

花烛离体培养中的壮苗

赵云鹏^{1,*} 郭维明^{1,**} 王广东¹ 文方德²

¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²珠海园艺研究所, 珠海 519070

提要 针对花烛离体培养中普遍存在的长期培养导致再生苗生长势退化的现象, 研究了如何恢复再生苗生长势, 获得健壮的无菌苗。结果表明, 花烛离体培养中, 随着继代次数的增加, 外源生长调节剂浓度应逐步降低直至0; 活性炭对无菌苗生长势的恢复有较显著效果。无菌苗茎尖是离体培养体系重建中诱导愈伤组织最适宜的外植体; 诱导愈伤组织的适宜培养基为改良的MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D; TDZ诱导芽的效果明显优于6-BA, MS+ 0.01 mg·L⁻¹ TDZ较适合于芽诱导。

关键词 花烛; 壮苗; 活性炭; TDZ; 培养体系重建

Aseptic Plantlet Hardening of *Anthurium andraeanum* in vitro Culture

ZHAO Yun-Peng^{1,*}, GUO Wei-Ming^{1,**}, WANG Guang-Dong¹, Wen Fang-De²

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Zhuhai Institute of Horticulture, Zhuhai 519070

Abstract The results showed that concentration of exogenous plant growth regulator should be decreased progressively until to 0 during *in vitro* culture, and activated charcoal had a remarkable effect on resuming growth vigor of anthurium aseptic plantlet. Shoot tip of aseptic plantlet was best for callus induction during re-establishing *in vitro* culture system and modified MS+1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D was preferable. MS+0.01 mg·L⁻¹ TDZ was advantageous for bud induction, and TDZ was better than 6-BA.

Key words *Anthurium andraeanum*; hardening; activated charcoal; TDZ; re-establishment of *in vitro* culture system

花烛是全球销量第二的热带花卉, 离体培养是目前花烛种苗生产的主要途径和有效方法^[1]。在花烛离体培养中经长期继代培养的愈伤组织往往会发生不分化、只生根而不分化芽或分化形成白化苗等现象。其原因之一是愈伤组织细胞中的叶绿体退化或变异, 再生功能丧失^[2]。王进茂等^[3]发现, 花烛继代次数大于15代时, 培养物出现严重退化, 表现为芽分化能力降低, 生长减弱, 繁殖系数减小, 移栽苗的栽培性状也出现退化, 生长缓慢, 佛焰苞变小, 花柄变短, 产花量降低等。我们在实践中亦发现类似情况。以上说明恢复培养物的生长势和更新培养体系是离体培养中保持较高繁殖系数和原植株栽培性状的一个重要环节。本文研究了花烛‘Jolanba’因长期继代导致生长势退化的再生芽的复壮, 以及培养体系的更新, 以期延长其愈伤组织的培养寿命和提高可持续培养的效率 and 效益。

材料与方法

以花烛 (*Anthurium andraeanum*) ‘Jolanba’

分化大量细小再生芽的愈伤组织和无菌苗为试材。

无菌苗生长势恢复试验中, 在MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹ (单位下同) 上继代15次以上分化大量细小再生芽的愈伤组织, 分别接种至MS+6-BA 0.5、MS₀、MS+0.3% 活性炭(AC)培养基上, 分别继代2次后, 比较再生芽的分化及生长状况。每处理24瓶, 每瓶接种1块外植体。

培养体系的重新建立试验分2个方面: (1) 愈伤组织诱导时, 分别选取无菌苗的茎尖、叶柄、带叶片的叶柄、叶片为外植体。无柄叶片水平放置, 其余外植体竖直插入到含不同生长调节剂配比的培养基上: 改良的MS (1/2 大量元素+全量其它元素, 下同)+6-BA 1.0; 改良的MS +2, 4-D 1.0; 改良的MS+6-BA 1.0+2, 4-D 0.1;

收稿 2003-03-17 修定 2003-10-29

资助 广东珠海农业科技园(园艺花卉区)建设项目(2002-1-4)。

* 现为浙江大学生命科学院博士生。

** 通讯作者(E-mail: guowm@njau.edu.cn, Tel:025-84395231)。

改良的MS+6-BA 1.0+2, 4-D 1.0; 改良的MS+6-BA 0.1+2, 4-D 0.1; 改良的MS+6-BA 0.1+2, 4-D 1.0。每处理重复4瓶, 每瓶接种4块外植体。接种后2个月统计愈伤组织的诱导率和大小。(2)再生芽诱导时, 取由无菌苗茎尖在改良MS+6-BA 1.0 +2, 4-D 0.1上培养2个月产生的愈伤组织为材料, 接种到不同生长调节剂配比的培养基上: MS₀; MS+6-BA 0.1; MS+6-BA 1.0; MS+噻二唑苯基脲(thidiazuron, TDZ) 0.01; MS+TDZ 0.1。每处理重复4瓶, 每瓶接种4块外植体。接种后2个月统计诱导的芽数。试验数据均采用SAS软件进行方差分析。

以上培养基均添加3%蔗糖、0.6%琼脂, 灭菌前pH值调至6.0~6.2, 1.2 kg·cm⁻²压力下灭菌17 min。培养室温度(25±2)°C, 光照度1 500~2 000 lx, 照光12 h·d⁻¹, 培养室中空气相对湿度为70%。

实验结果

1 无菌苗生长势的恢复

继代培养2次后, 在MS+0.3% AC中培养的愈伤组织分化的芽数略有减少, 但分化的芽生长状况明显优于MS₀和MS+6-BA 0.5, 表现为芽体和叶柄较粗壮伸长、颜色较红、叶片较宽、叶色较深; 而MS₀中培养的愈伤组织分化芽较多、芽体颜色偏白、叶片较小、叶色淡绿; MS+6-BA 0.5中愈伤组织分化大量丛生芽, 生长势最弱。因

此, 我们认为随着继代次数的增加, 宜逐步降低外源生长调节剂浓度, 直至完全不添加任何生长调节剂; AC对无菌苗生长势的恢复有较显著效果。但在后续研究中发现, 生长势提高后的无菌苗仍明显不如培养体系重新建立后的再生苗, 所以无菌苗生长势的恢复方法不宜长期应用, 应重新建立培养体系, 以提高成苗率和维持试管苗生产的可持续性。

2 培养体系的重新建立

2.1 影响愈伤组织诱导的因素 从表1可见:

(1) 试验的4种外植体形成愈伤组织的能力差异显著。无菌苗茎尖、带叶片的叶柄、叶片分别于接种后3~5周开始出现愈伤组织。无菌苗茎尖的愈伤组织诱导率最高, 生长势也最好, 叶柄在所有培养基上均无愈伤组织产生, 其余2种外植体的诱导效果介于二者之间。

(2) 单独6-BA并不能诱导愈伤组织, 2, 4-D浓度大于6-BA的组合也不能产生愈伤组织, 其它组合的愈伤组织诱导率因外植体种类而异。高浓度6-BA的诱导效果比低浓度的好, 当6-BA浓度为1 mg·L⁻¹时, 随着2, 4-D浓度的升高, 茎尖的愈伤组织诱导率呈现单峰曲线, 6-BA 1 mg·L⁻¹ +2, 4-D 0.1 mg·L⁻¹组合的诱导率达到100%。高浓度(1 mg·L⁻¹) 2, 4-D除与高浓度6-BA结合使用外, 其余单独或组合使用的均不能诱导茎尖产生愈伤组织。低浓度2, 4-D与高浓度6-BA组合对茎尖愈伤组织的诱

表1 不同外植体和生长调节剂配比对花烛‘Jolanba’愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different explants and growth regulator combinations on callus induction of *Anthurium andraeanum* ‘Jolanba’

生长调节剂配比 (浓度/mg·L ⁻¹)	愈伤组织诱导率/%				愈伤组织团的大小 /mm			
	茎尖	叶柄	带叶片的叶柄	叶片	茎尖	叶柄	带叶片的叶柄	叶片
6-BA 0+ 2, 4-D 0	87.5a	0	12.5c	75.0a	5.12ab	—	4.50ab	3.78b
6-BA 1.0+ 2, 4-D 0	0c	0	0c	0c	—	—	—	0c
6-BA 1.0+ 2, 4-D 0.1	100a	0	43.8b	0c	6.94a	—	3.00b	0c
6-BA 1.0+ 2, 4-D 1.0	31.3b	0	0c	0c	1.17c	—	—	0c
6-BA 0.1+ 2, 4-D 0.1	56.3b	0	68.8a	25.0c	3.00bc	—	6.06a	11.5a
6-BA 0.1+ 2, 4-D 1.0	0c	0	0c	0c	—	—	—	0c

显著性水平: $P < 0.05$ 。

导和增殖效果均优于其与低浓度6-BA组合。在相同低浓度(0.1 mg·L⁻¹)6-BA和2,4-D组合的培养基中带叶片的叶柄的诱导效果最佳。当6-BA浓度为1 mg·L⁻¹时,低浓度2,4-D虽然可促进愈伤组织的诱导,但抑制其增殖。

总之,花烛‘Jolanba’离体培养体系重建过程中诱导愈伤组织时,6-BA的质量浓度不能低于2,4-D。

2.2 生长调节剂对再生芽诱导的影响 从表2可见,外源细胞分裂素类似物明显促进芽的分化,两种不同的细胞分裂素类似物对再生芽诱导的效果有显著差异。TDZ诱导的总芽数尤其是芽体高大于1 cm的壮芽数明显高于6-BA;0.01和0.1 mg·L⁻¹ TDZ诱导效果差异不显著;不同浓度6-BA的诱导效果差异极显著,0.1 mg·L⁻¹诱导的总芽数大大高于1 mg·L⁻¹。这些表明低浓度的6-BA更有利于芽的分化。

表2 不同生长调节剂配比对花烛‘Jolanba’再生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different growth regulator combinations on bud induction of *Anthurium andraeanum* ‘Jolanba’

生长调节剂 (浓度/mg·L ⁻¹)	≤1 cm的芽 数/愈伤团	>1 cm的芽 数/愈伤团	总芽数/ 愈伤团
0	0.19cB	0.06bB	0.25cB
6-BA 0.1	1.38aAB	0bB	1.38bAB
6-BA 1.0	0.44bcB	0bB	0.44cB
TDZ 0.01	1.19abAB	0.81aA	2.00abA
TDZ 0.1	1.75aA	0.63aA	2.38aA

大小写字母分别表示显著性水平为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 。

讨 论

以无菌苗为外植体供体重新建立离体培养体系,不仅可明显降低从盆栽苗重新取材的人力和物力花费,大大降低污染率,缩短培养周期,提高培养效率 and 经济效益,而且诱导的愈伤组织经增殖3~4代后,再生芽的生长势远远优于长期继代培养的愈伤组织分化的芽,大大提高成苗质量。因此我们认为,在花烛离体培养一段时间

后,重新建立离体培养体系是十分必要的,重建时间则以再生苗生长势有较大退化之前为好。同时,在培养体系重建过程中,无菌苗茎尖的愈伤组织诱导能力较强,可能与其顶端分生组织较发达有关;单独用叶柄不能产生愈伤组织,而带叶片的叶柄有较高的诱导频率,其在低浓度6-BA下的诱导率显著大于高浓度6-BA,据此推测,叶片中合成的CTK或生长素类物质可能转运至叶柄基部,两者达到平衡后可促进愈伤组织的产生。选择可以添加的外源生长调节剂浓度时应该随外植体种类不同而有所变化,否则可能会降低愈伤组织诱导率,甚至不能产生愈伤组织。

TDZ为苯基脲类CTK,对芽分化和发育有极强的促进作用,其活性往往比腺嘌呤类CTK高1~2个数量级^[4]。崔瑾等^[5]在与花烛同科的芋头(*Colocasia esculenta*)中发现,0.1 mg·L⁻¹ TDZ能有效诱导4个品种芋头茎尖萌动和生长,促进丛生芽增殖和无菌苗根系的发生,提高驯化成活率;同时,0.01 mg·L⁻¹ TDZ能诱导无菌苗叶片切块的边缘直接再生芽点,转接后不定芽增殖并形成再生植株。TDZ在花烛离体培养中的应用尚未见报道。本文结果表明,TDZ诱导花烛愈伤组织分化芽的效果显著高于6-BA,其对花烛体细胞胚胎发生也有一定的诱导效应(另文发表)。TDZ促进花烛愈伤组织分化芽可能与其能调节愈伤组织内源细胞分裂素和生长素的代谢有关,其在花烛离体快繁中和对离体形态发生的作用机制值得探讨。

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. 热带农业科学, 2001, (1): 48~51, 60
- 2 杨 涛, 陈德海, 吴荔萍. 安祖花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): 1~7
- 3 王进茂, 郑均宝, 高秀丽等. 花烛组织培养的研究. 河北林果研究, 2000, 15 (1): 69~74
- 4 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控. 北京: 科学出版社, 1995. 8~16
- 5 崔 瑾, 朱月林, 李式军. 苯基噻二唑基脲(TDZ)在不同基因型芋组织培养中的生理效应. 南京农业大学学报, 2002, 25 (2): 31~34