

# 影响白三叶草高频率植株再生因素的研究

杨丽莉, 贾炜珑, 张彦芹

(山西省农业科学院旱地农业研究中心, 山西 太原 030031)

**摘要:**以白三叶草子叶和下胚轴为外植体, 进行直接再生系统中不同基本培养基成分和激素浓度的研究发现: 白三叶草下胚轴顶端细胞的分化能力最强, 分化率在 65% 以上, 子叶次之, 下胚轴其他部位几乎不分化。高维生素 and 微量元素可有效提高子叶的再生频率 15%, 而对下胚轴顶端细胞的分化影响不大。在 6-BA 3 mg/L + NAA 0.08 mg/L 的浓度下, 下胚轴上段的再生频率最高, 达 80% 以上。

**关键词:** 白三叶草; 外植体; 植株再生

中图分类号: S541<sup>+</sup> 203.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)04-0066-03

## Study on the Factors of Influence the Regeneration Frequent of the *Trifolium repens* L.

YANG Li-li, JIA Wei-long, ZHANG Yan-qin

(The Dry-Land Research Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031, China)

**Abstract:** The composition of different fundamental substrates and the different concentration of the hormone for the cotyledon of the *Trifolium repens* and its hypocotyls taken as the explants were studied. The results show: the strongest differentiation ability of the cellulæ on the top of the hypocotyls was more than 65% of the differentiation. The same ability of the cotyledon was right behind it. The rest parts of the hypocotyls have rarely the ability. The higher concentrated vitamins and the minor elements could raise about 15% of the regeneration frequency of the cotyledon, but they have no influence on the top cellulæ of the hypocotyls. When the concentration was 6-BA 3 mg/L + NAA 0.08 mg/L the regeneration frequency of the top hypocotyls was more than 80%.

**Key words:** *Trifolium repens*; Explant; Regeneration

白三叶草具有营养丰富、适应性强、适口性好等特点, 是温带地区优良的豆科牧草。20 世纪 80 年代起, 对白三叶草植株再生的研究已有一些报道<sup>[1,2]</sup>, 而对影响白三叶草直接诱导植株再生频率因素的研究国内未见报道。白三叶草组织培养中高频率植株再生是进一步进行基因转化的基础, 具有十分重要的意义。本试验对白三叶草直接诱导植株再生系统中不同外植体的再生能力和不同基本培养基成分、激素浓度对再生频率的影响进行了研究, 从而确定影响其高频率再生的主要因素。

## 1 材料和方法

白三叶草(*Trifolium repens* L.) 种子由北京大学林忠平教授提供。

白三叶草成熟种子用 70% 的酒精浸泡 2 min 后, 再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 25 min, 无菌水冲洗 4 次。滤纸吸干水分, 摆放于无营养物质的琼脂培养基上, 26~28 °C 暗培养萌发。将 5~6 d 苗龄的无菌苗分成子叶、胚轴上段(带生长点部分) 0.5 cm 和胚轴下段 0.5 cm, 分别接种于不同成分的培养基上(表 1)。试验设 3 次重复, 每一培养皿接种外植体数不少于

收稿日期: 2003-03-24

基金项目: 国家“863”资助项目(2001AA212166)

作者简介: 杨丽莉(1964-), 女, 河北唐山人, 学士, 助理研究员, 主要从事生物技术研究工作。

30 个。

外植体接种后置于 25~ 27 ℃, 暗培养 20 d 后再进行光培养, 30 d 统计分化率。光照强度 2 000~ 2 500 lx, 光照时间 16 h/d。分化频率(%)= 分化苗的外植体数/ 外植体总数× 100。待小苗长到 2~ 3 cm 时移至生根培养基中生根。

表 1 培养基配方

培养基编号	基本培养基	6- BA(mg/ L)	NAA (mg/L)	备注
1B <sub>2</sub> N <sub>0.04</sub>	MS 全量	2	0.04	其他成分为: 肌醇 100 mg/L+ 脯氨酸 600 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂粉 6 g/L。pH 5.8
1B <sub>3</sub> N <sub>0.08</sub>	MS 全量	3	0.08	
1B <sub>4</sub> N <sub>0.12</sub>	MS 全量	4	0.12	
2B <sub>2</sub> N <sub>0.04</sub>	MS 大量+ 有机+ 铁盐+ 4 倍微量	2	0.04	
2B <sub>3</sub> N <sub>0.08</sub>	MS 大量+ 有机+ 铁盐+ 4 倍微量	3	0.08	
2B <sub>4</sub> N <sub>0.12</sub>	MS 大量+ 有机+ 铁盐+ 4 倍微量	4	0.12	
3B <sub>2</sub> N <sub>0.04</sub>	MS 大量+ 铁盐+ 4 倍微量+ B <sub>5</sub> 有机	2	0.04	
3B <sub>3</sub> N <sub>0.08</sub>	MS 大量+ 铁盐+ 4 倍微量+ B <sub>5</sub> 有机	3	0.08	
3B <sub>4</sub> N <sub>0.12</sub>	MS 大量+ 铁盐+ 4 倍微量+ B <sub>5</sub> 有机	4	0.12	

2 结果与分析

2.1 不同外植体分化频率的差异

白三叶草不同外植体由于细胞结构及生理状态不同, 分化能力差异极大。暗培养 10 d 时观察, 子叶边缘和胚轴下段均明显膨大, 子叶边缘呈深绿色水渍半透明状; 胚轴下段呈白色。胚轴顶段的顶端膨大明显, 呈白色, 其余部分无明显变化。20 d 时子叶边缘和胚轴下段切口处有极少量愈伤组织出现, 胚轴顶端无愈伤组织。转入光培养 10 d 后, 个别子叶的边缘和胚轴下段的两端出现极少量绿色芽点, 胚轴顶端密集着大量绿色芽点。光培养 30 d 时, 子叶边缘分化少量小苗, 胚轴下段几乎不分化, 胚轴顶端处分化大量芽苗, 以下部分萎缩、干枯、脱落。由统计结果可以看出(表 2): 子叶和胚轴下段分化率很低, 尤其是胚轴下段几乎不分化; 子叶分化率在 23% 以下。胚轴顶段分化率在 65% 以上。因此, 3 种不同外植体直接诱导植株再生频率依次为: 胚轴顶段> 子叶> 胚轴下段。

2.2 不同基础培养基对白三叶草分化频率的影响

基础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再生植株和再生频率的大小。从表 2 可以看出, 对于胚轴顶段, 基本培养基成分并未从根本上影响其分化能力。白三叶草的子叶虽然再生频率很低, 但是, 在高微量元素和高维生素的培养基上分化率相对有所提高。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促进白三叶草子叶分化。在相同激素水平的条件下, 子叶的分化率在高微量元素和维

生素的培养基上比在 MS 基本培养基上平均高出 15%。

表 2 白三叶草诱导植株分化频率

培养基编号	外植体	接种数 (个)	分化数 (个)	分化率 (%)
1B <sub>2</sub> N <sub>0.04</sub>	子叶	214	3	2.4
	胚轴顶段	106	88	83.0
	胚轴下段	108	2	1.9
1B <sub>3</sub> N <sub>0.08</sub>	子叶	91	1	1.1
	胚轴顶段	116	110	95.7
	胚轴下段	134	0	0
1B <sub>4</sub> N <sub>0.12</sub>	子叶	179	6	3.4
	胚轴顶段	124	83	66.9
	胚轴下段	113	0	0
2B <sub>2</sub> N <sub>0.04</sub>	子叶	103	5	4.6
	胚轴顶段	117	90	76.9
	胚轴下段	94	0	0
2B <sub>3</sub> N <sub>0.08</sub>	子叶	90	7	7.8
	胚轴顶段	123	109	88.7
	胚轴下段	97	0	0
2B <sub>4</sub> N <sub>0.12</sub>	子叶	90	7	7.8
	胚轴顶段	139	91	65.5
	胚轴下段	93	0	0
3B <sub>2</sub> N <sub>0.04</sub>	子叶	126	13	10.1
	胚轴顶段	116	86	74.1
	胚轴下段	93	0	0
3B <sub>3</sub> N <sub>0.08</sub>	子叶	106	25	23.6
	胚轴顶段	100	84	84.0
	胚轴下段	89	0	0
3B <sub>4</sub> N <sub>0.12</sub>	子叶	106	21	19.8
	胚轴顶段	116	79	68.1
	胚轴下段	101	0	0

2.3 激素对芽苗分化率的影响

本试验中最高分化率的激素组合是 6- BA 3

mg/L+ NAA 0.08 mg/L。6-BA 具有较强促进芽分化的能力。从表 2 可以看出,随着培养基中 6-BA 含量的提高,分化频率明显增高,在 6-BA 浓度达到 3 mg/L 时,分化频率接近最大值。继续提高 6-BA 浓度到 4 mg/L 就会抑制细胞分化,分化频率降低。从试验中还可以观察到,NAA 具有较强促进根分化的能力,NAA 浓度在 0.08~0.12 mg/L 时,根系发育良好。

### 3 讨论

在对白三叶草直接诱导体细胞再生植株的研究中,外植体和培养基成分是影响植株再生的重要因素。其中外植体种类的作用大于培养基成分。

白三叶草直接再生方式与其他豆科牧草有较大差异。百脉根等豆科牧草的下胚轴和子叶的任何部位均有不同程度的再生能力<sup>[3]</sup>。而白三叶草的再生能力仅局限于胚轴顶端生长点的分生组织,子叶和下胚轴的其他部位直接再生能力极弱。

MS 培养基是植物组织培养中最常用的培养基,它的维生素含量较 B<sub>5</sub> 培养基的低。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子

叶分化芽苗的效果更好。有关高浓度微量元素对小麦<sup>[4]</sup>、大豆<sup>[5]</sup>组织培养再生植株的促进作用已见报道,与本试验结果相似。另一方面,高维生素和微量元素培养基对下胚轴上段生长点细胞的分化影响不大,表明分化能力强的外植体对培养基基本成分的浓度反应不敏感。

### 参考文献:

- [1] 韩碧文,刘淑兰. 植物离体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯,1988,(1): 9-15
- [2] 安利佳,李凤霞,张俊敏. 豆科植物组织培养研究[J]. 植物学报,1992,(10): 743-752
- [3] 时永杰,周丽霞. 百脉根的组织培养与植株再生[J]. 草业科学,1997,(14): 61-64
- [4] Kim J. Synergistic effects of praline and inorganic micronutrients and effects of individual micronutrients on soybean (*Glycine max*) shoot regeneration *in vitro*[J]. J Plant Physiol, 1994, 144: 726-734
- [5] 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.