

激素对比对白三叶草叶片愈伤组织诱导的影响

赵松峰 (河南省烟草技工学校, 河南 许昌 461000)

摘要: 用白三叶草叶片作外植体, 以 MS 为基本培养基, 用不同比例的细胞分裂素 (BA) 和生长素 (NAA) 进行了愈伤组织诱导研究。结果表明: 以 3.0 mg/L 的细胞分裂素和 3.0 mg/L 的生长素组合对白三叶草叶片分化具有较好的促进作用, 即适宜的培养基为 MS + BA 3.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L, 诱导率为 53.3%。

关键词: 白三叶草; 组织培养; 生长调节物质

中图分类号: S541+.2

文献标识码: A

文章编号: 1008-1631 (2008) 11-0036-02

Effects of Hormone Combinations on Callus Induction of *Trifolium repens* Leaves

ZHAO Song-feng (He'nan Tobacco Technical School, Xuchang 461000, China)

Abstract: *Trifolium repens* leaves were cultured as explants in MS medium combined NAA and BA with different concentration. The results showed that the best medium for callus differentiation directly was MS + BA 3.0mg/L + NAA 3.0 mg/L, and the leaf inducing rate was 53.3%.

Key words: *Trifolium repens*; Tissue culture; Plant hormone

白三叶草 (*Trifolium repens*) 又叫白车轴草, 是一种匍匐生长的豆科草本植物, 具有营养丰富、适应性强、适口性好和耐践踏等特点, 是温带地区优良的豆科牧草。

虽然对白三叶草组织培养的研究已有一些报道^[1], 但是对影响白三叶草叶柄诱导愈伤组织产生的不同激素配比的研究报道却较少。同时由于组织培养是提高植株优良记忆型的选择效率、加速优良基因型纯合过程的有效手段和途径, 而受基因型的影响, 不同品种之间的组织培养特性表现出一定的差异。因此, 探讨不同植株组织分化的培养条件, 特别是培养基中不同激素的适宜配比仍具有重要价值。以白三叶草为材料, 研究不同长时间的升汞消毒处理和不同激素浓度对比对白三叶草组织分化频率的影响, 试图找出合适白三叶草组织分化的最佳升汞消毒时长和最佳激素配比的培养基, 旨在为大量扩繁集约化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用的白三叶草取自许昌烟草技工学校苗圃, 外植体为去除叶脉的叶片。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 将 NAA 和 6-BA 浓度均设 0.1、0.5、1.0 和 3.0 mg/L 共 4 个梯度。以 MS 为培养基, 附加不同浓度的 NAA 和 6-BA 组合 (表 1), 观察不同激素浓度对比对白三叶叶片植株再生的影响。所有培养基保持

121 ℃ 灭菌 20 min 之前 pH 值调至 6.0, 琼脂粉 7.5 ~ 8.0 g/L, 蔗糖为 30 g/L, 基本培养基为 MS。

1.2.2 无菌材料的获得 2008 年 4 月上旬采集白三叶草的新鲜叶片, 除去颜色黯淡的老叶和幼嫩的新叶, 从中选取颜色鲜艳的叶片用自来水冲洗 60 min 后, 去除其表面黏附物。然后在超净工作台上, 用 70% 的酒精浸泡 30 s, 0.1% 的氯化汞消毒 5 min, 而后再用无菌水冲洗 3 次, 每次 3 min。取灭过菌的滤纸吸干外植体表面的水分, 在超净工作台上切取合适大小的叶片作为外植体进行愈伤组织诱导。

1.2.3 外植体接种培养方法 在超净工作台上将消毒灭菌过的叶片切成 0.75 cm × 0.75 cm 的正方形小块, 接种于 MS 培养基上。接种密度均为 10 个/皿 (培养皿直径 7.5 cm)。在温度 (25 ± 1) ℃、光强 1500 ~ 2000 lx、光周期 14 h 光/10 h 暗的条件下培养, 每 2 周继代 1 次。2 次重复, 每次重复至少采用 30 个外植体 (培养皿 3 个, 外植体 10 个/皿)。

1.2.4 数据统计 对接种到添加不同浓度 NAA 和 6-BA 组合的培养基上的诱导愈伤组织, 3 d 后进行观察记录, 20 d 后统计叶片愈伤组织边缘产生的直径 > 2 mm 的愈伤组织的比例。

2 结果与分析

BA 和 NAA 混合使用时, 以 MS + BA 3.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L 组合对愈伤组织的诱导率最高, 达到了 53.3% (表 1)。说明细胞分裂素与生长素配合使用, 二者的浓度较高且比值相等时, 有利于诱导愈伤组织的产生。此外, MS + BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 处理组合对于愈伤组织的生理状态也较其它处理组合要好。综合来看, 培养基 MS + BA 3.0 mg/L + NAA 3.0 mg/L 较

收稿日期: 2008-09-02

基金项目: 河南省科技攻关资助项目 (0624050023)

作者简介: 赵松峰 (1969 -), 男, 河南许昌人, 讲师, 主要从事植物生理学教学。

适合白三叶草初代培养愈伤组织的形成。

表 1 不同浓度的 NAA 和 BA 对比对愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effects of different concentrations NAA and BA on callus induction

处理 (mg/L)		产生愈伤组织时间 (d)	产生愈伤组织数量 (个)	诱导率 (%)	长势
NAA	6-BA				
0.1	0.1	6	2	6.7	分布散开, 团状较小
0.1	0.5	6	2	6.7	分布较密, 呈黄绿色
0.1	1.0	6	1	3.3	微小, 颜色较淡
0.1	3.0	5	1	3.3	颗粒呈浓绿色
0.5	0.1	0	0	0.0	没有出现愈伤组织
0.5	0.5	0	0	0.0	没有出现愈伤组织
0.5	1.0	0	0	0.0	没有出现愈伤组织
0.5	3.0	6	1	3.3	团状较小, 颜色发白
1.0	0.1	7	2	6.7	分布紧密, 颜色深绿
1.0	0.5	7	3	10.0	分布紧密, 颜色深绿
1.0	1.0	8	10	33.3	生长旺盛
1.0	3.0	0	0	0.0	没有出现愈伤组织
3.0	0.1	7	1	3.3	团状较小, 颜色发白
3.0	0.5	0	0	0.0	没有出现愈伤组织
3.0	1.0	0	0	0.0	没有出现愈伤组织
3.0	3.0	6	16	53.3	分布紧密, 颜色深绿

* 每处理外植体数量均为 30 个。产生愈伤组织时间为 0, 表示外植体在该培养基作用下, 在规定的统计时间内未能诱导出愈伤组织。

3 结论与讨论

3.1 NAA 和 6-BA 对白三叶草叶片的诱导结果分析

通过参考 NAA 和 6-BA 对白三叶草叶片诱导试验结果发现, 相同的激素配比, 对白三叶草茎段和叶片的诱导存在很大差异^[2]。这与其生理功能有关, 叶片为白三叶草的代谢源, 叶薄壁组织高度分化, 而其茎段主要起输导作用, 分化程度较低, 这一生理特点使得叶片脱分化时间较长或部分丧失脱分化的能力, 结果许多叶片外植体始终不能产生愈伤组织, 表现为叶片再生能力低于叶柄, 这可能与叶片和叶柄的易褐化程度不同以及两者的内源激素含量存在差异有关^[2]。在与叶片诱导试验的对比中可以看出, 白三叶草叶片外植体产生愈伤组织的时间、产生愈伤组织的个数及诱导率均低于相同条件处理的月季叶片, 而且白三叶草叶片易污染和产生褐化现象, 可能是由于白三叶草的基因型的缺陷所致。尽管白三叶草叶片外植体作为试验材料具有以上劣势, 但叶片外植体与培养基接触面积大, 营养吸收更充分, 这对于白三叶草再生体系的建立十分有利^[3]。此外, 本试验的研究也为将外源基因导入白三叶草植株, 进行分子育种方面的研究, 实现种质资源的改良打下了坚实的基础^[4]。

3.2 材料选取和培养基的问题

3.2.1 外植体 外植体的大小以及取材部位和时间等直接影响试验结果, 选择合适的外植体是顺利统计试验结果的保证。一般说来, 外植体越大越好, 因为幼小的外植体在经过消毒灭菌时容易被杀死, 以至难以长出愈伤组织。但过老的三叶草叶片其脱分化时间较长, 部分甚至不能长出愈伤组织。本次试验外植体材料的采集时

间在 4 月上旬, 三叶草生长茂盛, 在选取时应选生长茁壮、颜色鲜艳的叶片, 最好在叶面处带有黏液。除去老叶和幼叶。本试验中发现部分外植体出现褐变现象, 可在培养基中加入硝酸银, 能有效解决这一问题。

3.2.2 培养基 培养基是植物组织和细胞离体培养成功的重要因素, 直接影响外植体能否分化和愈伤组织诱导率的大小^[5]。对于白三叶草叶片, 基本培养基成分并未从根本上影响其愈伤组织产生的能力。白三叶草叶片的愈伤组织诱导率较低, 但是, 在高微量元素和高维生素的培养基上诱导率相对有所提高。也就是说, 高微量元素和维生素含量的培养基比 MS 常量培养基更能有效地诱导白三叶草叶柄愈伤组织的形成^[5]。本试验采用的是 MS 培养基, 与大多数培养基一样, MS 培养基的培养成分 (主要是各类无机盐浓度和糖分) 和物理化学性能 (琼脂含量、pH 值) 影响着试验的顺利进行。在第 1 批探索试验阶段, 由于琼脂含量较低以及 pH 值过低导致大量培养基未能凝固或凝得过于松动, 不能起到支持外植体的作用。培养基的 pH 值并非保持恒定, 在培养基的准备阶段 (尤其是高压灭菌后) 和外植体的生长过程中都发生着变化, 试验中需要不断对培养基的 pH 值进行实时测量和调整。培养基 pH 值不断变化的一个重要影响因素是 NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 之间供应与吸收的不平衡。在植物生长过程中, 培养基的 pH 值一般呈现先降低后升高^[6]。所以试验中对培养基 pH 值的调整直接关系到培养基能否凝固和愈伤组织的长势。几乎所有的培养基中都要加入糖。糖作为碳源, 为细胞提供合成新化合物的碳骨架, 为细胞的呼吸代谢提供底物与能源; 培养基的渗透调节也是靠糖来完成的^[7]。

3.2.3 培养条件及其它 影响组培的外界条件还有光通密度 (PPFD)、温度以及添加剂等。接种后, 培养皿应搬入恒温室中培养, 培养条件是温度 22 ~ 26℃、光照 12 ~ 14 h/d、光照强度 1 500 ~ 2 000 lx。温度过高、光照时间过长, 会导致培养皿中有水滴, 出现水渍现象, 易发生污染, 不利于愈伤组织的诱导^[8]。

三叶草外植体组培时除考虑以上因素外, 在实际的外植体培养中还需要考虑光敏色素、CO₂ 浓度等众多其他因素, 通过对这些影响因素合理的调配, 才能保证外植体生长良好。

本试验对白三叶草 (叶片) 的组织培养进行了探讨, 在不同浓度梯度和浓度组合的 NAA 和 6-BA 影响下, 我们可以得出最适合白三叶草外植体生长的 NAA 和 6-BA 组合。MS 培养基是植物组织培养中最常用的培养基, 其维生素含量较 B₅ 培养基低。在 MS 大量和铁盐的基础上增加微量元素和维生素含量, 对诱导叶柄愈伤组织的产生效果更好。有关高浓度微量元素对小麦^[9] 和大豆^[10] 组织培养诱导愈伤组织的促进作用, 与本试验结果相似。

4.1 地块选择

“冀创棉一”不适合与喜钾的作物倒茬或间作套种，例如萝卜和瓜类。

4.2 适宜播期

地膜棉田4月15~20日播种,裸地棉田4月20~30日播种,移栽棉田4月5日左右播种。

4.3 种植密度

适宜种植密度 2.25 万~3.75 万株/hm²，可根据土壤类型、肥力、水浇条件和种植模式来灵活确定。该品种下部营养枝生长健壮，发育快，适合稀植大棵、免整枝栽培。

4.4 肥水管理

4.4.1 底肥 底肥以鸡、牛或羊粪等有机肥为主, 化肥为辅, 化肥用量足够棉花苗期和蕾期利用即可。一般施二铵 375 kg/hm^2 、尿素 75 kg/hm^2 和钾肥 75 kg/hm^2 。

4.4.2 追肥 追肥分为初花肥、盛花肥和盖顶肥。(1) 初花肥：在棉花刚刚见花时施尿素 225 kg/hm² 和钾肥 225 kg/hm²；(2) 盛花肥：大量棉株第 4 个果枝开花时施尿素 150 kg/hm² 和钾肥 150 kg/hm²；(3) 盖顶肥：一般在 8 月初施用，用尿素 75 kg/hm² 和钾肥 75 kg/hm²。一般掌握 N 和 K 的比例为 1:1，初花肥和盛花肥最好离棉株 20 cm 采用宽沟施并盖土。

4.4.3 根外施肥 棉花生长后期，根的吸收能力降低。根部追肥易造成贪青晚熟，影响吐絮质量。可用磷酸二氢钾进行叶面喷施，自7月25日起每隔7d喷1次，连喷3~4次。

4.4.4 浇水 施肥须结合浇水进行，利于根系对营养的吸收。严禁等雨施肥或雨后施肥。

4.5 化控

掌握化控总原则是少量多次。一般情况下要进行

(上接第37页)

由于时间的限制,只完成了对白三叶草叶片的初代培养,成功地诱导出愈伤组织。倘若条件允许,还将进一步诱导白三叶草叶片不定芽的产生以及进行继代培养方向的研究,可为白三叶草系统化组织试验提供有效的数据资料,进而为白三叶草品种改良及广泛种植提供可靠的理论依据。

参考文献:

- [1] 韩碧文, 刘淑兰. 植物离体体细胞胚胎发生 [J]. 植物生理学通讯, 1988, (1): 9-15.
- [2] 郁萌萌, 施国新, 吕新丹, 等. 光叶槭叶片和叶柄再生体系的建立 [J]. 林业科学研究, 2006, 19 (2): 253-256.
- [3] 谢文彰. 单叶豆愈伤组织的诱导与分化 [J]. 台湾畜产研究所, 1995, (5): 22-26.
- [4] 赵志文, 赵强, 崔德才. 反义磷脂酶 D-r 基因转化白三叶草的研究 [J]. 山东农业大学学报, 2005, (6): 35-39.

4次。(1)第1次为蕾期化控。现蕾时进行,根据棉株长势定用量,一般喷施缩节胺 $112.5 \sim 225.0 \text{ g/hm}^2$ 。(2)第2次为初花期化控。见花时进行,也是根据长相来定用量,一般喷施缩节胺 $22.5 \sim 30.0 \text{ g/hm}^2$ 。(3)第3次为盛花期化控。是化控的关键时期。一般喷施缩节胺 $37.5 \sim 45.0 \text{ g/hm}^2$ 。(4)第4次化控在花铃期进行。化控一定要量足,可喷施缩节胺 $45 \sim 60 \text{ g/hm}^2$ 。

4.6 防治盲蝽象

抗虫棉的大面积种植,使棉田害虫的优势种群发生了变化,盲蝽象已成为当前棉田的主要虫害^[4],主要是绿盲蝽^[5]。绿盲蝽在北方1a发生5~6代,第1次防治关键时期在5月中下旬,第2次防治关键时期在6月上中旬,从6月下旬末开始进入第3代若虫孵化期,从此以后出现世代重叠,逐渐无明显代数界限,加之棉田密闭,防治困难。应及时检查主茎顶尖和果枝顶尖,当田间新被害株率达5%~10%,百株有虫达5头以上,应及时防治,一般隔7d防治1次,直至9月下旬。建议用辛硫磷和马拉硫磷复配防治。

参考文献:

- [1] 陈 斌, 何 敏, 穆宏声. 当前转基因抗虫棉生产中存在的问题及对策 [J]. 作物杂志, 2005, (5): 62-63.
- [2] 刘仕远, 刘济朝. 西瓜测土配方施肥结合施绿源生物有机肥肥效试验 [J]. 广西农学报, 2006, 21 (6): 17-19.
- [3] 谭亮萍, 寿 森. 萝卜肉质根形成与膨大的生理研究 [J]. 北方园艺, 2006, (1): 17-19.
- [4] 张 晓, 李 妙, 赵红霞, 等. 抗虫棉盲蝽蟥的发生与防治 [J]. 农业科技通讯, 2005, (3): 32-33.
- [5] 徐建国, 赵平厚, 范 惠, 等. 棉盲蝽发生规律与综合防治技术研究 [J]. 植物医生, 2004, 17 (6): 9-10.

- [5] 杨丽莉, 贾炜琰, 张彦芹. 影响白三叶草高频率植株再生因素的研究 [J]. 华北农学报, 2003, 18 (4): 66-68.
- [6] 梁海晏. 植物组织培养中与 pH 变化有关一些问题 [J]. 植物生理学通讯, 1987, (1): 1-6.
- [7] 周启发, 杨玉爱. 月季切花对 C-14-蔗糖的吸收分布 [J]. 中国农学通报, 1997, (4): 98-102.
- [8] 梁海晏. 光温条件及碳源对苧麻愈伤生长和分化的影响 [J]. 中国农学通报, 2004, (2): 65-66.
- [9] Kim J. Synergistic effects of praline and inorganic micromr tri-ents and effects of individual micronutrients on soybean (*Glycine max*) shoot regeneration in vitro [J]. J Plant Physiol, 1994, 144: 726-734.
- [10] Purnhauser L, Gyulai G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures [J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1993, 35: 131-139.