

付国勇, 苏豫梅, 刘超, 等. 鹰嘴豆愈伤组织诱导及培养条件的初步探索[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 63–65.

# 鹰嘴豆愈伤组织诱导及培养条件的初步探索

付国勇, 苏豫梅, 刘超, 高新, 张桦

(新疆农业大学农学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 为了研究鹰嘴豆愈伤组织诱导的培养条件, 确定了种子消毒方法为 75% 乙醇处理 3 min, 5% 次氯酸钠溶液处理 8 min, 无菌水清洗后播种; 鹰嘴豆萌发培养基为 1/2MS; 成苗培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L IBA; 外植体茎段长度为 0.8 cm 较为合适; 2,4-D 和 6-BA 激素浓度比例为 1:1 时对愈伤组织形成有利, 添加过多有抑制作用, 诱导愈伤组织形成的培养基为  $B_5 + 1 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 2 \text{ mg/L } 6\text{-BA}$ 。

**关键词:** 鹰嘴豆; 愈伤组织; 培养条件; 外植体茎段

**中图分类号:** S529.043; Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0063-03

鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.) 是世界上栽培面积较大的食用豆类作物之一, 主要分布在世界 40 多个国家, 在我国主要种植于新疆、甘肃等省区<sup>[1]</sup>。鹰嘴豆是豆科鹰嘴豆属植物, 起源于亚洲西部和近东地区, 全球栽培面积超过千万公顷, 大多分布在印度、巴基斯坦和土耳其等干旱或半干旱地区, 是世界第三大豆科作物<sup>[2-4]</sup>。鹰嘴豆是我国维吾尔族人民喜爱的一种副食品, 在新疆已有 2 500 年的历史, 种植面积在 2 万  $\text{hm}^2$  左右<sup>[5]</sup>。由于鹰嘴豆具有丰产耐旱、直立抗倒伏和较耐高温的特点, 因此十分适合在新疆等干旱和半干旱地区种植。就其产量而言, 目前鹰嘴豆的实际产量小于 1  $\text{t}/\text{hm}^2$ , 远低于其 5  $\text{t}/\text{hm}^2$  的理论产量, 导致其产量过低的主要因素有干旱、低效落后的农业生产方式和病虫害破坏。此外, 鹰嘴豆作为一种大规模种植的豆科作物, 其对于维持地球生物圈氮循环具有重要意义<sup>[6-7]</sup>。

目前, 国内对鹰嘴豆的研究还处在起步阶段, 关于鹰嘴豆的遗传转化体系在国内还未见报道, 新疆农业大学拥有地理和资源的优势, 有利于开展对鹰嘴豆遗传转化体系的研究工作。本研究以期后续的鹰嘴豆转基因、分子育种、离体组织培养等研究提供技术支持和理论依据, 为鹰嘴豆经济效益的提高和鹰嘴豆的高产提供一定的推动作用, 对鹰嘴豆品种的改良和推广具有积极的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试鹰嘴豆种子为迪西型鹰嘴豆, 由实验室保存。

### 1.2 种子消毒方法的选择

选取成熟度好、大小均一的鹰嘴豆种子, 分别以 100 粒种子为 1 份, 进行 3 种消毒试验, 每组试验重复 3 次。方法 1:

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31160306); 新疆农业大学前期课题(编号: XJAU201202); 新疆农业大学大学生创新项目(编号: XJAU2014036)。

作者简介: 付国勇(1989—), 男, 甘肃武威人, 硕士研究生, 研究方向为生物技术。E-mail: fgyong1212@163.com。

通信作者: 苏豫梅, 女, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: suema1292005@163.com。

75% 乙醇处理 8 min 后, 无菌水清洗 5~6 次, 无菌水浸泡 1 d, 次日在超净工作台中, 播种于 1/2MS 培养基中; 方法 2: 75% 乙醇处理 3 min 后, 用 5% 次氯酸钠溶液处理 8 min, 然后用无菌水清洗 5~6 次, 无菌水浸泡 1 d, 次日于超净工作台中接种于 1/2MS 培养基中; 方法 3: 0.1% 氯化汞处理 10 min, 无菌水清洗 5~6 次, 无菌水浸泡 1 d, 接种于 1/2MS 培养基中。用以上 3 种方法对鹰嘴豆种子进行消毒处理, 过程均在超净工作台中完成。成苗基本培养基配方为 1/2MS + 30 g/L 蔗糖 + Gelzan(一种植物凝胶) 2 g/L + 1.97 g/L 氯化镁 + 0.4 g/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。接种 3 d 后, 统计污染率, 计算公式为:

污染率 = 污染种子数/接种总数  $\times 100\%$ 。

### 1.3 鹰嘴豆萌发培养基选择

选择最佳消毒方法对鹰嘴豆进行消毒后, 于超净工作台中将其分别播种到 MS、1/2MS、 $B_5$  和 1/2 $B_5$  4 种不同的萌发培养基上, 以无菌水作对照。每种培养基 30 瓶, 每瓶接种 3 粒种子, 于  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$  温度、光照强度为 2 000 lx、16-8 h 光暗交替培养, 接种 7 d 后观察种子萌发及生长状况。

### 1.4 不同浓度 IBA 对成苗的影响

将 IBA 设置为 5 个浓度梯度(0、0.5、1、1.5、2 mg/L), 分别加入到萌发培养基中, 15 d 后观察其对鹰嘴豆成苗的影响, 每个浓度梯度 10 瓶, 每瓶播种 3 粒鹰嘴豆种子, 于  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$  温度、光照强度 2 000 lx 下 16-8 h 光暗交替培养, 接种 15 d 后观察种子萌发及生长状况。

### 1.5 外植体大小对愈伤组织形成的影响

采用鹰嘴豆的茎段为外植体, 对其进行愈伤组织的诱导。将生长 15 d 的鹰嘴豆无菌苗分别切取成 0.5、0.8、1.5 cm 3 个长度的外植体, 每种长度接种 10 瓶, 每瓶接种 6 块外植体。于  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$  温度下, 先暗培养 2 d, 再在光照强度为 2 000 lx、16-8 h 光暗交替培养, 接种 25 d 后观察茎段的出愈情况及生长状态。

### 1.6 激素对愈伤组织形成的影响

将生长 15 d 的鹰嘴豆无菌苗切成相同大小的茎段, 放置于以  $B_5$  为基本培养基, 添加不同浓度 2,4-D 和 6-BA 的诱导愈伤组织的培养基中, 每个浓度接种 10 瓶, 每瓶放置 6 块茎段外植体, 于  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$  温度、光照强度 2 000 lx、16-8 h

光暗交替培养,接种 25 d 后观察茎段的出愈情况及生长状态。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法的选择

分别用 3 种消毒方法处理后,将鹰嘴豆接种于 1/2MS 培养基中,观察鹰嘴豆种子生长情况发现:用方法 1 消毒处理后的种子在 3 d 后大部分污染,无法利用其形成的鹰嘴豆苗;方法 2 消毒处理后的种子无污染,且长势较好;方法 3 消毒处理后的鹰嘴豆种子在第 3 天开始出现褐变的现象,不久后死亡。通过对上述结果的观察统计,可以确立鹰嘴豆种子的最佳消毒的方法是方法 2,即 75% 乙醇处理 3min,用 5% 次氯酸钠溶液处理 8 min,然后用无菌水清洗 5~6 次并浸泡 1 d,次日于超净工作台中接种于成苗培养基中。不同消毒方法对鹰嘴豆出芽率的影响如图 1 所示。

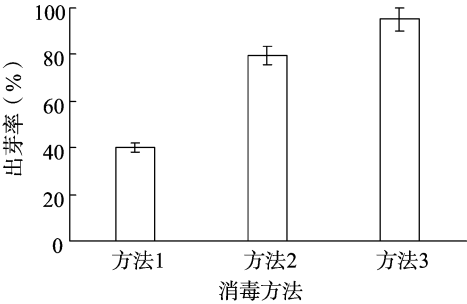


图1 不同消毒方法对鹰嘴豆出芽率的影响

2.2 鹰嘴豆种子萌发培养基的选择

由图 2 可知,5 种不同的培养基都可使鹰嘴豆种子发芽,其中萌发率最高的是 1/2MS。MS、B<sub>5</sub>、1/2B<sub>5</sub> 培养基中鹰嘴豆种子萌发率相差不大,但都不及 1/2MS 培养基,而鹰嘴豆种子在水中的萌发率最低。因此,使用 1/2MS 培养基作为鹰嘴豆种子萌发培养基。

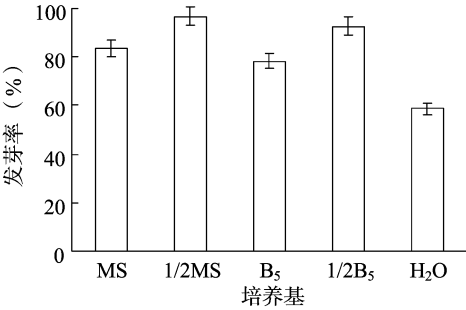


图2 不同培养基对鹰嘴豆种子萌发的影响

2.3 不同浓度 IBA 对成苗的影响

通过对添加不同浓度的 IBA 对鹰嘴豆成苗的结果进行对比后发现:0.5、1 mg/L 的 IBA 对鹰嘴豆的成苗有促进作用,且鹰嘴豆幼苗长势旺盛,相对不添加 IBA 的培养基成苗周期缩短 2~3 d,以 0.5 mg/L IBA 效果最佳;而 1.5 mg/L 的 IBA 对鹰嘴豆的成苗有抑制作用,鹰嘴豆种子在该浓度的培养基上生长缓慢,成苗周期延长(图 3)。

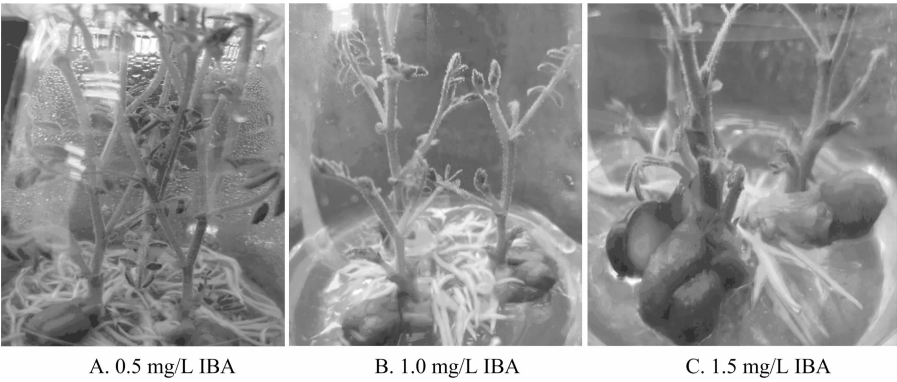


图3 不同浓度IBA对成苗时间的影响

2.4 外植体大小对愈伤组织形成的影响

通过对接种不同大小的外植体对鹰嘴豆愈伤组织形成结果的观察,发现 0.5、0.8 cm 的外植体在相同时间内都可形成愈伤组织,但是 0.5 cm 的茎段形成的愈伤组织过小,不利于后续试验的进行;0.8 cm 的茎段形成的愈伤组织大小合适,愈伤组织的状态良好;1.5 cm 的茎段形成的愈伤组织两头大中间小,且有栓质化的情况出现。从图 4 可以看出,鹰嘴豆茎段形成愈伤组织的大小以 0.8 cm 左右较为适宜。

2.5 激素对鹰嘴豆愈伤组织形成的影响

通过对不同激素组合的出愈结果的统计(表 1),发现 2,4-D 对愈伤组织的形成有重要影响,6-BA 对愈伤组织的形成效果不明显,但是对愈伤组织的分化有一定作用。因此,

诱导鹰嘴豆愈伤组织形成的最适培养基组合为 B<sub>5</sub> + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA。

3 结论与讨论

3.1 种子消毒剂的选择

由于鹰嘴豆种子保存条件的限制,在试验中培育无菌苗时会在一段时间后会有一层黄色的细菌覆盖培养基,影响鹰嘴豆发芽,因此应先对鹰嘴豆种子的消毒方法进行选择,以获得长势优良的无菌苗。在消毒方法的选择上,由于氯化汞对人体和植物都有毒害作用,且毒害不易被除去,还会导致鹰嘴豆种子褐化而不发芽的问题,所以选择对鹰嘴豆种子毒害较小且能有效杀菌的方法,本研究发现用 75% 乙醇和 5% 次

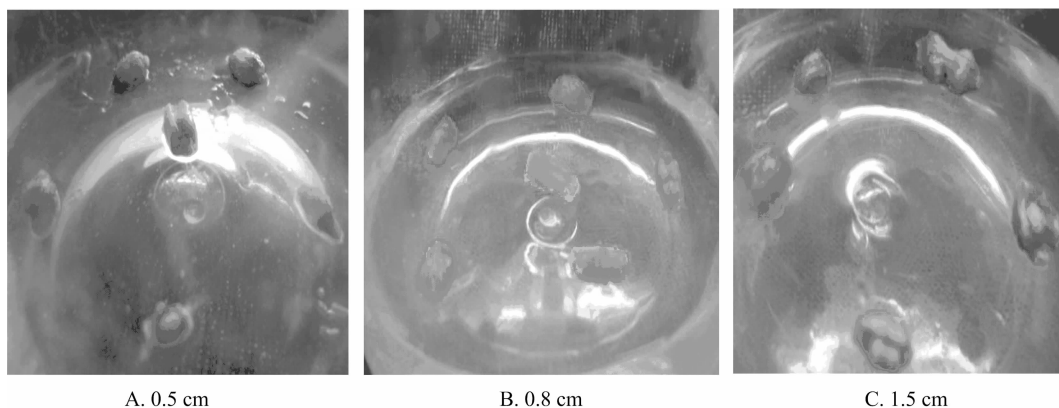


图4 外植体大小对愈伤组织形成的影响

表1 不同激素浓度对鹰嘴豆愈伤组织出愈率的影响

培养基编号	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	死亡率 (%)	出愈率 (%)
1	1	0	10.0	90
2	2	0	0	100
3	3	0	10.0	90
4	1	1	12.5	87
5	1	2	0	100
6	1	3	15.0	85
7	2	1	12.5	87
8	2	2	10.0	90
9	2	3	10.0	90

氯酸钠溶液配合使用的方法可对鹰嘴豆种子进行有效消毒。培养基中生长一段时间后出现的黄色细菌,分析认为可能是鹰嘴豆的内生菌污染。

在进行鹰嘴豆愈伤组织诱导的过程中发现,不同激素组合对鹰嘴豆愈伤组织形成和分化有明显的影 响,单独使用 2,4-D 的培养基对愈伤组织诱导有很好的效果,6-BA 对愈伤组织的诱导作用在本试验中表现不明显,但对愈伤组织的分化具有重要作用,这与解继红等的研究结果<sup>[8]</sup>相符。

### 3.2 硝酸银对鹰嘴豆愈伤组织分化及诱导不定芽的影响

在鹰嘴豆不定芽的诱导试验过程中发现,一定浓度的硝酸银溶液对鹰嘴豆愈伤组织的分化有较好效果,但可能会导致愈伤组织出现畸形分化的现象,分析可能与银离子的毒害作用有关,可以尝试在继代培养时采用隔代添加的方式来防止这种毒害作用,但添加适宜浓度的硝酸银对不定芽的诱导有利<sup>[9]</sup>;由于不同激素浓度对愈伤组织分化有比较大的影响,也可能与培养基中 2,4-D 和 6-BA 浓度不合适有关。

### 3.3 防止外植体褐化的方法

植物离体培养所面临的一个主要的问题是外植体褐化,外植体的褐化受多种因素影响。目前认为造成外植体褐化的原因主要有 2 个方面,分别是生物体内的多酚氧化酶的氧化作用引起的褐变和非酶促的褐变<sup>[10]</sup>。植物组织离体培养过程中使用防止外植体褐化的添加物种类繁多,为减少外植体的褐化和坏死,通常需要在培养基中加入适当浓度的抗氧化剂如二硫苏糖醇(DTT)、PVP、L-半胱氨酸、维生素 C、活性炭、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)等,但是效果有较大的差

异,且存在物种的差异<sup>[11-12]</sup>。在继代过程中也可通过添加活性炭来防止愈伤组织的褐化,活性炭是一种较强的吸附剂,它可以吸附培养物分泌到培养基中的酚、醌等有害物质,从而有效减轻褐变。需要注意的是,活性炭在吸附有害物质的同时也吸附培养基中的生长调节物质,而使其失去作用,影响外植体的正常发育。因此,在加入活性炭的培养基中应适当改变激素配比,使得在防止褐变的同时,外植体能够正常的发育。本研究发现,在培养基中添加抗氧化剂 PVP 可以有效抑制鹰嘴豆外植体的褐变。

### 参考文献:

- [1] 寇思荣,王思慧. 几个鹰嘴豆品种资源抗旱性的直接鉴定[J]. 干旱地区农业研究,1997,15(3):120-123.
- [2] 姚正良,刘 秦. 鹰嘴豆种质资源鉴定及开发利用前景[J]. 甘肃农业科技,2001(8):17-18.
- [3] 海力前木·卡地尔,艾拜都拉·阿布都. 新疆迪西型鹰嘴豆中脂肪和蛋白质组分的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(17):10241-10243.
- [4] 阿米娜·阿布力米提,祖丽哈娅提·那思尔丁,刘 成,等. 诺胡提(鹰嘴豆)的开发利用研究[J]. 新疆农业科学,2002,39(1):45-47.
- [5] Pua E C,Davey M R. Biotechnology in agriculture and forestry;transgenic crops IV[M]. Heidelberg:Springer-Verlag,2007:251-252.
- [6] Graham P H,Vance C P. Legumes:importance and constraints to greater use[J]. Plant Physiology,2003,131(3):872-877.
- [7] 解继红,云锦凤,杨 斌,等. 2,4-D 和 BAP 对蒙古冰草幼胚愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 中国草地,2006,28(2):44-47.
- [8] 金宝燕,苏 华,任华中. 硝酸银等因素对黄瓜直接不定芽诱导的影响[J]. 中国蔬菜,2006(6):21-22.
- [9] Asmus B,Hanne H. Enzymatic browning of vegetables calibration and analysis of variance by mutiway methods[J]. Chemometrics Intelligent Laboratory Systems,1996,34(1):85-102.
- [10] 刘兰英. '薄壳香'核桃组培中的褐化及防止措施研究[J]. 园艺学报,2002,29(2):171-172.
- [11] 郑 颖,秦红玫,黎云祥. 台湾桉木组织培养中污染和褐化的防止[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):64-65,117.
- [12] 宋钦虎,郭新梅,裴玉贺,等. 抑制玉米幼胚愈伤组织褐化的研究[J]. 农学报,2012,2(5):24-28.