

玉环剪豆茎尖脱毒与快繁技术

林颖^{1,2}, 刘永立^{1*}

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029; 2. 浙江省玉环县文旦实验厂, 浙江玉环 317600)

摘要 [目的]研究玉环剪豆的茎尖脱毒及快繁技术。[方法]选用含1~2个叶原基的玉环剪豆无菌苗茎尖为外植体,筛选其最佳脱毒培养基,并建立其组培快繁体系。[结果]玉环剪豆茎尖脱毒及诱导的最佳培养基为MS+1.0 μmol/L 6-BA+0.5 μmol/L NAA,成活率可达75.0%;RT-PCR检测结果显示试管苗脱毒率超过90%;脱毒苗茎段快繁的最佳配方为MS+10.0 μmol/L 6-BA+0.5 μmol/L NAA;脱毒苗在MS+20 μmol/L NAA培养基上的生根率达80%以上。[结论]该研究建立了一套适宜玉环剪豆地方品种的脱毒快繁体系,为玉环剪豆脱毒组培苗的工厂化生产奠定了基础。

关键词 玉环剪豆;茎尖培养;脱毒;快速繁殖

中图分类号 S643.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00046-01

Virus-free and Rapid Propagation Technology of *Pisum sativum* L.

LIN Ying et al (College of Agricultural and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029)

Abstract [Objective] The aim was to study the *in vitro* virus-free and rapid propagation technology of *Pisum sativum* L. [Method] The optimal virus-free medium was screened by using shoot tips with 1 to 2 leaf primordia of *P. sativum* aseptic seedling as explants. Then its tissue culture and rapid propagation system was established. [Result] The optimal medium for the induction of adventitious buds was MS + 1.0 μmol/L 6-BA + 0.5 μmol/L NAA and the survival rate could reach 75%; the RT-PCR results showed that the virus-free rate of shoot tip was over 90%; the optimal medium for bud multiplication was MS + 10.0 μmol/L 6-BA + 0.5 μmol/L NAA and the multiplication multiple reached 3.1 times; the average rooting ratio of the high-quality seeding was 80% in the MS + 20 μmol/L NAA medium. [Conclusion] This study established a set of suitable virus-free and rapid propagation system for local varieties of *P. sativum*, and provided foundation for the industrialized production of virus-free tissue culture seedlings of *P. sativum*.

Key words *Pisum sativum* L.; Shoot tip culture; Virus-free; Tissue culture; Rapid propagation

玉环剪豆(*Pisum sativum* L.)为软荚豌豆,是我国玉环县名特优农产品,被列为浙江省地方农家蔬菜良种,种植历史悠久,因采收豆类用剪刀而得名^[1]。其嫩荚色泽翠绿、脆嫩多汁、味道鲜美、清香爽口,风味独特、营养价值高,具有延缓衰老、美容保健等功能。玉环剪豆生长强健,适应性广,不用支架,易栽培,每年8月上旬早播,10月上市,既缓解了秋末蔬菜淡季,填补市场早期豆类蔬菜的空缺,又是农田种植结构调整中秋冬季的一熟高效益作物。收青荚后的茎叶既是饲草又是优质绿肥。因此,种植玉环剪豆不仅有显著的经济效益,又有良好的社会效益和生态效益。但近年来剪豆的病毒发病率呈上升趋势,感染后植株结荚少或不结荚,给剪豆生产造成了严重损失^[1]。蚕豆萎焉病毒病(BBWV)和黄瓜花叶病毒(CMV)是侵染剪豆的主要病毒,病毒主要通过种子和蚜虫传播,病毒一般通过种子传播而形成初侵染源,在田间再通过蚜虫传播而造成病害流行^[2]。采用组培方法使之脱毒,以产生无毒苗,并由此获得无毒种子,减少剪豆病毒初侵染源,可能是防治剪豆病毒病的有效途径之一。目前利用组培生产脱毒苗已在几十种植物上取得成功^[3-8],但有关剪豆茎尖脱毒苗的培育研究还尚未见报道。笔者以玉环优良的农家剪豆品种为材料,采用热处理结合茎尖培养的方对剪豆进行脱毒研究,以期探索一套适合玉环剪豆地方品种脱毒快繁的技术体系,为玉环剪豆脱毒组培苗的工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料 试验材料为采自玉环县的优良农家玉环剪豆。

1.2 无菌苗获得 将剪豆种子用自来水冲洗干净,在超净台上用75%的乙醇表面浸泡1 min,再转入0.1% HgCl₂溶液中浸泡15 min,无菌水漂洗3~5次后,接种于1/2MS培养基中培养,14 d左右长出幼苗供试验备用。

1.3 茎尖切取与培养 在双目解剖镜下,切取大小约为0.5 mm的无毒苗茎尖,并将其接种于含不同浓度萘乙酸(NAA)和6-苄氨基嘌呤(6-BA)的MS培养基中(表1)。培养条件:在(35±1)℃下培养2周后,将培养温度改为(25±1)℃,湿度50%,光照强度2 000~3 000 Lx,光照时间12~16 h/d。

1.4 试管苗脱毒鉴定 用RT-PCR进行试管苗脱毒鉴定。

1.5 脱毒苗快速繁殖试验 将已诱导成活的芽接种至以MS为基本培养基,添加不同浓度的NAA和6-BA(表2)的增殖培养中,置于温度25℃,光照强度2 000 Lx,光照时间12 h/d的环境中培养。培养30 d后统计植株高度、叶片数、根数等生长情况。

1.6 生根与移栽 将剪豆无菌苗接种至以1/2MS为基本培养基,并添加一定量NAA的生根培养基中进行生根培养。将生根的组培苗,移栽入无菌的营养土中,用烧杯扣上保湿,锻炼1周后,移入网室中。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对茎尖成活率的影响 茎尖成活的关键因素是茎尖的大小,且同一大小茎尖的成活率与其培养激素的浓度有关。表1表明,长度0.5 mm的茎尖在MS+6-BA 1.0 μmol/L+NAA 0.5 μmol/L培养基中的成活率最高,达

(下转第136页)

基金项目 玉环县科技局科技计划项目。

作者简介 林颖(1967-),男,浙江台州人,农艺师,从事园艺植物研究与推广工作, E-mail: liny5567@163.com。* 通讯作者,教授,博士,从事园艺植物生物技术方面的研究, E-mail: liyongli@zju.edu.cn。

收稿日期 2012-11-13

用具有良好效果,如刘雯^[18]等用生物球与植物一起净化污水就取得明显效果。

参考文献

- [1] 侯松. 精养池塘水质调控关键技术[J]. 河南水产, 2012(1): 18.
- [2] 吴伟. 应用复合微生物制剂控制养殖水体水质因子初探[J]. 湛江海洋大学学报, 1997, 17(1): 16-20.
- [3] 张庆, 李卓佳. 复合微生物对养殖水体生态因子的影响[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 43-47.
- [4] 苏志峰. 精养鱼池水质生物净化的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008: 15-16.
- [5] 林连升, 岳春梅, 佟雪红, 等. 养殖池塘水质生物净化效果试验[J]. 渔业现代化, 2005(6): 16-18.
- [6] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 224-226, 279-281, 694-697.
- [7] 陈佳荣. 水化学实验指导书[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 126-131, 147-149.
- [8] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 2版. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 162-163.

- [9] 巩波, 周毓晶. 城市污水处理方法探讨[J]. 中国科技博览, 2012(21): 186.
- [10] 程金平, 胡雄星, 郑敏, 等. 黄浦江水体生物膜对有机氯农药的富集[J]. 上海交通大学学报, 2007, 41(7): 1181-1188.
- [11] 徐会香, 刘长亮. 浅述污水生化处理工艺中填料的选择与应用[J]. 中国科技纵横, 2012(11): 60.
- [12] 瑛栋, 罗益锋. 碳纤维在水环境治理中的应用——21世纪的崭新课题[J]. 高科技纤维与应用, 2012, 37(4): 49-56.
- [13] 褚淑伟, 肖继波, 张立钦, 等. 一种新型竹纤维生物膜载体的制备与性能[J]. 林业科学, 2012, 48(7): 128-133.
- [14] 王晟, 王晓昌, 张玉先, 等. 生物滤池用于深度处理时的数学模型[J]. 中国给水排水, 2003, 19(4): 26-28.
- [15] 宋协法, 曹涵, 彭磊. 一种新型滤料在循环养殖水处理中的应用[J]. 环境工程学报, 2007, 12(1): 27-31.
- [16] 傅金祥, 陈正清, 赵玉华, 等. 挂膜方式对曝气生物滤池的影响[J]. 水处理技术, 2006, 32(8): 42-45.
- [17] 王晋, 马文林, 齐嵘. 新型固定床生物膜反应器硝化性能的研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2001(1): 90-92.
- [18] 刘雯, 丘锦荣, 卫泽斌, 等. 投加生物球对植物-生物膜氧化沟净化污水的影响[J]. 广东农业科学, 2009(6): 148-150, 157.

(上接第46页)

75.0%, 说明较低浓度的6-BA和NAA组合有利于茎尖的生长, 但随着6-BA浓度的增加, 茎尖褐变严重, 甚至开始死亡。

表1 不同激素配比对茎尖成活率的影响

处理	激素浓度// $\mu\text{mol/L}$		接种总数 个	成活数 个	成活率 %
	6-BA	NAA			
1	0.1	0	24	5	20.0
2	1.0	0	24	13	65.0
3	10.0	0	24	9	37.5
4	0.1	0.5	24	6	25.0
5	1.0	0.5	24	18	75.0
6	10.0	0.5	24	10	41.7
7	0.1	1.0	24	3	12.5
8	1.0	1.0	24	12	50.0
9	10.0	1.0	24	14	58.3

2.2 不同激素浓度对比对芽增殖的影响 将诱导成活的芽分别接种于含不同激素配比的MS培养基中进行培养, 1周后不定芽开始膨大, 4~5周后茎尖开始分化出丛芽, 但不同激素组合的增殖效果不同(表2)。在一定NAA浓度下, 芽增殖倍数随6-BA浓度的增加而增加, 其中处理3(10.0 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAA)的增殖倍数为3.1, 增殖效果最佳, 且新芽发育正常, 继代2~3次后生长良好。因此, 可选用MS + 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAA作为剪豆茎尖不定芽增殖的培养基。

表2 不同激素浓度对比对芽增殖的影响

处理	激素浓度// $\mu\text{mol/L}$		茎尖总数 个	出芽总数 个	增殖倍数
	6-BA	NAA			
1	0.1	0.5	24	28	1.2
2	1.0	0.5	24	46	1.9
3	10.0	0.5	24	75	3.1
4	0.1	1.0	24	26	1.1
5	1.0	1.0	24	38	1.6
6	10.0	1.0	24	68	2.8

2.3 芽的生根与移栽 根的诱导试验表明, 以1/2MS + 20 $\mu\text{mol/L}$ NAA培养基的生根效果最好。在无菌的营养基质中试管苗移栽成活率达85%左右。

2.4 脱毒检验 经观察及RT-PCR试验检测, 发现经35 $^{\circ}\text{C}$ 处理2周后, 0.5 mm长茎尖脱毒效果最好, 达90%。但脱毒苗的脱毒效果尚需采用血清学方法进行进一步测定。

3 结论与讨论

大量试验证明, 切取幼芽的茎尖分生组织, 经组织培养获得脱毒苗是解决品种退化、提高作物产量和品质的有效途径。而且在高于正常温度的培养条件下植物组织中的病毒粒子, 可被部分或完全地钝化, 有利于提高脱毒效果。该试验以玉环剪豆茎尖为外植体, 结合高温处理研究了不同激素组合对芽诱导与增殖的影响以及茎尖脱毒效果, 结果表明, 以MS为基本培养基, 附加不同浓度6-BA和NAA, 均可直接诱导出芽并成苗, 芽初代诱导的适宜培养基为MS + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAA; 不定芽增殖的适宜培养基为MS + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAA。通过反复试验, 选取剥离0.5 mm带有1~2个叶原基的茎尖进行培养, 可获得90%以上的脱毒率, 脱毒效果较明显, 但仍有10%左右的材料无法消除病毒, 因此, 该脱毒方法需进一步研究与改进。该试验通过对外植体取材及培养条件的优化, 建立了适宜玉环剪豆的脱毒与快繁体系, 为培育优质、高产的玉环剪豆提供了有效途径, 对解决品种种性退化、促进当地农业和农村经济发展、提高农民收入具有重要意义。

参考文献

- [1] 洪方云, 李兴良, 王珍彩, 等. 玉环剪豆[J]. 上海蔬菜, 2008(2): 23-24.
- [2] 周雪平, 濮祖芹. 国外豌豆病毒病的种类及防治[J]. 植物保护, 1994, 20(1): 31-32.
- [3] 董淑英, 孙静, 潘忠强, 等. 苹果茎尖脱毒技术研究[J]. 河北农业科学, 2001, 5(2): 30-35.
- [4] 文锦芬, 邓明华, 戈振扬, 等. 辣椒茎尖培养脱毒研究[J]. 昆明理工大学学报, 2002, 27(6): 158-160.
- [5] 江洪如, 余发新, 朱祺, 等. 龙牙百合茎尖脱毒快繁及种球培育技术[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(6): 953-956.
- [6] LIU L M, LI S, YU K X, et al. Rapid propagation of virus-free sugarcane plantlets via temporary immersion bioreactor system[J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(5): 148-150, 190.
- [7] 江洪如, 余发新, 刘腾云, 等. 金边瑞香茎尖脱毒及快繁技术[J]. 南昌大学学报, 2008, 32(1): 59-61.
- [8] 董越, 张丹, 靖凯. 浅谈马铃薯薯脱毒苗组培快繁技术[J]. 园艺与种苗, 2012(2): 17-18, 31.
- [9] HU X P, ZHANG X J, ZHU Y T, et al. Screening of the differentiation medium for virus-free test-tube seedling from stem tips of *Dioscorea opposita* [J]. Medicinal Plant, 2010, 1(4): 8-9.
- [10] 苗利娟, 韩锁义, 张新友, 等. 怀山药茎尖脱毒培养与茎段增殖研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(11): 123-125.
- [11] 许传俊, 黄瑞梅, 曾碧玉, 等. 植物组织培养脱毒技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3): 1318-1320, 1335.
- [12] 李志强, 王晶, 丁国亮, 等. 草莓热处理结合茎尖脱毒技术研究[J]. 北方园艺, 2012(5): 125-127.