

文章编号:1007-4961(2006)02-0119-05

## 二色胡枝子组织培养的研究

陈佳,陈晓阳,李云

(林木、花卉遗传育种教育部重点实验室,北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083)

**摘要:**为探索建立植株再生系统技术,以二色胡枝子种子为材料,对该树种组织培养进行了研究。结果表明,以0.1%升汞对种子灭菌2 min,发芽率较高,污染率仅为5%;基础培养基为1/2 MS,直立苗比例达到80%以上,显著高于MS和B5培养基;在增殖培养中,BA对分化系数影响最大,NAA其次,ZT的作用不明显,适宜的增殖培养基为1/2 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L,分化系数可达3.15;随着NAA浓度提高,对生根抑制作用加强,其浓度不宜超过0.5 mg/L,IBA对生根有促进作用,浓度以IBA 1.5 mg/L为宜。

**关键词:**二色胡枝子;组织培养;分化系数

中图分类号:Q 943.1

文献标识码:A

### Studies on tissue culture of *Lespedeza bicolor*

CHEN Jia, CHEN Xiao-yang, LI Yun

(Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants,

Ministry of Education of the People's Republic of China,

College of Biology Science and Technology, Beijing Forestry University, 100083, China)

**Abstract:** Tissue culture of *Lespedeza bicolor* was studied in this experiment to develop a regeneration system. The results showed that the best disinfection time for *Lespedeza bicolor* seeds was 2 min with 0.1% HgCl<sub>2</sub>, in which shooting percent reached 32.8%, while polluted percent of the seeds was just 5%. According to the results of experiment with orthogonal design, the concentration of 6-BA was the main factor which had a significant effect on the index of differentiation of buds. NAA was also effective as the second important factor and ZT seemed to have no effect. The optimum differentiation culture medium was 1/2 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L, of which the index of generation could reach 3.15. The concentrations of NAA should be lower than 0.5 mg/L because inhibiting effect on rooting of plants became stronger along with its increasing. IBA had promoting effect on rooting of plants, and the optimum concentration was 1.5 mg/L.

**Key words:** *Lespedeza bicolor*; tissue culture; differentiation index

二色胡枝子(*Lespedeza bicolor*)属于豆科植物,是一种多年生落叶灌木。其枝叶是家畜的优质青饲料;枝条坚实而柔韧,可用于编织和造纸;其花多,且花期长,蜜源量大,可用来大力发展养蜂;而且是极好的薪炭材料;也作为水土资源恢复中的先锋植物,具有显著的水土保持功能。因此,二色胡枝子具有重要的经济和生态价值<sup>[1-5]</sup>。

关于二色胡枝子的栽培,目前仅限于常规的播种和扦插繁殖<sup>[6-9]</sup>,其组织培养至今还没有较为系

统的研究报道<sup>[10,11]</sup>。笔者以河北省平山县的二色胡枝子为材料,对胡枝子的组织培养进行了研究,目的是为建立转基因植株再生系统提供技术。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

材料采自河北省平山的二色胡枝子种子,分别以种子、完整胚苗、去除顶芽的胚苗、带顶芽的茎段以及不带顶芽的茎段等为材料进行试验。

收稿日期:2005-12-20;修改稿收期:2006-03-28

基金项目:国家“863”项目(2002AA241111)和引进国际先进农业科学技术“948”项目(2001-25)。

作者简介:陈佳(1980-),女,江苏常州人,北京林业大学生物科学与技术学院在读硕士研究生。

## 1.2 方法

1.2.1 种子处理方法 直接以浸泡一夜后的种子作外植体进行接种。在超净工作台上用75%的酒精表面灭菌30 s,分别2 min、4 min、6 min用0.1%升汞灭菌,再用无菌水冲洗4次,每瓶放置5~8粒种子接种于MS培养基上,每种灭菌时间下共接150~200粒种子。

1.2.2 启动培养 将无菌苗分别接种到3种培养基(MS、B5和1/2MS),筛选基础培养基。每种培养基上1次接种10株苗,共3次重复。

1.2.3 增殖培养 增殖培养中以去顶胡枝子幼苗为材料,以1/2 MS为基础培养基,采用 $L_9(3^4)$ 正交配比试验<sup>[12,13]</sup>;以BA、NAA和ZT为参数因素(见表1),各因素选取3水平,共9个处理组合。每种组合接种15个材料,重复3次。

表1 增殖培养正交实验设计 mg/L  
Table 1 Orthogonal design for experiment of differentiation culture

水平 Level	BA	NAA	ZT
1	1.0	0.01	0
2	3.0	0.1	0.5
3	5.0	0.5	1.0

1.2.4 生根培养 取胚苗顶芽茎段,以1/2MS为基础培养基,分别采用IBA和NAA单因子诱导,比较其生根条数及粗壮程度,选出最佳浓度。

以上所有的培养基中均添加30 g/L琼脂5~6 g/L,pH值调至6.5~6.8。培养室内均温为20℃,光照时间为14 h,光强为2 200 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子培养

接种10 d后观察并统计污染率和发芽率(见表

表4 生长调节剂对增殖的影响

Table 4 Effect of different growth regulators on differentiation of buds

No.	BA	NAA	ZT	分化系数 Differentiation index
1	1(1.0)	1(0.01)	1(0)	3.15
2	1(1.0)	2(0.1)	2(0.5)	3.00
3	1(1.0)	3(0.5)	3(1.0)	3.25
4	2(3.0)	1(0.01)	2(0.5)	3.00
5	2(3.0)	2(0.1)	3(1.0)	2.57
6	2(3.0)	3(0.5)	1(0)	2.62
7	3(5.0)	1(0.01)	3(1.0)	2.12

2)。由表2可知,随着灭菌时间的延长污染率逐渐下降,在6 min的灭菌时间下污染率降为0,但发芽率也随着灭菌时间的延长而降低,因此综合两个因素来看,最佳的灭菌时间为2 min,因为此时发芽率达到最高,虽然污染率最高,但也仅为5%。

表2 不同灭菌时间下的污染率发芽率比较

Table 2 Effect of different disinfection time on the rate of polluting and germinating of seeds

灭菌时间/min Disinfection time	污染率/% Polluting rate	发芽率/% Germinating rate
2	5	32.8
4	3.8	9.2
6	0	0

### 2.2 启动培养

接种10 d后,幼苗的长势结果见表3。由表3可知,MS和1/2 MS培养基上长出的幼苗平均高相差不大,均好于B5,从直立苗所占的比例来看,MS和B5培养基上有近半数的幼苗由于长势孱弱而倒伏在培养基上,1/2 MS上仅为15%。因此,增殖培养中选取1/2 MS培养基作为基础培养基。

表3 不同培养基上的苗高及直立苗率对比

Table 3 Comparison of average height of plants and rate of perpendicular plant among different culture mediums

培养基 Medium	苗平均高/cm Mean plantlet height	直立苗率/% Perpendicular plantlet rate
MS	4.62	56.8
1/2 MS	4.64	85.3
B5	4.04	57.1

注:标准定为茎直立,表3为符合这一标准的比例。

### 2.3 增殖培养

以去顶芽胚苗为试验材料按正交设计安排增殖培养试验。17 d后观察记录,并统计分化系数,结果见表4。

续表 4  
Continued from Table 4

No.	BA	NAA	ZT	分化系数 Differentiation index
8	3(5.0)	2(0.1)	1 (0)	1.55
9	3(5.0)	3(0.5)	2 (0.5)	2.19
K <sub>1</sub>	9.4	8.27	7.32	≥23.45
K <sub>2</sub>	8.19	7.12	8.19	
K <sub>3</sub>	5.86	8.06	7.94	
X <sub>1</sub>	3.13	2.76	2.44	
X <sub>2</sub>	2.73	2.37	2.73	
X <sub>3</sub>	1.95	2.69	2.65	
R	1.18	0.39	0.29	
SS	2.16	0.25	0.13	
MS	1.08	0.125	0.065	F <sub>0.05</sub> = 19
F	216**	25*	13	F <sub>0.01</sub> = 99
BA 多重比较	X <sub>1</sub> = 3.13 X <sub>2</sub> = 2.73 X <sub>3</sub> = 1.95	X <sub>1</sub> - X <sub>3</sub> = 1.18** X <sub>2</sub> - X <sub>3</sub> = 0.78**	X <sub>1</sub> - X <sub>2</sub> = 0.4*	Se = 0.041
NAA 多重	X <sub>1</sub> = 2.76 X <sub>3</sub> = 2.69 X <sub>2</sub> = 2.37	X <sub>1</sub> - X <sub>2</sub> = 0.39* X <sub>3</sub> - X <sub>2</sub> = 0.32	X <sub>1</sub> - X <sub>3</sub> = 0.07	D <sub>0.05</sub> = 0.34 D <sub>0.01</sub> = 0.78

注:分化系数是指分化苗数/去顶芽胚苗数。

2.4 生根培养

幼苗转到生根培养基上 17 d 后,统计结果见表 5 和表 6。在 IBA 诱导下,随着浓度的增大(1.0 mg/L 由于污染严重暂不考虑),胡枝子生根率、平均生根数以及根的粗壮程度也都有所增加,所以利用 IBA 诱导生根浓度为 1.5 mg/L 时最佳。NAA 生根诱导恰恰相反,随着浓度的增大,生根率、平均生根数、根平均长等均呈下降趋势,而且有愈伤组织生成,在愈伤上生根不利于苗移栽成活,因此利用 NAA 诱导生根浓度不宜高于 0.05 mg/L。

对分化系数进行方差分析,可见 BA 和 NAA 对分化系数有显著影响,其中 BA 的影响达到了极显

表 5 IBA 对组培苗生根的影响

Table 5 Effect of IBA on rooting of plantlets in tissue culture

浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	生根率/ %	平均生 根数	根均长/ cm	生根 情况
Concentra- tion	Rooting rate	Mean roots number	Mean root length	Growth status
0.1	66.7	1	1.25	略有分叉,根较细
0.5	100	1.8	1.76	须根多
1.0	50	1.375	0.73	污染严重
1.5	100	2.44	1.29	根较粗壮,有许多分叉

表 6 NAA 对组培苗生根的影响

Table 6 Effect of NAA on rooting of plantlets in tissue culture

浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	生根率/ %	平均生 根数	根均长/ cm	生根 情况
Concentra- tion	Rooting rate	Mean roots number	Mean root length	Growth status
0.05	88.9	1.515	2.22	根四散,坚固, 多分叉,粗壮
0.1	70	0.74	1.7	较坚固,粗壮
0.5	60	0.86	1	有愈伤,根粗短
1.0	22.2	0.56	0.67	在愈伤上长根, 且有落叶,叶子枯黄

著(见表 5),而 ZT 影响不明显。对 BA 和 NAA 的多重比较可知(见表 6),BA 的第一水平与第三水平差异显著度在临界值  $\alpha = 0.01$  之上,而第一水平与第二水平和第二水平与第三水平的差异在  $\alpha = 0.05$  之上,所以 BA 的最佳浓度为 1.0 mg/L; NAA 的第一水平和第二水平差异在  $\alpha = 0.05$  之上,所以 NAA 最佳浓度为 0.01 mg/L 时。因此,通过该正交试验得出的最佳增殖配方为 1/2 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L。

### 3 结论与讨论

本试验主要采取直接利用种子在培养基中发芽获得外植体,但总体来说发芽率不高,原因可能是胡枝子的种子硬实率较高<sup>[8,9]</sup>。因此,在以后的试验中可以考虑先用浓硫酸浸种的方法,浸种的时间需要进一步摸索。此外,笔者曾采用先将种子放在培养皿中在光照培养箱中进行萌发,之后对幼苗进行灭菌然后接种在培养基中的方法,但由于新芽长出以后再行进行灭菌接种污染率较高,如果直接利用培养皿中萌发的幼苗,建议采用种子萌发长出1~2 cm时的幼苗作为外植体,苗再高不利于灭菌。

组织培养的优势就是利用分化系数指数增长特点,在短期内获得大量具有优良遗传性状的苗木。因此,增殖培养配方的选择至关重要。

安利佳等在对豆科31种材料进行研究时曾对3种胡枝子的组培进行了简单的试验<sup>[11]</sup>,其基础培养基是在MS和B5基础上改良的一种培养基,激素浓度为2,4-D 0.5 mg/L + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + KT 1.0 mg/L + GA3 1.0 mg/L,但分化效果不太好,分化率在19.9%~62.3%之间。赖荣坤在其学士论文中也曾对二色胡枝子的组培进行了初步研究<sup>[10]</sup>,其筛选出的分化培养基配方为MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。笔者利用这个配方进行培养发现,虽然其生长状况不错,但没有丛生芽出现,分化率不高。BA与NAA的不同浓度配比常常被用来诱导不定芽,因此,以胚苗的带顶芽茎段和不带顶芽茎段做增殖培养的预实验,BA/NAA的比例分别为200,100,40,20和10,结果发现,对于不带顶芽茎段,BA/NAA在40~200时其分化系数均在2.7左右,而BA/NAA为10和20时其分化系数接近2,而分化率差异不显著,均大于等于75%;对于带顶芽茎段,分化情况明显不如只带侧芽的茎段,它们的分化系数都低于2,分化率小于等于50%。因此,去顶芽的胚苗为材料,采用了正交试验,通过不同浓度的植物生长调节剂的筛选,确定最佳增殖配方为1/2MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L,在这种培养基下,分化系数可以达到3左右。该配方中BA/NAA的比例为100,也正在40~200之间。

细胞分裂素与生长素的比例高低决定了外植体的发芽或者生根。通常情况下,高的细胞分裂素/生长素有利于增殖分化,可以通过调节细胞分裂素与生长素的种类、比例以及组合从而达到较好的增殖效果<sup>[14,15]</sup>。该试验主要是考虑了BA、NAA以及ZT

的因素,结果表明,ZT浓度对胡枝子分化没有显著影响,而BA/NAA比为100时可以取得较好的分化效果,但分化系数仅为3左右。由于ZT价格较贵,因此进一步实验可以考虑其他的分裂素和生长素种类及组合,如在BA和NAA的基础上添加2,4-D,从而筛选出更好的配方以达到更高的分化系数。

生根培养中选择了两种植物激素进行单因子诱导试验,结果发现在IBA浓度为1.5 mg/L或NAA浓度为0.05 mg/L时,其生根率、根均长、长势等均为最佳。研究中发现,随着浓度的升高,IBA可以促进生根,而NAA则对生根有抑制作用。有关的文献报道,随着生长素浓度(IBA或NAA)的增加,不同的植物表现出不同的生根结果,如在四倍体刺槐的生根培养中,随着NAA浓度从0到1.0 mg/L的升高过程中,其生根状况逐渐达到最佳<sup>[16]</sup>,这和本研究中NAA浓度的升高抑制生根的结果恰恰相反,不过更多的研究显示随着浓度的升高,生长素先是促进生根,当达到一定浓度后则抑制生根<sup>[17-20]</sup>。对于每一种植物,都有一个对应的最佳浓度,过高的激素浓度都会抑制生根<sup>[21-24]</sup>。因此,胡枝子生根培养再深入的实验可以考虑升高IBA浓度或降低NAA浓度,从而筛选出更好的配方。

致谢:实验过程中得到了丁霞、李慧、李忠秋等同学的帮助,在此一并致谢。

#### 参考文献:

- [1] 奚同行,林圣玉.枝子的开发利用价值及发展前景[J].中国水土保持,1995,(4):42-44.
- [2] 邹德斌,宋占民,王 萍.胡枝子制浆造纸的初步研究[J].纸和造纸,1996,(2):40-41.
- [3] 顾振文,程润柏,黄金明,等.胡枝子林的营造管理技术及水保效益分析[J].中国水土保持,1996,(5):29-31.
- [4] 陈默君,李昌林,祁 永.胡枝子生物学特性和营养价值研究[J].自然资源,1997,(2):74-81.
- [5] 宁国赞,刘惠琴,白新学,等.胡枝子根瘤菌优良菌种筛选及应用[J].土壤肥料,1995,(5):41-44.
- [6] 杨艳生,刘柏根,沙寄石.水土资源恢复中的先锋豆科灌木——胡枝子的栽植研究[J].长江流域资源与环境,1994,3(4):330-336.
- [7] 刘合刚,刘国杜.细梗胡枝子的栽培技术[J].时针国医国药,2001,12(7):671-672.
- [8] 李昌林,陈默君.胡枝子种子萌发及幼苗生长[J].黑龙江畜牧兽医,1994,(7):18-21.
- [9] 徐兴友,刘永军,孟宪东,等.阴山胡枝子种子硬实与萌发特性研究[J].种子,2004,23(9):3-5.
- [10] 赖荣昆.二色胡枝子的组培快繁技术研究[D].北京:北京林业大学,2002.

- [11] 安利佳,李凤霞,张俊敏,等.豆科植物组织培养的研究[J].植物学报,1992,34(10):743-752.
- [12] 续九如,黄智慧.林业试验设计[M].北京:中国林业出版社,1995.
- [13] 李春喜,王文林.生物统计学[M].北京:科学出版社,1998.
- [14] 李 云.林果菜花组织培养快速育苗技术[M].北京:中国林业出版社,2001.
- [15] Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro[J]. Symp SocExp Biol, 1957, 11: 118-131.
- [16] 郑亚琴.不同激素配方对四倍体刺槐组织培养的影响分析[J].种子,2005,24(7):76-77.
- [17] Al - Maarri K, Arnaud Y, Miginiac E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane' seedlings and cultivar 'Williams': factors affecting root formation in vitro and ex vitro[J]. Scientia Horticulturae, 1994, 58(3):207-214.
- [18] 胡建刚,郭继善.无花果的组织培养[J].南京林业大学学报,1994,18(3):73-76.
- [19] 李平英,赵秋玲,韩云花,等.一品红组织培养技术研究[J].甘肃农业科技,2005,30(1):27-30.
- [20] 刘 杰,罗晓芳,陈雪梅.美国红栎的组织培养与快速繁殖[J].河北林果研究,2004,19(1):63-65.
- [21] Casimiro I, Marchant A, Bhalerao R P, et al. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation[J]. Plant Cell, 2001, 13:843-852.
- [22] Laskowski M J, Williams M E, Nusbaum H C, et al. Formation of lateral root meristems is two-stage process[J]. Development, 1995, 121:3303-3310.
- [23] 郑 媛,王佩香,曾 弦,等.生长激素对绞股蓝无菌苗生根的影响[J].上海中医药大学学报,2005,19(2):29-31.
- [24] 王树才,徐郎莱,夏 凯.侧根的发生及其激素调控[J].植物学通报. 2003,20(2):129-136.

(编辑 刘彦琴)

## 全英文刊物《中国高等学校学术文摘·林学卷》 于 2006 年 1 月开始出版

为了全面、及时地反映中国高等林业院校的科研水平,促进林业院校的科研工作,为国际权威检索系统提供来自中国高校的学术内容,由教育部发起并由高等教育出版社和德国 Springer 出版公司联合主办了英文系列刊物《中国高等学校学术文摘》。其中《中国高等学校学术文摘·林学卷》(Frontiers of Forestry in China: Selected Publications from Chinese Universities)由北京林业大学承办。该刊物内容主要选自国内优秀大学学报和专业期刊最新发表的论文,经编委会再次遴选后翻译成英文出版,并由 Springer 出版社在海外发行。该刊为季刊,第 1 期已于 2006 年 1 月出版。

中国工程院副院长、著名林学家、林业教育学家沈国舫院士担任该刊主编,编委会由国内外林学及相关领域的知名专家组成。《中国高等学校学术文摘·林学卷》将主要刊登以下学科的学术论文:森林生态学、森林培育学、森林经理、林木遗传育种、自然保护区学、森林植物学、森林病虫害防治、森林资源信息管理、水土保持科学、木材科学、林产化工、林业经济与政策等。

该刊致力于提供一个林业科学前沿动态的学术论坛,以此来促进中外林业研究者的全面交流,并突出中国高校在林业领域的巨大贡献;同时为中国各科技文献数据库提供重要数据来源,为国际著名检索机构提供高水平的学术内容。

希望各方面专家能鼎力支持并积极推荐已发表的优秀中文稿件。

联系人:北京林业大学期刊编辑部 颜帅、程朋军

电 话:010-62337605、010-62337915

E-mail: yanshuai@bjfu.edu.cn, pjcheng@bjfu.edu.cn