

肥荚红豆种子无菌诱导植株再生及快速繁殖

彭绿春^{1,2,3,4}, 王丽花^{1,2,3,4}, 马双喜⁵, 苏艳^{1,2,3,4}, 张艺萍^{1,2,3,4}, 宋杰^{1,3,4}, 瞿素萍^{1,2,3,4,*}

¹云南省农业科学院花卉研究所, 昆明650205; ²农业部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明), 昆明650205; ³云南省花卉育种重点实验室, 昆明650205; ⁴云南花卉技术工程研究中心, 昆明650205; ⁵云南省玉溪市易门县林业局, 云南玉溪651100

摘要: 以肥荚红豆种子为外植体, 研究了种子预处理、诱导萌发、不定芽增殖、壮苗、生根的方法, 摸索培养基中激素的最佳配比, 建立了肥荚红豆组织培养快速繁殖技术。结果表明: 5%~10% NaOH溶液浸泡种子1 h的预处理有利于促进肥荚红豆种皮的剥离和种子萌发; 适宜于种子萌发的培养基为MS (Read)+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, 萌发率可达100%; 最佳增殖培养基为Read+6-BA 1.0~1.5 mg·L⁻¹+KT 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, 增殖数可达每瓶23个以上; 最佳壮苗培养基为Read+6-BA 0~0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹; 最佳生根培养基为Read+IAA 1.0 mg·L⁻¹, 其生根率可达90.54%。研究结果提高了肥荚红豆的繁殖效率, 有效促进肥荚红豆组培规模化育苗技术的成熟与推广应用, 对推动其产业开发应用具有重要意义。

关键词: 肥荚红豆; 种子; 植株再生; 高效繁殖

Plant Regeneration through Seed Aseptic Germination and Rapid Propagation Technology of *Ormosia fordiana* Oliv.

PENG Lü-Chun^{1,2,3,4}, WANG Li-Hua^{1,2,3,4}, MA Shuang-Xi⁵, SU Yan^{1,2,3,4}, ZHANG Yi-Ping^{1,2,3,4}, SONG Jie^{1,3,4}, QU Su-Ping^{1,2,3,4,*}

¹Flower Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; ²Supervision and Testing Centre for Flowers of Ministry of Agriculture (Kunming), Kunming 650205, China; ³Yunnan Flower Breeding Key Laboratory, Kunming 650205, China; ⁴Yunnan Flower Research and Development Center, Kunming 650205, China; ⁵Forestry Bureau of Yimen County, Yuxi, Yunnan 651100, China

Abstract: The plant regeneration system of *Ormosia fordiana* Oliv. was studied with the pretreatment and germination induction of seed, multiplication and hardening of adventitious bud, rooting of the shoot. The results showed that the best seed germination medium was MS (Read)+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ with 100% of germination rate, and the best multiplication medium was Read+6-BA 1.0–1.5 mg·L⁻¹+KT 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ which has more than twenty-three multiplication buds in each bottle. Read+6-BA 0–0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ was the best hardening medium. The best rooting medium was Read+IAA 1.0 mg·L⁻¹ with 90.54% of the rooting rate. The research would promote the reproductive efficiency of *Ormosia fordiana* Oliv.. It improved the maturity and application of large-scale seedling technology, and had the vital significance on development and application of *Ormosia fordiana* Oliv..

Key words: *Ormosia fordiana* Oliv., seed; plant regeneration; effective multiplication

肥荚红豆(*Ormosia fordiana* Oliv.), 系豆科(Leguminosae)红豆属(*Ormosia*)乔木, 在我国主产于广东、海南、广西及云南等地, 国外越南、缅甸、泰国、孟加拉也有分布, 其茎、皮、根均可入药(国家中医药管理局中华本草编委会2000), 有研究表明肥荚红豆茎、叶提取的活性成分, 对人体病原菌金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用, 该活性成分能开发为新的抗生素(李国红等2008); 再者, 肥荚红豆的纹理通直, 宜用于建筑业和制作高档家具, 具有较高经济价值和极大开发潜力。海南已将肥荚红豆列入其本土特有植物名录中,

加以保护开发(Francisco-Ortega等2010)。目前, 肥荚红豆的市场需求旺盛, 但由于野生资源数量有限及缺乏高效繁殖方法而严重制约了肥荚红豆的开发应用。云南省易门县林业局相关研究显示, 肥荚红豆种子室外萌发, 其萌发率不到10%, 枝条扦插生根率低且成苗周期长。在此背景下, 肥荚红豆种源快速高效繁殖方法的研发是其产业发展的迫切需要。迄今为止, 国内外尚无肥荚红豆繁

收稿 2013-05-14 修定 2013-06-04

资助 云南省科技计划项目(2011EB111)。

* 通讯作者(E-mail: qusuping@sina.com; Tel: 0871-5895288)。

殖技术正式的研究报道。与常规繁殖方法相比,植物组织培养在木本植物快速繁殖和规模化生产上更具有优势(Thorpe等1991)。本研究以肥荚红豆种子为试验试材,无菌诱导其植株再生,建立组培快繁技术体系,以期实现肥荚红豆种源的高效繁殖,有效促进肥荚红豆组培规模化育苗技术的成熟与推广应用,以推动其产业化开发应用。

材料与方 法

1 试验材料

本试验所用材料来源于云南省易门县龙泉国家森林公园,为前一年收获的肥荚红豆种子。

2 方法

2.1 种子消毒与预处理

选择饱满无破损和虫眼的肥荚红豆种子,用洗衣粉水震荡清洗后,再用流水冲洗约10 min。在超净工作台上先用75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗1遍后,再用0.12%氯化汞溶液消毒15 min,无菌水清洗3遍后,放入无菌的NaOH溶液中浸泡1 h,NaOH溶液设置0、5%、10%和15%四个浓度梯度(王令霞等1998;赵沛基等2003;李志英等2007;陶茸等2011;Husain等2011),最后用无菌水冲洗3遍。

种子消毒和预处理完成之后,剥去种皮,接种于MS培养基上(不添加任何植物生长调节剂),以筛选适宜的种子预处理方法。

2.2 种子萌发培养基的筛选

采用2.1中筛选出来的适宜的种子预处理方法,消毒和处理种子后,剥去其种皮,接种于下列培养基中:(1) MS, (2) MS+6-BA 0.5+NAA 0.1, (3) MS+6-BA 1.0+NAA 0.1, (4) Read, (5) Read+6-BA 0.5+NAA 0.1, (6) Read+6-BA 1.0+NAA 0.1,其中激素浓度单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下文同此。观察种子萌发生长情况,筛选适宜的种子萌发培养基。

2.3 继代培养基的筛选

将种子萌发诱导出来高约3~4 cm的小苗从豆瓣上切下,从中间分成上下两段分别接种到增殖培养基中,50 d后观察统计其增殖率和生长情况。增殖培养基配方,基本培养基为MS和Read (Economic和Read 1984),使用6-BA、KT和NAA三种激素组合,其中6-BA浓度为0.5、1.0和1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,KT浓度为0和0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA浓度为0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 不变。每个处理接种5瓶(即5个重复),每瓶4棵。

2.4 生根培养基的筛选

切取生长健壮,高3~4 cm的芽接种到生根培养基中。生根培养基以Read为基本培养基,附加IAA,浓度分别为0.5、1.0和1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每处理接种10瓶,每瓶15棵。30 d后以生根率、长根数为指标观察记录生根情况。

2.5 炼苗与移栽

待再生植株生长健壮,生根整齐,长至5~7 cm高时,将培养瓶移到大棚内,覆盖遮光率为50%的遮阳网,温度控制在20~30 $^{\circ}\text{C}$,5~7 d后揭去遮阳网和瓶膜,取出生根苗,洗去根部培养基,放入0.1%的多菌灵溶液中浸泡5 min。之后小心移栽到经过消毒处理的基质中。在湿度为60%~70%,温度为20~30 $^{\circ}\text{C}$ 的大棚中培养1~2个月。小苗长出新叶后,移入普通大棚进行常规管理。以上所用基质为腐叶土、红土和珍珠岩按3:1:1的比例混合,并采用甲基托布津800倍液淋洒消毒。

2.6 室内培养条件

试验中各阶段培养条件均为:培养温度(23±2) $^{\circ}\text{C}$;光照强度25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间12 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。培养基中添加蔗糖30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂6.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值5.6。

2.7 数据处理分析

数据使用SPSS18.0软件分析,采用邓肯法在0.05水平进行差异显著性检验。

实验结果

1 种子预处理效果

肥荚红豆种子表面较干净,易于消毒。本研究采用材料与方法2.1中的种子消毒方法可将外植体污染率控制在10%以内。但其种皮坚硬,不利于种子萌发,需对其进行预处理以促进萌发。肥荚红豆种子用不同浓度NaOH溶液处理的效果见表1。从试验结果可知,NaOH溶液浸泡可软化肥荚红豆种皮,并促进其种子萌发。随NaOH溶液浓度增加,软化效果越好,但若浓度过高,易对种子造成伤害,甚至死亡。浸泡种子的适宜NaOH溶液浓度为5%~10%,种皮易于剥离,种子萌发早,且萌发率高,达94.7%。

2 种子萌发诱导

种子经消毒和处理后,放入萌发培养基,3~4 d豆瓣裂开,并慢慢转绿,最早的7 d后开始萌发并长出较粗的根(图1-A)。培养20 d后,统计其在不同培养基中的萌发生长情况(表2)。在所试验的6种

表1 不同浓度NaOH溶液处理对种子萌发的影响

Table 1 Affect of NaOH solution of different concentrations on seed germination

NaOH浓度/%	种子数/粒	萌发数/粒	萌发率/%	死亡数/粒	死亡率/%	种子萌发情况
0	16	4	25.0	0	0	种皮坚硬, 几乎不能剥离, 豆瓣多不裂开, 阻碍种子萌发
5	19	18	94.7	1	5.3	种皮软化, 易剥离, 3~4 d豆瓣裂开, 9 d后种子萌发
10	19	18	94.7	1	5.3	种皮软化, 易剥离, 3~4 d豆瓣裂开, 10 d后种子萌发
15	20	14	70.0	6	30.0	种皮软化, 十分易于剥离, 2~3 d豆瓣裂开, 14 d后种子萌发

污染种子不计入不同浓度NaOH溶液处理效果比较。萌发率=萌发数/种子数 \times 100%, 死亡率=死亡数/种子数 \times 100%。

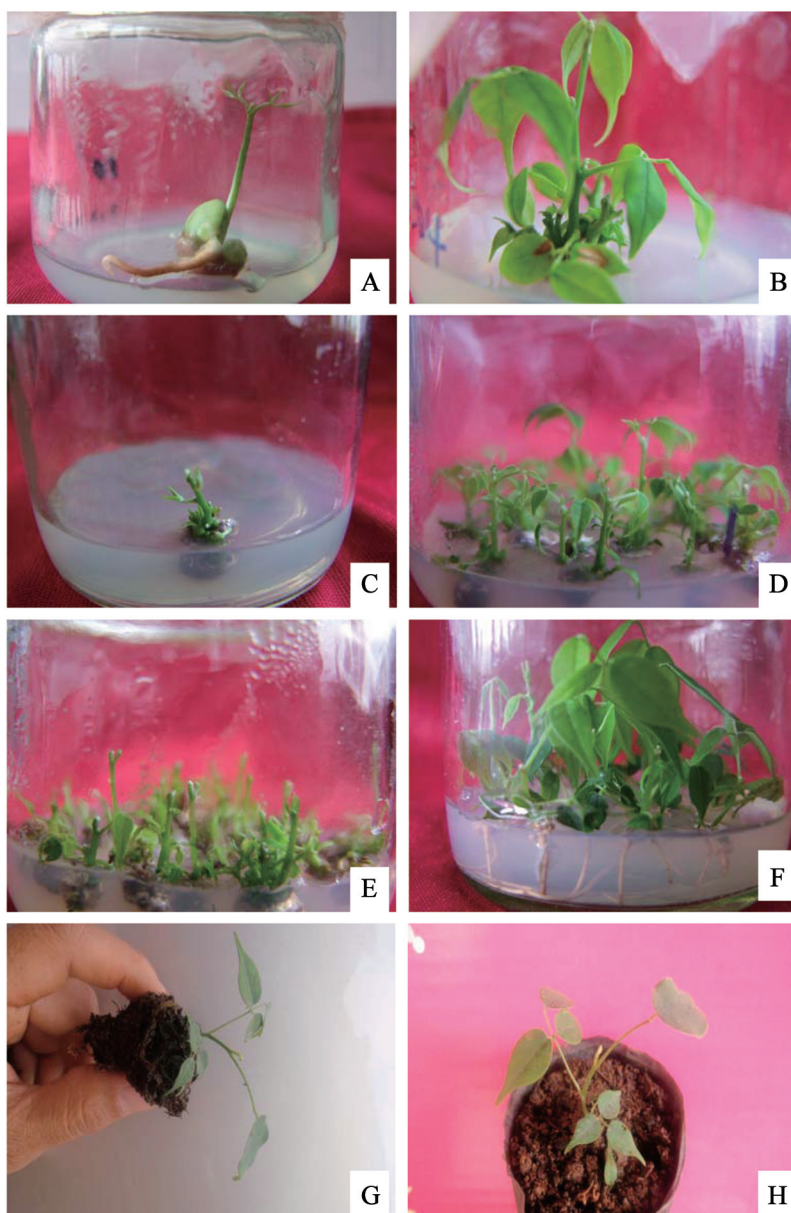


图1 肥荚红豆种子无菌诱导植株再生

Fig.1 Plant regeneration of *Ormosia fordiana* Oliv. through seed aseptic germination

A: 诱导7 d后, 种子萌发; B: 小苗上段增殖情况; C: 小苗下段增殖情况; D: 7号培养基中, 增殖苗生长健壮、舒展; E: 10~12号培养基中, 增殖苗矮小, 枝叶不舒展; F: 瓶内生根情况; G、H: 炼苗成活, 长出新根。

表2 不同培养基中种子萌发生长情况

Table 2 The germination and growth performance of the seeds on different medium

培养基	接种数/粒	萌发数/粒	萌发率/%	萌发时间/d	萌发整齐度	长势
1	30	25	83.3	10	不整齐	长势弱、叶色淡
2	30	30	100	8	整齐	长势健壮
3	30	29	96.7	7	不整齐	植株不伸展、部分玻璃化
4	30	26	86.7	9	不整齐	长势弱
5	30	30	100	7	整齐	长势健壮
6	30	30	100	7	不整齐	植株不伸展、部分玻璃化

培养基中,除不添加任何激素的MS和Read培养基中种子萌发率稍低外,其余培养基中种子萌发率均较高,几乎为100%,且种子萌发率差异很小,各培养基对肥荚红豆种子萌发的影响主要表现在萌发时间、整齐度、长势方面:添加细胞分裂素的培养基中,种子萌发较早,萌发率高,萌发的时间整齐;细胞分裂素浓度较高的培养基中,常出现玻璃化现象,且植株、叶片不舒展。可见最适宜于肥荚红豆种子萌发的培养基为MS (Read)+6-BA 0.5+NAA 0.1,萌发时间最早,萌发率最高,且萌发整齐,小苗生长正常、健壮。

3 继代增殖培养

种子萌发长出的小苗,切成上下两段分开接种到不同的培养基中,10 d后,茎段基部长出白色松软愈伤组织,之后在靠近茎基部的愈伤组织上分化出不定芽(图1-B、C)。培养50 d后观察发现各处理间差异较大。以增殖数为指标,进行方差

分析(表3)。从试验结果看,不管以小苗上部还是下部为增殖母体,其增殖数随培养基变化的趋势一致。即1~6号,以MS为基本培养基的组合中,不论激素配比如何,增殖率均较低;而7~12号,以Read为基本培养基的组合中,增殖率则显著高于1~6号培养基,其中不同激素组合的增殖数又有显著差异,添加KT的培养基增殖数显著高于不添加的,以Read+6-BA 1.0~1.5+KT 0.1+NAA 0.1增殖数最高,达每瓶23个以上。

从继代增殖培养的长势来看:随培养时间增长,1~6号培养基中的增殖母体叶片变黄枯萎,最后大部分整株死亡,在死亡母体基部有1~2个零星增殖的不定芽。可见MS基本培养基不适宜于肥荚红豆的继代增殖培养,这也是导致1~6号培养基中,母体增殖率极低的主要原因。7~12号培养基中,不同激素配比,植株长势也表现出明显差异。在不添加KT的7~9号培养基中,增殖数稍低,但叶片

表3 不同培养基对肥荚红豆继代增殖的影响

Table 3 Effect of different medium on *Ormosia fordiana* Oliv. multiplication

编号	基本培养基	激素浓度/mg·L ⁻¹			增殖数/个	
		6-BA	KT	NAA	上部	下部
1	MS	0.5	0	0.1	1.20±0.447 ^{ef}	2.00±0.707 ^{ef}
2	MS	1.0	0	0.1	0.60±0.548 ^f	1.60±0.894 ^{ef}
3	MS	1.5	0	0.1	2.00±0.707 ^e	1.20±0.447 ^f
4	MS	0.5	0.1	0.1	1.40±1.140 ^{ef}	2.00±0.000 ^{ef}
5	MS	1.0	0.1	0.1	1.00±0.000 ^{ef}	2.40±0.548 ^{ef}
6	MS	1.5	0.1	0.1	1.80±1.095 ^{ef}	2.80±0.447 ^e
7	Read	0.5	0	0.1	6.00±1.000 ^d	10.08±1.304 ^d
8	Read	1.0	0	0.1	14.60±0.894 ^{bc}	18.40±1.517 ^b
9	Read	1.5	0	0.1	15.80±1.304 ^b	18.60±1.817 ^b
10	Read	0.5	0.1	0.1	13.40±1.517 ^c	16.60±1.673 ^c
11	Read	1.0	0.1	0.1	23.00±1.414 ^a	26.40±1.517 ^a
12	Read	1.5	0.1	0.1	23.60±1.517 ^a	27.60±1.949 ^a

增殖数指除增殖母体以外的丛生芽数,以瓶为单位计。同一列中标有不同字母表示处理间在0.05水平存在显著性差异,表4同。

舒展, 植株健壮, 尤其是细胞分裂素6-BA较低的7号培养基(图1-D); 添加KT的10~12号培养基, 增殖数较高, 但增殖的不定芽较矮小, 叶片及植株不舒展(图1-E)。说明KT适宜于诱导肥荚红豆增殖, 而较低浓度的6-BA适宜于壮苗, 最佳壮苗培养基为Read+6-BA 0~0.5+NAA 0.1。

4 生根培养

根据继代增殖培养的试验结果, 以Read为基

本培养基进行生根培养。不同浓度IAA对生根率及生根量的影响试验结果见表4。对生根率及生根量两个指标分别进行方差分析, 各处理间存在显著差异。适宜的肥荚红豆生根培养基配方为Read+IAA 1.0, 生根率和生根量最高, 分别为90.54%, 3.73根·株⁻¹, 培养7 d后就可见有根发生, 20 d后根可长整齐, 30 d后待植株生长健壮, 长到5~7 cm高时即可出苗(图1-F)。

表4 不同浓度IAA对肥荚红豆生根的影响

Table 4 Effect of different IAA concentrations on *Ormosia fordiana* Oliv. rooting

IAA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	生根量/根·株 ⁻¹	其他
0	0±0 ^d	0±0 ^d	—
0.5	64.51±1.894 ^c	1.84±0.232 ^c	10 d后开始生根, 长根不整齐
1.0	90.54±1.636 ^a	3.73±0.164 ^a	7 d开始生根, 20 d根长得较整齐
1.5	79.77±1.193 ^b	2.57±0.164 ^b	7 d开始生根, 长根不整齐

5 炼苗与移栽

炼苗是组培苗移栽到土壤之前的一个关键步骤。组培苗从异养过渡到自养状态, 移栽管护难度较大, 需调节平衡好外界环境与再生苗之间的关系。按照材料与方法2.5中的方法, 进行肥荚红豆组培苗炼苗与移栽, 成活率可达70%以上(图1-G、H), 成活植株长势一致, 观察无表型变异。

讨 论

本试验中主要采用的2种基本培养基: MS和Read, 前者的主要特点是无机盐浓度高, 特别是硝酸盐、钾离子和氨离子含量丰富; 而后者是一种低盐浓度培养基。陈正华(1986)总结了97种木本植物的快繁培养基, 发现有7种植物的芽诱导采用了MS及修改的高盐培养基。孙晓敏等(2012)等在光皮桦茎段再生植株研究中也指出MS培养基在腋芽诱导方面要优于低盐浓度的WPM培养基和1/2MS培养基。而在本研究中从萌发时间, 萌发整齐度及萌发率三个方面看, 两种类型基本培养基对肥荚红豆种子的萌发影响差异不大。而在历时50 d的增殖培养过程中, 两种类型基本培养基对肥荚红豆增殖苗的生长表现出了显著的差异, MS培养基明显不适宜于肥荚红豆再生植株生长。故作者认为, MS培养基对有些植物, 尤其是木本植物的毒害作用是一个长期积累, 慢慢表现的过程。在

初始的诱导阶段, 由于诱导过程所需时间常较短, 这种作用往往还不表现出来, 随时间增长, 开始影响植物生长甚至死亡。所以对盐浓度敏感的植物, 在时间较短的诱导阶段, 对基本培养基的选择不甚严格, 但在培养时间较长的增殖阶段, 就须严格根据需要进行选择基本培养基。

从试验结果来看肥荚红豆高频植株再生体系的建立关键在于掌握和控制好植物激素的合理配比。调节激素种类和组合则是获得高效再生植株的重要手段(翟彦等2011)。由于激素的积累作用, 能有效诱导植物产生芽或促进嫩茎增殖, 所需激素的种类和浓度在不同培养阶段有所不同(李浚明2003)。激动素KT的主要生理作用是促进细胞分化、分裂及生长, 诱导愈伤组织长芽。本试验中, KT与6-BA配合使用较单独使用6-BA显著提高了丛芽增殖率, 但却不利于丛芽进一步生长发育, 即使培养较长一段时间, 增殖丛芽仍不能舒展枝叶, 而无法达到下一步生根的要求。从增殖培养的试验结果可知, 在不添加KT, 且6-BA浓度较低的培养基中, 植株生长健壮, 枝叶舒展。故在肥荚红豆增殖培养之后, 需在附加较低浓度6-BA的培养基中壮苗培养, 以利于下一步的生根培养。

本试验通过种子萌发、增殖、壮苗、生根培养的系统研究, 建立肥荚红豆种子无菌诱导植株再生体系, 实现肥荚红豆的快速繁殖, 为肥荚红豆

种苗的规模化生产提供技术支持, 有利于促进肥荚红豆产业的深度开发。

参考文献

- 陈正华(1986). 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 24
- 国家中医药管理局中华本草编委会(2000). 中华本草(卷4), 上海: 上海科学技术出版社, 597
- 李国红, 张克勤, 周薇(2008). 从植物肥荚红豆中提取的活性成分及其应用. 中华人民共和国国家知识产权局, CN102008540A
- 李浚明(2003). 植物组织培养教程. 北京: 中国农业大学出版社, 85~92
- 李志英, 龙开易, 王珠清, 徐立(2007). 克拉豆的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 43 (2): 330
- 孙晓敏, 陈争, 李美飞, 童再康(2012). 光皮桦组织培养离体再生研究. 西北植物学报, 32 (3): 604~610
- 陶茸, 师尚礼, 李玉珠, 徐焯(2011). 种子处理对扁蓊豆种子在1/2MS培养基上发芽率的影响. 草原与草坪, 31 (3): 69~72
- 王令霞, 谭乐和, 朱红英(1998). 不同浓度的NaOH溶液对中粒种咖啡种子发芽率与幼苗生势的影响. 热带农业科学, 6: 25~28
- 翟彦, 张宗勤, 贾敏, 王岩, 宋西德, 周雷(2011). 百合体细胞胚胎发生和植株再生. 西北植物学报, 31 (4): 834~841
- 赵沛基, 沈月毛, 彭丽萍, 甘烦远(2003). 云南红豆杉离体胚的培养. 植物生理学通讯, 39 (4): 327~329
- Economous AS, Read PE (1984). *In vitro* shoot proliferation of *Minnesota deciduous azaleas*. HortScience, 19 (1): 60~61
- Francisco-Ortega J, Wang FG, Wang ZS, Xing FW, Liu H, Xu H, Xu WX, Luo YB, Song XQ, Gale S et al (2010). Endemic seed plant species from Hainan Island: a checklist. Bot Rev, 76 (3): 295~345
- Husain MK, Anis M, Shahzad A (2007). *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. In vitro Cell Dev Biol Plant, 43: 59~64
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP (1991). Application of micropropagation to forestry. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds). Micropropagation Technology and Application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishes, 311~336