

安祖花组织培养和植株再生的研究

葛方兰¹, 苟帮超², 江利平¹, 叶德萍¹, 李维^{1*}

(1. 四川师范大学生命科学学院, 四川成都 610066; 2. 四川省成都市青羊区教育局, 四川成都 610031)

摘要 [目的]为安祖花幼苗的规模化生产提供依据。[方法]以叶片、叶柄以及组培苗气生根为外植体, 进行安祖花愈伤组织的诱导, 探索安祖花再生植株规模化生产的最佳途径。[结果]叶片、叶柄以及组培苗气生根均能成功地诱导产生愈伤组织, 其中叶片诱导率最高(92%), 组培苗气生根诱导率可达82%。诱导愈伤组织分化产生不定芽的最佳培养基为1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L。培养基1/2MS+IBA 0.5 mg/L和MS+IBA 0.5 mg/L均可诱导不定芽产生根, 无明显差异。将珍珠沙和花泥按1:1(V:V)混合后作为组培苗移栽的培养基质, 经30 d培养, 幼苗成活率达91%。[结论]以气生根为外植体, 规模化再生植株只需55~60 d, 生产成本也大大降低。

关键词 安祖花; 愈伤组织; 芽分化; 植株再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)06-02238-02

Study on the Tissue Culture and Plant Regeneration of *Anthurium andraeanum* Lind.

GE Fang-lan et al (College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610066)

Abstract [Objective] The research aimed to provide basis for large-scale production of *Anthurium andraeanum* Lind. seedlings. [Method] With leaf blade, petiole and aerial root in tissue culture seedling as explants, the callus induction of *A. andraeanum* was carried out and the optimum approach for the large-scale production of the regenerated plants in *A. andraeanum* were discussed. [Result] Leaf blade, petiole and aerial root of tissue culture seedling could all successfully induce the production of callus, among which the stimulate rate of leaf blade was highest (92%) and that of the aerial root of tissue culture seedling could reach 82%. The optimum medium for inducing the adventitious bud differentiation from callus was 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + KT 0.1 mg/L. Both medium 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L and medium MS + IBA 0.5 mg/L could induction root production from the adventitious buds without obvious differences. When the mixture of perlite and flower foam (by the volume ratio of 1:1) was taken as the culture substrate for the transplantation of tissue culture seedlings, the survival rate of *A. andraeanum* seedlings reached 91%. [Conclusion] With the aerial roots as explants, the plant regeneration in a large scale only needed 55~60 d and the production cost was also greatly decreased.

Key words *Anthurium andraeanum* Lind.; Callus; Bud differentiation; Plant regeneration

安祖花(*Anthurium andraeanum* Lind.)为多年生草本植物, 近年来逐渐成为世界新兴的高档盆栽和切花花卉, 深受国内外消费者喜爱^[1]。自1974年以来, 国内外就有研究者对组织培养安祖花进行了大量研究^[2-5], 但由于其品种多, 易退化, 更新快, 国内实现规模化生产安祖花育苗的成功报道还较少^[3-7]。因此, 有必要探讨利用不同品种及其外植体进行组织培养和植株再生的研究。笔者对一种安祖花切花品种的组织培养、植株再生进行了研究, 旨在为规模化生产安祖花幼苗提供依据, 同时也为开展利用转基因技术改良安祖花品质奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料购自四川省广汉英豪花卉基地, 为荷兰引进的优良安祖花切花品种。幼嫩叶片、叶柄和花穗来自温室条件下培养的安祖花植株, 气生根从该研究中获得。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒。取新鲜采集的外植体, 用自来水冲洗30 min, 然后依次用0.01%高锰酸钾溶液处理5 min、80%乙醇处理30 s、0.1%升汞处理5 min, 处理过程中不断摇动。消毒后用无菌去离子水清洗3次, 用无菌吸水纸吸干水分, 叶片、花穗剪成1.5~2.0 cm小块, 叶柄、气生根剪成2.0 cm长, 接种到愈伤组织诱导培养基上。

1.2.2 愈伤组织的诱导。将消毒的外植体接种于以下4种愈伤组织诱导培养基中: ①1/2MS+2.4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L; ②1/2MS+2.4-D 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L; ③MS+KT 2.0 mg/L; ④1/2MS+6-BA 1.0 mg/L, pH值均为5.8, 琼脂

浓度为6.0 g/L。每瓶接种3~6个外植体, 培养温度26℃, 光照强度1500~2000 lx, 光照周期12 h/d。

1.2.3 芽的诱导。用手术剪刀剪取愈伤组织, 接种至3种培养基中, 诱导产生不定芽。所用培养基分别为: ①1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L; ②1/2MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L; ③1/2MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。培养条件同“1.2.2”。

1.2.4 根的诱导。当分化的芽苗高度大于1.0 cm时, 将生长健壮的芽苗切成单苗接种于生根培养基培养。生根培养基包括: ①1/2MS+0.5 mg/L IBA; ②MS+0.5 mg/L IBA。

1.2.5 壮苗培养基。1/2MS。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导 根据安祖花愈伤组织诱导的研究报道^[2,4-6], 设计4种不同的愈伤组织诱导培养基接种幼嫩叶片、叶柄和花穗等外植体。培养15 d左右, 可见叶片、叶柄明显变绿, 叶片呈卷曲状。经过40 d左右的脱分化培养, 花穗小块逐渐褐化, 未能长出愈伤组织, 而叶片小块和叶柄小块边缘35 d左右长出浅黄色的愈伤组织, 60 d后统计愈伤组织。诱导率见表1。

在4种不同培养基中, 花穗不能诱导产生愈伤组织, 幼嫩叶片和叶柄均产生愈伤组织, 前者诱导率明显高于后者; ①号配方诱导率最高, 外植体粗大, 叶脉处或V型切口底部容易产生愈伤组织, 愈伤组织先呈浅黄色(图1a、b), 然后逐渐转绿, 花穗小块不适合诱导愈伤组织。②~④号配方诱导产生的愈伤组织逐渐褐化, 无法进行转瓶和根的诱导。

由于在根的诱导过程中, 发现气生根很容易诱导, 气生根数目较多, 而且气生根的摘取, 对植株影响最小, 因此该研究还利用气生根作为外植体, 诱导产生愈伤组织和进行植株再生, 结果表明, 愈伤组织诱导的①号培养基最为有效, 诱导

基金项目 四川省教育厅重点资助项目(2004-6)。

作者简介 葛方兰(1970-), 女, 四川自贡人, 硕士, 讲师, 从事分子遗传学方面的教学和研究工作。*通讯作者。

收稿日期 2007-10-23

率达 81%(表 1)。

表 1 不同诱导培养基处理对叶片、叶柄和气生根愈伤组织形成的影响
Table 1 The effect of different induction media on callus from leaf, petiole and aerial root

培养基编号 No. for medium	叶柄 Petiole			叶片 Leaf			气生根 Aerial root		
	调查数 No. of investigated	统计数 Statistic	诱导率// % Induction rate	调查数 No. of investigated	统计数 Statistic	诱导率// % Induction rate	调查数 No. of investigated	统计数 Statistic	诱导率// % Induction rate
①	21	16	76	57	52	92	21	17	81
②	15	10	67	54	46	85	19	11	57
③	17	6	35	48	22	45	23	0	0
④	17	5	29	56	17	31	21	0	0

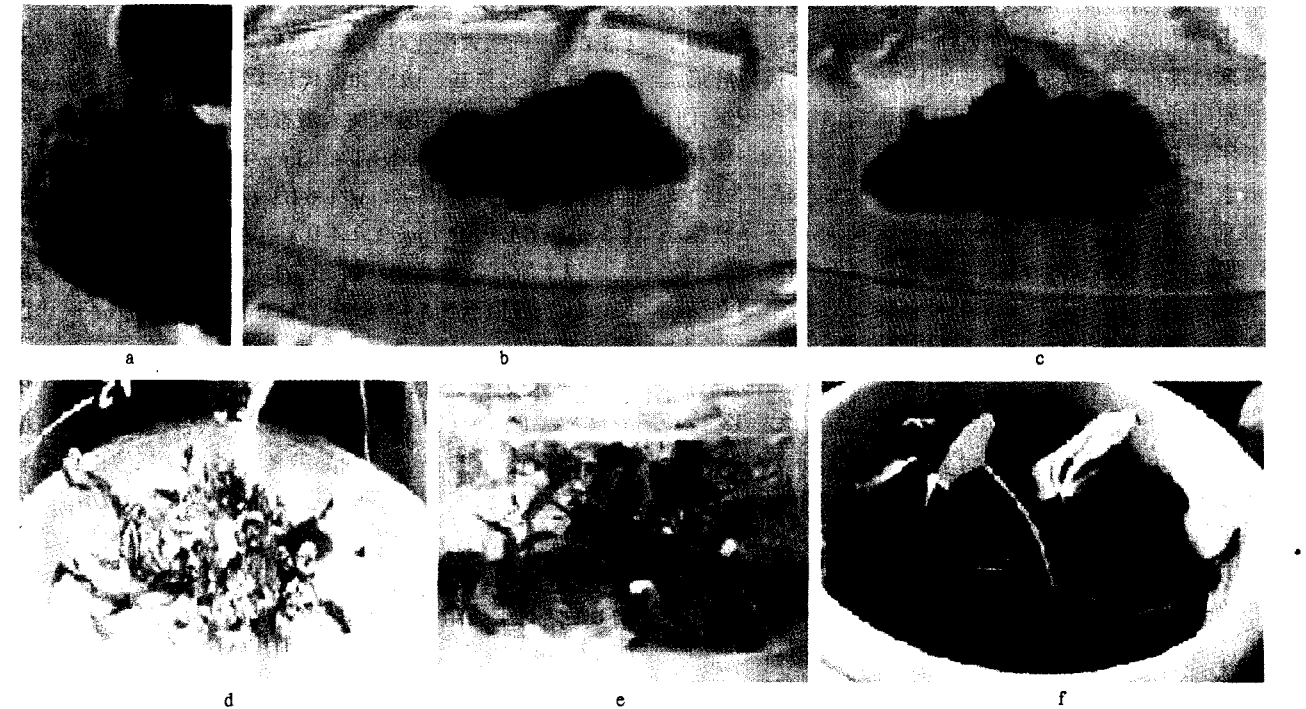
2.2 芽的诱导 将诱导产生的愈伤组织转入新的培养基中继续培养,待愈伤组织长到 0.7 cm² 左右,转入诱导产生不定芽的培养基中进行芽的诱导。设计的 3 种培养基配方均能诱导芽的产生(表 2)。根据芽数量、芽长度和芽粗 3 项特征进行评估,芽在块状的愈伤组织四周发射状丛生(见图 1c、d),数量多,长短、粗细不一,其中①号配方中诱导产生的芽数量适中,芽长而粗壮(表 2)。将芽剪下,根据每个培养瓶 3~4 根芽苗的标准进行根的诱导。

表 2 不同诱导培养基处理对不定芽形成的影响
Table 2 The effect of different media on bud induction

编号 No.	培养基 Media	愈伤组织 Callus			综合评价结果 Results of comprehensive evaluation
		芽数量 No. of buds	芽长度 Bud length	芽粗 Bud diameter	
①	1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L	多 More	长 Long	粗 Thick	A
②	1/2MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L	少 Less	长 Long	较粗 Relatively thick	B
③	1/2MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	多 More	短 Short	细 Thin	C

注:A、B、C 分别表示综合评价的好、中、差指标。
Note: A, B, C indicate the index of good, common and weak, respectively.

2.3 根的诱导和壮苗 利用两种不同培养基进行根的诱导,结果发现数天内即可见根的生长(图 1e),两种配方没有明显的差异。每根芽可诱导产生根 7 条左右,多为气生根。按每瓶 1~2 株幼苗的标准转入壮苗培养基中壮苗,当叶片生长达到 1.0~2.0 cm² 后进行炼苗。



注:a 为叶片诱导产生愈伤组织;b 为愈伤组织;c 为愈伤组织的分化;d 为不定芽;e 为试管苗;f 为移栽的再生苗。
Note: a indicates callus induced from leaves; b indicates callus; c indicates callus differentiation; d indicates adventitious buds; e indicates plantlets; f indicates transplanted regenerated seedlings.

图 1 安祖花快速繁殖过程
Fig.1 Rapid propagation of *Anthurium andraeanum*

大部分元素相同,而有机成分的差别较大,特别是 VB_1 含量, L_3 中 VB_1 含量是 MS 中的 100 倍,且有研究认为, VB_1 在组织培养中有助于诱导胚性愈伤组织的形成^[15],这可能是导致两者形成愈伤组织差异的直接原因。

不同激素配比对小麦成熟胚愈伤组织分化率影响很大,就试验采用的 4 种配比来看, L_3 培养基添加 0.1 mg/L 2,4-D 和 1.5 mg/L 6-BA 可作为理想的小麦成熟胚愈伤组织分化培养基。在 IAA 与 KT 配比试验中,从前人研究^[14]中得知 IAA 浓度在 0.1 mg/L 时愈伤组织分化率较高,超过 0.1 mg/L 时,随 IAA 浓度增加分化率降低,故试验中 IAA 都采用 0.1 mg/L 的浓度。在 2,4-D 与 6-BA 的配比试验中,已知在一定浓度范围内(1~8 mg/L),2,4-D 浓度增加有利于愈伤组织的诱导,但不利于愈伤组织的分化,故其浓度不宜过高,一般认为 4 mg/L 2,4-D 对成熟胚愈伤组织的诱导较有利^[8],分化时 2,4-D 浓度应适当降低,一般采用 0.1 mg/L。高浓度 2,4-D 对愈伤组织的分化不利,而细胞分裂素能拮抗高浓度 2,4-D 对愈伤组织分化的抑制作用,2,4-D 在较低的浓度条件下,细胞分裂素却不表现拮抗作用^[16]。因此可以推测,2,4-D 可开启有关细胞分裂的基因,使细胞分裂增殖,但同时抑制了有关分化基因的表达。而细胞分裂素使细胞分裂的同时,主要是促进有关分化基因的表达,使细胞朝着分化为器官的方向发展,只有高浓度 2,4-D 才表现出对分化的抑制。其原因可能是 2,4-D 浓度高,消耗慢,长时间作用于愈伤组织,导致分化率降低,所以细胞分裂素也只能在这种情况下才表现出对 2,4-D 的拮抗作用。前人研究认为^[14],6-BA 浓度在 2 mg/L 时愈伤组织分化率较高,低于或高于 2 mg/L,分化率都会下降,但该试验采用了 1 mg/L 与 1.5 mg/L 两个梯度,从结果看,6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时愈伤组织分化率较高。因此,在小麦成熟胚离体培养研究中,建议采用低浓度 2,4-D 诱导愈伤

组织,分化培养基中降低生长素浓度,提高细胞分裂素浓度。

参考文献

- [1] MAES O C, CHIBBAR R N, CASWELL K, et al. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors [J]. *Plant Sci*, 1996, 121: 75-84.
- [2] SHARMA V K, RHAO A, VARSHNEY A, et al. Comparison of developmental stage of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf [J]. *Plant Cell Rep*, 1995, 15: 227-231.
- [3] RAJYALAKSMI A G, MAHESHWARI A K, MAHESHWARI S C. High frequency regeneration of plants from the leaf-bases via somatic embryogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Plant Physiol*, 1991, 82: 617-623.
- [4] VIERTEL K, HESS D. Shoot tips as an alternative source for generable embryogenic callus culture [J]. *Plant Tissue Cell and Organ Cult*, 1996, 44: 183-188.
- [5] 陈璋, 朱秀英. 水稻种胚离体培养的遗传研究 [J]. *植物学报*, 1992, (11): 850-855.
- [6] 潘向群, 梁海曼. 大麦成熟胚培养的培养基研究 [J]. *作物学报*, 1991, (4): 267-272.
- [7] 周洪生. 甜玉米胚愈伤组织诱导、继代、植株再生的研究 [J]. *作物学报*, 1993(1): 55-61.
- [8] OZGEN M, TURET M, ALTINOK S, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 18: 331-335.
- [9] WARD K A, JORDAN M C. Callus formation and plant regeneration from immature and mature embryos of rye [J]. *ProQuest Agriculture Journals*, 2001, 37: 361-368.
- [10] 杨淑慎, 郭振, 徐虹. 小麦胚愈伤组织的诱导和植株再生 [J]. *西北农业学报*, 2002, 11(4): 46-48.
- [11] 李红潮, 胡道芬, 王虹. 影响小麦成熟胚培养因素的研究 [J]. *华北农学报*, 1990, 5(1): 22-27.
- [12] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues [J]. *Plant physiol*, 1962, 15: 473-494.
- [13] BECKER D, LOFZ H. Production of fertile transgenic wheat by microprojectile bombardment [J]. *Plant Tissue Cell and Organ Culture*, 1994, 5: 299-307.
- [14] 尹钧, 任江萍, 宋丽, 等. 基因枪转化小麦幼胚的再生培养与转基因植株的获得 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(9): 1565-1570.
- [15] 郭向云, 尹钧, 余贵荣, 等. VB_1 和干燥处理对小麦幼胚愈伤组织培养的影响 [J]. *华北农学报*, 2003, 18(4): 19-22.
- [15] 唐宗祥, 张怀琼, 张怀渝, 等. 2,4-D, KT 对小麦成熟胚愈伤组织形成、分化的影响 [J]. *四川农业大学学报*, 2004, 22(3): 203-205.

(上接第 2239 页)

2.4 移栽 将组培苗移出培养室,在室温下放置 7 d,取出幼苗,洗净根部残留培养基,移栽入培养基[珍珠沙:花泥为 1:1(V:V)混合],温度控制在 20~28℃,每天喷雾,使培养室内湿度保持在 75%~90%。移栽成活后,每隔 3~5 d 施复合肥 1 次。光照时间保持在每天 10 h 以上。经过 30 d 的培养,幼苗成活率达到 91%,形成的幼苗如图 1f 所示。

3 结论

该研究利用叶片、花穗、叶柄、气生根为外植体诱导产生愈伤组织,叶片、叶柄以及组培苗气生根均能成功地诱导产生愈伤组织,叶片诱导率最高达 92%;越靠近叶柄部分和带有叶脉的叶片,就越容易诱发生愈伤组织;用该研究获得的组培苗气生根为外植体,愈伤组织诱导率可达 82%。而花穗消毒不易彻底,污染率较高。组培苗气生根数目多,气生根的摘取对植株影响最小。因此,利用气生根作为外植体进行规模化再生植株可以极大地节约成本。

从外植体诱导产生愈伤组织,分化出芽,生根形成试管苗,最快需 55~60 d,缩短了繁殖周期。该研究为工厂化生产安祖花幼苗提供了依据,也为进一步开展安祖花转基因技术的研究打下了坚实的实验基础。

参考文献

- [1] 夏春华. 世界红掌切花业概况和发展海南红掌切花生产的思路 [J]. *热带农业科学*, 2001(1): 48-51.
- [2] PIERIK R L M, STEEGMANS H H M, VANDERMYS J A J. Plantlet formation in callus tissues *Anthurium andraeanum* Lindl [J]. *Scientia Horticulturae*, 1974(2): 193-198.
- [3] 兰芹英, 仇玉萍, 张远辉, 等. 不同红掌品种的叶片、叶柄和茎段愈伤组织的诱导及植株再生 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(6): 1006-1009.
- [4] 郭维明, 赵云鹏, 文方德. 花烛愈伤组织不同继代培养的再分化差异 [J]. *园艺学报*, 2004, 31(1): 69-72.
- [5] 黄群声, TDZ 和 CPPU 对红掌快速繁殖的影响 [J]. *亚热带植物科学*, 2004, 33(3): 39-41.
- [6] 廖飞雄, 邹春萍, 王恒明, 等. 观叶花烛的组织培养和快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 189.
- [7] 郭军战, 费昭雪, 成密红. 红掌不同外植体愈伤组织诱导与不定芽分化的研究 [J]. *西北林学院学报*, 2006, 21(3): 72-74.