

安祖花愈伤组织诱导和植株再生的研究^{*}

姚振¹, 季静^{1,2**}, 王萍^{1,3}, 王罡^{1,2}

(1. 吉林大学植物科学学院植物基因工程中心植物分子生物学研究室, 长春 130062; 2. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; 3. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

摘要: 为建立适合安祖花遗传转化的受体体系, 分别选取安祖花组培苗带叶柄的叶片和带叶柄的茎段为外植体, 进行了愈伤组织的诱导和植株再生试验。结果表明: 以带叶柄的茎段为外植体对愈伤诱导效果好于带叶柄的叶片。使用带叶柄茎段为外植体, 以 1/2MS + BA 1.0 mg/L + 2, 4-D 0.1 mg/L 为基本培养基进行愈伤组织诱导和继代培养, 愈伤组织诱导率最高为 89.65%; 使用 3% 蔗糖作为碳源的 1/2MS 添加 0.1 mg/L KT 能显著提高诱导率; 添加 NAA 0.5 mg/L 或 2, 4-D 0.5 mg/L 有助于生根。

关键词: 安祖花; 组织培养; 带叶柄叶片; 带叶柄茎段

中图分类号: S682.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2006)01-0043-04

Induction of Callus and Plantlet Regeneration of *Anthurium andraeanum*

YAO Zhen¹, JI Jing^{1,2}, WANG Ping¹, WANG Gang^{1,2}

(1. Laboratory of Plant Molecular Biology, Research Center for Plant Genetic Engineering, College of Plant Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Agriculture and Biology Engineering College, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Marine School, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Induction of callus and plantlet regeneration were carried out from leaves and shoot cuttings with petiole as explants in *Anthurium andraeanum*. The results indicated that the frequencies of callus formation from shoot cuttings with petiole were higher than those from leaves with petiole. The medium containing 1/2MS + BA 1.0 mg/L + 2, 4-D 0.1 mg/L was proved to be the most effective for inducing callus from shoot cuttings with petiole and the highest frequency of callus induction was 89.65%. The frequency of callus formation was improved when 0.1 mg/L KT, 1/2MS and 3% sucrose were applied. Adding 2, 4-D 0.5 mg/L or NAA 0.5 mg/L benefited root formation. Suitable type of explants was found and the adaptive acceptor system for genetic transformation was also built.

Key words: *Anthurium andraeanum*; tissue culture; leaf with petiol; shoot cutting with petiol

安祖花(*Anthurium andraeanum*)是天南星科安祖花属多年生附生常绿草本植物, 又名红掌、火鹤花、花烛、大叶花烛、台灯花。1896年由法国著名植物学家 Elouard Andr 自哥伦比亚西南部的热带雨林引种到欧洲, 1983年由荷兰引入中国。安祖花是仅次于热带兰的第二大热带花卉。

随着生物技术的发展, 花卉转基因研究也逐渐成为热点。据报道, 花卉转基因已经获得菊花、

康乃馨、玫瑰、唐菖蒲、郁金香、非洲菊、兰花等转基因植株^[1]; 台湾正在利用转基因技术转化安祖花、晚香玉、菊花、百合及蝴蝶兰等花卉^[2]。国内外已有采用安祖花盆栽苗的嫩茎切段、叶片、叶柄、茎尖等作为外植体诱导愈伤组织, 并建立再生体系的报道^[3-9]。遗传转化中, 无论是农杆菌介导法还是基因枪轰击法都需要大量外植体。安祖花生长相对缓慢, 上述外植体都很难在短时间内诱

* 基金项目: 天津市农业委员会资助项目(04260)

作者简介: 姚振(1980-), 男, 硕士, 研究方向: 植物分子生物学。

收稿日期: 2004-11-06

** 通讯作者

导产生大量的愈伤组织,而通过多次继代增殖愈伤组织的方法,继代的代数太多不利于转化和筛选。因此,现有的安祖花组织培养体系耗时长,并且取材范围窄,不能满足安祖花进行遗传转化时需大量受体材料的要求。

本研究选用安祖花组培苗带叶柄叶片和茎段为外植体,探讨建立适合安祖花遗传转化的再生体系的适宜条件,为安祖花的进一步遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的安祖花由吉林省长春市国联花卉公司提供,品种为香槟(XP)、亚利桑那(ARZ)、亚特兰大(ATL)、克拉特(KLT)和 AYZ。

各种培养基见表 1,琼脂的质量分数为 0.8%,蔗糖、葡萄糖质量分数为 3%,pH 5.8,高压灭菌。

表 1 培养基成分

Table 1. The composition of media

培养基种类 Culture	编号 No.	成分 Composition	
叶片诱导 Leaf induction	MS1	MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KT 2.0 mg/L + 2,4-D 0.05 mg/L + 蔗糖	
	MS2	MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 2.0 mg/L + 蔗糖	
	MS11	1/2 MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L + 葡萄糖	
	MS12	1/2 MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + 葡萄糖	
	MS13	1/2 MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L + 蔗糖	
茎段诱导 Shoot cutting induction	MS14	1/2 MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + 蔗糖	
	MS15	MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L + 葡萄糖	
	MS16	MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + 葡萄糖	
	MS17	MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L + 蔗糖	
	MS18	MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + 蔗糖	
继代 Subculture	MS14	1/2MS + BA1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + 蔗糖	
	芽分化 Bud differentiation	MS21	1/2 MS + BA 0.5 mg/L + 蔗糖
		MS31	1/2 MS + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖
生根 Rootage	MS32	1/2 MS + 2,4-D 0.5 mg/L + 蔗糖	
	MS33	1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + 蔗糖 3%	
	MS34	1/2 MS + 蔗糖	

1.2 试验设计与统计方法

1.2.1 带叶柄叶片诱导 带叶柄叶片用 MS1、MS2 诱导愈伤组织,供试品种为 XP、AYZ、ARZ。

1.2.2 带叶柄茎段诱导 带叶柄茎段的诱导培养基设 KT 浓度、碳源种类和营养元素水平 3 个因子,2 个水平共 8 个处理,KT 浓度为 0 mg/L 和 0.1 mg/L;碳源种类为 3% 葡萄糖和 3% 蔗糖;营养元素水平为 MS 和 1/2MS。供试品种为 KLT、ARZ、ATL。

试验采用随机区组设计,每处理 3 次重复,各接种 30~80 个外植体。试验数据采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。

1.2.3 生根试验 生根试验采用 M31、M32、M33、M34 4 种培养基,供试品种为 KLT、ARZ、ATL。统计观察试验结果。

1.3 试验方法

1.3.1 接种方法 在无菌条件下取组培苗 2 个

部位:(1)带叶柄叶片;(2)除去叶片后的茎段切成小段,每段带有 1 个叶柄,接种到诱导培养基上,28℃ 下进行培养,每天光照 14~16 h。4 周后统计愈伤组织的诱导率。

1.3.2 继代和分化 将诱导后逐渐膨大的愈伤组织切成小块,放入继代培养基中继代培养,也可将大块愈伤组织转到分化培养基中诱导分化出苗。

1.3.3 生根和移栽 将 ARZ 的分化苗剪成长约 2 cm(带顶端)的小段转入生根培养基生根培养。约 4~6 周后移栽到疏松透气的腐殖土中。

2 结果与分析

2.1 带叶柄叶片愈伤组织诱导效果

带叶柄叶片在诱导培养基中 5~7 周形成愈伤组织,愈伤组织在叶片和叶柄交界处出现。XP 和 AYZ 在 MS1 中的出愈率为 3.42% 和 11.54%,

在 MS2 中为 3.45% 和 4.00%, 而 ARZ 在 2 种诱导培养基中均未有愈伤组织产生(表 2)。

表 2 不同安祖花品种带叶柄叶片在 2 种培养基中的愈伤组织诱导率

Table 2. Frequency of callus induction based on culture and genotype %

培养基 Medium	品种 Variety		
	XP	AYZ	ARZ
MS1	3.42	11.54	0
MS2	3.45	4.00	0

2.2 带叶柄茎段愈伤组织诱导效果

带叶柄茎段接种到诱导培养基 2 周后, 茎段与叶柄交界处开始膨大, 4 周后膨大成为明显的愈伤组织。方差分析结果表明, 不同培养基和不同品种对诱导率均有显著影响, 以 MS14、MS13 的诱导率最高, MS11、MS17 次之, 这 4 种培养基的愈伤组织诱导率间无显著差异, 均在 80% 以上, MS16、MS15 的诱导率最低(表 3)。3 个品种带叶柄茎段的愈伤组织诱导率分别为 KLT 77.62%, ARZ 75.47%, ATL 63.25%。分析结果显示, KLT 和 ARZ 的诱导率极显著高于 ATL ($P < 0.01$)。品种与培养基的交互作用显著, 在平均诱导率最高的培养基 MS14 以及培养基 MS11、MS12 中, ARZ 的诱导率高于 ATL 和 KLT; 在其它培养基中 KLT 的诱导率均最高。

表 3 不同培养基对带叶柄茎段的愈伤组织诱导率

Table 3. Frequency of callus formation from shoot cuttings with petiole under different cultures %

培养基 Medium	平均诱导率 Average frequency of callus formation
MS14	89.65 ^{aA}
MS13	89.62 ^{aA}
MS11	81.88 ^{aBA}
MS17	80.26 ^{aAb}
MS18	67.98 ^{bBC}
MS12	62.90 ^{bcCD}
MS16	52.49 ^{cd}
MS15	52.12 ^{cd}

试验结果表明, 是否添加 KT、碳源种类和营养元素水平对诱导率均有显著影响。添加 0.1 mg/L KT 的平均诱导率为 75.97%, 极显著高于不添加 KT 的平均诱导率(68.26%), 说明在培养基中添加 KT 有利于愈伤组织的诱导; 使用蔗糖为碳源的平均诱导率为 81.88%, 使用葡萄糖为碳源平均诱导率为 62.35%, 说明蔗糖优于葡

萄糖; 1/2 MS 的平均诱导率为 81.01%, MS 的平均诱导率为 62.21%, 即 1/2 MS 有利于愈伤组织的形成。

2.3 愈伤组织的分化

愈伤组织在继代培养基上不断增殖, 在愈伤组织增殖到适当大小时分化出少量的幼苗。愈伤组织在继代 1 年后仍然有很强的继代和分化能力。将大块愈伤组织转入分化培养基后, 4~6 周分化出大量幼苗, 平均每块愈伤组织分化 10 株以上。

2.4 再生苗的生根

4 种生根培养基对安祖花再生苗生根的影响见表 5。对于品种 ARZ, 添加 2, 4-D 和 NAA 最适合生根, 幼苗的生长旺盛、根数多、叶厚而多, 但生根慢; 添加 IBA 效果不明显, 生根的情况与对照相似, 生根的速度快但根量少。MS31、MS32 培养基上生根呈簇状、早期幼苗有畸形的情况, 但随时间的延长此现象消失。移栽的存活率均为 100%, 添加 2, 4-D 和 NAA 的处理幼苗生长好于添加 IBA 的处理和对照。

表 4 不同生根培养基上安祖花的生长状况

Table 4. Growth situation in different media on *Anthurium andraeanum* plantlet rooting

培养基 Medium	移栽时生根条数 No. of roots per plantlet	移栽时叶数 No. of leaves per plantlet	生长状况 Growth situation
MS31	> 10	7.4	根簇状, 根上部生长旺盛, 生根迟
MS32	> 10	7.4	根簇状, 根上部生长旺盛, 生根迟
MS33	3.6	3.9	根少, 上部生长较好, 生根早
MS34	2.5	4.4	根少, 上部生长正常, 生根早

3 讨论

3.1 叶柄茎段是适合于遗传转化的理想受体

国内有使用盆栽苗叶片^[3-6]、叶柄^[4-6]、茎尖^[7]、嫩茎切段^[5-8]诱导安祖花愈伤组织的报道, 国外在 1975 年便有成功诱导的报道^[9], 盆栽苗作为外植体的诱导技术已成熟。我们曾采用组培苗不带叶柄叶片、剪开的叶片、叶柄诱导愈伤组织都未成功, 这一点与黄珺梅对组培苗诱导的结果^[10]不一致。本研究中组培苗带叶柄叶片的愈伤诱导

率较低,可能试验中所用培养基配方较少有,这种外植体能否适合于遗传转化尚需进一步研究。使用带叶柄茎段诱导获得成功,但值得注意的是愈伤组织产生的部位不是盆栽苗茎段诱导时的生物学下端^[8],而是在叶柄与茎段的交界处膨大形成完整的愈伤组织。在遗传转化中,相对于田间取材,以组培苗带叶柄茎段为外植体取材方便,不受栽培条件和季节的限制,能短时间内获得大量的材料或愈伤组织。带叶柄茎段诱导率在80%以上,可满足遗传转化的要求。

3.2 培养基对愈伤组织诱导的影响

本研究中,组培苗带叶柄茎段诱导愈伤组织适合的培养基是1/2 MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L,这与文献^[3]中报道的使用盆栽苗叶片诱导时6-BA和2,4-D配合使用有利于诱导的结果相一致,其它文献使用的诱导培养基激素配方有单独使用6-BA、6-BA和NAA配合等^[8,10],可见诱导中6-BA是不可缺少的。1/2MS比MS诱导率高,张桂和等已有报道。此外,有人报道用盆栽苗茎段作为外植体时,使用改良MS作为营养元素,即调整大量元素的用量和配比其诱导率高于1/2MS^[8],本试验中未涉及改良MS,但组培苗使用1/2MS和MS的诱导率已达到遗传转化的要求,推测安祖花的愈伤组织诱导不需要高的营养元素浓度。岑益群等^[4]认为使用盆栽苗叶片和叶柄作为外植体时,蔗糖为碳源比葡萄糖诱导率低,本试验中蔗糖的诱导率高于葡萄糖,是否由所用外植体材料不同造成,尚待进一步研究。

3.3 2,4-D、NAA、IBA对生根的作用

潘学峰等^[3]在使用茎段为外植体时,使用这3种激素诱导生根,生根率达到了100%。在本试验中,诱导率均为100%,但经过比较,添加IBA的处理与对照没有区别,添加2,4-D和NAA的处理明显好于对照,这可能与安祖花根形成时体内内源激素水平有关。生根中使用2,4-D、NAA有助于生根,培育壮苗,这一点对于大规模生产幼苗和遗传转化筛选后的幼苗生根特别有意义,其机理有待进一步探讨。

参考文献:

(上接第42页)

参考文献:

- [1] 王桂芹. 向日葵不同品种耐盐碱性与解剖结构比较研究[J]. 昭乌达蒙族师专学报, 2002, 23(6): 34-36.
- [2] 徐惠风. 向日葵不同节位叶片光合特性及其与产量关系的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(1): 6-9.
- [3] 王立军, 汪矛, 谷安根. 肾叶唐松草幼苗初生维管系统的解剖学研究[J]. 植物研究, 1990, 10(4): 101-106.
- [4] 王立军, 谷安根, 张友民. 甜菜幼苗的分化及其肥大直根的定位研究[J]. 作物学报, 2000, 26(1): 87-91.
- [5] 谷安根, 王立军. 子叶节区理论在研究被子植物起源、形态演化与分类系统中的应用[J]. 植物学通报, 1993(10): 43-51.
- [6] 谷安根, 王立军. 南瓜幼苗初生维管系统的解剖学研究[J].

- [1] 柴明良, 汪炳良. 若干花卉转基因研究的现状和前景[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 664-670.
- [2] 王强生. 利用基因工程技术圆一个古老的梦[J]. 科学发展, 2002, 351: 35.
- [3] 潘学峰, 潘梅, 洪世军. 红掌叶片愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2000, 18(2): 144-149.
- [4] 岑益群, 蒋如敏. 安祖花离体增殖的形态发生与理化因子效应[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 187-192.
- [5] 姚丽鹃, 徐晓薇, 陈香雪. 安祖花的组织培养和快速繁殖[J]. 浙江农业科学, 2004(4): 190-192.
- [6] 远凌威, 袁正仿, 张苏锋. 安祖花的组织培养及快速繁殖研究[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2004, 17(3): 338-340.
- [7] 浩仁塔本, 余伟位. 安祖花的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1995(6): 433.
- [8] 张桂和, 徐碧玉, 彭存智, 等. 安祖花茎段培养与离体繁殖[J]. 上海农业学报, 2001, 17(3): 13-16.
- [9] Pierik R L M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lind in liquid media [J]. Neth J Agric Sci, 1975, 23(4): 299-302.
- [10] 黄瑛梅, 洪丽萍, 邹小鲁. 安祖花的离体培养及快速繁殖[J]. 福建热作科技, 2002, 27(1): 12-13.

东北师大学报, 1995(专刊): 1-5.

- [7] 谷安根, 王立军. 子叶节区理论与被子植物演化形态学的进展[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2000: 34-37.
- [8] 张恕茗, 谷安根, 王立军. 茄子幼苗初生维管系统的解剖学研究[J]. 植物研究, 1997, 17(2): 163-167.
- [9] Gu Angen, Wang Mao, Wang Lijun. Studis on cotyledon node zone in some genera of the Ranunculaceae [J]. Cathaya, 1990, 2: 171-180.
- [10] Jia Weiping, Gu Angen, Wang Mao. Morphological and anatomical studies on the seedling of *Myosarus minimus* [J]. Cathaya, 1993, 5: 167-178.
- [11] 强科斌. 苍耳根一茎过渡区、子叶节区的初步研究[J]. 西北植物学报, 1993, 13(5): 19-22.