河南农业科学,2012,41(11):45-48
Journal of Henan Agricultural Sciences

不同花生品种幼叶丛生芽诱导研究

苗利娟,张新友*,黄冰艳,董文召,汤丰收,秦　利,高　伟,韩锁义
(河南省农业科学院 经济作物研究所,河南省油料作物遗传改良重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要:为筛选高诱导率的花生品种并建立花生的高频再生体系,比较了22个花生品种在MS和1/2MS培养基中的萌发情况,同时以4 d苗龄的花生幼叶为外植体,研究了花生幼叶丛生芽诱导率的品种差异性,以及羧苄青霉素(Carb)和头孢霉素(Cef)对花生丛生芽诱导的影响。结果表明:22个花生品种的种子在1/2MS培养基上萌发率均比在MS培养基上稍高。不同品种花生幼叶丛生芽诱导率差异明显,其中Hz006、Hz001、Hz012和Hz037幼叶外植体的丛生芽诱导率较高,均高于90%,Hz015最低,只有31.8%。添加500 mg/L Carb对花生幼叶丛生芽分化无抑制作用,其中,Hz009添加500 mg/L Carb后,丛生芽诱导率比不添加抗生素的CK提高13.5个百分点;Cef则对多数花生品种芽诱导率具有抑制作用,其中以Hz010最为明显,其丛生芽诱导率下降48.5个百分点。因此,花生种子预培养的适宜培养基为1/2MS,遗传转化时应选择Hz006、Hz001、Hz012和Hz037等高诱导率的花生品种,农杆菌介导花生转化时选择Carb抑菌比较合适。

关键词:花生;品种;丛生芽诱导;抗生素
中图分类号:S565.2　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2012)11-0045-04

Efficient Induction of Adventitious Buds from Peanut Leaflets of Various Varieties

MIAO Li-juan, ZHANG Xin-you*, HUANG Bing-yan, DONG Wen-zhao, TANG Feng-shou, QIN Li, GAO Wei, HAN Suo-yi
(Henan Key Laboratory for Oil Crops Improvement, Industrial Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to screen peanut genotypes with high induction efficiency of adventitious buds and to set up a high efficient regeneration system of peanut leaflets, MS and 1/2MS medium for peanut germination were compared based on the culture response of 22 different genotypes. The differences in induction frequency among various genotypes and the effects of Carb and Cef on the adventitious buds induction were also investigated using leaflets from 4 day-germinated peanut seeds as explants. It was shown that the germination rates of peanut seeds on 1/2MS medium were higher than those on MS medium. There were significant differences in bud induction rates among 22 genotypes. Moreover, the genotypes with induction rates above 90% were Hz006, Hz001, Hz012 and Hz037, while Hz015 had the lowest induction rate of 31.8%. No inhibition to bud induction was detected with 500 mg/L of Carb added to the medium and the induction rate of Hz009 was increased by 13.5 percentage points compared with that of CK. For most of the genotypes Cef had a negative effect on bud induction and the bud induction rate of Hz010 on the medium with Cef added was significantly dropped by 48.5 percentage points. It was concluded that 1/2MS was the suitable medium for peanut seeds germination and the genotypes of Hz006, Hz001, Hz012 and Hz037 with high induction rate were recommended for peanut genetic transformation. Additionally, Carb was a better antibiotic than Cef when they were used to control the over growth of agrobacteria on leaflet explants during the agrobacteria mediated transformation.

Key words: peanut; variety; clumped bud induction; antibiotics

收稿日期:2012-06-26
基金项目:国家花生产业技术体系建设项目(CARS-14);河南省科技创新人才计划项目(104200510003);河南省科技攻关重点项目(092102110044)
作者简介:苗利娟(1981-),女,河南滑县人,研究实习员,本科,主要从事植物组织培养研究。E-mail:miao8139@163.com
*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。E-mail:haasz@126.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

花生是世界上重要的经济作物和油料作物，具有很高的经济价值和营养价值。我国是花生的主产国之一，产量居世界首位。培育高产、优质、抗病、抗逆新品种是我国花生育种的主要目标[1-2]。但目前育成的花生品种大部分遗传基础狭窄，种质资源中缺乏优质以及对病虫免疫或高抗的材料，导致常规杂交育种技术难以培育出高抗、优质的花生新品种[3]。由于受杂交不亲和、杂种不育等因素影响，远缘杂交中花生野生种优质基因和抗性基因的利用受到局限[4]。利用体细胞杂交和基因转化导入外源优良基因为花生品质改良及抗逆性的提高提供了新途径，其转化的关键环节是建立稳定高效的花生再生体系。近年来，国内外许多学者利用花生幼叶[5]、胚轴[6-7]、幼胚[8]等外植体开展了丛生芽诱导及植株再生的研究，但多数存在花生不定芽诱导率低及植株再生困难等问题。花生的组织培养除受外植体类型影响外，还受其他因素制约，例如，不同品种的花生丛生芽诱导率差别较大等。此外，农杆菌介导法作为转基因研究常用的转化方法，其过程中选择合适的抗生素进行抑菌非常关键，任艳等[9]指出，羧苄青霉素(Carb)抑菌效果最好，且对花生组培苗影响最小。本研究在以往花生幼叶不定芽高效诱导研究[10]的基础上，进一步筛选诱导率更高的花生品种，并比较了Carb和头孢霉素(Cef)2种抗生素对花生幼叶丛生芽诱导分化的影响，以期为花生的基因转化及外源基因利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 22个花生品种：Hz001－Hz006、Hz008－Hz016、Hz026、Hz027、Hz030、Hz037、Hz041、Hz049、Hz102，均为河南省农业科学院经济作物研究所花生室保存。

1.1.2 植物激素 6-BA、NAA、TDZ均为国产分析纯。

1.1.3 抗生素 Carb和Cef，医用，分别购自北京索莱宝生物科技有限公司，用无菌蒸馏水配成200 g/L的母液，－20 ℃保存备用。

1.1.4 培养基 基础培养基：MS；种子预培养培养基：MS和1/2MS；芽诱导培养基：MS＋6-BA 3 mg/L＋NAA 0.8 mg/L＋TDZ 0.3 mg/L＋$AgNO_3$ 3.5 mg/L；分化培养基：MS＋6-BA 5 mg/L＋NAA 1 mg/L＋$AgNO_3$ 3.5 mg/L。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 不同种子预培养培养基对花生种子萌发的影响 对于22个花生品种，选取颗粒饱满、表面无裂痕、胚芽未萌动的花生种子，先用70%的乙醇浸泡30 s，之后用0.1%的$HgCl_2$溶液浸泡消毒8 min，再用无菌水冲洗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剥掉，之后分别接种于MS和1/2MS培养基的无菌罐头瓶中，于光照培养室中25～26 ℃、光照16 h/d条件下培养，4 d后，观察不同品种花生在2种培养基中的种子萌发情况，统计萌发率。

1.2.2 不同花生品种幼叶丛生芽诱导率的差异 制备不同花生品种4 d的幼叶外植体[9]，将其接种在芽诱导培养基上，置光照培养室培养，2周后，转到分化培养基上使芽点进一步分化，再培养3周后统计丛生芽诱导率。

1.2.3 Carb和Cef对花生幼叶丛生芽诱导的影响 向芽诱导培养基和分化培养基中分别加入500 mg/L Carb和Cef抗生素，以不添加抗生素为对照(CK)，观察2种不同抗生素对丛生芽诱导的影响。

2 结果与分析

2.1 不同品种花生种子在2种培养基中的萌发差异

从表1可以看出，花生种子在1/2MS培养基上的萌发率普遍稍高于MS培养基；萌发率均在90%以上的有Hz001、Hz003、Hz004、Hz006、Hz009、Hz012、Hz026、Hz027、Hz102，且在1/2MS培养基上，一些花生品种的萌发率达到了100%。Hz002的萌发率非常低，在1/2MS培养基和MS培养基中分别为26.7%和19.5%。相同培养基中不同品种的萌发率存在很大差异，最大相差80.5个百分点，花生萌发率与品种有很大关系。同一品种在不同培养基中的萌发率差异不是太大，最大相差14.7个百分点，但从试验中观察来看，在1/2MS培养基上的幼苗长势比在MS培养基上健壮。

表1 不同品种花生种子在2种培养基中的萌发率 %

花生品种	培养基		花生品种	培养基	
	1/2MS	MS		1/2MS	MS
Hz001	100	98.2	Hz013	73.1	73.1
Hz002	26.7	19.5	Hz014	76.3	72.0
Hz003	97.0	91.3	Hz015	89.0	89.0
Hz004	99.0	96.0	Hz016	86.0	85.0
Hz005	79.6	75.4	Hz026	100	97.5
Hz006	98.8	95.5	Hz027	96.8	95.4
Hz008	86.8	72.1	Hz030	73.0	65.6
Hz009	94.0	91.3	Hz037	81.0	75.8
Hz010	100	89.5	Hz041	87.8	79.3
Hz011	84.6	83.2	Hz049	75.4	71.0
Hz012	100	100	Hz102	98.6	98.0

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　不同品种花生幼叶丛生芽诱导率的差异

由图 1 可以看出，不同品种花生幼叶丛生芽诱导率差异较大(31.8%～98.4%)，幼叶丛生芽诱导率在 80%以上的只有 6 个品种。其中，Hz006 丛生芽诱导率最高(98.4%)，Hz001、Hz012 和 Hz037 的诱导率也达到了 90%以上，且几乎都是丛生芽(图 2a－2c)；而 Hz015 的丛生芽诱导率只有 31.8%，且诱导愈伤较多(图 2d)，诱导过程出现愈伤组织较多的品种还有 Hz004、Hz008、Hz011、Hz013、Hz003、Hz049 等。

2.3　Carb 和 Cef 对花生幼叶丛生芽形成的影响

由图 3 可以看出，Carb 对花生幼叶丛生芽的形成有一定的促进作用，Hz004、Hz009 和 Hz027 在添加 500 mg/L Carb 后，丛生芽诱导率比 CK 分别提高了 12.1、13.5、9.8 个百分点；而 Cef 对花生幼叶丛生芽的诱导则有抑制作用，对外植体伤害较大，大多数花生品种诱导率出现不同幅度的降低，其中，Hz010 表现最明显，加入 Cef 的丛生芽诱导率只有 5.5%，诱导率比 CK 降低了 48.5 个百分点。

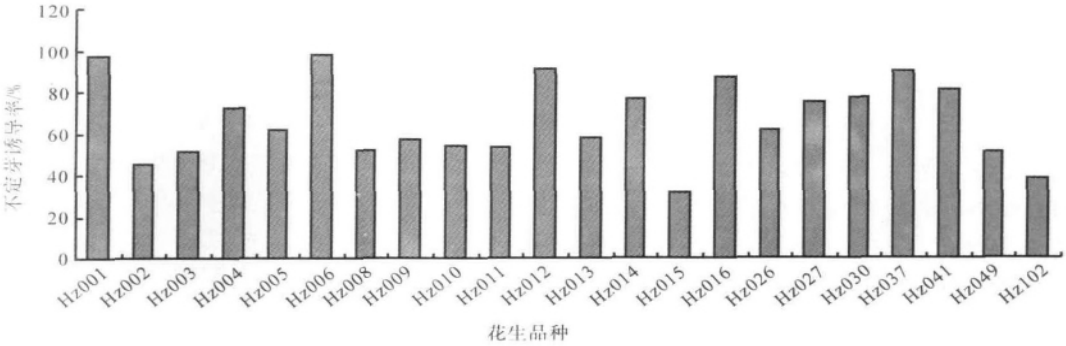
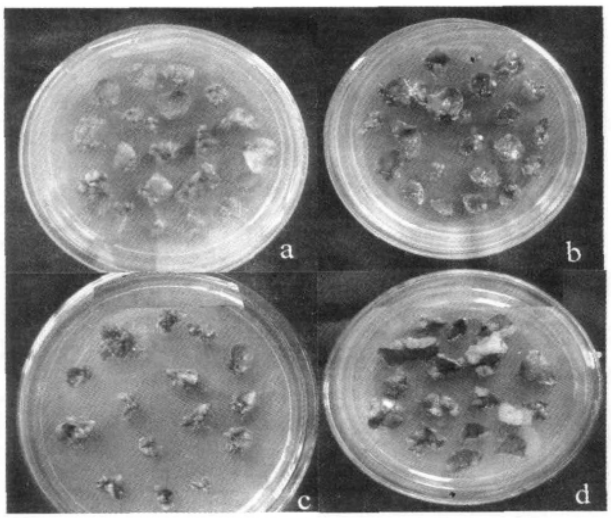


图 1　不同品种花生幼叶丛生芽诱导率的差异



a. Hz006；b. Hz001；c. Hz012；d. Hz015

图 2　不同花生品种幼叶丛生芽和愈伤组织

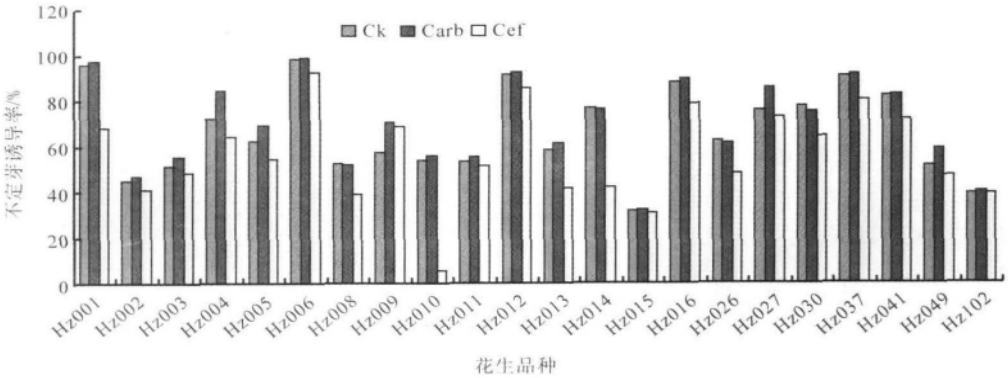


图 3　Carb 和 Cef 对花生幼叶丛生芽诱导率的影响

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 结论与讨论

3.1 不同培养基对不同花生品种种子萌发的影响

不同花生品种种子在1/2MS培养基上的萌发率稍高于MS培养基，但同一品种差别不是太大，相差最大的为Hz008，在1/2MS和MS培养基上的萌发率相差14.7个百分点，其他品种相差很不明显。不同花生品种的萌发率差异较大，大多数品种的种子萌发率都在70%以上，但Hz002在1/2MS培养基、MS培养基上的萌发率分别仅为26.7%、19.5%，萌发率非常低，而该品种为白籽花生，白籽花生的出芽率有待进一步研究。可见，种子萌发率与花生品种关系密切。从苗的长势来看，1/2MS培养基上的幼苗长势比在MS培养基上的长势壮，这可能与培养基中蔗糖的质量浓度有关，1/2MS培养基中蔗糖质量浓度只有MS培养基中的一半，渗透压低，种子易吸胀，萌发快，因此，幼苗长势较健壮。

3.2 不同品种花生幼叶芽诱导率的差异

不同花生品种在同一培养基上的芽诱导率差异显著，22个花生品种中，芽诱导率达到90%以上的有Hz001、Hz012、Hz006、Hz037，最高的为Hz006，达到98.4%，且大多数为丛生芽；最低的为Hz015，只有31.8%，与Hz006诱导率相差将近70个百分点，且诱导愈伤较多，诱导过程出现愈伤较多的品种还有Hz004、Hz008、Hz011、Hz013、Hz003、Hz049等。花生幼叶芽的诱导率受花生品种的影响较大，这与前人的研究结果[11-13]一致，进一步证实了不同花生品种对其幼叶芽诱导分化的影响。本研究筛选出的高诱导率花生品种，可应用于更深入的花生转基因研究。

3.3 Carb和Cef对花生幼叶丛生芽诱导的影响

Carb和Cef是农杆菌介导转化试验中广泛使用的杀菌剂，对大多数菌株的抑菌效果较好，但对植物组织分化影响不同[14-16]。因此，农杆菌转化之前，在抗生素的敏感性试验中，不仅要考虑抗生素的抑菌效果，还要考虑抗生素对植物组织诱导分化及其再生的影响，确定适宜的抗生素种类及最佳质量浓度是非常重要的。

研究表明，Carb对多数花生幼叶丛生芽诱导有一定的促进作用，Hz004、Hz009、Hz027添加Carb后，不定芽诱导率分别提高了12.1、13.5、9.8个百分点；而添加Cef后，22个花生品种的芽诱导率均下降，从试验结果来看，不同花生品种对Cef的反应有所不同，Hz010的芽诱导率下降最明显，添加500 mg/L Cef后，不定芽诱导率下降了48.5个百分点，可见，Cef对不定芽诱导有一定的抑制作用，这与邹湘辉[17]和秦耀国等[18]的结果一致。

参考文献：

[1] 张保亮，张晓玲，杨桥，等. 国际花生育种研究进展[J]. 中国农学通报，2005，21(4)：148-151.

[2] 张斌，范仲学，柳絮，等. 花生再生体系的建立[J]. 安徽农业科学，2006，34(15)：3590-3592.

[3] 李美芹，王晶珊，孙世孟，等. 花生幼叶组织培养及有效植株再生[J]. 花生学报，2004，33(3)：10-14.

[4] 孙显明，王强，于立芝，等. 影响农杆菌介导的花生遗传转化条件的研究[J]. 中国农学通报，2008(7)：218-220.

[5] Chengalrayan K，Mhaske V B，Hazra S. High-frequency conversion of abnomal peanut somatic embryos[J]. Plant Cell Reports，1997，16：783-786.

[6] George L，Eapen S. Influence of genotype and explant source on somatic embryogenesis in peanut[J]. Oleagin-eux，1993，48(8)：361-364.

[7] Little K L，Magbanua Z V. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epricotyls[J]. Plant Cell Reports，2000，19：351-357.

[8] Ozais-Akins P，Anderson W F，Holbrook C C. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.：Genotypes comparison[J]. Plant Science，1992，83：103-111.

[9] 任艳，王辉，石延茂，等. 抗生素在花生组织培养中的抑菌效应研究[J]. 山东农业科学，2011(10)：74-75，81.

[10] 苗利娟，黄冰艳，张新友，等. 花生幼叶丛生芽高效诱导的制约因素研究[J]. 河南农业科学，2008(1)：40-44.

[11] Ozias-Akins P. Plant regeneration form immature embryos of peanut[J]. Plant Cell Reports，1989，8：217-218.

[12] 邹湘辉，庄东红，郑奕雄，等. 花生不同品种外植体培养芽诱导的研究[J]. 花生学报，2003，32(增刊)：306-310.

[13] 雷萍萍，李美芹，张力凡，等. 花生组织培养及高频率植株再生[J]. 中国油料作物学报，2009，31(2)：163-166.

[14] 高燕，沙红，贺宾. 抗生素对油葵不定芽产生率的影响[J]. 新疆农业大学学报，2008，31(4)：66-68.

[15] 庄东红，邹湘辉，周敏，等. 农杆菌介导的花生遗传转化的研究[J]. 中国油料作物学报，2003，25(4)：47-51.

[16] 康薇，郑进，洪华珠. 抗生素对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响[J]. 安徽农业科学，2008，36(29)：12593-12594.

[17] 邹湘辉. 根癌农杆菌介导的花生遗传转化的研究[D]. 汕头：汕头大学，2004.

[18] 秦耀国，曹必好，杨翠芹，等. 转化用抗生素对青花菜离体再生的影响[J]. 北方园艺，2009(3)：36-38.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net