

青海春蚕豆组织培养技术研究

刘 洋,高 霞

(青海省农林科学院,青海 西宁 810016)

摘 要:2001—2005 年对蚕豆组织培养快繁技术体系的建立进行了整套、深入细致的研究,研究结果表明:蚕豆茎节是适宜快繁的外植体;芽增殖最适培养基(单位:mg/L,下同):N6 + NAA0.1—1.0 + BA0.5—4.0 + 肌醇 100—300;壮苗培养基是:N6 + NAA0—0.5 + BA0—0.5 + 多效唑 1.0—3.0;生根培养基是:N6 + NAA0.4—0.5。

关键词:春蚕豆;组织培养;快繁;研究

中图分类号:S336

文献标识码:A

文章编号:1004-9967(2006)03-0001-03

Study on Tissue Culture of Spring Faba Bean in Qinghai

LIU Yang, GAO Xia

(Crop Institute, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining Qinghai 810016, China)

Abstract: Taking the stem segments with lateral buds as explants, the tissue culture of faba bean were studied from 2001 to 2005. The results showed that the stem of faba bean is suitable explants for its rapid propagation; N6 + NAA0.1—1.0 + BA0.5—4.0 + Inositol 100—300 gave the best result for subculture of shoots and the multiplication rate; N6 + NAA0—0.5 + BA0—0.5 + ppp1.0—3.0 for robust seedling; N6 + NAA0.4—0.5 for ex vitro shoots rooting.

Key words: Faba bean; Tissue Culture; Rapid propagation; Study

植物组织培养是植物脱除病毒和离体快速繁殖的一种新手段,另外在植物育种、种质保存和次生物质生产等方面也具有重要的作用和广阔的应用前景。在国内,组培快繁技术主要应用于花卉、瓜果、林木、蔬菜等,国外蚕豆组培研究始于上世纪七、八十年代,研究者认为茎尖、上胚轴、茎基节作外植体,在适宜的培养条件下,诱芽和生根的效果较好,继代多次仍然保持旺盛的芽分化能力(Jejkloua)等(1984)、Thgan等(1987)、Sagreh(1988),在黑暗条件下发芽成苗14d的子叶节和茎基节为外植体培养得到的再生苗、后代性状与其原始群体种子繁殖的后代表现一致,Griga等(1994)以合子胚、茎尖为外植体进行培养,获得了开花的再生植株^[1-5]。Sayegh(1988)在MS培养基添加无机盐、铁、生长素获得最佳诱导效果,以茎尖、茎基节为外植体,培养一周后出现芽,生根培养三周后生根率55%,第五周73%。在国内,20世纪80年代初,上海农学院黄德俐等采用秋蚕豆品种三白豆和田鸡青的下胚轴、子叶和去子叶胚为外植体,经过培养获得了愈伤组织和11个绿

苗,同期西南农业大学徐正华等报道,利用四川成胡10号蚕豆品种的上胚轴或下胚轴作外植体,经培养直接获得蚕豆绿苗5株。以后国内外未见有关蚕豆组织培养的报道^[7]。

1 材料

1.1 最适外植体的选择^[8]:春蚕豆的幼叶、茎节、带子叶胚、下胚轴、茎段、顶芽。

1.2 芽诱导和芽增殖:经初代培养的小芽。

1.3 壮苗培养:经继代培养2—3次,高2—3cm的芽。

1.4 生根培养:经壮苗培养的试管苗。

1.5 炼苗和移栽:具有≥3根(根长≥3cm)的试管苗。

2 方法

2.1 最适外植体研究方法:以N6为基础培养基,不添加任何生长调节剂、添加6—BA低浓度0.1mg/l和高浓度4.0mg/l,分别接种上述各材料12个,三次重复。每次重复于接种后15d,统计芽数。经筛选后,选择最适快繁外植体。

2.2 芽诱导和芽增殖的研究方法:本实验包括下

列因素,各因素浓度范围如下:细胞分裂素(6-BA):0—4.0(mg/l);生长素(α -NAA):0—1.0(mg/l),肌醇 100—500(mg/l)为添加物,试验选用最优设计。以 N6 为基础培养基,试验进行 8 次重复,每处理接种 10 个外植体,于接种后 10d,20d 统计芽数。10d 统计的芽数用于芽诱导分析,20d 统计的芽数用于芽增殖分析,经统计分析后选出最优的芽诱导和芽增殖培养基和生长调节剂浓度配比。

2.3 壮苗培养的研究方法:本实验包括三个因素:NAA、6-BA、多效唑;每个因素包括两个水平:NAA—0.1,0.2mg/l、6-BA—0.05,0.01mg/l、多效唑—2.0,3.0mg/l;共 8 个处理,每个处理 3 次重复,每重复接种 10 瓶。基础培养基为 N6。10d 后和 20d 后分别统计叶片数和株高,并观测叶色,长相(随机取 4 瓶,编号)。

2.4 生根培养的研究方法:以 N6 为基础培养基添加 NAA 浓度为 0—0.5mg/l,接种小苗大小一致,高度为 1.2—2.0cm,2—3 节的健壮苗,3 次重复,每重复接种 10 瓶,30d 后统计生根数目。

2.5 炼苗和移栽方法:

2.5.1 炼苗:自 2003 年分批次瓶苗假植 9 期共 718 株;2004 年假植 5 期共 823 株。2003 年假植苗在我院生物中心日光温室中培养,2004 年 1 月

瓶苗假植在作物所土温室(塑料棚)中培养,因培养条件不适宜,移栽的 500 多株小苗全部死亡,又于 3 月移至生物中心日光温室培养。假植期间,室温一般为 6—33℃,湿度 32—46%,采用自然光照。假植基质为蛭石加腐熟羊粪。5 月中旬气温明显升高,将假植苗移至田间搭建的简易塑料小棚。顶部为可活动的遮阳网,每天 12:00—16:00 覆盖遮阳网。

2.5.2 移栽:炼苗后移栽大田。大田土壤准备:前作小麦,四月上旬浅翻整地,施入有机肥 $45\text{m}^3 \cdot \text{hm}^{-2}$,尿素 $75\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,磷酸二胺 $225\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。宽窄行移植,人工定点挖穴,带土移栽,压紧按实,浇水,小水细渗,浇透后覆土,使地表保持平、干、细碎状态。

3 研究结果与分析

3.1 最适外植体选择

由表 1 中可以得到,带子叶胚出芽最好、茎节次之,顶芽再次之,幼叶、茎段没有出芽,下胚轴仅个别有芽的出现。此结果说明,茎节、带子叶胚可以做快繁外植体,但带子叶胚产生的芽也可能是子叶为胚提供营养而发育成芽,另外胚中本来就有胚芽^[9]。另据有关资料茎节诱导产生的腋芽在培养过程中产生变异小,故认为茎节是最好的快繁外植体^[10]。

表 1 不同外植体在 MS 培养基上出芽情况

外植体	重复 I			重复 II			重复 III			平均芽数		
	无	0.1	0.4	无	0.1	0.4	无	0.1	0.4	无	0.1	0.4
幼叶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
茎节	35	41	60	47	53	66	36	45	57	3.27	3.86	4.72
带子叶胚	60	41	72	36	39	67	46	56	61	3.94	3.78	5.56
下胚轴	0	3	5	2	1	3	1	0	4	0.083	0.11	0.33
茎段	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
顶芽	12	18	22	14	20	19	17	15	26	1.19	1.47	1.86

3.2 芽诱导与芽增殖培养

10d 统计的芽数用于芽诱导分析,经统计分析,得芽诱导的数学模型为(模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 分别代表 NAA、6-BA 和肌醇的浓度,下同)^[6]

$$y = 54 + 7.895X_1 + 1.179X_2 + 2.777X_3 - 4.150X_1X_2 + 7.833X_1X_3 - 8.946X_2X_3 - 2.357X_1^2 - 3.638X_2^2$$

$$- 8.421X_3^2$$

对模型的 F 测验结果(表 3)表明有 NAA、6-BA 和肌醇与蚕豆芽分化具有真实回归关系。经实际值与预测值模拟测验分析,实际值与预测值差异不显著,即此回归方程与实际吻合。

表 2 饱和 D 设计中 10d、20d 芽数统计表(8 次重复平均小芽数)

培养基编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10d 芽数	18	51	31	20	28	31	24	29	32	16	30
20d 芽数	54	52	97	90	60	104	102	76	124	32	128

各处理间差异显著,经频数分析得到芽诱导

的最优培养基为:

N6 + NAA0.1—0.75 + BA0.5—2.00 + 肌醇
100—300(单位:mg/l)

表 3 芽诱导方差分析表

SOURCE	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
处理间	9	10.2275	1.1364	3.3016*	2.456	3.597
组 内	2	4.4652	2.2326	6.4863**	3.555	6.013
误 差	18	6.1948	0.3442			
总变异	29	20.8875				

20d(表 2)所统计芽数用于芽增殖分析,经分析得到芽增殖数学模型为:

$$y = 3.380 - 0.4497X_1 - 0.1722X_2 + 0.3604X_3 - 4.150X_1X_2 + 7.833X_1X_3 - 8.946X_2X_3 - 2.357X_1^2 - 3.638X_2^2 - 8.421X_3^2$$

对模型的 F 测验结果表明 NAA、6—BA 和肌醇与蚕豆芽分化具有真实回归关系。经实际值与预测值模拟测验分析,实际值与预测值差异不显

表 5 方差分析结果表

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
区 组	2	0.008328	0.004164	13.41**	3.74	6.51
处 理	7	0.045291	0.006470	8.18**	2.44	3.54
A(NAA)	1	0.001584	0.001584	5.10*	4.60	8.86
B(6—BA)	1	0.007884	0.007884	25.39**	4.60	8.86
C(多效唑)	1	0.004134	0.004134	13.32**	4.60	8.86
A × B	1	0.011484	0.011484	36.99**	4.60	8.86
A × C	1	0.018984	0.018984	61.14**	4.60	8.86
B × C	1	0.000759	0.000759	2.45	4.60	8.86
A × B × C	1	0.000459	0.000459	1.48	4.60	8.86
误 差	14	0.004347	0.000310			
总变异	23	0.057966				

由结果分析知:NAA 的浓度,低浓度要优于高浓度;6—BA 的浓度,高浓度要优于低浓度;多效唑的浓度,低浓度要优于高浓度。NAA 和 6—BA 的互作极显著,NAA 和多效唑的互作极显著,因此壮苗培养的最优组合为:N6 + 0—0.5mg/L NAA + 0—0.5mg/L 6—BA + 1.0—3.0mg/L 多效唑,该组合可同时取得有益的 NAA、6—BA 和多效唑主效应和 NAA × 6—BA、NAA × 多效唑的互作效应。

3.4 生根培养:

在表 6 中 N6 + NAA0.4 培养基的生根率最高,三次统计结果平均为 80.8%,其次为 N6 + NAA0.5 的培养基生根率为 66.7%。因此生根培养基为:N6 + NAA0.4—0.5mg/l。

3.5 炼苗与移栽:

3.5.1 炼苗流程:瓶苗移至温室—开瓶炼苗 3d—取出瓶苗—假植管理(日喷水 2 次,中午室温 ≥

著,即此回归方程与实际吻合。

经方差分析(表 4):各处理间差异极显著,采用频数分析法,得到芽增殖的最优培养基为:N6 + BA0.5—4.00 + 肌醇 100—300(单位:mg/l)

表 4 芽增殖方差分析表

SOURCE	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
处理间	9	555.599261	7.3324	8944**	2.456	3.597
组 内	2	93.3622	46.6811	3.701*	3.555	6.013
误 差	18	227.0361	12.6131			
总变异	29	875.9975				

3.3 壮苗培养:

在本实验中,由于因素和互作的 V = 1, t 测验, q 测验, SSR 测验的结果和 F 测验的结果都相同,所以可根据 F 测验的结果(表 5)直接作出判断。

25℃开窗通风)—假植 30d,定植大田。

3.5.2 大田移栽管理:栽后一周,叶面喷施营养液和多菌灵,以后每周喷施。定植后 10—12d,人工松土,除草,灌水后、雨后及时松土除草。试管苗植株茎秆生长细弱,易倒伏,于结荚期用细竹杆搭支架固定。

表 6 不同 NAA 浓度生根情况统计

培养基	接种数			生根数			平均生根率 (%)
	I	II	III	I	II	III	
N6 + NAA0	40	40	40	5	7	9	17.5
N6 + NAA0.1	40	40	40	10	12	15	30.8
N6 + NAA0.2	40	40	40	13	12	16	34.2
N6 + NAA0.3	40	40	40	13	13	16	52.7
N6 + NAA0.4	40	40	40	32	30	35	80.8
N6 + NAA0.5	40	40	40	28	27	25	66.7

3.5.3 移栽成活率:大田移栽成活率较高,在适宜条件下,除个别因操作(下转第 6 页)

期目测效分别为 50.8%、71.9%、77.5%、85.6%、95.6%，剂量增加防除效果升高，结合对赖草抑制情况和总体控制效果，农民乐防除赖草以 $2\ 250\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 为宜。对硬枝早熟禾、三脉紫菀及茵陈蒿抑

制情况和防效分析，对硬枝早熟禾以 $2\ 250\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 为宜、三脉紫菀、茵陈蒿防除应采用 $3\ 000\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 为宜。

表 2 农民乐对西宁地区休闲地杂草优势种群的防除效果

药剂名称	剂量 g, ai, ha^{-1}	赖草			三脉紫菀			硬枝早熟禾			茵陈蒿		
		除株效	鲜重效	目测效	除株效	鲜重效	目测效	除株效	鲜重效	目测效	除株效	鲜重效	目测效
农民乐	750	50.71	75.59	50.8	45.00	55.02	45.0	57.62	78.78	57.0	49.57	78.27	50.0
农民乐	1050	59.16	84.98	71.9	56.65	65.07	60	65.8	84.66	66.3	72.17	75.01	57.5
农民乐	1500	59.16	87.79	77.5	60.8	67.47	61.3	74.35	84.66	77.3	71.6	81.53	62.3
农民乐	2250	71.27	92.02	85.6	65	80.06	68.8	80.67	82.3	86.3	82.03	75.01	66.3
农民乐	3000	89.86	94.84	95.6	81.65	87.56	86.5	91.83	90.43	97.5	85.65	85.88	81.5
草甘膦	1500	75.21	80.75	73.8	81.65	55.02	30	75.47	79.82	60.6	82.03	71.71	30
CK*	0	532.5	1890.4	66.9	180	240.1	439	807.3	349.9	46.6	517.5	396.9	21.7

注：* CK 中株防效、鲜重效、目测效栏中所对应数据的单位分别为株 m^{-2} 、 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ 、 cm 。

草甘膦 $1500\text{ml}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理，对赖草的控制效果为 73.8%，对其它三种杂草敏感性差。

3 结果与讨论

草甘膦以植物的 EPSP(5-烯醇丙酮酰-莽草酸-3-磷酸合成酶)为靶标酶，对绿色植物具有较高的活性^[2]。一般休闲地杂草基数大，而且在长期的生长竞争中逐渐演变为多年生杂草为优势种群，一年生杂草发生量小。采用农民乐防除休闲地杂草，速效性好，持效期长。在该试验条件和用量范围内，74.7%农民乐对苣荬菜的适宜剂量为

$1\ 500\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ ，对野胡萝卜为 $750\text{—}1\ 050\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。赖草、硬枝早熟禾为 $2\ 250\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ ，对西伯利亚蓼、三脉紫菀、茵陈蒿为 $3\ 000\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。从对杂草的敏感性、总体控制效果上均优于同等剂量的 10% 草甘膦水剂。

参考文献：

- [1] 韩宝祥, 邵凤成, 孙桂凤, 等. 新型除草剂——农民乐[J]. 农业科技通讯, 2000, (4): 27.
- [2] 张宏军, 王萍, 周志强, 等. 杂草对草甘膦抗性及其抗性治理[J]. 农药科学与管理, 2004, (5): 18—22.

(上接第 3 页)

损伤外，有效成活率达 100%。除 2003 年第一期移栽时，因地下害虫危害，导致成活率为 60% 外，其余的均达 100%。适宜在 4 月下旬至 6 月上旬定植。

3.5.4 生育表现：大田再生株的生育特点主要表现为生长缓慢，长势弱，生长量小，易倒伏，对逆境反应敏感，早熟，易早衰。

3.5.5 主要产量性状：试管苗在大田定植后结荚少、粒稍小、平均每株产籽 10—14 粒，最多 44 粒，少于对照 20—58 粒。组培苗子一代除百粒重在 160g 左右，低于对照外，生长正常。子二代、子三代生长正常，株高、分枝数、荚数趋于正常，百粒重达到 178.89g，和对照(百粒重:178.57g)无明显差异。

4 讨论

4.1 在蚕豆组织培养的过程中，部分培养物的褐化、玻璃化问题，是否因品种、生长调节剂种类与浓度、培养时间的不同而异，还需要进一步研究。

4.2 试管苗子一代的百粒重低于对照，但子一代群体中无形态变异株和变异籽粒。子二代、三代生长正常，株高、分枝数、荚数、百粒重正常。子

一代百粒重偏低的主要原因还需进一步研究。

参考文献：

- [1] Tejklava, -E, novak, -FJ. Growth regulator action on faba bean (*Vicia faba* L.) shoot apices in vitro culture. Rostlinna - Vyroba. 1984, 30: 543—553.
- [2] Thynn, -M, Werner, -D. Plantlet regeneration and somatic differentiation in faba bean (*Vicia faba* L.) from callus culture of various explants. Angewandte-Botanik. 1987, 61: 5—6.
- [3] Sayegh, -AJ. A protocol for faba bean (*Vicia faba* L.) microproagation from seedlings FABIS-Ne wletter. 1988, No. 21, 12—13.
- [4] Griga-M; Klenoticova - H. Plant regeneration in callus Cultures of faba bean(*Vicia faba* L.) Rostlinna-Vyroba, 1994, 40: 697—709.
- [5] Griga. Germplasm program - legume; annual report for 1994. International Center for Agricultural Research in the Dru Area. 1994, 316 pp.
- [6] 徐中儒. 农业试验最优回归设计[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1988.
- [7] 曹改义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2001.
- [8] 西北农林科技大学. 植物组织与细胞培养[M]. 1994.
- [9] 江苏农学院. 植物生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [10] 杨小康. 关于杂稻制种幼穗分化期多效施用效果的数学模型研究[J]. 种子, 1994, (3): 24—28.