

绿豆耐盐愈伤组织的诱导

贾学方,王 超

(东北农业大学 园艺学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为探讨绿豆品种的耐盐性,利用离体培养技术,将吉绿 3 号绿豆种子在 MS 培养基中培养获无菌苗,然后将其子叶,下胚轴,胚根分别做为外植体放入诱导培养基产生胚性愈伤组织,培养基中放入的不同浓度 NaCl。对愈伤组织盐胁迫处理,结果表明:当 NaCl 浓度由 0.2% 增加到 1.0% 时,愈伤组织的体积减小,颜色加深,由绿色变至黑褐色至死亡。在含有 1.0% NaCl 诱导培养基上的愈伤组织逐渐变成褐色,最终枯死;将经过 0.6% NaCl 诱导培养存活的愈伤组织、子叶、下胚轴、胚根分别转入含有 0.6%、0.8%、1.0% NaCl 的选择培养基(MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.6 mg·L⁻¹)上,进行比较,鉴定愈伤组织的耐盐性。结果显示:胚根、下胚轴、子叶愈伤组织的最佳盐胁迫浓度分别为 0.4%、0.8%、0.6%。因此,下胚轴的耐盐性最好,子叶一般,胚根最差。

关键词:绿豆;离体培养;愈伤组织;耐盐性

中图分类号:S522 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)08-0010-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.08.0010

土壤盐渍化是影响农业生产和生态环境的重要非生物逆境之一^[1]。提高豆类作物的耐盐性,是开发利用盐渍化土壤,从根本上解决农业生产和环境生态盐渍化问题的有效手段^[2]。绿豆是生态农业、有机农业的重要经济作物,进行绿豆耐盐性研究,对提高盐碱地区作物产量,缓解土壤盐渍化危害具有重要意义^[3]。

本试验用绿豆种子在 MS 培养基中培养无菌苗,然后将其的子叶,下胚轴,胚根分别作为外植体放入诱导培养基里产生胚性愈伤组织,对愈伤组织盐胁迫处理,最后对愈伤组织进行耐盐性鉴定,其目的是通过比较绿豆不同外植体的愈伤组织对耐盐性反映程度的不同来选取最好的耐盐材料,从而培育出耐盐性最好的绿豆品种,供生产生活利用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为吉绿 3 号绿豆种子(*Vigna radiata*),由吉林省农业科学院作物育种研究所提供。

试验所用试剂及仪器设备有 MS 基本培养基、6-BA、2,4-D、NAA、NaCl、酒精、升汞等。三

角烧瓶、培养皿、小刀、解剖针、酒精灯、高压灭菌锅、超净工作台、恒温干燥箱、光照培养箱等。

1.2 方 法

1.2.1 无菌苗的获得 将成熟的绿豆种子用自来水冲洗后,用小刀破皮后,用 75% 酒精消毒 1 min,然后放入 0.1% 的升汞溶液中浸泡 10 min,在超净工作台上用无菌水冲洗 4 次,将处理好的种子接种在事先准备好的种子萌发培养基上,25℃,弱光条件下培养^[4]。

1.2.2 愈伤组织的诱导及最佳诱导培养基的筛选 无菌苗培养 7 d 后,选取下胚轴,子叶和胚根为外植体诱导愈伤组织,下胚轴、胚根剪切成 2~4 mm 的小段,子叶切成 2~4 mm²,接种在诱导培养基上,设计 8 种诱导培养:

- ①MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4D 0.4 mg·L⁻¹
- ②MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4D 0.6 mg·L⁻¹
- ③MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4D 0.8 mg·L⁻¹
- ④MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4D 1.0 mg·L⁻¹
- ⑤MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹
- ⑥MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.6 mg·L⁻¹
- ⑦MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.8 mg·L⁻¹
- ⑧MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹

23~25℃ 条件下诱导愈伤组织。每种培养基 3 瓶,每瓶接种外植体 10 个。以添加 NaCl 作为对照,观察诱导率。计算公式:

诱导率(%)=诱导数/接种数×100

1.2.3 不同浓度 NaCl 对愈伤组织的盐胁迫处

收稿日期:2015-03-11
第一作者简介:贾学方(1989-),女,吉林省蛟河市人,在读硕士,从事蔬菜作物育种研究。E-mail: kuailefang100@126.com。
通讯作者:王超(1966-),男,黑龙江省哈尔滨市人,教授,博士,从事蔬菜育种方面的研究。E-mail: wangchao504@126.com。

理 选取长势最好的一组,其诱导培养加上不同浓度的 NaCl 作为盐胁迫培养基,其浓度分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 共 5 个处理,将下胚轴,子叶,胚根的愈伤组织各取 0.5 cm³ 左右的小块接种到不同浓度的盐胁迫培养基上。每种胁迫培养基 3 瓶,每瓶处理 10 小块愈伤组织(分别是下胚轴,子叶,胚根),在 23~25℃ 条件下培养,调查盐胁迫结果。以不添加 NaCl 作对照^[5]。

1.2.4 愈伤组织耐盐性的鉴定 愈伤组织耐盐性的检测设 3 种培养基(MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.8 mg·L⁻¹),其 NaCl 浓度分别是: 0.6%、0.8%、1.0%。在盐胁迫处理后,将盐胁迫处理之后的愈伤组织的下胚轴、子叶、胚根各取 0.5 cm³ 左右的小块接种到不同浓度的耐盐性选择培养基上,每处理 10 块愈伤组织,在 23~25℃ 条件下培养,调查其耐盐性结果。

表 1 不同诱导培养基对外植体的影响
Table 1 Effect of different induction media on explants

培养基 Medium	子叶 Cotyledons				下胚轴 Hypocotyl				胚根 Embryo root			
	接种数	诱导数	诱导率/%	形态特征	接种数	诱导数	诱导率/%	形态特征	接种数	诱导数	诱导率/%	形态特征
	Vaccination number	Induced number	Induction rate	Morphological characteristics	Vaccination number	Induced number	Induction rate	Morphological characteristics	Vaccination number	Induced number	Induction rate	Morphological characteristics
①	30	18	60	+	30	18	60	+	30	18	60	0,+
②	30	21	70	0,+	30	21	70	++	30	21	70	+
③	30	24	80	++	30	18	60	+	30	21	70	+
④	30	21	70	0,+	30	18	60	0,+	30	21	70	+
⑤	30	24	80	++	30	21	70	++	30	24	80	++
⑥	30	24	80	++	30	24	80	+++	30	24	80	++
⑦	30	27	90	+++	30	27	90	++++	30	27	90	+++
⑧	30	24	80	++	30	21	70	+++	30	24	80	++

“++++”愈伤组织质量最好,体积大,新鲜均匀疏松,绿色;“+++”愈伤组织较好,体积较大,较新鲜疏松,浅绿色;“++”愈伤组织质量较差,体积较小,发暗,较硬,绿中带褐点;“+”愈伤组织质量差,体积小,致密,暗褐色;“0”愈伤组织质量差,体积小,褐化。下同。
“++++”mean best callus,big volume,fresh,even and loose,green;“+++”mean better callus,bigger volume,more fresh and loose,light green;“++”mean poor quality callus,small volume,dark,hard,green and small point;“+”mean poorer quality callus,small size,dense,dark brown;“0”mean poor quality callus,small volume,browning. The same below.

2.2 不同外植体的愈伤组织的耐盐性差异

观察子叶、下胚轴、胚根作为愈伤组织在不同浓度 NaCl 选择培养基的耐盐性差异(见表 2)。将⑦号诱导培养基上获得的子叶的愈伤组织接种在含不同浓度的 NaCl 选择培养基上,发现在对

2 结果与分析

2.1 不同外植体对诱导培养基的筛选

将无菌苗诱导后,观察子叶、下胚轴、胚根在不同培养基中的生长情况(见表 1)。发现子叶、下胚轴、胚根在不同诱导培养基中表现有一定的差异。子叶在①②④和⑦差异非常明显,①②④的愈伤组织在培养过程中表现为深绿色,致密,体积小,后期出现褐点,⑦表现为体积较大,较新鲜疏松,绿色。由此筛选出愈伤组织质量最好的一组是⑦;下胚轴在①③④和⑦差异非常明显,①③④的愈伤组织在培养过程中表现为质量差,体积小,后期出现绿中带褐点,⑦表现为绿色,结构疏松,体积大,后期仍保持新鲜。由此筛选出愈伤组织质量最好的一组是⑦;胚根在②③④和⑦差异非常明显,②③④的愈伤组织在培养过程中表现为质量差,体积小,后期表面出现黄中带褐点,⑦表现为黄色,愈伤组织较好,体积较大,较新鲜疏松。由此筛选出愈伤组织质量最好的一组培养是⑦。

照组,含 NaCl 0.2%组和 0.4%组愈伤组织长势较好,在 0.6%和 0.8%组生长较差,开始出现愈伤组织死亡,在 1.0%组中的愈伤组织大部分死亡,只有个别存活。试验表明,子叶在 NaCl 含量为 0.2%、0.4%时表现相似,最高耐盐量为 0.

8%，它们随 NaCl 含量的升高其表现变化不大；将⑦号诱导培养基上获得的下胚轴的愈伤组织接种在含不同浓度的 NaCl 选择培养基上，发现在对照组，含 NaCl 0.2%组和 0.4%组愈伤组织长势非常好，在 0.6%组生长较好，0.8%组生长较差，开始出现愈伤组织死亡，在 1.0%组中的愈伤组织大部分死亡，只有个别存活。试验表明，下胚轴在 NaCl 含量为 0.2%和 0.6%，0.6%时表现相似，最高耐盐量为 0.6%；将⑦号诱导培养基上获得的胚根的愈伤组织接种在含不同浓度的 NaCl 选择培养基上，发现在对照组，含 NaCl 0.2%组愈伤组织长势好，在 0.4%组生长一般，开始出现愈伤组织死亡，0.6%组和 0.8%组生长很差，大部分愈伤组织死亡，只有个别存活，在 1.0%组中的愈伤组织全部死亡。试验表明，根随着 NaCl 含量的增高生长量逐渐减小，当 NaCl 为 0.6%，

就出现了死亡现象，所以最高耐盐量为 0.4%。

2.3 不同愈伤组织耐盐性的鉴定

将经过不同浓度盐胁迫的子叶、下胚轴、胚根愈伤组织接种到不同 NaCl 浓度(0.6%、0.8%、1.0%)选择性培养基上，并以普通的愈伤组织为对照。经对比明显发现(见表 3)，普通的子叶、下胚轴、胚根愈伤组织接种到选择性培养基上几乎全部褐化死亡，而经过 0.2%、0.4%、0.6%NaCl 诱导的子叶愈伤组织明显耐盐性要高于普通的子叶愈伤组织，经过 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% NaCl 诱导的下胚轴愈伤组织明显耐盐性要高于普通的下胚轴愈伤组织，经过 0.2%、0.4%NaCl 诱导的胚根愈伤组织明显耐盐性要高于普通的胚根愈伤组织。此外，从诱导率来看，0.6%、0.8%、0.4%的 NaCl 分别为子叶、下胚轴、胚根愈伤组织的最佳盐胁迫浓度。

表 2 愈伤组织在不同浓度 NaCl 培养基中的耐盐性差异

Table 2 Salt resistance difference of callus in different concentration of NaCl medium													
NaCl 浓度/% Concentration of NaCl	子叶 Cotyledons				下胚轴 Hypocotyl				胚根 Embryo root				
	接种数	诱导数	诱导率/%	形态特征	接种数	诱导数	诱导率/%	形态特征	接种数	诱导数	诱导率/%	形态特征	
	Vaccination	Induced	Induction	Morphological	Vaccination	Induced	Induction	Morphological	Vaccination	Induced	Induction	Morphological	
	number	number	rate	characteristics	number	number	rate	characteristics	number	number	rate	characteristics	
0(CK)	30	27	90	+ + + +	30	27	90	+ + + +	30	27	90	+ + + +	
0.2	30	18	60	+ + +	30	18	60	+ + +	30	18	60	+ + +	
0.4	30	18	60	+ + +	30	18	60	+ + +	30	12	40	+ +	
0.6	30	12	40	+ +	30	12	40	+ +	30	6	20	0,—	
0.8	30	6	20	+ ,0	30	6	20	0,—	30	3	10	0,—	
1.0	30	3	10	0,—	30	3	10	0,—	30	0	0	—	

“—”愈伤组织黑褐色，已枯死。
“—”mean black brown callus,ersiccation.

表 3 不同愈伤组织耐盐性的鉴定

Table 3 Salt resistance identification of different callus

NaCl 浓度/% Concentration of NaCl	子叶 Cotyledons									下胚轴 Hypocotyl									胚根 Embryo root								
	0.6			0.8			1.0			0.6			0.8			1.0			0.6			0.8			1.0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
0	30	5	16.7	30	2	7.0	30	0	0	30	6	20.0	30	3	10.0	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0
0.2	30	16	53.3	30	10	33.3	30	2	7.0	30	19	63.3	30	13	43.3	30	2	7.0	30	14	46.7	30	2	7	30	0	0
0.4	30	17	56.7	30	11	36.7	30	3	10.0	30	19	63.3	30	14	46.7	30	4	13.3	30	15	50.0	30	3	10	30	2	7
0.6	30	19	63.3	30	14	46.7	30	5	16.7	30	20	66.7	30	15	50.0	30	4	13.3									
0.8										30	21	70.0	30	17	56.7	30	6	20.0									

a:接种数;b:诱导数;c:诱导率(%)。
a:vaccination;b:induced number;c:induced rate.

3 结论与讨论

以吉绿 3 号绿豆为试验材料培养无菌苗,诱导愈伤组织,不同的外植体(胚根、下胚轴和子叶)的最佳诱导培养基为 MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.8 mg·L⁻¹ NAA。不同外植体的诱导率有所差异,其中下胚轴的诱导率最高,子叶次之,胚根诱导率最低。经过盐胁迫的愈伤组织接种到含不同浓度 NaCl 的选择性培养基中,与未经盐胁迫的愈伤组织比较,其明显地获得了较高的耐盐性^[8]。研究发现,最佳盐胁迫浓度在不同外植体愈伤组织之间有明显差异^[9],子叶愈伤组织最佳盐胁迫浓度为 0.6%NaCl,胚根愈伤组织最佳盐胁迫浓度为 0.4%NaCl,下胚轴愈伤组织最佳盐胁迫浓度为 0.8%NaCl。其中,以由下胚轴为外植体在盐胁迫下,更容易诱导出耐盐的愈伤组织,可以进一步培养分化产生耐盐绿豆突变体的植株。下一步研究工作重点应放在耐盐的愈伤组织分化成苗和筛选出更多不同基因型在离体盐胁迫下诱导出

的耐盐突变体,为绿豆耐盐育种和遗传改良奠定基础^[10]。

参考文献:

[1] 李敏. 绿豆化学成分及药理作用的研究概况[J]. 上海中医药杂志, 2001, 20(5): 15-18.
[2] 张继中, 何太. 绿豆高产栽培技术[J]. 内蒙古农业科技, 2011, 22(1): 138-135.
[3] 邵红雨等. NaCl 对吸胀后绿豆种子发芽和幼苗生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 19(06): 57-66.
[4] 许祥明, 叶和春, 李国风. 植物抗盐机理的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 35(4): 101-104.
[5] 范华美. NaCl 胁迫下 SA 浸种绿豆幼苗的生长及生理特征[J]. 2003, 33(18): 125-130.
[6] Petrusse L M, Winicol L. Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1997, 31(6): 206-216.
[7] 张继中, 何太. 绿豆高产栽培技术[J]. 内蒙古农业科技, 2011, 29(1): 123-125.
[8] 王丽侠. 绿豆几个表型性状的遗传特性分析[J]. 作物学报, 2008, 23(6) 30-35.
[9] 肖媛. 盐渍化对绿豆品种幼苗生长耐盐性的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 35(21): 134-140.
[10] 葛春辉, 计巧灵, 王雪华. 绿豆耐盐性愈伤组织的生理生化特性[J]. 植物研究, 2008, 36(5): 28-89.

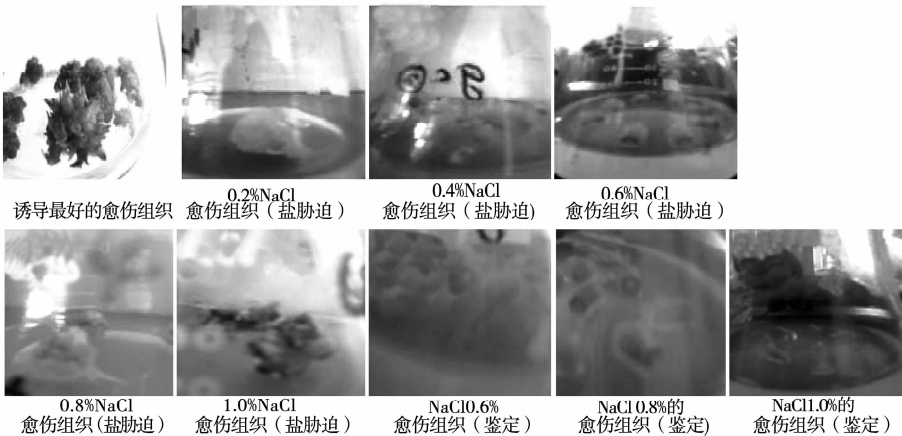
Induction of Salt-tolerant Callus in Mung Bean

JIA Xue-fang, WANG Chao

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: In order to research the salt resistance of mung bean varieties, through the tissue culture technology, the mung bean seed was cultured in the MS medium to get the sterile seedlings, and then serve the cotyledons, hypocotyl, embryo root as the explant into dedifferent inductive medium (according to add nutrients divided into eight kinds) and produced embryonic callus, and making the callus suffered from different salt stress processing that medium added the NaCl with different concentration. The results showed that when NaCl concentration increased from 0.2% to 1.0%, callus volume decreases and color burn became to yellowish brown and black to death. Contained 1.0% NaCl induction medium, the group of gradually turned into brown, eventually die; the survival callus, cotyledon, hypocotyl, and radicle in the 0.6% NaCl induction were transferred to contain 0.6%, 0.8% and 1.0% NaCl choose medium (MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.6 mg·L⁻¹), salt resistance of callus was compared and identified. The results showed that the best salt stress concentration for radicle, hypocotyl and cotyledon callus were 0.4%, 0.8% and 0.6% respectively. Therefore, salt resistance of hypocotyl was better than cotyledon, radicle was the worst.

Keywords: mung bean; in vitro culture; callus; salt resistance



附图 1 愈伤组织诱导

Attached fig. 1 Callus induced