

# 不同激素处理对白羊草愈伤组织分化的影响

于 娜<sup>1</sup>, 董宽虎<sup>2</sup>

(1. 山西省林业职业技术学院 园林系, 山西 太原 030009; 2. 山西农业大学 动物科技学院, 山西 太谷 030801)

**摘 要:**以白羊草成熟种子为外植体,研究了适宜白羊草分化培养基的激素组合和活性炭在白羊草生根阶段的诱导作用。结果表明:MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.04 mg/L 利于胚性愈伤组织的保持和分化;在生根试验中,添加活性炭 2 g/L 的 2 号处理能明显提高白羊草的生根率及根长。

**关键词:**白羊草;成熟种子;愈伤组织分化;生根率

**中图分类号:**S 336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0083-04

白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)属禾本科孔颖草属多年生草本植物,其生长势强、产草量高、抗旱、耐牧、适应性广,是暖温带丘陵山地重要的草地资源,白羊草以其营养价值高而在牧草生产中具有广阔的前景<sup>[1]</sup>。白羊草在世界各暖温带都有分布,我国主要分布于华北、西北的南部、河南、山东的低山坡地和黄土高原<sup>[2]</sup>。为充分利用这一建群优势种,驯化与选育优良的白羊草种质资源,满足白羊草草地资源的持续利用,该研究以白羊草成熟种子为外植体,在进行离体组织培养研究的基础上<sup>[3-4]</sup>,研究了适宜白羊草分化培养基的激素组合和活性炭在白羊草生根阶段的诱导作用,以期获得更高的愈伤组织分化率和生根率,为白羊草的分子生物学研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的白羊草种子于 2012 年 10 月采自海拔 1 100 m,位于北纬 37°22',东经 112°35'的山西省太谷县凤山。种子千粒重 0.6975 g<sup>[5]</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基的配制 该试验以 MSB 培养基(MS 无机盐+B<sub>5</sub> 有机成分)加 3%蔗糖、5%琼脂粉制备基础培养基,pH 值调至 5.8,培养基用 100 mL 三角瓶分装,每瓶 20 mL,封口膜包扎,121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2.2 白羊草种子的处理 取完全成熟,结构完整的白羊草种子,拨去外稃,先用无菌水浸泡 10 min,去除杂质并使其沉淀,然后用 75%酒精浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3 次,再用 0.1%升汞溶液消毒 15 min,期间不断摇动,用无菌水冲洗 3 次后,用滤纸吸干水渍。

1.2.3 愈伤组织的诱导 将消毒晾干的白羊草种子接种于附加 2,4-D 2.0 mg/L 的愈伤组织诱导培养基上,每个处理接种种子 30 个,重复 3 次。将诱导出的愈伤组织接种至继代培养基:MSB+2,4-D 1.0 mg/L。诱导愈伤的条件为黑暗、室温(25±2)℃。

1.2.4 诱导愈伤组织分化 将继代培养后紧密而坚硬的愈伤组织转移 MSB 附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的培养基上,6-BA/NAA 的浓度分别为 0.1/0.02、0.1/0.03、0.1/0.04、0.1/0.05、0.1/0.06、0.03/0.04、0.06/0.04、0.15/0.04 mg/L,分别编号为 A1~A8。每处理接种愈伤 20 个,重复 3 次。分化培养条件为 16 h/d 光照、室温(25±2)℃、光照强度 2 000~3 000 lx。

1.2.5 生根培养 在 MSB 培养基上施加 3 个浓度水平活性炭,分别为 B1:MSB+AC 1 g/L、B2:MSB+AC 2 g/L、B3:MSB+AC 3 g/L,以 MSB 不加活性炭做对照(B),研究不同浓度的活性炭对白羊草生根的影响。生根培养条件为 16 h/d 光照、室温(25±2)℃、光照强度 2 000~3 000 lx。

1.2.6 练苗与移栽 将壮根后的白羊草幼苗进行移栽。移栽前先去掉封口膜在培养室中练苗 2~3 d 后,把幼苗基部的残留琼脂洗净,移栽至小盆内,移栽基质为腐殖质:细沙:菜园土=1:1:1 的比例混匀配制而成。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 6-BA/NAA 配比对愈伤组织分化率的影响

由表 1 中 A1~A5 处理可知,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织分化率呈现先上升后下降的趋势,A1 培养基胚性愈伤组织诱导率和分化率均最低,A3 培养基胚

**第一作者简介:**于娜(1979-),女,山西阳城人,硕士,助教,研究方向为草地资源与草地管理。E-mail:yuna1023@126.com。

**责任作者:**董宽虎(1956-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为草地资源与草地管理。E-mail:dongkuanhu@126.com。

**基金项目:**山西省科技攻关资助项目(20120311011-1);山西省科技基础条件平台建设资助项目(2012091004-0101);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20101403110002)。

**收稿日期:**2013-12-20

性愈伤组织诱导率和分化率均最高,即 NAA 为 0.04 mg/L 时分化率达到最高,且胚性愈伤率保持最高,说明这个激素组合在对白羊草成熟种子为外植体分化中作用最好。当 NAA 浓度的逐步增加,胚性愈伤率和分化率又明显下降,说明 NAA 浓度过低过高都不利于胚性愈伤组织的保持和分化。

表 1 不同激素浓度对白羊草成熟种子外植体分化的影响

Table 1 Effect of different hormone concentrations on callus differentiation from mature embryo of *Bothriochloa ischaemum*

培养基 Medium	激素浓度 Hormone concentrations/mg · L <sup>-1</sup>		胚性愈伤率 Rate of embryogenic callus/ %	分化率 Differentiation frequency/ %
	6-BA	NAA		
A1	0.1	0.02	66.35±1.48c	2.56±2.56e
A2	0.1	0.03	92.59±3.7a	17.61±4.63cd
A3	0.1	0.04	96.97±3.03a	64.18±5.93a
A4	0.1	0.05	88.89±11.11ab	54.44±4.75a
A5	0.1	0.06	83.81±5.32ab	38.88±7.33b
A6	0.03	0.04	86.92±3.03a	27.45±14.06ab
A7	0.06	0.04	94.44±5.56a	40.14±2.17a
A8	0.15	0.04	44.62±2.65b	48.87±5.65a

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: Different small letters in the same column mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same below.

由于愈伤组织诱导率随着激素浓度的变化存在一定的变化趋势,因此在不改变 NAA 浓度前提下,变化 6-BA 浓度,进一步找到更合适的浓度。在 NAA 0.04 mg/L 的基础上,另外增设 6-BA 水平。

从表 1 中 A6~A8 处理可以看出,当 NAA 浓度保持不变时,6-BA 浓度在这 3 个浓度下分化差异不显著( $P<0.05$ ),当 6-BA 浓度降低至 0.03 mg/L 时,分化率只有 27.45%;6-BA 浓度上升为 0.06 mg/L 时,分化率为 40.14%;6-BA 浓度为 0.15 mg/L 时分化率最高,为 48.87%,此时尽管胚性愈伤率不高,但几乎所有的胚性愈伤组织都能分化。表明 6-BA 浓度对愈伤组织分化率影响不显著。

## 2.2 不同激素对比对胚性愈伤组织质量的影响

由表 2 可以看出,不同的激素组合对愈伤组织增殖及形态的影响不同。在 6-BA 浓度保持在 0.1 mg/L 时,愈伤组织长势随着 NAA 浓度的提高增长速度先快后慢,愈伤等级也随之变化,以 A3~A5 号培养基愈伤质量最好,没有毛状物的产生,其它培养基上都有毛状物的出现,NAA 浓度保持 0.04 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加愈伤等级提高,质量由软变硬,颜色由浅变深,增长速度加快。

## 2.3 活性炭对白羊草生根的影响

加入活性炭以后,小苗增长迅速,地上部分长至 3 cm 左右时,根也出现并能达到 4~5 cm,说明活性炭能促进根的生长。

表 2 不同激素对比对白羊草愈伤组织质量的影响

Table 2 Effect of different hormones combination on the quality of callus of *Bothriochloa ischaemum*

培养基 Medium	愈伤质地 Quality of callus	愈伤长势 Multiplication of callus	愈伤等级 Level of callus
A1	淡黄色,较硬,有毛状物	++	2
A2	淡黄色,较硬,有毛状物	+++	2
A3	鲜黄色,较硬,	++++	1
A4	鲜黄色,较硬	++++	1
A5	鲜黄色,较硬	++++	1
A6	淡黄色,较软,毛状物	++	4
A7	深黄色,较硬	++	3
A8	黄褐色,较硬	+++	2

注:十表示愈伤组织的生长速度,十越多表示生长速度越快。

表 3 表明,B1 和 B2 处理的生根率均高于 CK 和 B3 处理。尤其是 2 g/L 的活性炭能明显提高生根率及根长,但当活性炭的浓度达到 3 g/L 时,则抑制了白羊草的生根,不仅降低生根率,而且降低根的生长速度,这说明了活性炭在一定浓度范围内能明显促进根的伸长生长。而高浓度(3 g/L)的活性炭则抑制白羊草的生根。

表 3 活性炭对白羊草生根的影响

Table 3 Effect of active carbon on root production of *Bothriochloa ischaemum*

培养基 Medium	生根率 Rate of rooted/ %	平均根长/cm Mean length of root/cm	生根表现 Root production
CK	75.26	2.13	较细弱,短小,生根慢
B1	79.02	3.16	繁密,粗壮
B2	87.45	4.20	根长,粗壮
B3	53.12	2.33	根较粗,生根慢

## 3 讨论与结论

活性炭(AC)在生根阶段具有非常明显的作用。一般认为 AC 对诱导生根有利,如有些植物在仅有 AC 而无生长素的培养基中即可生根<sup>[6]</sup>,有些植物则需在同时含有生长素和 AC 的培养基中才能生根<sup>[7]</sup>,但也有人认为 AC 对生根无影响或降低生根率和根条数<sup>[8]</sup>,甚至有人认为 AC 抑制生根<sup>[9]</sup>。这主要是因为 AC 在吸附有害物质的同时,又吸附了培养基中的生长调节物质和其它培养基成分,尤其是当较高浓度的 AC 与常量的生长调节物质同时使用时,AC 常常抵消生长调节物质的作用。在该试验中,将 AC 用于生根培养,明显促进了根的伸长生长,对生根有利,尤以 2 g/L 的生根效果较理想,不仅生根率高,生根数多,且根长;但当活性炭浓度达到 3 g/L 时,却抑制生根,降低生根率及根条数,这可能是 AC 在吸附有害物质的同时也吸附了生长调节物质。

植物生长调节剂的诱导作用对植物的脱分化有着重要的意义,不同的植物生长调节剂及其配比可能对愈伤组织的诱导作用不同。

添加低浓度的细胞分裂素 6-BA,能有效的提高植物细胞诱导愈伤组织的再生能力。6-BA 作为外源激素,能改善细胞内源生长素和细胞分裂素的比例,调节细胞生理生化状态,有利于胚性愈伤组织的发生,从而增加分

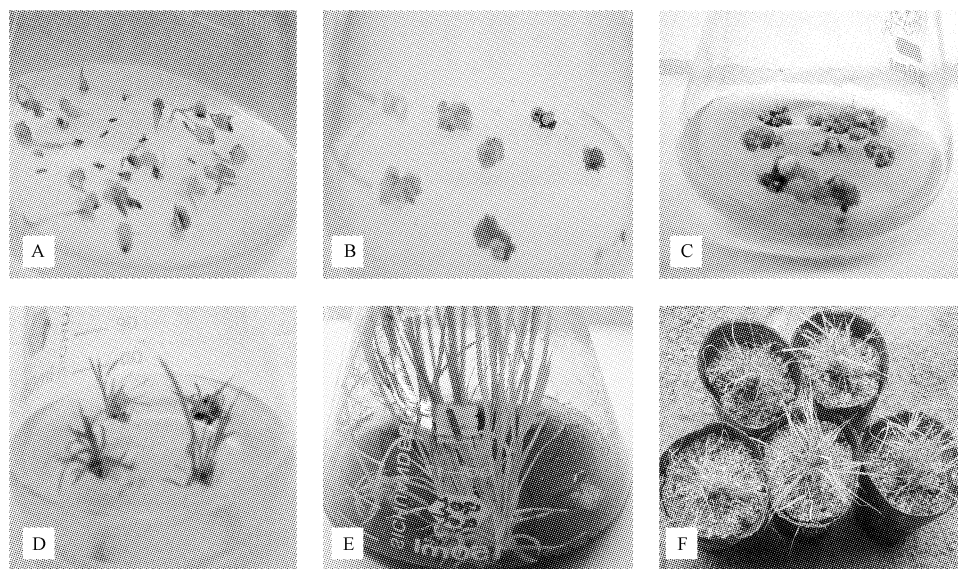


图1 白羊草植株再生过程

注:A种子诱导产生的愈伤组织;B外表呈干燥、紧密、颗粒状愈伤组织;C、D在分化培养基上愈伤组织分化绿苗;E活性炭培养基上再生植株;F移植再生苗。

Fig. 1 The course of plant regeneration of *Bothriochloa ischaemum*

Note: A. Callus induced from mature seeds; B. Callus of dry, compact, small pellet; C, D. Shoots regenerated from callus; E. Regenerated plant on active carbon; F. Transplanted the regenerated plant in pot on the differentiation medium.

化频率。Bai等<sup>[10]</sup>分别对早熟禾、大麦、狗牙根、高羊茅的研究结果表明,在诱导培养基中添加较低浓度6-BA促进了胚性愈伤组织的形成,提高了愈伤质量,增加其再生能力。长期以来,人们广泛地把生长素/细胞分裂素比值运用于组培中,二者的比例决定着芽和根的分化。一般来说,当生长素/细胞分裂素比值高时,有利于长根,低时有利于长芽,中间比值利于愈伤组织的诱导和分化<sup>[11]</sup>。

植物体内同时存在数种植物激素,它们之间可相互促进增效,也可相互拮抗抵消<sup>[12]</sup>。在植物生长发育过程中,任何一种生理过程往往不是培养基中某一激素的单独作用,而是培养基中多种激素相互作用的结果<sup>[13]</sup>。

该试验中白羊草愈伤组织诱导分化的激素适应范围较宽,不同的外植体对不同的生长素敏感性不同,而且,在含有不同浓度生长素和细胞分裂素的继代培养基上无菌苗都能生长,只是NAA对芽分化的影响较大,6-BA的诱导动力较NAA低。由试验分析得知,白羊草在6-BA 0.03~0.15 mg/L都可以进行分化,在6-BA 0.10 mg/L的浓度时分化率较高。而白羊草对NAA也有较宽的适应范围,在0.02~0.10 mg/L内均能适应,而增殖时以较低的生长素浓度和较高的细胞分裂素浓度较好。较高浓度的6-BA与较低浓度的NAA配合诱导出的丛生芽,无菌苗生长量少,叶片较小,若生根则还需要一个壮苗阶段。

## 参考文献

- [1] 时永杰,孙晓萍,刘晓强,等. 白羊草幼穗的组织培养[J]. 草业科学, 1998, 15(6): 19-20.
- [2] 徐朗然,张继敏,于士友. 黄土高原白羊草的基本特征及其地理学意义[J]. 西北植物学报, 1997, 17(1): 88-93.
- [3] 于娜,董宽虎. 白羊草成熟胚组织培养及植株再生体系的建立[J]. 草地学报, 2008, 16(5): 466-469.
- [4] 于娜,董宽虎. 白羊草成熟种子组织培养影响因素的研究[J]. 现代农业科技, 2011.
- [5] 黄锋华,董宽虎. 白羊草灌丛草地植物量及优势种牧草营养动态研究[J]. 草原与草坪, 2007(2): 14-17.
- [6] 李群,杜文平,王米力,等. 植物组织培养中控制与污染技术的研究[J]. 四川林业科技, 1996(20): 22-24.
- [7] Ronse A C. *In vitro* propagation of *Otacanthus coccineus* Lind. [J]. Journal of Plant Biotechnology, 1992, 30(3): 243-245.
- [8] Berardi G. Micropropagation of Gallery pear from seeding explants[J]. Sci Horticul (Amsterdam), 1993, 53(12): 157.
- [9] Antonelli M, Chiariolli A. *In vitro* rooting of different peach genotypes [J]. Acta Horticul, 1988, 227: 414.
- [10] Bai Y, Qu R. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue[J]. Plant Breeding, 2001, 120: 239-242.
- [11] 熊丽,吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [12] 解晓红,武宗信,冯文龙,等. 地黄茎尖快繁技术及其问题探讨[J]. 山西农业科学, 2003, 31(3): 66-68.
- [13] 王丽艳,荆瑞勇. 花椒组织培养与快繁技术的研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(增刊): 67-69.



# 苦豆子内生拮抗放线菌的筛选及活性菌株鉴定

祁鹤兴, 胡美娟, 王 丽, 周星辰, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以6种植物病原真菌为靶标菌,采用皿内对峙培养法,对126株苦豆子内生放线菌进行了抗菌活性筛选。结果表明:15株菌具有较高的抑菌活性,占总菌株数11.9%,其中菌株YWZKDS<sub>4</sub>和NDZKDS<sub>55</sub>对稻瘟病菌和黄瓜枯萎病菌的抑菌带宽度最大,分别为15.12 mm和18.54 mm;菌株NDZKDS<sub>22</sub>具有广谱抗菌活性,它们的抑菌带宽度均大于10 mm以上;根据形态特征和16S rRNA基因序列同源性分析,3株活性菌株YWZKDS<sub>4</sub>、NDZKDS<sub>22</sub>、NDZKDS<sub>55</sub>分别与*Streptomyces scabiei*、*Streptomyces albospinus*和*Streptomyces capillispiralis*亲缘关系最近,序列相似性分别为99.1%、96.4%、98.8%。试验结果表明,苦豆子内生放线菌对6种植物病原真菌具有较好的抑菌活性。

**关键词:**苦豆子;内生放线菌;抑菌活性;鉴定;16S rRNA序列分析

**中图分类号:**S 476 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0086-06

在生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙,不引起植物产生明显症状的微生物称为植物内生菌<sup>[1]</sup>。现有研究发现,植物内生放线菌具有稳定的生存空间,与土壤微生物及附生微生物相比与宿主植物之间的关系更加密切<sup>[2]</sup>,且能产生具有广泛生物学活性的多种次生代谢产物,包括抗生素、水解

酶类、促生物质和一些尚未鉴定的抗菌蛋白等,这些物质在植物抵抗病原菌入侵、潜伏、扩展蔓延过程中具有重要的应用潜能。

利用生防菌防治植物病害是生物防治的重要内容之一。从药用植物内生菌中分离出的生物活性物质,有51%是新发现的化合物,而从土壤微生物中发现的新物质仅为38%。因此,从药用植物内生菌中筛选新型抗菌物质的潜力巨大<sup>[3]</sup>。沙生药用植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)主要分布于西北干旱荒漠和半荒漠地区,在宁夏种群优势突出,是宁夏重要的道地药材之一<sup>[4]</sup>。有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫等药用价值<sup>[5]</sup>,同时还具有饲用价值和生态学功能,目前已成为国内外研究的热点,但在植物内生菌方面的研究还较少。

该研究在前期对苦豆子内生放线菌分离、形态初

**第一作者简介:**祁鹤兴(1990-),女,青海西宁人,硕士研究生,研究方向为生物防治及微生物资源利用。E-mail: 390495559@qq.com.

**责任作者:**顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,现主要从事植物病理学的教学和科研工作。E-mail: gupeiwen2013@126.com.

**基金项目:**宁夏自治区科技支撑计划资助项目(NG2013)。

**收稿日期:**2013-12-10

## Effect of Different Hormone Concentrations on Callus Differentiation from Mature Embryo of *Bothriochloa ischaemum*

YU Na<sup>1</sup>, DONG Kuan-hu<sup>2</sup>

(1. Department of Landscape, Shanxi Forestry Vocational Technical College, Taiyuan, Shanxi 030009; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taiyuan, Shanxi 030801)

**Abstract:** Taking mature seed of *Bothriochloa ischaemum* as explant, suitable callus differentiation of different hormone concentrations, active carbon on root production of *Bothriochloa ischaemum* MS medium were discussed. The results showed that the culture medium of callus differentiation was MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.04 mg/L; root production were improved in the active carbon 2 g/L.

**Key words:** *Bothriochloa ischaemum*; mature seeds; callus differentiation; rate of rooted