

截叶胡枝子组织培养的研究

陈佳¹ 陈晓阳¹ 李忠秋² 骈瑞琪¹ 丁霞¹

(1 北京林业大学林木花卉遗传育种教育部重点实验室

2 中国科学院动物研究所)

摘要:为胡枝子遗传转化奠定基础,对截叶胡枝子的组织培养进行了研究.结果表明:以 2.1% NaClO 对种子灭菌 10 min,发芽率较高,污染率为 0;初代培养 6-BA 最佳浓度为 1.0~2.0 mg/L, NAA 为 0.01 mg/L, 2,4-D 为 0~0.01 mg/L, 分化系数为 2~2.5;继代培养最佳配方为 MS 培养基含 1 倍量的大量元素 + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L;生根培养中 IBA 比 NAA 更有利于有根苗的生长,随着 NAA 浓度提高,对生根抑制作用加强,其浓度不宜超过 0.1 mg/L, IBA 的最佳浓度为 0.5~1.0 mg/L. 分化苗在培养过程中出现严重的黄化现象,针对这一问题,开展了无机盐(NH₄NO₃、MgSO₄·7H₂O、CaCl₂·2H₂O)、铁盐、糖的浓度和光的种类的比较试验.结果表明,氮、镁、铁对黄化有显著影响,当 MgSO₄·7H₂O 浓度为 300 mg/L、NH₄NO₃ 浓度为 1 600 mg/L、MS 中铁盐浓度为 3 倍时,黄化苗率最低,而其他 3 种因素在该试验不同处理间的差异不显著;6 种因素各处理间在子叶节分化系数上的差异均不显著.

关键词:截叶胡枝子,组织培养,黄化

中图分类号:S722.3⁺7 文献标识码:A 文章编号:1000-1522(2007)05-0031-07

CHEN Jia¹; CHEN Xiao-yang¹; LI Zhong-qiu²; PIAN Rui-qi¹; DING Xia¹. **Tissue culture of *Lespedeza cuneata***. *Journal of Beijing Forestry University* (2007) 29(5) 31-37 [Ch, 29 ref.]

1 Key Laboratory for Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, P. R. China.

In order to develop the genetic transformation, tissue culture of *Lespedeza cuneata* was studied in this paper. The results indicated that the best time of seed disinfectant of 2.1% NaClO was 10 min, and the pollution percentage was zero under this sterilization condition. The optimal concentrations of primary differentiation were 6-BA 1.0-2.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L and 2,4-D 0-0.01 mg/L, on which the differentiation index could reach 2-2.5. The optimal culture medium in secondary differentiation was MS medium containing original macroelements + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L. IBA was more suitable than NAA for the rooting of plantlets. The optimum concentration of IBA was 0.5-1.0 mg/L, whereas that of NAA should be less than 0.1 mg/L, since high concentration of NAA had an inhibiting effect on rooting. In order to solve the serious problem of bud etiolation, experiments with different concentrations of NH₄NO₃, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, iron salt, sugar and types of lights were conducted. The results showed that the concentration changes of N, Mg and Fe had significant effects on inhibiting etiolation, and the optimal concentrations were NH₄NO₃ 1 600 mg/L, MgSO₄·7H₂O 300 mg/L, and iron salt 83.4 mg/L. Another three factors had no significant effects on etiolation. And there were no significant differences in the generation index for all of the six factors in the etiolation experiments.

Key words *Lespedeza cuneata*, tissue culture, etiolation

收稿日期:2006-04-14

<http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目:“863”国家高技术研究发展计划(2002AA241111).

第一作者:陈佳,硕士.主要研究方向:生物技术.电话:010-82716207 Email:flashstar999@163.com 现工作单位地址:100088 北京明光科智慧大厦 1208A 室.

责任作者:陈晓阳,教授,博士生导师.主要研究方向:林木良种选育与生物技术. Email:xychen@bjfu.edu.cn 地址:北京林业大学生物科学与技术学院.

截叶胡枝子 (*Lespedeza cuneata*) 为多年生豆科胡枝子属草本植物, 根系发达, 抗病虫能力强, 耐干旱和土壤贫瘠. 它不仅对改良生态和提高土壤肥力起良好作用, 而且可以作为饲料^[1-3]. 与二色胡枝子 (*L. bicolor*)、短梗胡枝子 (*L. cyrtobotrya*) 等相比较, 截叶胡枝子单位面积年生物量较大, 但耐冻性弱, 适口性也稍差. 因此, 为进一步提高截叶胡枝子的抗逆性和改善饲料品质, 就需要开展截叶胡枝子转基因工程, 而解决截叶胡枝子组织培养的技术问题, 则是转基因工程的前提和基础. 目前胡枝子的组织培养国内外还未有很详细的研究报道, 仅安利佳等^[4]在对豆科植物组织培养中对绢毛胡枝子 (*L. sericea*)、短梗胡枝子和兴安胡枝子 (*L. daurica*), 胡冬南等^[5]对美丽胡枝子 (*L. formosa*) 以及陈佳等^[6]对二色胡枝子进行过研究, 且只是侧重于对豆科植物中的不同种类的比较, 因此有必要对胡枝子属植物做全面的组织培养研究. 本文对截叶胡枝子进行了较为系统的组织培养研究, 这可为进一步开展胡枝子基因工程遗传改良奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 启动与初代培养

截叶胡枝子的种子来自美国密西西比州, 由中国林木种子代购. 分别采用升汞 0.1% (2、4、6 min) 和 NaClO 2.0% 10 min 对截叶胡枝子种子进行灭菌, 种子接种于 MS 培养基上. 每瓶放置 50~80 粒种子, 接种 10 瓶. 待种子发芽后 15 d 左右, 取出种苗去掉顶端带芽茎段, 并去掉底端胚根部分. 即以带子叶片的节段 (以下都称为子叶节段) 接于分化培养基上, 开展了两组正交试验. 在第一组试验中, 6-BA 的浓度分别为 0.2、1.0 和 2.0 mg/L; NAA 的浓度分别为 0、0.01 和 0.1 mg/L; 2,4-D 的浓度分别为 0、0.01 和 0.1 mg/L. 第二组试验增加了各种生长调节剂浓度的差异幅度, 6-BA 的浓度分别为 2.0、5.0 和 8.0 mg/L; NAA 的浓度分别为 0.01、0.1 和 0.5 mg/L; 2,4-D 的浓度分别为 0、0.01 和 0.5 mg/L. 正交试验设计均采用 $L_9(3^4)$. 每种组合接种 15 个材料, 重复 3 次.

1.2 继代培养

取子叶节分化苗, 去掉顶芽, 接种. MS 培养基含大量元素分别为 1/4、1/2 和 1 倍; 6-BA 的浓度分别为 0.5、2.0 和 8.0 mg/L; IBA 的浓度分别为 0、0.01 和 0.5 mg/L; 2,4-D 的浓度分别为 0、0.01 和 0.5 mg/L. 正交试验设计均采用 $L_9(3^4)$. 每种组合接种 15 个材料, 重复 3 次.

1.3 生根培养

取带顶芽茎段, 比较 MS 培养基含全量大量元素 (1 倍量) 和含 1/2 大量元素 (1/2 倍量) 对茎段生根的影响, 分别以 IBA 和 NAA 作单因素诱导, 比较其生根条数及粗壮程度, 选出最佳浓度. 每种培养基接种 10 个材料, 重复 3 次.

1.4 降低黄化率的试验

以子叶节段分化为材料, 以 MS 大量元素中的 NH_4NO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以及铁盐、光和糖分别作单因素试验 (表 1), 而其他因素仍为 MS 培养基中的浓度. 此外, 外源激素配比为 6-BA 1 mg/L + 2,4-D 0.01 mg/L. 每种培养基接种 15 个左右, 重复 3 次.

表 1 培养基矿质元素、糖、光试验设计
TABLE 1 Experiment designs on the factors of abio-salt, sugar and light

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	铁盐浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NH_4NO_3 浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	糖浓度/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	光
500	600	83.4(3 倍)	1 800	白砂糖 30	白光
400	500	55.6(2 倍)	1 600	蔗糖 20	红光
300	400	27.8(1 倍)	1 400	蔗糖 30	蓝光
200	300	13.9(1/2 倍)	1 200	蔗糖 40	

注: 铁盐为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 螯合物; MS 中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 370 mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为 440 mg/L、 NH_4NO_3 为 1 650 mg/L、铁盐为 27.8 mg/L、糖为 30 g/L.

以上所有的培养基中除黄化试验, 均添加白砂糖 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/d, 光强为 2 200 lx. 文中的分化系数为分化苗与母芽的比值. 另对各因素导致的黄化率利用 SPSS 软件中的 K-S test 进行检验, 均符合正态分布, 故采用一元方差分析及多重比较.

2 结果与分析

2.1 启动培养

用 0.1% 升汞和 2.1% NaClO 对种子灭菌, 接种 10 d 后观察污染率和发芽率 (表 2). 由表 2 可知, 随着灭菌时间的延长, 污染率逐渐下降. 经 6 min 的灭菌, 污染率降为 0, 种子发芽率有明显提高; 用 NaClO 灭菌, 10 min 污染率为 0, 而且发芽率较高. 鉴于 NaClO 的毒性小于升汞, 最好选择 2.1% NaClO.

表 2 不同灭菌剂及不同灭菌时间对种子污染率和发芽率的影响 %

灭菌时间/min	0.1% 升汞			2.1% NaClO
	2	4	6	10
污染率	13.8	14.0	0	0
发芽率	1.7	0	16.1	24.0

2.2 初代培养

以子叶节段为材料,做了两组正交试验,23 d 后观察分化情况.第一次正交试验 6-BA 最佳浓度为 1.0 mg/L, NAA 最佳浓度为 0.01 mg/L, 2,4-D 最佳浓度为 0.01 mg/L,但经方差分析,3 种调节剂在 3 个浓度下的差异均未达到显著水平.

第二次试验调整生长调节剂的浓度.6-BA 浓度为 2.0~8.0 mg/L, NAA 为 0.01~0.5 mg/L, 2,4-D 为 0~0.5 mg/L(表 3).由表 3 可以看出,6-BA 的最佳浓度为 2.0 mg/L, NAA 的最佳浓度为 0.01 mg/L, 2,4-D 的最佳浓度为 0.其中,6-BA 影响最大,2,4-D 的作用最小.经方差分析(表 4),6-BA 和 NAA 3 个浓度有显著差异,而 2,4-D 在 0~0.5 mg/L 仍没有显著影响.对 6-BA 和 NAA 3 种浓度进行多重比较(表 5),结果表明,6-BA 2.0 mg/L 与 8.0 mg/L 有显著差异, NAA 0.01 mg/L 与 0.5 mg/L 有显著差异.

两次试验结果虽有差异,但并不矛盾,因为两次 NAA 的最佳浓度一致,虽然 6-BA 两次最佳浓度不一致,但在 1.0 和 2.0 mg/L 两者是无显著差异的,因此 6-BA 最佳浓度应在 1.0~2.0 mg/L 之间.

表 3 生长调节剂对初代培养增殖的影响

TABLE 3 Effects of different growth regulators on the primary differentiation of buds

	6-BA	NAA	2,4-D	23 d 后分化系数
1	1(2.0)	1(0.01)	1(0)	2.39
2	1(2.0)	2(0.1)	2(0.01)	2.02
3	1(2.0)	3(0.5)	3(0.5)	1.976
4	2(5.0)	1(0.01)	2(0.01)	1.946
5	2(5.0)	2(0.1)	3(0.5)	1.95
6	2(5.0)	3(0.5)	1(0)	1.812 5
7	3(8.0)	1(0.01)	3(0.5)	1.809
8	3(8.0)	2(0.1)	1(0)	1.783
9	3(8.0)	3(0.5)	2(0.01)	1.545
水平 1 之和 K_1	6.386	6.145	5.985 5	Σ 17.231 5
水平 2 之和 K_2	5.708 5	5.753	5.511	
水平 3 之和 K_3	5.137	5.333 5	5.735	
$K_1/3$	2.129	2.048	1.995	
$K_2/3$	1.903	1.918	1.837	
$K_3/3$	1.712	1.778	1.912	
R	0.417	0.27	0.158	

表 4 生长调节剂对初代培养增殖效果的方差分析

TABLE 4 Variance analysis of the effects of growth regulators on primary differentiation of buds

差异来源	自由度	平方和 SS	均方 MS	均方比 F	F 值
6-BA	2	0.263	0.131 5	46.14*	$F_{0.05} = 19$
NAA	2	0.111	0.055 5	19.47*	$F_{0.01} = 99$
2,4-D	2	0.04	0.02	7.02	
试验误差	2	0.005 7	0.002 85		
总误差	8	0.419 7			

注:* 差异显著($\alpha = 0.05$), ** 差异极显著($\alpha = 0.01$), 下同.

表 5 6-BA 和 NAA 浓度两因素的多重比较

TABLE 5 Multiple comparisons between the concentrations of 6-BA and NAA

因素	K/3	$ X_{i=1,2} - X_3 $	$ X_1 - X_2 $
6-BA	$X_1 = 2.129$	0.417*	0.226
	$X_2 = 1.903$	0.191	
	$X_3 = 1.712$		
NAA	$X_1 = 2.048$	0.27*	0.14
	$X_2 = 1.918$	0.14	
	$X_3 = 1.778$		
Se = 0.030 8, $D_{0.05} = 0.256 6, D_{0.01} = 0.585 2$			

2.3 继代培养

取子叶节分化得到的去顶芽茎段进行增殖培养,23 d 后观察,结果见表 6.由表 6 可以看出,MS 大量元素浓度在 1 倍,6-BA 浓度在 2.0 mg/L, IBA 浓度在 0.5 mg/L, 2,4-D 在 0.5 mg/L 对茎段分化效果最佳.其中 6-BA 的作用最大, IBA 的作用最小.

表 6 生长调节剂对继代培养增殖效果的影响

TABLE 6 Effects of different growth regulators on the secondary differentiation of buds

	MS 大量元素倍数	6-BA	IBA	2,4-D	23 d 后分化系数
1	1(1/4)	1(0.5)	1(0)	1(0)	1.13
2	1(1/4)	2(2.0)	2(0.01)	2(0.01)	1.33
3	1(1/4)	3(8.0)	3(0.5)	3(0.5)	1.20
4	2(1/2)	1(0.5)	2(0.01)	3(0.5)	1.33
5	2(1/2)	2(2.0)	3(0.5)	1(0)	1.47
6	2(1/2)	3(8.0)	1(0)	2(0.01)	1.27
7	3(1)	1(0.5)	3(0.5)	2(0.01)	1.37
8	3(1)	2(2.0)	1(0)	3(0.5)	1.57
9	3(1)	3(8.0)	2(0.01)	1(0)	1.26
水平 1 之和 K_1	3.66	3.83	3.97	3.86	Σ 11.93
水平 2 之和 K_2	4.07	4.37	3.92	3.97	
水平 3 之和 K_3	4.20	3.73	4.04	4.10	
$K_1/3$	1.220	1.277	1.323	1.287	
$K_2/3$	1.357	1.457	1.307	1.323	
$K_3/3$	1.400	1.243	1.347	1.367	
R	0.18	0.214	0.040	0.080	

经方差分析(表 7), MS 培养基、6-BA 和 2,4-D 不同浓度对茎段分化的影响达到显著水平,而 IBA 3 个浓度的差异不显著.经多重比较(表 8), MS 大量元素浓度为 1 倍和 1/2 倍时均与 1/4 倍浓度有显著的差异;6-BA 为 2.0 mg/L 与 0.5 mg/L 和 8.0 mg/L

表 7 生长调节剂在继代培养中增殖效果的方差分析

TABLE 7 Variance analysis of the effects of growth regulators on secondary differentiation of buds

差异来源	自由度	平方和 SS	均方 MS	均方比 F	F 值
MS 大量元素	2	0.053	0.026 5	265**	$F_{0.05} = 19$
6-BA	2	0.078 9	0.039 45	394.5**	$F_{0.01} = 99$
IBA	2	0.002 3	0.001 15	11.5	
2,4-D	2	0.009 5	0.004 75	47.5*	
误差	2	0.000 2	0.000 1		
总误差	10	0.143 9			

的差异达到显著水平;2,4-D 为 0.5 mg/L 与 0 mg/L 的差异达到显著水平.

表 8 MS 大量元素、6-BA 和 2,4-D 浓度三因素的多重比较

TABLE 8 Multiple comparisons among the concentrations of macroelements, 6-BA and 2,4-D

因素	K/3	$ X_{i=1,2} - X_3 $	$ X_1 - X_2 $
MS 大量元素	$X_1 = 1.220$	0.180**	0.137**
	$X_2 = 1.357$	0.043	
	$X_3 = 1.400$		
6-BA	$X_1 = 1.277$	0.034	0.180**
	$X_2 = 1.457$	0.214**	
	$X_3 = 1.243$		
2,4-D	$X_1 = 1.287$	0.080*	0.036
	$X_2 = 1.323$	0.044	
	$X_3 = 1.367$		

Se = 0.005 77, $D_{0.05} = 0.048$, $D_{0.01} = 0.109 6$

表 9 IBA 对生根的影响

TABLE 9 Effects of concentration of IBA on the rooting of buds

IBA 浓度/(mg·L ⁻¹)	1 倍大量元素	1/2 倍大量元素			生根情况
	生根率/%	生根率/%	平均生根数	均长/cm	
0.1	54.2	76.9	1.08	0.64	
0.5	41.7	100	1.33	1.07	根细长, 卷曲; 偶有分叉;
1.0	54.2	90	1.60	1.61	数天后有黄叶和落叶
1.5	44.0	83.3	1.83	1.81	

2.5 降低黄化率试验

截叶胡枝子组织培养过程中黄化现象较为严重. 本文以 MS 培养基中的大量元素以及铁盐、光和糖分种类作单因素试验, 分析这些元素对截叶胡枝子子叶节分化及其分化苗黄化的影响.

2.5.1 Mg²⁺ 浓度对分化系数及黄化的影响

由图 1 可以看出, 浓度低到 200 mg/L 和高到 500 mg/L 时, 黄化率都比较高; 当其浓度为 300 mg/L

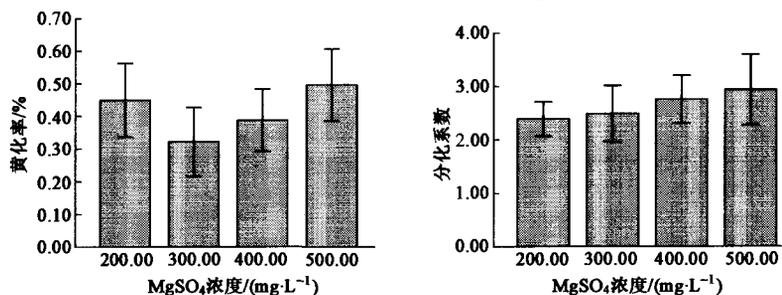


图 1 MgSO₄ 浓度对截叶胡枝子黄化率和分化系数的影响

FIGURE 1 Influence of concentration of MgSO₄ on the etiolation rates and differentiation index of *L. cuneata*

2.5.2 N 浓度对分化系数及黄化的影响

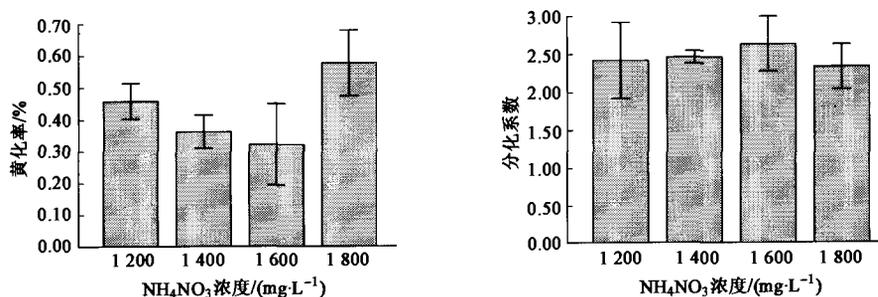
由图 2 可知, NH₄NO₃ 浓度高到 1 800 mg/L 或低到 1 200 mg/L 时, 黄化率均较高. 当其浓度为 1 600 mg/L 时, 黄化率最低, 不同浓度间在子叶节分化系数上的差异不明显. 方差分析结果表明, NH₄NO₃ 不同浓度间在黄化率上的差异达到显著水平 ($F =$

2.4 生根培养

将增殖得到的带顶芽茎段分别用 IBA 和 NAA 诱导生根, 其中用 IBA 诱导时采用 MS 培养基 1 倍大量元素与 1/2 大量元素作对比, 而 NAA 诱导采用 1/2 大量元素. 20 d 后观察表明, 大量元素为 1 倍时生根率明显低于 1/2 倍的生根率, 因此选用减半的大量元素有利于生根, 而随着 IBA 浓度的升高, 生根率先增加后减小, 平均生根数和根均长都有增加. 综合各因素, 可选择 IBA 为 0.5 ~ 1.0 之间的浓度 (表 9). NAA 为 0.1 mg/L 时有明显长根, 但浓度增加后有利于愈伤组织形成, 而不利于长根. 因此, IBA 比 NAA 更适合诱导截叶胡枝子长根.

时, 黄化率最低. 随着 MgSO₄·7H₂O 浓度提高, 分化系数有增大的趋势. 根据方差分析, 浓度之间在黄化率上达到显著水平 ($F = 4.052^*$, $P = 0.016$), 而在子叶节分化系数上的差异没有达到显著水平 ($F = 1.950$, $P = 0.144$). 由多重比较可知, 300 mg/L 浓度与 500 mg/L 和 200 mg/L 在黄化率上的差异达到显著水平 (300 mg/L 与 500 mg/L, $P = 0.003$; 300 mg/L 与 200 mg/L, $P = 0.049$).

7.865**, $P = 0.002$), 在子叶节分化系数上的差异没有达到显著水平 ($F = 0.676$, $P = 0.579$). 经多重比较, NH₄NO₃ 浓度为 1 600 mg/L 的黄化率与 1 800 mg/L 和 1 200 mg/L 的有显著差异 (1 600 mg/L 与 1 800 mg/L, $P < 0.001$; 1 600 mg/L 与 1 200 mg/L, $P = 0.030$).

图2 NH₄NO₃ 浓度对截叶胡枝子黄化率和分化系数的影响FIGURE 2 Influence of concentration of NH₄NO₃ on the etiolation rates and differentiation index of *L. cuneata*

2.5.3 铁盐浓度对分化系数及黄化的影响

由图3看出,随着铁盐浓度的增加,黄化率逐渐降低.方差分析表明,铁盐不同浓度间在黄化率上的差异达到极显著水平($F = 39.298^{**}$, $P < 0.001$);在子叶节分化系数上的差异未达到显著水平($F = 0.128$, $P = 0.942$).当MS中铁盐浓度为3倍时,能

极大地降低其黄化率.其与1倍和1/2倍浓度达到极显著差异(3倍与1倍, $P = 0.001$;3倍与1/2倍, $P < 0.001$),而且2倍浓度与1倍和1/2倍浓度也达到极显著差异(2倍与1倍, $P = 0.003$;2倍与1/2倍, $P < 0.001$).

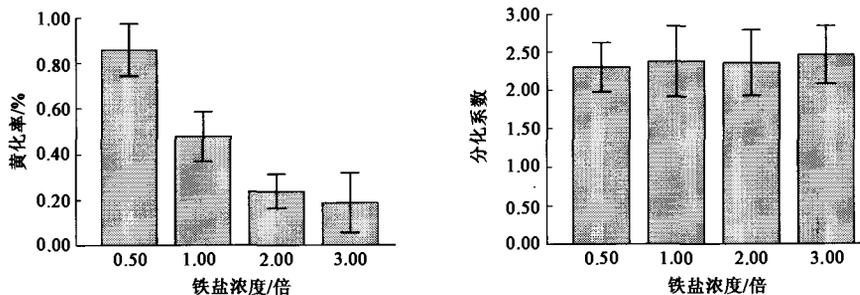


图3 铁盐浓度对截叶胡枝子黄化率和分化系数的影响

FIGURE 3 Influence of concentration of iron salt on the etiolation rates and differentiation index of *L. cuneata*

2.5.4 Ca²⁺、糖和光对分化系数及黄化的影响

经方差分析,Ca²⁺的浓度、糖的种类和浓度以及光的种类各处理间在子叶节分化及分化苗黄化率处理间的均方比 F 值分别为:Ca²⁺ 分化系数 $F = 0.780$ ($P = 0.515$)、黄化率 $F = 1.258$ ($P = 0.308$);糖分化系数 $F = 4.693$ ($P = 0.022^*$)、黄化率 $F = 0.777$ ($P = 0.529$);光分化系数 $F = 1.514$ ($P = 0.259$)、黄化率 $F = 1.626$ ($P = 0.237$).可看出糖对分化系数差异显著,但方差不齐,经过不齐次方差分析光对分化系数差异并不显著.因此这3种因子的影响均未达到显著水平.这表明本试验对这些因素所设的处理对分化系数及黄化的影响不大.

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.在初代培养中本文以子叶节为材料,分化率很高,根据两次正交试验,6-BA最佳浓度在1.0~2.0 mg之间,NAA为0.01 mg/L,2,4-D最佳浓度应在0~0.01 mg/L之间,分化系数在2~2.5之间.在继代培养中,MS培养基大量元素的浓度、6-BA以及2,4-D对分化均有显著影响,增殖的最佳配方为MS含1倍大量元素+6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L.但分化系数不太高,仅在1.2~1.5之间,因此,增殖培养还有待进一步研究.

3 结论与讨论

本试验采取直接利用种子在培养基中发芽获得无菌体系,采用2.1% NaClO 灭菌10 min能达到外植体灭菌的目的.分化培养基配方的选择至关重要.安利佳等^[4]在对豆科31种材料进行研究时曾对绢毛胡枝子、短梗胡枝子、兴安胡枝子进行了简单的组培试验,在MS和B5基础上设计了基础培养基,激素浓度为2,4-D 0.5 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA

在生根培养中,MS培养基含1/2倍大量元素生根率明显高于1倍大量元素.诱导生根适用较高浓度的IBA,而NAA适用较低浓度,过高浓度时容易生成愈伤组织而抑制根的生长.有关文献报道,不同植物生根对生长素浓度(IBA或NAA)变化的反应有差异,如在四倍体刺槐(*Robinia pseudoacacia*)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^[7],这与本研究中NAA浓度的升高抑制生根的结果恰恰相反.但是,更多的研究表明,随着生长素浓度的升高,促进生根

的效果加强,当达到一定浓度后则抑制生根^[8-15].此次试验 IBA 最佳浓度为 0.5~1.0 mg/L,从总体上来说,IBA 比 NAA 更有利于根的生成和苗的生长.

截叶胡枝子初代分化时,就出现苗黄化现象,严重时白化和落叶.而且,生根苗也出现黄叶和落叶现象.在试验所设置的不同处理之间,钙浓度、光的种类和不同糖及其浓度对截叶胡枝子分化苗的黄化率无显著影响,而镁、氮和铁盐的浓度对分化苗黄化率产生了显著影响.对于镁和氮,过高和过低的浓度都引起了较高的黄化率,适当的浓度能显著的降低黄化率,其浓度均接近 MS 培养基中的浓度,黄化率大约都在 30%.而高浓度的铁盐有利于截叶胡枝子苗的生长;以 3 倍于 MS 培养基中的铁盐浓度能显著降低黄化苗的生长,黄化率降为 20%,而 MS 培养基下黄化率仍为 30%左右.另外,这 6 种因素对截叶胡枝子子叶节分化都无显著的影响.植物黄化研究的大田试验报道较多^[16-26],主要原因是土壤营养元素的缺乏,如氮、磷、钾、铁等元素的缺失.有研究认为,土壤氮、磷、钾养分状况对植物缺铁黄化发生有重要影响^[27],如硝态氮的吸收和还原都将产生或释放相同数量的氢氧根离子,因此可引起植物物质外体 pH 升高,铁的有效性降低,从而导致某些植物出现黄化^[28].可见,缺铁是植物黄化最直接的原因,因此增加铁盐浓度有较为明显的作用,这在此次试验中也得到证实.调节适当的氮、磷、钾浓度对于植物正常生长有明显的的作用,在黄瓜(*Cucumis sativus*)叶片黄化研究中发现,缺氮和氮过剩都会引起叶片黄化^[20],这一点在此次试验中也得到证实.有些研究认为,植物缺铁性病害在盐碱地和石灰质过高的地方表现严重^[16,18,21,27],因为在石灰性土壤中,硝态氮是植物吸收的主要氮素形态,硝态氮与重碳酸根共同作用,导致质外体 pH 升高,从而抑制了铁的输出,导致黄化加重^[29].因此,在以后的试验中,可在添加铁盐的同时,适当降低 pH 值.

参 考 文 献

- [1] 欧阳延生,戴征煌,吴志勇,等.美国截叶胡枝子在红壤丘陵岗地的适应性及其应用研究[J].江西农业科技,1996,24(2):44-45.
OUYANG Y S, DAI Z H, WU Z Y, et al. Adaptability and utilizations of *Lespedeza cuneata* on hills of laterite[J]. *Jiangxi Agricultural Science and Technology*, 1996, 24(2):44-45.
- [2] 刘修圣,吕鹏怀,李辉.胡枝子对水土保持作用的研究[J].黑龙江水专学报,2000,27(2):41-42.
LIU X S, LÜ P H, LI H. Application research on shrub *lespedeza* in water and soil conservation [J]. *Journal of Heilongjiang Hydraulic Engineering College*, 2000, 27(2):41-42.
- [3] 奚同行,林圣玉.胡枝子的开发利用价值及发展前景[J].中国水土保持,1995,16(4):42-44.
XI T X, LIN S Y. Value in use and develop foreground of *lespedeza* [J]. *Soil and Water Conservation in China*, 1995, 16(4):42-44.
- [4] 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.
AN L J, LI F X, ZHANG J M, et al. Studies on tissue cultures of legumina [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1992, 34(10):743-752.
- [5] 胡冬南,杜金友,骈瑞琪,等.美丽胡枝子再生体系的研究[J].北京林业大学学报,2006,28(5):94-98.
HU D N, DU J Y, PIAN R Q, et al. Establishment of regeneration system of *Lespedeza formosa* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2006, 28(5):94-98.
- [6] 陈佳,陈晓阳,李云.二色胡枝子组织培养的研究[J].河北林果研究,2006,21(2):119-123.
CHEN J, CHEN X Y, LI Y. Studies on tissue culture of *Lespedeza bicolor* [J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2006, 21(2):119-123.
- [7] 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.
ZHENG Y Q. Effect analysis of different hormone constitutions on tissue cultures of *Robinia pseudoacacia* tetraploid [J]. *Seed*, 2005, 24(7):76-77.
- [8] 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.
- [9] 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.
HU J G, GUO J S. Tissue culture on *Ficus carica* L. [J]. *Journal of Nanjing Forestry University*, 1994, 18(3):73-76.
- [10] 李平英,赵秋玲,韩云花,等.一品红组织培养技术研究[J].甘肃林业科技,2005,30(1):27-30.
LI P Y, ZHAO Q L, HAN Y H, et al. Study on the technology of tissue culture on *Euphorbia pulcherrima* [J]. *Journal of Gansu Forestry Science and Technology*, 2005, 30(1):27-30.
- [11] 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.
LIU J, LUO X F, CHEN X M. Tissue culture and rapid propagation of *Quercus coggyria* [J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2004, 19(1):63-65.
- [12] CASIMIRO I, MARCHANT A, BHALERAO R P, et al. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation [J]. *Plant Cell*, 2001, 13:843-852.
- [13] LASKOWSKI M J, WILLIAMS M E, NUSBAUM H C, et al. Formation of laeral root meristems is two-stage process [J]. *Development*, 1995, 121:3 303-3 310.
- [14] 郑媛,王佩香,曾弦,等.生长激素对纹胶蓝无茵苗生根的影响[J].上海中医药大学学报,2005,19(2):29-31.
ZHENG Y, WANG P X, ZENG X, et al. Effect of growth hormone on aseptic root formation of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Acta Universitatis Traditionis Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai*, 2005, 19(2):29-31.
- [15] 王树才,徐郎莱,夏凯,等.侧根的发生及其激素调控[J].植物学通报,2003,20(2):129-136.

- WANG S C, XU L L, XIA K, *et al.* Lateral root formation and its regulation by phytohormones[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(2):129-136.
- [16] 潘佑找,费永俊. 果树缺铁性黄化的原因及防治技术[J]. 森林病虫害通讯,2000,19(4):30-31.
- PAN Y Z, FEI Y J. Cause and control techniques of fruit tree iron-deficiency disease[J]. *Forest Pest and Disease*, 2000, 19(4):30-31.
- [17] 魏良民,田晓东. 微量元素缺乏导致甜菜叶片黄化原因分析[J]. 中国甜菜糖业,2004,42(3):48-49.
- WEI L M, TIAN X D. Cause analysis on etiolation of beet leaves by lack of microelement [J]. *China Beet and Sugar*, 2004, 42(3):48-49.
- [18] 蒋代华,李昆志,顾明华,等. 银杏幼树黄化原因的探讨[J]. 广西农学报,2002,3(增刊):119-123.
- JIANG D H, LI K Z, GU M H, *et al.* Inquire into the etiolation's cause of young ginkgo plant [J]. *Journal of Guangxi Agriculture*, 2002, 3(Supp.):119-123.
- [19] 姚晓芹,马文奇,刘栋臣. 果树缺铁性黄化植株诊断方法的研究进展[J]. 山西果树,2005, 26(3):34-35.
- YAO X Q, MA W Q, LIU D C. Research development on diagnosing methods of fruit tree iron-deficiency disease [J]. *Shanxi Fruit Trees*, 2005, 26(3):34-35.
- [20] 万惠恩. 温室黄瓜叶片八种黄化的识别与诊断措施[J]. 农业科技与信息,2004,21(1):39.
- WAN H E. Identifications on eight leave etiolations of cucumber [J]. *Agricultural Sciences, Technology and Informations*, 2004, 21(1):39.
- [21] 蒋代华,陈佩琼,白厚义,等. 银杏幼树黄化的土壤原因及对策研究[J]. 广西植物,2002,22(3):283-288.
- JIANG D H, CHEN P Q, BAI H Y, *et al.* A study on young ginkgo plants etiolation and the countermeasures [J]. *Guihaia*, 2002, 22(3):283-288.
- [22] MORALES F, GRASA R, ABADIA A, *et al.* Iron chlorosis paradox in fruit trees[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1998, 21(4):815-825.
- [23] 何瀚. 云南山茶叶片黄化初步研究[J]. 云南大学学报, 2001, 23(1):57-59.
- HE H. The primary study of leaf etiolation of *Camellia reticulata* [J]. *Journal of Yunnan University*, 2001, 23(1):57-59.
- [24] 苏祖友. 柑桔黄化原因及其防治措施探讨[J]. 福建果树, 2003, 31(2):36-37.
- SU Z Y. Discussion on causes and prevention methods on etiolations of oranges [J]. *Fujian Fruits*, 2003, 31(2):36-37.
- [25] 赵国防,文丽华. 西洋杜鹃叶片黄化及其防治[J]. 天津农林科技,2002(2):18-19.
- ZHAO G F, WEN L H. Leaf etiolations of occident azalea and its prevention and cure [J]. *Tianjin Agricultural and Forestry Sciences and Technology*, 2002(2):18-19.
- [26] 冯卫星,张卫东,彭锋. 葡萄缺素黄化的主要原因及防治对策[J]. 新疆农垦科技,2003, 26(4):13-15.
- FENG W X, ZHANG W D, PENG F. Main causes and control methods of grape auxin-deficiency etiolation [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences and Technology*, 2003, 26(4):13-15.
- [27] 武建林,李有文,李立平,等. 植物黄化与氮磷钾营养的关系[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1):104-108.
- WU J L, LI Y W, LI L P, *et al.* Plant iron deficiency chlorosis and its relationship with nitrogen, phosphorus and potassium [J]. *Journal of Northwest Agriculture*, 2004, 13(1):104-108.
- [28] LUCENA J. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis: A review [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2000, 23(11-12):1 591-1 606.
- [29] MENGEL K, GEURTZEN G. Iron chlorosis on calcareous soils: Alkaline nutritional condition as the cause for chlorosis[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1986, 9(1):161-173.

(责任编辑 董晓燕)

2008年《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的专业性学术期刊,全国优秀农业期刊,由中国农科院副院长刘旭先生担任主编. 该刊为中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录. 据中国期刊引证研究报告统计,2006年度《植物遗传资源学报》影响因子达0.872.

报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论. 诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究.

季刊,大16开本,128页. 定价20元,全年80元. 各地邮局发行,邮发代号:82-643. 国内刊号CN11-4996/S,国际统一刊号ISSN1672-1810.

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加3元.

地址:100081北京市中关村南大街12号中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

电话:010-62180257; 010-62180279(兼传真) Email:zwzczyxb2003@163.com; zwzczyxb2003@sina.com