

红掌气生根根段再生快繁体系的建立

王桂兰 陈超* 李朝霞 李伟 林小静

唐山师范学院生物科学技术系, 河北唐山 063000

提要 以红掌气生根根段为材料, 诱导再生团块产生, 进而分化出苗, 形成快速繁殖系统。培养基1/2MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.6 mg·L⁻¹适于气生根的保持和繁殖, 1/2MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹适于诱导气生根再生团块的产生, MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹可使再生团块分化成苗。不论是愈伤组织, 还是再生团块, 出现绿色组织是分化所必需的。添加2,4-D、6-BA和2,4-D的适当比例、MS培养基的无机盐浓度在再生团块的诱导与分化成苗中起重要作用。
关键词 红掌; 气生根; 再生团块; 快繁

Establishment of Rapid Propagation System of Aerial Root Segments of *Anthurium andraeanum* Linden *in vitro*

WANG Gui-Lan, CHEN Chao*, LI Zhao-Xia, LI Wei, LIN Xiao-Jing

Department of Biological Science and Technology, Tangshan Teacher's College, Tangshan, Hebei 063000, China

Abstract The results showed that the aerial root segments could produce reproduction block mass and differentiate plantlet. The green tissue was essential for differentiation. 2,4-D had very important effects on inducing callus and reproduction block mass, and 2,4-D must cooperate with 6-BA. The mineral salt concentration in MS had very important role during induction and formation of reproduction block mass. 1/2MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.6 mg·L⁻¹ could be used for aerial root growth, 1/2MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹ was suitable for inducing the appearance of reproduction block mass, and MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹ could induce differentiated plantlet from reproduction block mass. The proper ratio of 6-BA and 2,4-D and inorganic salt concentration in MS played an important role in induction of reproduction block mass and differentiation of plantlet.

Key words *Anthurium andraeanum* Linden; aerial root; reproduction block mass; rapid propagation

自Pierik于1974年对红掌进行组织培养成功以来, 人们相继对其进行了大量的研究^[1~5]。已用的外植体有茎尖、茎段、叶片、叶柄等。从目前的研究来看, 红掌各种外植体诱导的愈伤组织长期继代后普遍出现分化再生能力退化的现象, 每隔15~20代, 就要重新建立培养体系^[6~8]。由于红掌品种多, 更新快, 培养体系的建立时间又相对较长, 因此对其快速繁殖是很不经济的。为此, 有必要探讨新的红掌组培快繁途径。

材料与amp;方法

以红掌(*Anthurium andraeanum* Linden)品种“Arizona”刚成熟嫩绿色的叶片为外植体, 从温室中取材后放入烧杯里, 轻轻洗去表面浮尘后, 用自来水流水冲洗30 min, 然后在超净工作台上,

用无菌水冲洗2遍, 再用70%酒精浸润30 s, 接着用0.1% HgCl₂消毒6 min后, 用无菌水冲洗5~6次, 将外植体切割成1 cm×1 cm的小块, 接种于叶愈伤组织诱导培养基: (1) 1/2MS(1/2大量元素+全量其它元素)+6-BA 0.5 mg·L⁻¹(单位下同)+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹。将产生的愈伤组织转接到继代培养基上: (1) 1/2MS+6-BA 0.5+2,4-D 0.5; (2) 1/2MS+6-BA 0.5+2,4-D 0.2; (3) 1/2MS+6-BA 1.0+2,4-D 0.6; (4) 1/2MS+6-BA 1.5+IBA 0.3。每个处理15瓶, 每瓶接种1.5~2.0 mm愈伤组织10块。30 d

收稿 2004-08-02 修定 2004-12-22

资助 河北唐山市科技局重大科技项目(0114101)。

*通讯作者(E-mail: wang651217@sina.com, Tel: 0315-3863160)。

后统计愈伤组织在不同继代培养基上的反应。将愈伤组织分化出的气生根, 切成1 cm左右的小段接种于再生团块诱导培养基及前面的4种培养基上: (5)MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2; (6)1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2; (7)MS+6-BA 3+NAA 0.3; (8)1/2MS+6-BA 3+NAA 0.3。每个处理15瓶, 每瓶接种10~12个根段。30 d后统计根段再生团块的诱导情况。将根两端产生的再生团块切下, 接于上述的8种培养基上, 30 d后统计再生团块的再生情况。将25 cm以上的苗切下, 接于生根培养基: (9)1/2MS+NAA 1.0, (10)1/2MS+NAA 0.2上生根。以上培养基均添加30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂, pH 5.8。培养温度(26±2)℃, 光照度为27~36 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间10~12 h·d⁻¹。

实验结果

1 叶片愈伤组织的诱导与继代

在前人与我们以往工作的基础上, 选定培养基(1)作为叶片愈伤组织的诱导培养基。在此培养基上诱导率为87.8%。采用MS无机盐浓度培养基诱导愈伤组织, 开始几天切口处褐变, 10 d后褐

变加重, 外植体颜色变为墨绿色, 30 d后大部分外植体褐变死亡。接种到1/2MS无机盐浓度培养基上的外植体, 20 d后开始长出浅黄色愈伤组织(图1-a)。证明低浓度的无机盐对红掌愈伤组织诱导有利, 这与前人的研究结果^[3]相同。因此, 继代培养基均选用1/2MS无机盐浓度的培养基。

如表1所示, 4种继代培养基转接3 d后, 愈伤组织块上有增大的迹象, 10 d后愈伤组织生长扩增明显, 均出现绿色的愈伤组织团块。30 d后均分化出少量小苗, 培养基(1)、(3)上还长出许多气生根, 说明稍高浓度的2, 4-D有利于根的分化(图1-c)。培养基(1)、(3)可作为初始根源提供的培养基, 但为减少培养基的种类, 根据后面的实验, 我们选择(3)用作气生根的保持和繁殖培养基。在继代培养过程中, 均出现愈伤组织退化的现象(图1-b), 一般过程: 诱导出的淡黄色愈伤组织在继代过程中变为绿色愈伤组织, 绿色愈伤组织再次继代就出现绿黄相间的愈伤组织, 将其中的黄色愈伤组织继代, 愈伤逐渐变为褐色最终死亡。如将其中绿色的愈伤组织挑出转接, 则又出现绿黄相间的愈伤组织。

表1 红掌叶愈伤组织在不同继代培养基上的生长情况

Table 1 The growths of foliage callus of *Anthurium andraeanum* 'Arizona' on different subculture media

编号	培养基	生长情况
(1)	1/2MS+6-BA 0.5+2, 4-D 0.5	愈伤组织由淡黄转绿, 随着时间的延长, 分化少量苗并分化大量气生根(可提供初始气生根根源)
(2)	1/2MS+6-BA 0.5+2, 4-D 0.2	愈伤组织由淡黄转绿, 随着时间的延长, 分化少量苗不分化气生根(随继代次数增加愈伤组织衰老)
(3)	1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.6	愈伤组织由淡黄转绿, 随着时间的延长, 分化少量苗并分化大量气生根(可提供初始气生根根源)
(4)	1/2MS+6-BA 1.5+IBA 0.3	愈伤组织由淡黄转绿, 随着时间的延长, 分化少量苗, 不分化气生根(随继代次数增加愈伤组织衰老)

2 气生根段再生快繁体系的建立

2.1 气生根段再生团块的诱导 将气生根的切段接于8种培养基上(表2)。30 d后统计再生团块的诱导率, 发现生长素类生长调节剂中2, 4-D对诱导再生团块是必需的, 而且6-BA和2, 4-D的比要在5倍以上。具有6-BA和2, 4-D且比值达到5倍的培养基诱导出的再生团块呈绿色(图1-e), 可进一步作为快繁的材料。具6-BA和IBA的培养基诱导气生根段两端膨大, 产生黄色的愈伤组织, 这种愈伤组织不具备分化的潜力, 并逐步变褐死亡。气生根段如带根尖, 在培养基(3)上根尖继续延伸

生长(图1-d), 另一端不产生再生团块, 而在其它培养基上带根尖的气生根段不再延长生长, 因此认为(3)可作为气生根根尖保持和繁殖根源的培养基。与愈伤组织的诱导相似, 再生团块的诱导率在1/2MS培养基上比MS培养基上高, 这也可能与再生团块的诱导需要较低浓度的无机盐有关。从结果来看, 培养基1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2对诱导气生根再生团块的产生最好, 从此种培养基上获得的再生团块可作为快繁的起始材料。

2.2 气生根再生团块的分化再生与快速繁殖 从表3结果可以看出, 再生团块很容易分化与再生(图

1-f、g), 但有再生苗数量多少、长势强弱的区别, 诱导培养基对分化再生也很好。在再生团块

诱导中表现很差的培养基(3)、(4)、(7)、(8)在再生团块分化中有不同程度的表现。这可能与再生

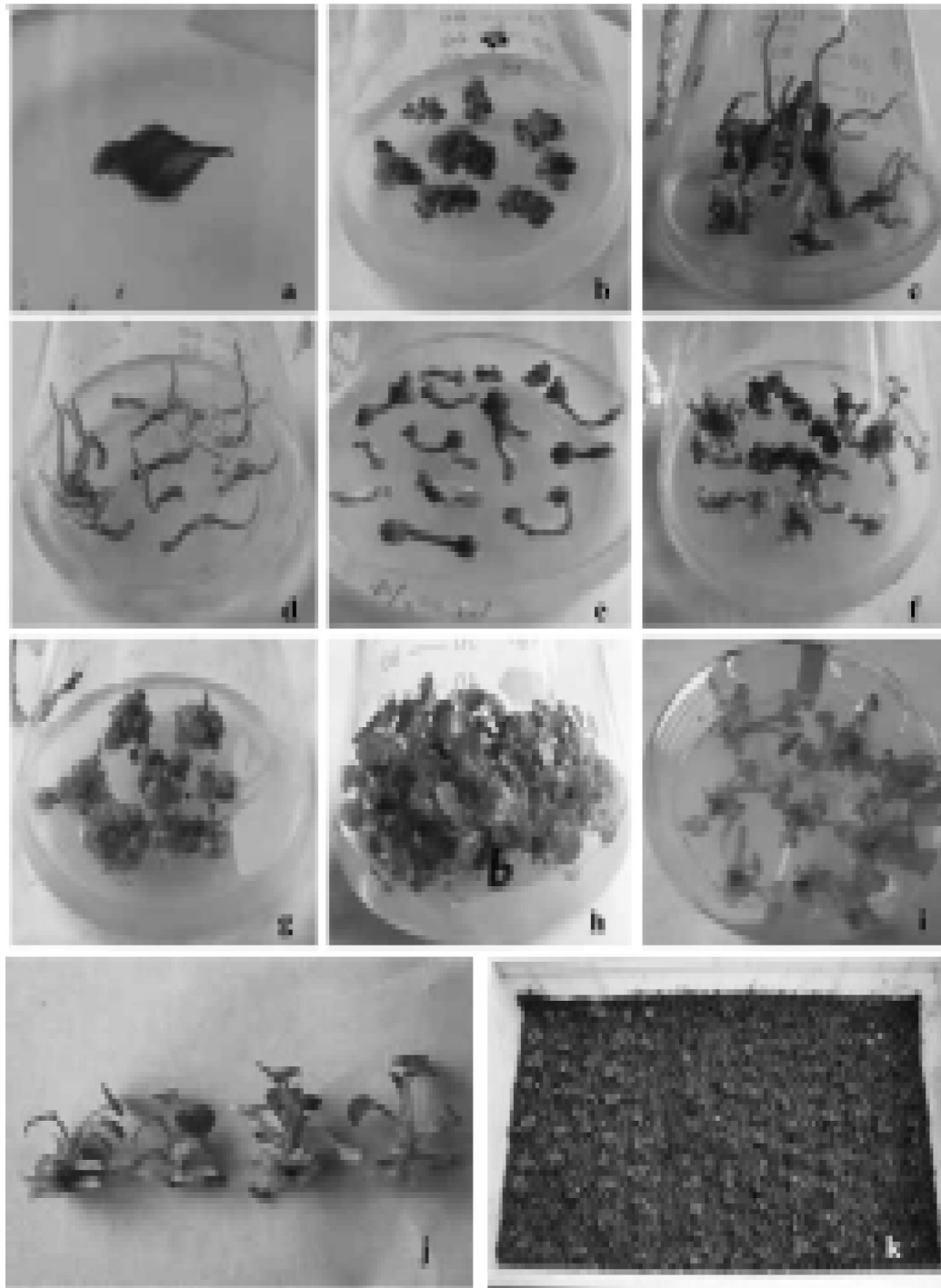


图1 红掌气生根再生快繁体系的建立

Fig.1 Establishment of rapid propagation system of *Anthurium andraeanum* using aerial root *in vitro*

a: 叶片诱导产生愈伤组织; b: 叶愈伤组织; c: 愈伤组织诱导产生气生根; d: 带根尖端继续生长; e: 根段诱导再生团块; f: 再生团块直接在根上分化情况; g: 再生团块切下后分化情况; h: 试管苗快速繁殖; i、j: 30 d 后生根情况; k: 移栽的生根苗。

表2 红掌气生根段(不带根尖)在不同诱导培养基上的生长情况
Table 2 The growths of aerial root segment (without root tip) of *Anthurium andraeanum* 'Arizona' on different inducing media

编号	培养基	诱导率/%	生长情况	继续培养出现的结果
(1)	1/2MS+6-BA 0.5+2, 4-D 0.5	0	根段黄褐化	死亡
(2)	1/2MS+6-BA 0.5+2, 4-D 0.2	0	根段黄褐化	死亡
(3)	1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.6	0	根段黄褐化	死亡
(4)	1/2MS+6-BA 1.5+IBA 0.3	62	两端膨大, 长出黄色致密愈伤	没有再生成苗的潜力
(5)	MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2	54	根段两端膨大, 形成绿色团块, 直径0.5~0.8 cm, 芽点较(6)少	绿色团块可再生成苗
(6)	1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2	100	根段两端膨大迅速, 形成绿色团块, 直径0.5~1.5 cm, 膨大的表面分化出许多芽点	绿色团块可再生成苗, 可作为快繁的起始材料
(7)	MS+6-BA 3+NAA 0.3	36	根段颜色暗黄, 两端略膨大	逐步变褐死亡
(8)	1/2MS+6-BA 3+NAA 0.3	54	根段颜色暗黄, 两端略膨大	逐步变褐死亡

团块的诱导与再生所要求的生长调节剂不同有关。与诱导不同的是, 再生团块的成苗中, 相同生长调节剂的条件下, MS培养基较1/2MS培养基在苗的数量、叶色、叶的大小等几个方面都表现较大优势, 说明在苗的生长中需要较高浓度的无机盐。这与再生团块诱导时的要求正好相反。经几个方面的综合评价, 我们认为培养基(5)和(7)均可作为再生团块分化再生培养基, 培养基(5)的效果最佳(图1-h)。

3 试管苗的生根培养

在生根培养基上培养30 d后统计的结果表明: 培养基(9)上, 试管苗切口处都变黑, 生根率为58%, 根数少, 仅1~3条, 出根不整齐; 培养基(10)上的试管苗切口处未变黑且长出6条以

上乳白色粗壮短根, 生根率达100%, 出根整齐(图1-i、j)。这说明红掌试管苗生根需要较低浓度的NAA。

4 试管苗移栽

移栽前, 在温室内对瓶苗进行增光($90\sim 180\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)锻炼。移栽时, 取出小苗, 轻轻洗去培养基, 将小苗栽入以蛭石为基质的栽培槽中, 基质在栽入前用0.1%甲基托布津喷淋消毒。移栽后, 湿度保持在90%以上, 逐步降低温室中湿度至正常湿度为止。温度控制在27℃左右, 7 d后, 叶面喷施1/2MS大量元素营养液, 每周1次, 30 d后进入小苗的常规管理。按照以上程序进行试管苗的出瓶, 成活率可达100%(图1-k)。

表3 红掌气生根段诱导的再生团块在不同培养基上的再生情况
Table 3 The regrowths of reproduction block mass induced from aerial root segments of *Anthurium andraeanum* 'Arizona' on different media

编号	培养基	再生情况	综合评价结果
(3)	1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.6	分化出苗, 每团块分化出3~7株苗, 叶浅绿色, 叶大, 叶展, 苗高0.5~2.0 cm, 长势尚可, 长气生根	++
(4)	1/2MS+6-BA 1.5+IBA 0.3	分化出苗, 每团块分化3~6株苗, 叶浅绿色, 叶小, 苗高0.5~1.5 cm, 长势弱	+
(5)	MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2	分化出苗, 每团块分化出10多个芽点, 再生出近10株苗, 叶绿色, 叶大, 叶展, 苗高1.5~3.0 cm, 长势旺	+++++
(6)	1/2MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.2	分化出苗, 分化倍数与(5)相差不多, 叶色浅, 叶小, 长势尚可	+++
(7)	MS+6-BA 3+NAA 0.3	分化出苗, 每团块分化出10多个芽点, 再生出10余株苗, 叶绿色、略小, 叶展, 苗高1.5~2.5 cm, 长势旺	++++
(8)	1/2MS+6-BA 3+NAA 0.3	分化出苗, 与(7)相差不多, 叶色较浅, 叶略小, 长势尚可	+++

“+”的多少表示此6种培养基分化再生苗的数量及长势情况, “+++++”为最好。

根据以上实验, 我们总结出红掌气生根段再生快繁体系建立过程为: 叶片→在培养基(1)上诱导愈伤组织→在培养基(1)、(3)上诱导气生根的形成→在培养基(3)上进行气生根根尖保持和繁殖根源→在培养基(6)上诱导形成气生根的再生团块→在培养基(5)上再生团块分化成苗→在培养基(10)上再生苗生根→按试管苗的移栽方法进行生根苗的移栽。

讨 论

以气生根建立的再生快繁系统, 从气生根到形成再生团块, 再到形成能用于生根的再生苗的时间比以前愈伤组织的再生系统诱导时间大大缩短; 形成的再生团块切除用于生根的苗时, 再切割后接于同样的培养基上仍可再生成苗。初步试验看出此种再生快繁系统经多次继代后未出现退化现象, 对此我们尚在进一步研究中。

前人的试验指出, 红掌愈伤组织经长期继代后, 细胞中叶绿体退化, 失去再生功能^[8]。本文中也发现这一现象, 只是所用的品种出现退化的时期更为提前。不论是愈伤组织, 还是再生团块, 绿色组织是分化所必需的。说明叶绿体的维持是组织再生的必要条件, 这与前人的工作^[7, 8]是一致的。

在气生根再生团块的诱导中, 各种生长素类生长调节剂的应用结果表明, 2, 4-D起至关重要的作用, 6-BA和2, 4-D的协同作用也是必需的, 6-BA与2, 4-D要有一个很高的比值(本文中为5倍以上)。另外, MS培养基中的无机盐浓度在再生团块的诱导与再生中也很重要, 低浓度有利于愈伤组织和根的再生团块的诱导, 高浓度有利于再生丛苗的旺盛生长。

参考文献

- 1 浩仁塔本, 余伟莅. 安祖花的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 1991, (6): 432
- 2 李志芳, 叶秦, 赵贵林等. 花烛的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 1997, 33(3): 197
- 3 兰芹英, 李启任, 何惠英等. 红掌愈伤组织诱导和芽的分化. 园艺学报, 2003, 30(1): 107~109
- 4 吕复兵, 王碧青, 廖飞雄等. 红掌叶片离体培养与植株再生研究. 广东农业科学, 2002, (6): 24~25
- 5 贾永芳, 李名扬. 安祖花研究进展. 江苏林业科技, 2002, 29(4): 43~45
- 6 赵云鹏, 郭维明, 王广东等. 花烛离体培养的壮苗. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 48~50
- 7 王进茂, 郑均宝, 高秀丽等. 花烛的组织培养的研究. 河北林果研究, 2003, 15(1): 69~73
- 8 杨涛, 陈德海, 吴荔萍等. 安祖花的组织培养及其细胞和叶绿体发育过程的电镜观察. 亚热带植物通讯, 1998, 27(1): 187~192