

苗利娟,张新友,黄冰艳,等. 河南省育成花生品种的幼叶体细胞胚胎诱导[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):68-70.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.018

河南省育成花生品种的幼叶体细胞胚胎诱导

苗利娟,张新友,黄冰艳,石磊,齐飞艳,高伟,董文召,汤丰收

(河南省农业科学院经济作物研究所/黄淮海油料作物重点实验室/河南省油料作物遗传改良重点实验室,河南郑州 450002)

摘要:选用河南省育成的 5 个不同类型的花生品种,在 6 种培养基配方及 2 种光照处理下进行胚小叶片外植体诱导体胚效率研究。结果表明,豫花 1 号、豫花 22 号、豫花 9719、豫花 9847 等 4 个品种体细胞胚诱导率均在 2,4-D 浓度为 15 mg/L 时最高,2 种光周期处理的趋势一致,豫花 9719 的体细胞胚诱导率最高。在 4 周全黑暗培养条件下,豫花 12 号体细胞胚诱导率在 2,4-D 浓度为 5 mg/L 时最高,而在暗 2 周转光暗交替(其中光照培养 16 h,黑暗培养 8 h)2 周处理条件下,2,4-D 浓度为 10 mg/L 时体细胞胚诱导率最高,达 45.00%;可见暗培养的平均诱导率低于暗 2 周转光暗交替 2 周处理。因此,以育成品种胚小叶片为外植体直接诱导体细胞胚,2,4-D 浓度以 10~15 mg/L 为宜,暗 2 周转光暗交替 2 周处理的体细胞胚诱导率较高。

关键词:花生;幼叶;体细胞胚胎;培养基;光周期

中图分类号: S565.203.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0068-03

花生是我国重要的油料作物,在全国各省(区、市)均有种植。近年来,河南省花生种植面积位居全国首位,常年种植面积稳定在 100 万 hm^2 左右。在气候恶化、灾害性天气频发、环境污染等问题下,为生产提供高产、稳产、优质、抗逆性强的

花生优良品种、对保障花生生产可持续发展和食用油安全具有重要意义。众所周知,栽培花生遗传基础狭窄,缺乏抗病、抗虫、耐逆性突出的种质资源,常规育种难以在优质、多抗新品种选育方面取得重大突破;野生种质的优异基因常与一些不良性状基因连锁,且与栽培种之间存在杂交不亲和、杂种不育等障碍,难以直接通过杂交方法加以利用。基因工程为花生利用外源基因提供有效途径,已有多例利用基因工程进行花生代谢途径遗传调控或将外源基因成功转入花生,改良花生品质、抗病、抗虫、耐旱、耐盐等性状的研究报道^[1-9]。然而,基因转化及植株再生效率受基因型影响较大,国内外遗传转化的成功实例基本局限在少数几个诱导率较高的基因型上。本研究旨在探索河南省育成花生品种的组培再生效果,扩大花生基因转化的受体基因型范围,为基因工程技术与常

收稿日期:2014-05-06

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2011CB109304);国家“863”计划(编号:2013AA102602);国家花生产业技术体系建设专项(编号:CARS-14);河南省财政专项(编号:201218305)。

作者简介:苗利娟(1981—),女,河南滑县人,硕士,助理研究员,主要从事花生基因工程研究工作。Tel:(0371)65750825;E-mail:miao8139@163.com。

通信作者:张新友,博士,研究员,主要从事花生遗传育种研究工作。Tel:(0371)65729560;E-mail:haasz@126.com。

[10]刘航,李丹,李绍波. 水稻红莲型 CMS 育性恢复 QTL 分析[J]. 武汉植物学研究,2005,23(2):111-115.

[11]江玲,曹雅君,王春明,等. 利用 RIL 和 CSSL 群体检测水稻种子休眠性 QTL[J]. 遗传学报,2003,30(5):453-458.

[12]Wan J L,Zhai H Q,Wan J M,et al. Mapping QTL for traits associated with resistance to ferrous iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), using japonica chromosome segment substitution lines[J]. Acta Genetica Sinica,2003,30(10):893-898.

[13]何风华,席章营,曾瑞珍,等. 利用单片段代换系鉴定水稻株高及其构成因素的 QTL[J]. 中国水稻科学,2005,19(5):387-392.

[14]何风华,席章营,曾瑞珍,等. 利用单片段代换系定位水稻抽穗期 QTL[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1505-1513.

[15]汪岳林. 利用单片段代换系定位水稻粒形及粒重 QTL[D]. 福州:福建农林大学,2008.

[16]朱文银,杨德卫,林静,等. 利用染色体片段置换系定位水稻落粒性主效 QTL[J]. 植物学通报,2008,25(4):443-448.

[17]Rogers S O,Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. Plant Mol Biol Manual,1988,A6:1-10.

[18]徐建军,赵强,赵元凤,等. 利用重测序的水稻染色体片段代换系群体定位剑叶形态 QTL[J]. 中国水稻科学,2011,25(5):483-487.

[19]徐建军,赵强,汤在祥,等. 利用重测序的染色体片段代换系群体定位水稻粒型 QTL[J]. 中国水稻科学,2011,25(4):365-369.

[20]梁国华,周培南,杨华,等. 红莲型细胞质雄性不育恢复品种的筛选与分类[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2002,23(3):41-45.

[21]张宏根,朱正斌,李波,等. 粳稻野败型细胞质雄性不育恢复系 SWR78 的恢复基因定位[J]. 中国水稻科学,2009,23(4):377-382.

[22]梁国华,法锦宁,杨华,等. 红莲型细胞质雄性不育恢复系特青和珍汕 97 的恢复性遗传分析[J]. 江苏农业研究,2001,22(1):7-11.

[23]黄青阳,何予卿,凌杏元,等. 3 种水稻细胞质雄性不育育性遗传的比较[J]. 中国农业科学,2000,33(3):8-13.

[24]李绍清. 水稻红莲型细胞质雄性不育与育性恢复的分子机理[D]. 武汉:武汉大学,2004:64-109.

规育种的结合奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物基因型

选用不同时期河南省育成审定的 5 个花生品种:豫花 1 号、豫花 12 号、豫花 22 号、豫花 9719、豫花 9847,其中豫花 1 号、豫花 9719 为大果品种,豫花 12 号、豫花 22 号为小果品种,豫花 9847 为中果品种。

1.2 胚小叶外植体制备及培养

选取籽粒饱满、无破损的花生种子,置于三角瓶中,在超净工作台上用 75% 乙醇浸润洗 30 s,然后用 0.1% HgCl_2 浸泡 8~10 min,中间轻摇数次,用无菌水冲洗 3~4 次,浸泡 3~4 h,用镊子将种皮去掉,并剥去 1 张子叶,将带胚轴子叶接种于 MS 培养基中,于 25℃ 下光照培养。取出培养 4 d 的带胚轴子叶,在超净工作台上从小叶柄以上切取胚小叶,接种于体胚诱导培养基(以 MS 为基本培养基,附加 1、3、5、10、15、20 mg/L 2,4-D,分别记为培养基 1、2、3、4、5、6),每个品种接种 50 个外植体,重复 2 次,置于光照培养室培养,培养温度为 25℃,设 2 个光照处理:全黑暗培养 4 周、暗 2 周转光暗交替(其中光照培养 16 h、黑暗培养 8 h)2 周。

1.3 统计分析

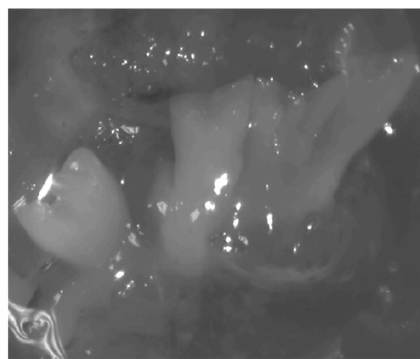
4 周后统计产胚外植体数,计算体细胞胚诱导率:体细胞胚诱导率 = 产胚外植体数/接种外植体数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 体细胞胚的形成

预培养 4 d 的胚小叶外植体接种于诱导培养基上,1 周后叶片切口处膨大并有少量的黄绿色愈伤组织出现;培养至 3 周左右,愈伤组织表面出现颗粒状突起,随着继代时间的延

长,很快形成簇状、易剥离的体细胞胚,每个外植体上形成 3~5 个体细胞胚,颜色为淡绿色(图 1)。



图中白色部分为体细胞胚,观察到的实际颜色为淡绿色

图1 诱导培养 4 周的体细胞胚

2.2 不同基因型品种体细胞胚诱导率

豫花 1 号、豫花 22 号、豫花 9719、豫花 9847 等 4 个品种的体细胞胚诱导率均在 2,4-D 浓度为 15 mg/L 时最高,2 种光周期处理的趋势一致:当 2,4-D 浓度为 0~15 mg/L 时,体细胞胚诱导率基本上随 2,4-D 浓度的升高而逐渐提高,其中豫花 9719 的体胚诱导率最高,最高达 75.58%;其次为豫花 1 号;当 2,4-D 浓度为 20 mg/L 时,这 4 个品种体细胞胚诱导率明显降低(图 2-A 至图 2-D)。在全黑暗培养 4 周条件下,只有豫花 12 号体细胞胚诱导率在 2,4-D 浓度为 5 mg/L 时最高;在暗 2 周转光暗交替 2 周条件下,豫花 12 号体细胞胚诱导率在 2,4-D 浓度 10 mg/L 时最高,达 45.00%(图 2-E),高于全黑暗培养 4 周处理的诱导率,不同基因型花生体细胞胚诱导率差异很大,大多数品种的诱导率在 2,4-D 浓度为 10~15 mg/L 时较高,可见 2,4-D 的适宜浓度为 10~15 mg/L。

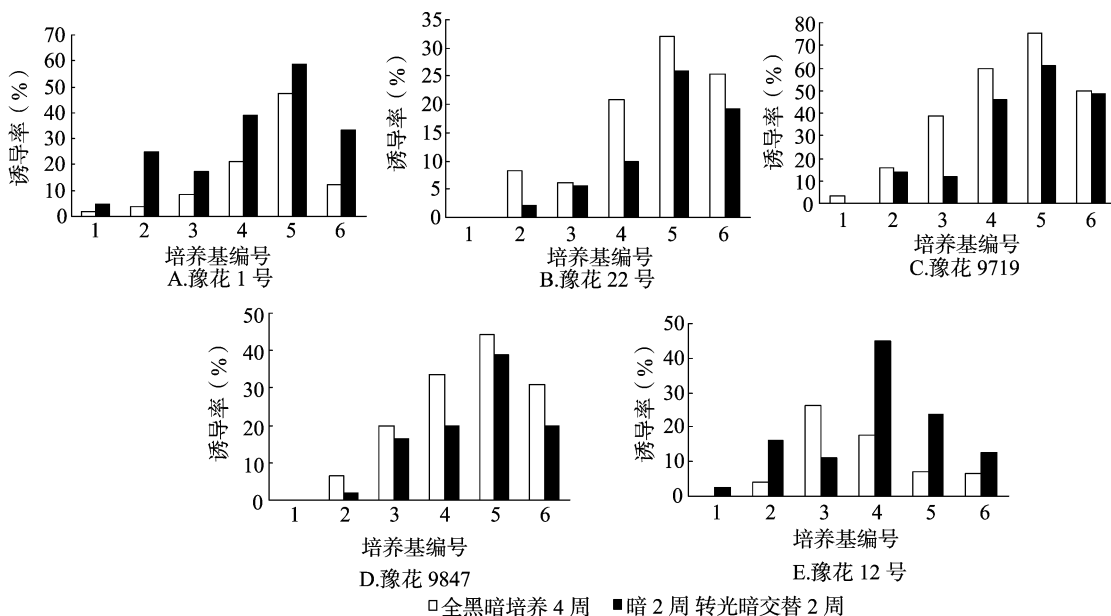


图2 不同培养基和光照条件对各品种花生体细胞胚诱导率的影响

2.3 光周期对体细胞胚再生率的影响

由表 1 可知,全暗培养 4 周处理的平均诱导率低于暗 2 周转光暗交替处理。其中,豫花 1 号和豫花 9847 等 2 个品种

体胚诱导率在这 2 种光周期培养条件下的差异较大,而豫花 9719 的体胚诱导率在这 2 种光周期培养条件下差异较小。可见,在暗 2 周转光暗交替 2 周条件下诱导胚状体可以提高

表 1 不同光照处理的体细胞胚诱导率差异

光周期处理	体细胞胚诱导率(%)				
	豫花 1 号	豫花 12 号	豫花 22 号	豫花 9719	豫花 9847
全黑暗培养 4 周	12.37	6.40	19.35	48.27	20.00
暗 2 周转光暗交替 2 周	33.33	12.77	25.45	50.00	30.95

体细胞胚诱导率。

3 结论与讨论

本研究结果表明,以胚小叶为外植体直接诱导体细胞胚,培养基中 2,4-D 浓度以 10~15 mg/L 为宜,光周期以暗 2 周转光暗交替 2 周处理的体细胞胚诱导率较高。不同基因型花生体细胞胚诱导率差异很大,豫花 9719 的体胚诱导率最高,达到 75.58%。

3.1 2,4-D 最佳浓度差异

2,4-D 是体细胞胚诱导常用的激素,乔利仙等研究了山东省不同类型花生品种的体细胞胚诱导和再生情况,在 2,4-D 浓度为 10 mg/L 下获得较高的体胚诱导率^[10]。蒋菁等以花生胚小叶为外植体,在含 10 mg/L 2,4-D 的诱导培养基上,体胚诱导率最高的达到 62.8%^[11-12]。周蓉等发现 10 mg/L 2,4-D 有利于提高体胚诱导率^[13]。刘艳芝等以花生品种四粒红的胚轴为外植体,诱导体胚 2,4-D 最佳浓度为 20 mg/L,体细胞胚发生率达到 66.67%。有的研究结果与本研究的 10~15 mg/L 为最佳浓度范围有所不同,这可能由选用不同的基因型和不同外植体对诱导的反应差异所致。

3.2 基因型诱导反应差异

Chengalrayan 等比较了美国弗吉尼亚型(普通型大花生)与兰娜型(小花生)的体细胞胚诱导和再生反应,结果表明,胚性愈伤诱导率、体细胞胚发生和再生率与基因型相关,结果显示兰娜型比弗吉尼亚型诱导效应强^[15]。乔利仙等认为,在 2,4-D 浓度为 10 mg/L 时,珍珠豆型和普通型品种体细胞胚诱导率变异范围较相近,为 42.2%~85.0%,龙生型体细胞胚诱导率 61.1%~87.8%,鲁花 14 号、鲁花 8 号、鲁花 9 号、鲁花 22 号等中间型品种体细胞胚诱导率为 84.1%~91.2%^[10]。本研究的普通型大花生豫花 9719 具有较高的体细胞胚诱导率,珍珠豆型花生品种豫花 22 号体细胞胚诱导率较低,进一步说明不同基因型对体细胞胚诱导反应差异较大。

3.3 光周期处理差异

前人利用不同外植体直接诱导体细胞胚发生,在光周期方面也进行了大量研究,结果表明黑暗培养的体细胞胚诱导率稍低^[11,16-17],与本研究结果一致。但进一步的体细胞胚萌发试验结果显示,黑暗培养的体细胞胚易于再生植株;本研究中黑暗处理对体细胞胚再生的影响有待进一步试验。

参考文献:

[1]Livingstone D M,Hampton J L,Phipps P M,et al. Enhancing resist-

ance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxidase gene [J]. Plant Physiology,2005,137:1354-1362.

[2]Bhatnagar - Mathur P,Devi M J,Reddy D S,et al. Stress - inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water - limiting conditions[J]. Plant Cell Reports,2007,26:2071-2082.

[3]Anuradha T S,Divya K,Jami S K,et al. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens[J]. Plant Cell Reports,2008,27:1777-1786.

[4]黄冰艳,张新友,苗利娟,等. 花生 *FAD2* 基因 RNAi 载体转化及转基因籽粒脂肪酸分析[J]. 中国油料作物学报,2008,30(3):290-293.

[5]Niu C,Akasaka - Kennedy Y,Faustinelli P,et al. Antifungal activity in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) conferred by a nonheme chloroperoxidase gene[J]. Peanut Science,2009,36:126-132.

[6]Sundaresha S,Kumar A M,Rihino S,et al. 2010. Enhanced protection against two major fungal pathogens of groundnut, *Cercospora arachidicola* and *Aspergillus flavus* in transgenic groundnut over - expressing a tobacco β 1-3 glucanase[J]. European Journal of Plant Pathology,2010,126:497-508.

[7]Asif M A,Zafar Y,Iqbal J,et al. Enhanced expression of AtNHX1, in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improves salt and drought tolerance[J]. Molecular Biotechnology,2011,49:250-256.

[8]Tiwari S,Mishra D K,Chandrasekhar K,et al. Expression of δ - endotoxin Cry1EC from an inducible promoter confers insect protection in peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants [J]. Pest Management Science,2011,67:137-145.

[9]Iqbal M M,Nazir F,Ali S,et al. 2012. Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot[J]. Molecular Biotechnology,2012,50:129-136.

[10]乔利仙,隋炯明,谭玲玲,等. 花生体胚诱导及植株再生[J]. 农学学报,2012,2(10):9-13.

[11]蒋菁,熊发前,唐秀梅,等. 赤霉素、光照及基因型对花生体细胞胚诱导和植株再生的影响[J]. 南方农业学报,2013,44(6):903-908.

[12]蒋菁,唐秀梅,熊发前,等. 花生体细胞胚诱导及植株再生研究[J]. 中国农学通报,2012,28(3):138-142.

[13]周蓉,廖伯寿,陈小媚,等. 影响花生体细胞胚胎发生因素的研究[J]. 花生学报,2001,30(3):9-12.

[14]刘艳芝,韦正乙,谭化,等. 花生体细胞胚发生及植株再生[J]. 吉林农业科学,2008,33(4):7-10.

[15]Chengalrayan K,Gallo - Meagher M. Evaluation of runner and virginia market types for tissue culture responses [J]. Peanut Science,2004,31(2):74-78.

[16]晏立英,陈坤荣,罗莉霞,等. 花生体细胞胚胎诱导和植株再生研究[J]. 中国油料作物学报,2000,22(3):9-12.

[17]张书标,庄伟建. 不同品种、外植体和光照条件对花生体细胞胚诱导的影响[J]. 广西农业生物科学,2001,20(4):243-245.