

## 蚕豆种子离体萌发和快繁技术研究

屈巧玲<sup>1</sup>, 胡润田<sup>1</sup>, 康诗腾<sup>1</sup>, 许凌波<sup>1</sup>, 王亦菲<sup>2,3</sup>, 陆瑞菊<sup>2,3</sup><sup>1</sup>上海市文来中学, 上海 201101; <sup>2</sup>上海市农业科学院生物技术研究中心;<sup>3</sup>上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106)

**摘要:**以蚕豆为研究对象, 比较了种子处理对种子发芽率的影响、培养基中添加 AC, Vc 和 PVP 对抑制外植体褐化的效果以及培养基中添加 MET、香蕉、椰汁和马铃薯对试管苗繁殖系数及玻璃苗的影响。结果表明发芽时保留种皮、接种时胚根向上对蚕豆种子的萌发有着至关重要的影响, 用 5.0mg/L GA<sub>3</sub> 溶液浸种 12h 有利于种子萌发; 培养基中添加 0.5g/L AC 能有效抑制外植体的褐化, 并能使植株生长健壮; 培养基中添加 150mg/L 椰汁能提高繁殖系数, 有效抑制玻璃苗的发生。

**关键词:**蚕豆; 快繁; 繁殖系数; 玻璃苗

**中图分类号:**S643.6 **文献标识码:**A

Study on invitro of Germination and Rapid Propagation of *Vicia faba* L.Qu Qiaoling<sup>1</sup>, Hu Runtian<sup>1</sup>, Kang Shiteng<sup>1</sup>, Xu Lingbo<sup>1</sup>, Wang Yifei<sup>2,3</sup>, Lu Ruiju<sup>2,3</sup><sup>1</sup>Shanghai Wenlai middle school, Shanghai 201101;<sup>2</sup>Biotech Research Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences;<sup>3</sup>Shanghai Key Lab. of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106)

**Abstract:** Using *Vicia faba* as donor materials, the effects of seed-treatment on germination, supplementing AC, Vc and PVP to induction media on explant-browning and adding MET, banana, potato and coconut water to propagating media on propagating coefficient and bud-vitrification were investigated. The results showed that the frequency of germination were able to be increased by keeping seed vessel, culturing seeds with radicle up and pre-treating seeds in 5.0mg/L GA<sub>3</sub> solution for 12h. The frequency of explant-browning was reduced by adding AC 0.5mg/L to induction media and the vigor of plantlets was promoted by the AC-adding. The propagating coefficient could be improved and the frequency of bud-vitrification increased by adding 150mg/L coconut water.

**Key words:** *Vicia faba* L, Rapid propagation, Propagation coefficient, Vitreous buds

蚕豆是一种指示植物, 蚕豆的微核技术是适用于监测污染物对遗传物质损伤的一项短期生物监测技术, 具有简便、快速、灵敏度高等特点<sup>[1-3]</sup>。但蚕豆是常异交作物, 自然异交率在 30%~50% 之间, 因而随着世代的增加自然群体内混杂严重, 使品种失去原有的特性。组织培养技术在加快繁殖速度、脱毒复壮上具有其他繁殖方法所不可比拟的优势。蚕豆的组织培养的报道不多<sup>[4-7]</sup>。蚕豆快繁群体的构建, 不仅可以对品种进行提纯复壮, 提供均匀一致的研究群体, 更可以研究快繁后代的遗传稳定性和对生长逆境的适应性, 将会有助于对整个植物乃至动物克隆后代的抗逆性

及遗传稳定性评估, 这无疑具有重要的学术意义和应用价值。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

以农家品种“崇明蚕豆”为供试材料, 于 2004 年 3 月—2005 年 5 月在上海市农业科学院生物技术研究中心实验室进行实验。

## 1.2 种子发芽

选择饱满、均匀的蚕豆种子, 置 70% 的酒精中 1min 后, 再用饱和的漂白粉溶液浸泡 10min, 然后用无菌水冲洗 5~6 次。放在铺有无菌纱布的磁盘中, 倒

第一作者简介: 屈巧玲, 1962 年出生, 大学本科, 高级教师, 从事生物学教学多年。Tel: (021) 54792520。

通讯作者: 陆瑞菊, E-mail: cs7@saas.sh.cn, Tel: 021-62208660-3201。通信地址: 201106 上海市北翟路 2901 号, 上海市农科院生物技术研究中心。

收稿日期: 2006-01-27, 修回日期: 2006-02-16。

入添加 5mg/L GA<sub>3</sub> 的无菌水浸泡 12h, 待种子完全吸水后, 再用饱和的漂白粉溶液浸泡 10min, 然后用无菌水冲洗 5~6 次, 接种到无激素的 MS 培养基上。在 (23±1)°C、光强 1800Lx、每天光照 12h/ 黑暗 12h 的光周期下培养。

### 1.3 培养基

以 MS 培养基为基本培养基, 发芽培养基中添加 30g/L 蔗糖、6.0g/L 琼脂, pH 5.8; 增殖培养基则在发芽培养基的基础上添加 0.5mg/L 6-BA (6-苄氨基嘌呤)、0.01mg/L NAA (萘乙酸)、0.5mg/L MET (矮壮素)、800mg/L CH (水解干酪素)、0.5g/L AC (活性炭); 生根培养基中添加 1.0mg/L NAA、0.5g/L AC。121°C 高温高压灭菌。

## 2 结果

### 2.1 蚕豆种子的发芽

比较了无菌水或 5.0mg/L GA<sub>3</sub> 浸种、接种时种子



图 1 保留种皮、胚根向上植株的长势

的放置方式、是否保留种皮以及光照对蚕豆种子发芽率的影响。从表 1 可以看出, 5.0mg/L GA<sub>3</sub> 浸种能明显促进发芽, 用 GA<sub>3</sub> 浸种的发芽率 (处理 3) 是用无菌水浸种 (处理 6) 的 2 倍 (94.4/47.2); 在光照培养条件下, 保留种皮的发芽率 (处理 1) 是剥去种皮的 (处理 2) 1.77 倍 (95.8/54.2); 在暗培养条件下, 保留种皮的发芽率 (处理 3) 是剥去种皮的 (处理 4) 4.72 倍 (94.4/20.0); 接种时胚根向上放置方式的发芽率 (处理 1) 是胚根向下 (处理 5) 的 36.8 倍 (95.8/2.6)。结果表明用 5.0mg/L GA<sub>3</sub> 浸种、保留种皮对蚕豆种子的发芽率有明显的促进作用; 而接种时种子的放置方式对发芽有至关重要的影响; 发芽阶段有无光照对种子的发芽率没有明显的影响。保留种皮和胚根向上的处理促使植株生长健壮 (图 1), 反之则较为弱小 (图 2)。

### 2.2 褐化抑制剂的筛选

在蚕豆的快繁过程中, 切口部分受伤氧化, 酚类

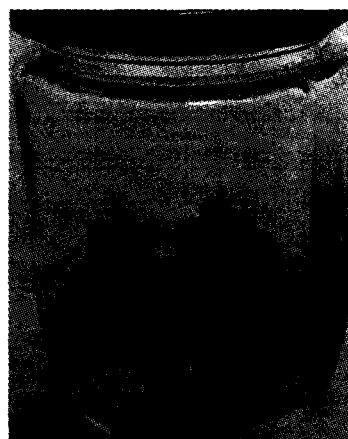


图 2 剥去种皮、胚根向下植株的长势

表 1 各种处理对蚕豆种子发芽率的影响

处理	接种数	发芽数	发芽率 (%)
1: 5mg/L GA <sub>3</sub> 浸种、胚根向上、光照培养、保留种皮	24	23	95.8
2: 5mg/L GA <sub>3</sub> 浸种、胚根向上、光照培养、剥去种皮	24	13	54.2
3: 5mg/L GA <sub>3</sub> 浸种、胚根向上、黑暗培养、保留种皮	36	34	94.4
4: 5mg/L GA <sub>3</sub> 浸种、胚根向上、黑暗培养、剥去种皮	30	6	20.0
5: 5mg/L GA <sub>3</sub> 浸种、胚根向下、光照培养、保留种皮	39	1	2.6
6: 无菌水浸种、胚根向上、黑暗培养、保留种皮	36	17	47.2

物质外渗, 极易出现褐化现象, 使快繁无法进行下去, 因此抗褐化是个急需解决的问题, 褐化抑制剂的筛选显得尤为重要。从表 2 可以看出, 增殖培养基中不添加任何抗褐化剂的话, 所有外植体全部褐化死亡; 在增殖培养基中添加 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) (图 4)、AC (活性炭) 能较为有效地阻止褐化的发生; 尤其是在添加 AC 的培养基上, 繁殖系数为 2.3, 褐化现象也得到了控制, 植株生长十分健壮 (图 3); Vc (抗坏血酸) 的效果最差, 褐化植株百分率高达 64.0% (图 5)。另外, 在蚕豆快繁苗中, 玻璃苗现象也较为严重, 严重

影响了繁殖系数, 在培养基中添加 0.5mg/L MET 可以十分有效地控制快繁苗的玻璃化。在添加 0.5mg/L 6-BA、0.01mg/L NAA、0.5mg/L MET、800mg/L CH、0.5g/L AC 的培养基上, 30d 继代 1 次, 繁殖系数为 2~3。在快繁 3 代后, 快繁苗与种子苗没有差异, 茎秆粗壮, 叶色浓绿, 长势良好。

### 2.3 添加物对蚕豆试管苗玻璃化的影响

在蚕豆离体培养中, 试管苗增殖系数与玻璃苗的形成率呈正相关。在试验中发现适当提高 6-BA 的浓度可提高繁殖系数, 但玻璃苗也随之大大增加。增

表 2 不同添加剂的效果及快繁后代的长势

添加剂	外植体数	褐化的外植体数	褐化率(%)	繁殖系数	长势
CK	50	50	100%	/	所有植株褐化死亡
PVP (1mg/L)	50	8	16.0	1.8	植株生长较为瘦弱、叶色发黄
Vc (50mg/L)	50	32	64.0	1.5	褐化死亡的植株太多
AC (0.5g/L)	50	10	20.0	2.3	茎秆粗壮、叶色浓绿、长势良好



图 3 培养基中添加 0.5g/L AC



图 4 培养基中添加 1mg/L PVP

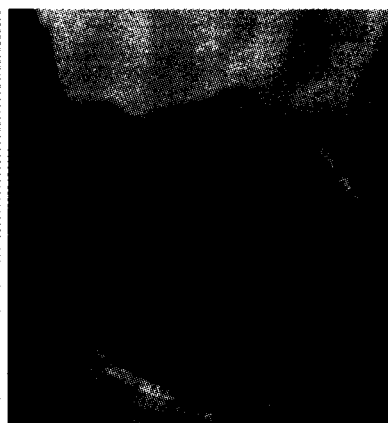


图 5 培养基中添加 50mg/L Vc

殖培养基中添加 0.5mg/L 的矮壮素 (MET)、150mg/L 香蕉、椰汁和马铃薯, 比较添加物对蚕豆试管苗玻璃化的影响。从表 3 可以看出: 当培养基中 6-BA 浓度从 0.5mg/L 上升为 1.0mg/L 时, 繁殖系数从 3.72 上升到 4.98, 玻璃苗频率也从 23.12% 上升到 31.33%; MET、香蕉、椰汁和马铃薯的添加都能在一定程度上抑制玻璃苗的发生; 在添加 150mg/L 香蕉、马铃薯的

培养基上, 试管苗生长矮小, 繁殖系数较低; 在添加 0.5mg/L MET 的培养基上, 试管苗生长十分健壮, 但试管苗生长缓慢, 繁殖系数很低; 在添加椰汁的培养基上, 试管苗生长健壮, 玻璃苗百分率虽然大于其他添加物的, 但繁殖系数最高。因此如果只考虑短期内获得大量有效的试管苗, 增殖培养基中椰汁的添加最为有效。

表 3 添加物对蚕豆试管苗玻璃化的影响

培养基	添加物	接种数	增殖情况		玻璃苗情况	
			增殖数	繁殖系数	数量	百分率(%)
MS + 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.01mg/L	/	50	249	4.98	78	31.33
	0.5g/L MET	50	137	2.74	6	4.38
	150g/L 香蕉	50	152	3.04	30	19.74
	150g/L 椰汁	50	260	5.20	55	21.15
	150g/L 马铃薯	50	125	2.50	26	20.80
MS + 6-BA 0.5mg/L + NAA 0.01mg/L	/	50	186	3.72	43	23.12
	0.5g/L MET	50	119	2.38	0	0.00
	150g/L 香蕉	50	128	2.56	19	14.84
	150g/L 椰汁	50	194	3.88	35	18.08
	150g/L 马铃薯	50	93	1.86	16	17.20

#### 2.4 试管苗的生根

试管苗在不含激素的 1/2MS 培养基上也能有近 50% 的生根率; 在添加 1.0mg/L NAA、0.5g/L AC 的生根培养基上, 生根率可达 100%; 含 IBA 1.0mg/L、0.5g/L AC 的培养基生根率约为 80%。将丛生芽培养至高度达 1.5 cm 左右时, 自基部切下, 转入添加 1.0mg/L NAA、0.5g/L AC 生根培养基中, 生根率达 100%, 根系生长良好, 当植株长至 3~4cm 高时, 打开瓶口, 炼苗 2d 后移栽入钵, 成活率可达 90% 以上。

#### 3 讨论

蚕豆种子发芽时, 用 5.0mg/L GA<sub>3</sub> 浸种、保留种皮对蚕豆种子的发芽率有明显的促进作用, GA<sub>3</sub> 的作

用也许是打破了种子的休眠, 蚕豆种皮中含有促进萌发的活性因子, 保留种皮则保留了这些活性因子; 而接种时种子的放置方式对发芽有至关重要的影响, 也许胚根向上的方式有利于胚根的萌动; 发芽阶段有无光照对种子的发芽率没有明显的影响; 快繁过程中, 在增殖培养基中添加 150mg/L 的椰汁可以提高繁殖系数, 还可降低玻璃苗的发生; 添加 0.5g/L AC 可以有效防止褐化现象的发生。这与汪秀峰<sup>[4]</sup>的研究结果有所不同, AC 具有较强的吸附力, 能吸附外植体表面所形成的多酚氧化物, 也能吸附培养基中的营养成分, 因而他认为 AC 不能用于解决组织培养中的褐化问题。这可能是由于试验所用材料和方法不同所致,

另外,在试验中 AC 的添加量较少 0.5g/L,是汪秀峰使用量的 1/5。在西洋杜鹃的组织培养中,也证实了培养基中添加适量的 AC 确有防止外植体褐化的作用<sup>[8]</sup>。

### 参考文献

- 1 段昌群,王焕校.重金属对蚕豆遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨.植物学报,1995,37(1):14~24
- 2 沈光平,微核与染色体畸变的相关性.遗传,1985,7(1):15~17
- 3 Shahin S A, El-Amoodi K H. Induction of numerical chromosome aberrations during DNA synthesis using the fungicides nimrod and rubigan-4 in root tips of *Vicia faba* L. Mutat Res, 1991, 261: 169~176
- 4 汪秀峰,植物组织培养“抗褐”之初探.安徽农业科学,1999,27(4): 325~326
- 5 刘洋.蚕豆茎段离体培养再生植株简报.青海农林科技,2003,3: 56~57
- 6 Mutasim Mohamed Khalafalla, Kazumi Hattori A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.) Plant Growth Regulation,1999,27(3):145~148
- 7 Mutasim Mohamed Khalafalla, Kazumi Hattori Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. Plant Growth Regulation 2000,32 (1):59~63
- 8 王亦菲,孙月芳,周润梅,陆瑞菊.两种西洋杜鹃的组织培养.上海农业学报,2003, 19(2):9~11

(责任编辑:回文广)