appropriate explant. The result showed that stem with nod was the ideal material (better than other parts of the plant at callus induction), the callus formation rate of stem with nod was 100% in MS with hormone BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L, and there were no buds in division culture. The productive rate of Axillary bud and Clump sprouts reached 100% at the medium of MS + BA 2~3 mg/L + NAA 0.1 mg/L, the quatiety of bud increment was above three and the rate of root growth was more than 86% at the MS solid culture medium with NAA 2 mg/L. The surviving ratio of transplanted plant exceeded 85%.

Key words: pea; explant selection; tissue culture; increment auotiety

责任编辑 陈绍兰

表 4 不同浓度 NAA 对豌豆不定芽生根的影响

植物激素/(mg · L ⁻¹)	接种数	根 数	生根率/%
0.5	21	3	14
1.0	20	4	20
2.0	20	15	75
3.0	22	19	86