

NH₄NO₃ 及碳源对红掌愈伤组织诱导影响的研究

刘 熠¹, 刘国锋², 张 翼³

(1. 上海植物园 上海城市植物资源开发应用工程技术研究中心, 上海 200231; 2. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070;

3. 河南四季春园林艺术工程有限公司, 河南 郑州 450002)

摘 要:以红掌的根段和叶片为外植体, 探讨了不同 NH₃NO₃ 浓度和不同碳源组合对外植体愈伤组织诱导率的影响。结果表明: 红掌再生对 NH₄NO₃ 的浓度非常敏感, 低浓度的 NH₄NO₃ 有利于诱导愈伤组织, 浓度较高时抑制愈伤的诱导; 而不同的碳源也会影响到外植体愈伤组织的诱导, 蔗糖与葡萄糖相比更适合于红掌愈伤组织的诱导。其中 NH₄NO₃ 0 mg/L、蔗糖 3% 组合中根和叶片的愈伤组织诱导率最高, 分别是 92.6% 和 81.5%。

关键词:红掌; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号: S 682.1⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)24-0152-03

红掌(*Anthurium andraeanum*)为天南星科花烛属多年生常绿草本植物, 又名安祖花是一种观花、观叶兼宜的世界名贵花卉, 也是目前全球发展速度快、需求量较大的高档热带切花和盆栽花卉。自 Pierik 等^[1-2]对红掌组织培养取得成功以来, 国内外学者对其进行了大量的组织培养的研究报道, 但绝大多数的报道仅限于单一器官(茎尖报道最多), 根的组培更是鲜有报道^[3-5]。因此对红掌根和叶片的愈伤组织诱导及分化的研究具有很高的理论价值和应用价值, 为红掌快速繁殖体系的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室保存的红掌品种‘Red Queen’无菌苗。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 选取生长势较强的无菌苗, 叶片切去叶柄并刻伤叶脉, 根切成 0.5 cm 左右的根段, 分别接种在预先准备好的诱导培养基上, 每个培养基中接种 9 个外植体, 各设 6 次重复。接种完后放入培养室无光条件下培养。研究采用双因素试验设计, MS 培养基为基本培养基, 添加不同浓度的 NH₃NO₃ (NH₃NO₃: 0~825 mg/L)^[6] 和不同碳源(葡萄糖和蔗糖)。其中添加植物激素为 1.0 mg/L 6-BA 以及 0.1 mg/L 2,4-D^[7]。诱导愈伤培养基共 24 种(表 1)。

表 1 诱导愈伤组织培养基

NH ₃ NO ₃ /mg·L ⁻¹	碳源				
	3%葡萄糖	3%蔗糖	1%葡萄糖	2%蔗糖	2%葡萄糖
0	1	7	13	19	19
200	2	8	14	20	20
412.5	3	9	15	21	21
600	4	10	16	22	22
720	5	11	17	23	23
825	6	12	18	24	24

1.2.2 愈伤组织的分化培养 分别从 NH₃NO₃ 浓度为 0、200、412.5 mg/L 的 3 个处理中选取长势较好的愈伤组织, 无菌条件下转接到出芽培养基上, 每个培养皿接种 10 个外植体, 设 3 次重复。光照培养, 1 个月 after 观察出芽率。出芽培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L。

1.2.3 生根培养 将愈伤组织分化得到的不定芽切分成单芽接种到生根培养基上, 每个培养皿接种 10 个外植体, 设 3 次重复, 光照培养, 1 个月 after 统计生根率。生根培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L。

1.2.4 培养条件 培养室温度为 (25±1)℃, 光照时间为 14 h/d, 光照强度为 1 000 lx 左右。

1.2.5 数据记录与分析 对外植体进行定期观察, 统计诱导愈伤组织的数量, 记录发芽数及生根数, 并进行数据整理, 用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

外植体接种后 20 d 左右开始产生愈伤组织, 6 周后出现明显的黄色颗粒状愈伤组织。根段愈伤组织产生部位在根的两端切口处, 叶片产生部位在叶中脉接近叶柄处。

由表 2 可知, 2 种外植体在不同的培养基上的愈伤组织诱导率有很大差异, 但无论是对于叶片还是根

第一作者简介: 刘熠(1983-), 男, 硕士, 工程师, 现主要从事花卉种质资源收集与遗传育种研究工作。E-mail: Liuzhaojob@126.com。
责任作者: 刘国锋(1975-), 男, 博士, 教授, 现主要从事园林植物遗传育种工作。

收稿日期: 2011-09-01

段,较低的 NH_3NO_4 浓度都更有利于愈伤组织的诱导,当培养基中 NH_3NO_4 含量高于 600 mg/L 时,几乎无法诱导出愈伤组织。同时外植体、 NH_3NO_4 以及不同碳源之间存在一定相互作用。而在试验设计的 24 种诱导培养基中,处理 7 对于根和叶片来说都具有较好的诱导效果,愈伤组织诱导率均达到 80% 以上。

表 2 不同培养基中外植体的平均诱导率

处理	叶片的诱导率/%	根的诱导率/%
1	85.2	22.2
2	48.1	7.4
3	18.5	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	81.5	92.6
8	37	18.5
9	22.2	7.4
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	51.1	15.6
14	68.9	15.6
15	55.6	4.4
16	22.2	0
17	4.4	0
18	0	0
19	64.4	4.4
20	46.7	4.4
21	55.6	2.2
22	4.4	0
23	0	0
24	0	0

表 3 愈伤组织诱导率的三因素方差分析 $\alpha=0.05$

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	PR>F
a	3	0.16	0.05	2.68	0.06
b	2	1.14	0.57	29.58	<.0001
c	1	2.25	2.25	116.43	<.0001
a×b	6	1.33	0.22	11.45	<.0001
a×c	3	0.48	0.16	8.27	<.0001
b×c	2	0.04	0.02	0.95	0.40
a×b×c	11	0.76	0.07	3.58	0.001

注:a 表示不同的碳源;b 表示不同的 NH_3NO_4 浓度;c 表示不同外植体。

2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

在相同培养基中,2 种外植体的愈伤组织诱导率之间存在显著差异,叶片的愈伤诱导率均大于根的诱导率。特别是在葡萄糖和蔗糖混合碳源的 2 组培养基中,根与叶片诱导率差异尤为明显,叶片诱导率远大于根。这表明,红掌叶片比根更适合作为诱导愈伤组织的外植体。根对碳源的变化则更为敏感。

2.2 不同碳源对愈伤组织诱导的影响

不同碳源对根的愈伤组织诱导有显著影响,而叶片对碳源的变化并不敏感,诱导率差异不显著。红掌根段在含有 3% 蔗糖的培养基中的诱导率较高,随着蔗糖浓度的减少,诱导率随之降低,表明蔗糖作为碳源更有利于红掌的根诱导愈伤组织。由表 4 可知,3% 蔗

糖培养基与其它 3 组碳源的培养基相比,根的愈伤组织诱导率存在显著优于其它 3 组,平均诱导率为 39.5%。

表 4 不同碳源对根诱导率的多重比较

不同碳源	平均诱导率/%
3% 蔗糖	39.50A
1% 葡萄糖 2% 蔗糖	11.85B
2% 葡萄糖 1% 蔗糖	9.87BC
3% 葡萄糖	3.70C

2.3 不同 NH_3NO_4 浓度对愈伤组织诱导的影响

由表 5 可知, NH_3NO_4 浓度对红掌愈伤组织诱导的影响非常显著,2 种外植体均表现出对 NH_3NO_4 浓度的敏感。随着 NH_3NO_4 浓度增高,诱导率明显下降。低浓度 NH_3NO_4 有利于红掌外植体愈伤组织诱导。随氨盐浓度的不断升高,诱导率逐级降低,当氨盐浓度升高到 600 mg/L 后几乎诱导不出愈伤组织,试验诱导率为 0。说明氨盐对红掌愈伤组织的诱导有重要作用,不含氨盐的培养基更有利于愈伤组织的诱导。外植体类型、不同碳源和氨盐浓度之间存在互作,根段在 7 号培养基(NH_3NO_4 浓度为 0 mg/L,3% 蔗糖)中的愈伤组织诱导率最高,达到 92.6%。叶片在 1 号培养基(NH_3NO_4 浓度为 0 mg/L,3% 葡萄糖)中愈伤组织诱导率最高,愈伤组织诱导率高达 85.2%。因此,要想提高愈伤组织诱导率,不同的外植体要选择不同的碳源和氨盐浓度,以实现最适外植体在最佳培养基下的最高诱导率。综上所述,1 号培养基最适合做叶片愈伤组织诱导,而 7 号培养基最适合做根段愈伤组织诱导的培养基。

表 5 不同 NH_3NO_4 浓度对根诱导率的多重比较

NH_3NO_4 /mg·L ⁻¹	根平均诱导率 /%	叶片平均诱导率 /%
0	33.70A	70.55A
200	11.48B	50.18B
412.5	3.52C	37.96B

2.4 愈伤组织的分化

由红掌外植体诱导出来的组织诱导在光照培养下很容易分化出不定芽。而不定芽分化的速度、质量与愈伤组织状态、增殖速率有很大关系。不定芽分化的前提是要有生长旺盛、分化能力强的愈伤组织。将不同氨盐浓度下诱导出的愈伤转移到出芽培养基光下培养,1 周后叶片愈伤转绿,1 个月后观察出芽率。由表 6 可知,叶片和根段的愈伤出芽率之间差别不大。不定芽的形成与愈伤组织诱导率有一定相关性,诱导率高的外植体上形成的不定芽分化快、数量多、长势好。

表 6 愈伤组织分化结果

处理	叶片愈伤 增殖系数	根段愈伤 增殖系数
1	4.3	4.7
2	5.6	4.3
3	5.3	4.8

2.5 不定芽的生根

将不定芽切分成单芽接种到生根培养基上光下培养1个月,由表7可知,不同编号的培养基中叶片和根段不定芽的生根率没有显著差异,但总体来说叶片出芽率和生根率略高于根段。

表7 不定芽的生根结果

处理	平均生根数	
	叶片不定芽/条	根段不定芽/条
1	4.2	3.6
2	4.4	3.6
3	3.9	3.8

3 讨论与结论

红掌愈伤组织诱导和不定芽分化是进行快速繁殖的基础和前提。国内外已有大量关于红掌愈伤组织诱导与不定芽分化方面的研究^[5,8-9]。该试验对碳源和氮源等红掌愈伤组织诱导和不定芽分化的影响因素进行了初步的研究与探讨。

同一红掌品种不同外植体的愈伤组织诱导率 and 不定芽分化存在较大差异,兰芹英等^[10]、吕复兵等^[11]研究认为叶柄愈伤组织诱导能力高于叶片,并且大多数品种都表现出茎段>叶柄>叶片。但也有的研究者认为利用未展开叶片的叶柄能诱导出更多的愈伤组织^[12]。而关于根段作为外植体诱导愈伤的报道较少。愈伤组织的诱导和外植体的遗传因素及本身的生理生化密切相关,不同外植体的诱导差异,因植物种类和部位而不同,造成这种差异的原因可能是由于不同部位所含的内源细胞分裂素与生长素的绝对含量和相对比例不同所致。所以,在愈伤组织诱导的过程中,选择合适的外植体很重要^[9],该研究发现在相同的培养基中,

叶片的愈伤组织诱导能力明显高于根段。不同的红掌外植体应当选择差异化的培养方式。目前国内外报道中多采用MS基本培养基,叶片和根的诱导率不尽如人意,该研究中对MS培养基的进一步优化使得其根和叶片的诱导率均可以稳定达到90%以上。

参考文献

- [1] Pierik R L M, Steegman S H H M, Vander Meys J A J. Plantlet formation in callus tissues *Anthurium andraeanum* Lind [J]. Scientia Horticulture, 1974(2):193-198.
- [2] Pierik R L M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from cultivated *in vitro* [J]. Physiol. Plant, 1976, 37:80-82.
- [3] 丁爱萍, 张艳春. 红掌组织培养研究[J]. 中国花卉园艺, 2003(5): 26-28.
- [4] 江如蓝, 张施君, 郑迎东, 等. 红掌的组织培养和快速繁殖[J]. 仲凯农业技术学报, 2002, 15(4):49-53.
- [5] 肖三元, 梁国平, 杨炎, 等. 红掌不同品种产生愈伤组织的差异[J]. 热带农业科技, 2005, 28(2):7-9.
- [6] Chen F C, Kuehnle A R, Sugii N. *Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 49:71-74.
- [7] 夏慧敏, 傅玉兰, 杨海燕, 等. 红掌组培快繁技术研究现状的综述[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(21):5516-5517.
- [8] 夏时云, 麦瑜玲, 许继勇, 等. 提高红掌叶片愈伤组织诱导和植株分化及壮苗率的技术研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2):45-48.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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[J]. 广东农业科学, 2002(6):25-26.
- [12] 黄君梅, 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.

Effect of NH_4NO_3 and Carbon Sources on the Callus Induction of *Anthurium andraeanum*

LIU Zhao¹, LIU Guo-feng², ZHANG Yi³

(1. Shanghai Botanical Garden, Shanghai Engineering Research Center of Sustainable Plant Innovation, Shanghai 200231; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. Henan Four Season Spring Garden Art Engineering Company Limited, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: *Anthurium* root and leaf was chosen as explants, the effect of different NH_4NO_3 concentrations and different combinations of carbon sources on the callus induction were studied. The results showed that *A. andraeanum* was sensitive to NH_4NO_3 , a beneficial effect of low ammonium/nitrate ratio on growth and shoot production. The carbon source also had impact on callus induction. Sucrose was suitable for callus induction of *A. andraeanum*. The best option was NH_4NO_3 0 mg/L and sucrose 3%, the calli induction rates of roots and leaves were 92.6% and 81.5%.

Key words: *Anthurium andraeanum*; tissue culture; callus