

硝酸铵和植物生长调节剂对花烛愈伤诱导 和植株再生的影响

张毅华, 唐 丽, 谷艾素, 崔 瑾*

(南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以花烛(*Anthurium andraeanum* Lind.)品种阿拉巴马和塞拉叶片为外植体,研究硝酸铵和植物生长调节剂对花烛愈伤组织诱导及植株再生的影响。结果表明,将硝酸铵用量减少至MS配方量的1/4时,阿拉巴马和塞拉叶片愈伤诱导率分别显著提高285.9%和458.5%;叶片愈伤组织诱导的最适培养基为改良MS(1/4NH₄NO₃)+TDZ 0.4 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L;不定芽分化和试管苗增殖的最适培养基为1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L,添加适量生长素(IBA 0.2 mg/L)有利于试管苗生长。

关键词: 植物生长物质;花烛;愈伤组织;植株再生

中图分类号: S682 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)04-0125-05

Effects of NH₄NO₃ and Plant Growth Regulator on Callus Induction and Plant Regeneration from *Anthurium andraeanum* Lind.

ZHANG Yi-hua, TANG Li, GU Ai-Su, CUI Jin*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Effects of NH₄NO₃ and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration from *Anthurium andraeanum* Lind. were studied, with the leaves of *Anthurium andraeanum* cultivars Alabama and Sierra as explants. The results showed that, when the amount of NH₄NO₃ was reduced to 1/4 in the MS medium, the frequencies of callus induction of both cultivars were significantly increased by 285.9% and 458.5% respectively. The optimum culture medium for leaf callus induction was modified MS medium (1/4NH₄NO₃) supplemented with 0.4 mg/L TDZ and 1.0 mg/L 2,4-D. The optimum medium for adventitious bud induction and plantlet multiplication was 1/2MS+0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT. Addition of 0.2 mg/L IBA was beneficial to plantlet growth.

Key words: plant growth regulator; *Anthurium andraeanum*; callus; plant regeneration

花烛(*Anthurium andraeanum* Lind.)又名红掌、安祖花,为天南星科花烛属多年生草本植物,具有较高的观赏价值,现已经成为仅次于热带兰的第二大热带花卉商品^[1]。最早花烛繁殖主要利用实生繁殖和分株繁殖,但存在种子不易获得、繁殖速度缓

慢等问题。自1974年Pierik等^[2]成功建立花烛离体培养技术以来,利用组织培养技术进行花烛种苗生产已成为一种快速有效的繁殖方式^[3-5]。

植物生长物质在植物组织培养中起着重要的调节作用。愈伤组织诱导一般需要细胞分裂素与生长

收稿日期:2012-12-20

基金项目:国家自然科学基金项目(30800764)

作者简介:张毅华(1990-),男,山西太原人,在读本科生,研究方向:植物生物学。E-mail:569195257@qq.com

*通讯作者:崔瑾(1974-),女,江苏镇江人,副教授,博士,主要从事植物发育生物学研究。

E-mail:cuijin@njau.edu.cn

素结合使用^[6-10],但也有单独使用细胞分裂素诱导愈伤组织的报道^[6]。目前,在花烛的组织培养中发现,使用 6-BA 和 KT^[11-12]以及 2,4-D^[10]具有显著效应。而采用具有细胞分裂素活性的新型植物生长调节剂噻二唑苯基脲(TDZ)对花烛进行离体培养的报道还较少,且结果不完全相符。黄群声^[13]研究表明,TDZ 与 6-BA 适当配比有利于花烛外植体的脱分化。而徐彬^[14]研究表明,单独使用 TDZ 或 TDZ 结合 KT 导致外植体褐化,不能诱导出愈伤组织。赵云鹏等^[15]发现,TDZ 诱导花烛愈伤组织分化芽的效果显著高于 6-BA。徐彬^[14]研究发现,添加 TDZ 导致花烛腋芽发生畸形,叶黄化,且不利于腋芽的发生。花烛不同品种间基因型差异大,有关硝酸铵含量及植物生长物质对不同品种花烛离体发育影响的研究报道较为鲜见。以花烛 2 个重要栽培品种阿拉巴马和塞拉为材料,着重研究硝酸铵含量和 TDZ 质量浓度对花烛愈伤组织诱导以及不同生长调节剂配比对其不定芽分化、试管苗增殖生长的影响,以改善花烛组织培养条件,优化快繁体系,提高花烛种苗的生产效率。

1 材料和方法

1.1 材料

花烛品种阿拉巴马和塞拉购买于南京市仙林花卉物流中心。取完全展开的幼嫩叶片(保留中脉),置于 75%乙醇中 30 s,无菌水洗 5 次,再置于 5%次氯酸钠中灭菌 15 min,无菌水洗 5 次,用无菌吸水纸吸干后备用。试验所用培养基均添加蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L,高压灭菌前调节 pH 值至 5.8,植物生长调节剂采用过滤灭菌。培养温度为(25±2)℃。

1.2 方法

1.2.1 硝酸铵含量对花烛愈伤组织诱导的影响

取 2 个花烛品种灭菌后的叶片,切割成 1 cm² 方块,分别接种于含有全量 NH₄NO₃(1 650 mg/L)、1/2NH₄NO₃、1/4NH₄NO₃、1/6NH₄NO₃、1/8NH₄NO₃ 的愈伤组织诱导培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 中,置于黑暗培养,2 个月后观察并统计愈伤组织发生情况。

1.2.2 TDZ 质量浓度对花烛愈伤组织诱导的影响

以改良 MS(将 MS 基本培养基中 NH₄NO₃ 含量减少至原用量的 1/4)为基本培养基,取 2 个花烛品种灭菌后的叶片,切割成 1 cm² 方块,接种于含有不同质量浓度 TDZ(0.05、0.2、0.4、0.6 mg/L)的愈伤组织诱导培养基中,置于黑暗培养,2 个月后观察并统计愈伤组织发生情况。

1.2.3 植物生长调节剂配比对花烛愈伤组织诱导的影响 以改良 MS 为基本培养基,取 2 个花烛品种灭菌后的叶片,切割成 1 cm² 方块,接种于含有不同生长调节剂的愈伤诱导培养基中:(1)TDZ 0.4 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L;(2)TDZ 0.4 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;(3)TDZ 0.4 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L;(4)6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L,置于黑暗培养,2 个月后观察并统计愈伤组织发生情况,计算愈伤组织诱导率,愈伤组织诱导率=(出愈外植体数/接种外植体总数)×100%。

1.2.4 植物生长调节剂配比对花烛不定芽分化的影响 以 1/2MS(MS 大量元素减半,微量元素、铁盐和有机成分同 MS)为基本培养基,将诱导出的愈伤接种于含有不同植物生长调节剂的不定芽分化培养基中:(1)6-BA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L;(2)6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L;(3)6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L;(4)KT 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L;(5)KT 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L;(6)6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L;(7)6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L,置于 40 μmol/(m²·s)光下培养,光照时间 12 h/d,1 个月后统计不定芽的发生情况,计算不定芽分化率,不定芽分化率=(分化出不定芽的愈伤数/接种愈伤总数)×100%。

1.2.5 植物生长调节剂配比对花烛试管苗增殖的影响 以 1/2MS 为基本培养基,将花烛阿拉巴马试管苗接种于含有不同植物生长调节剂的培养基中:(1)6-BA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L;(2)6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L;(3)6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.1 mg/L;(4)6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L;(5)KT 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L;(6)KT 0.2 mg/L+IBA 0.1 mg/L,置于 40 μmol/(m²·s)光下培养,光照时间 12 h/d,1 个月后统计试管苗增殖情况。增殖系数=(结束培养时的苗数-接种时的苗数)/接种时的苗数。

1.3 数据处理

采用 Excel 2003 进行数据处理,SPSS 16.0 进行方差分析,邓肯氏新复极差法^[16]检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 硝酸铵含量对花烛愈伤组织诱导的影响

由表 1 看出,当 NH₄NO₃ 含量减至原来的 1/4 时,阿拉巴马、塞拉 2 个花烛品种的愈伤组织诱导率均达到最高,分别为 91.00%和 88.92%,比全量 NH₄NO₃ 处理显著提高 285.9%和 458.5%。全量 NH₄NO₃ 处

理下愈伤组织诱导率均显著低于其他处理。

表 1 不同硝酸铵含量对花烛愈伤组织诱导率的影响 %

NH ₄ NO ₃ 含量	阿拉巴马	塞拉
全量 NH ₄ NO ₃	23.58±6.15d	15.92±4.14d
1/2NH ₄ NO ₃	49.33±11.81c	43.08±10.56c
1/4NH ₄ NO ₃	91.00±3.88a	88.92±4.00a
1/6NH ₄ NO ₃	86.17±4.25ab	82.67±5.75ab
1/8NH ₄ NO ₃	63.92±12.83bc	61.83±11.26bc

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05),下同。

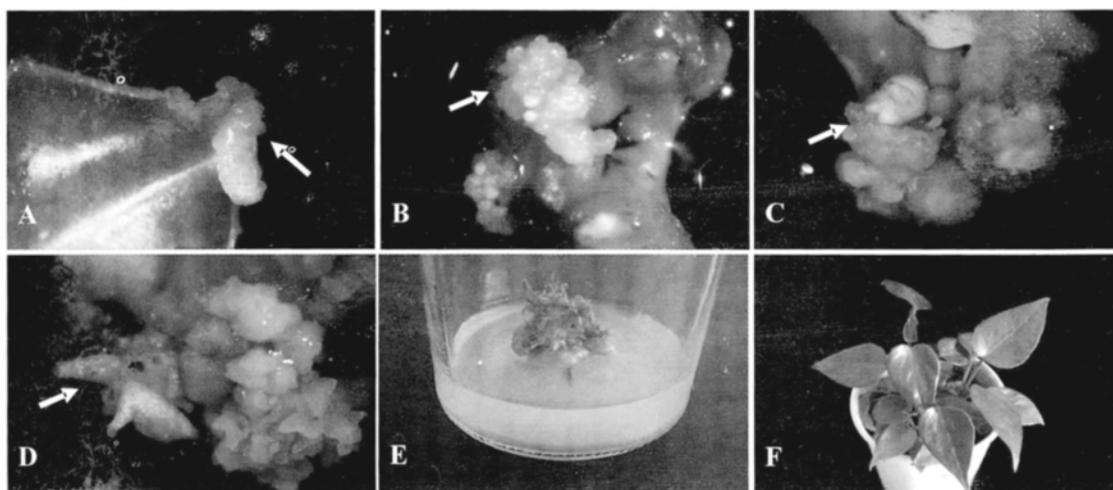
2.2 TDZ 质量浓度对花烛愈伤组织诱导的影响

叶片外植体培养 3 周后体积开始增大,叶片明显变绿,外植体呈卷曲状。1 个月后叶片切口处开始长出黄绿色愈伤组织,随后愈伤组织不断增殖。

从表 2 可以发现,当 TDZ 质量浓度为 0.4 mg/L 时,2 个花烛品种外植体的愈伤诱导率最高,且生长迅速,增殖明显(图 1—2)。TDZ 质量浓度较高时(0.6 mg/L),外植体出现褐化现象。

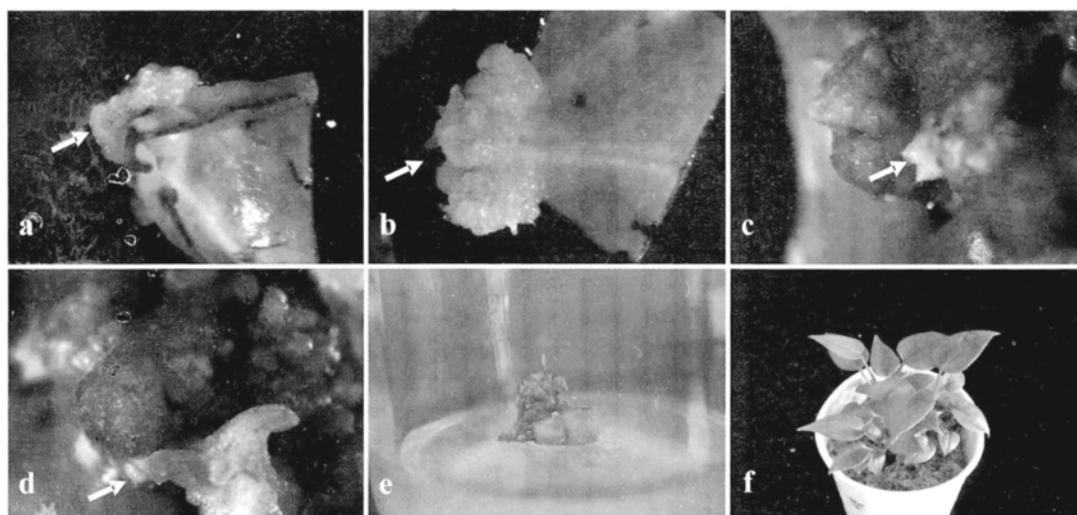
表 2 不同质量浓度 TDZ 对花烛愈伤组织诱导率的影响 %

TDZ 质量浓度/(mg/L)	阿拉巴马	塞拉
0.05	41.67±4.17c	33.33±3.86c
0.2	58.33±6.30bc	50.00±6.68bc
0.4	83.33±4.98a	77.78±7.03a
0.6	66.67±7.39ab	58.33±6.30b



A. 叶片边缘脱分化出浅黄色愈伤组织;B. 愈伤组织增殖;C. 愈伤组织再分化出红色不定芽;D. 不定芽形成丛生苗;E. 丛生苗增殖;F. 再生植株

图 1 花烛阿拉巴马离体形态建成



a. 叶片边缘脱分化出浅黄色愈伤组织;b. 愈伤组织增殖;c. 愈伤组织再分化出绿色不定芽;d. 不定芽形成丛生苗;e. 丛生苗增殖;f. 再生植株

图 2 花烛塞拉离体形态建成

2.3 植物生长调节剂配比对花烛愈伤诱导组织的影响

从表 3 可以看出,0.4 mg/L TDZ+1.0 mg/L 2,4-D 对花烛愈伤组织诱导效果较好,愈伤组织诱导率

最高,其中阿拉巴马的愈伤组织诱导率高达 93.75%。其他植物生长调节剂处理也能诱导出愈伤组织,但是愈伤组织诱导率低于上述培养基。在相同培养条件下,阿拉巴马的愈伤组织诱导率高于塞拉。

表 3 不同植物生长调节剂对花烛愈伤组织诱导率的影响

植物生长调节剂及其质量浓度/(mg/L)	阿拉巴马	塞拉
TDZ 0.4+2,4-D 1.0	93.75±4.09a	50.00±6.68a
TDZ 0.4+2,4-D 1.0+KT 0.5	77.08±5.16c	28.57±6.52b
TDZ 0.4+2,4-D 1.0+6-BA 0.5	75.00±6.68c	31.25±6.25ab
6-BA 0.5+2,4-D 1.0+KT 0.5	85.42±5.62ab	28.57±6.52b

2.4 植物生长调节剂配比对花烛不定芽分化的影响

培养 4 周后,愈伤组织体积逐渐增大,形成紧密的愈伤块。2 周后阿拉巴马愈伤组织中再分化出红色不定芽,塞拉愈伤中再分化出绿色不定芽(图 1—2)。由表 4 可见,在所有植物生长调节剂处理中,2

个品种花烛不定芽分化率均为 100%。愈伤分化芽数以处理 6-BA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L 和 6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L 较高,其次为处理 6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L。

表 4 不同植物生长调节剂对花烛不定芽分化的影响

植物生长调节剂及其质量浓度/(mg/L)	阿拉巴马		塞拉	
	不定芽分化率/%	愈伤组织分化芽数/(个/块)	不定芽分化率/%	愈伤组织分化芽数/(个/块)
6-BA 0.2+KT 0.5	100	24.9±2.3a	100	24.7±1.9a
6-BA 0.2+IBA 0.2	100	15.8±1.8bc	100	12.7±1.1c
6-BA 0.2+NAA 0.2	100	13.2±1.5cd	100	11.2±1.3cd
KT 0.2+NAA 0.2	100	10.6±1.1d	100	9.0±1.2d
KT 0.2+IBA 0.2	100	10.1±1.2d	100	8.5±1.5cd
6-BA 0.2+IBA 0.2+KT 0.5	100	22.3±2.1a	100	21.5±1.5ab
6-BA 0.2+NAA 0.2+KT 0.5	100	19.9±1.8ab	100	19.6±1.6b

2.5 植物生长调节剂配比对花烛试管苗增殖的影响

由表 5 可知,6-BA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L 处理试管苗的增殖系数最高,为 5.23,显著高于其他处理,其次是 6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L。在 6-BA 存在的条件下,KT 能够提高试管苗的增殖系数;6-BA 不存在时,KT 对试管苗的增殖效

果不明显。可见,6-BA 和 KT 同时存在时花烛试管苗的增殖系数较高。6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.1 mg/L 和 6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L 处理下试管苗的株高和叶面积较大且显著高于其他处理,可见培养基中添加适量的生长素(IBA 0.2 mg/L)有利于试管苗的生长。

表 5 植物生长调节剂配比对花烛试管苗增殖、生长的影响

植物生长调节剂及其质量浓度/(mg/L)	增殖系数	株高/cm	叶面积/cm ²	根数/个
6-BA 0.2+KT 0.5	5.23±0.27a	4.73c	4.56b	8a
6-BA 0.2+IBA 0.2	3.90±0.45b	5.14b	4.36c	7a
6-BA 0.2+IBA 0.2+KT 0.5	4.66±0.26ab	6.45a	5.10a	6ab
6-BA 0.2+IBA 0.2+KT 0.1	4.11±0.38b	6.35a	4.99a	5b
KT 0.2+NAA 0.2	1.46±0.18c	4.14e	2.85d	7a
KT 0.2+IBA 0.2	1.62±0.25c	4.31d	2.80d	4c

3 结论与讨论

本试验结果表明,培养基组分中的 NH₄NO₃ 含量影响愈伤组织诱导率的高低。当 NH₄NO₃ 含量降至原来的 1/4 或 1/6 时,愈伤诱导率明显高于其他处理。有研究表明,低质量浓度的氨盐对很多红掌

愈伤组织诱导有利,206~825 mg/L 较为合适,大于 825 mg/L 或小于 206 mg/L 将不利于愈伤组织的诱导^[17]。本试验结果与此报道相符,这可能是由于高浓度的 NH₄NO₃ 容易引起叶片的褐化,从而导致愈伤诱导率低^[18]。

TDZ 是具有细胞分裂素活性的苯基脲衍生物,比

细胞分裂素活性高。有研究表明,TDZ对愈伤组织诱导具有很高的活性^[13,19-21]。本试验结果表明,单独使用TDZ能够诱导2个品种花烛叶片产生愈伤,且当TDZ为0.4 mg/L时,愈伤组织诱导率均最高。不同生长调节剂配比试验结果表明:TDZ 0.4 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L对2个花烛品种愈伤组织诱导效果较好,这与Yu等^[22]认为TDZ既不适合单独使用,也不适合与2,4-D配合使用进行花烛愈伤组织诱导的结论不相符,可能是不同花烛品种对生长调节剂的反应不同所致。此外,相同培养条件下阿拉巴马愈伤组织诱导率高于塞拉,外植体更容易脱分化。试验中还发现,TDZ质量浓度较高时(0.6 mg/L)2个花烛品种的外植体均出现褐化现象,可见TDZ质量浓度是外植体脱分化的关键。

芽分化是影响花烛快繁效率的主要因素之一。Lightbourn等^[23]研究发现,6-BA是影响愈伤组织芽分化最重要的植物生长调节剂。也有研究表明,不定芽分化往往是多种植物生长调节剂相互平衡及协同作用的结果,生长调节剂的比例尤为重要^[18,24-25]。本研究发现,试验所有处理均能诱导出不定芽,但是不同的生长调节剂配比对不定芽的诱导效果不同。其中,同时添加6-BA和KT的处理诱导效果最好,每块愈伤所形成的不定芽数目最多,显著高于单独添加6-BA或KT的处理,这与前人的研究结果一致^[26-27]。可见,6-BA和KT配合使用有利于促进花烛不定芽的形成。

试管苗增殖和生长效率是优化花烛快繁体系的重要环节。6-BA比KT更有利于阿拉巴马试管苗的增殖生长,培养基中同时添加6-BA和KT显著促进试管苗的增殖生长。此外,在培养基中添加适量IBA能够显著促进试管苗茎、叶的生长,有利于培育壮苗,提高快繁效率。

参考文献:

- [1] Laws N, Galinsky B. Anthurium world market survey[J]. Flora Culture International, 1996, 6: 21-23.
- [2] Pierik R L M, Steegmans H H M, van Der Meys J A J. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. [J]. Scientia Horticulture, 1974, 2(2): 193-198.
- [3] Kuehnle A R, Sugii N. Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of *Hawaiian anthuriums* [J]. Hort-Science, 1991, 26(7): 919-921.
- [4] 岑益群, 蒋如敏, 邓志龙, 等. 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] 赵云鹏, 郭维明, 王广东. 花烛不同愈伤组织解剖结构的观察[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 60-64.
- [6] Kunisaki J T. *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. [J]. HortScience, 1980, 15(4): 508-509.
- [7] Geier T. Factors affecting plant regeneration from leaf segment of *Anthurium scherzerianum* Schott (Araceae) cultured *in vitro* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1986, 6(2): 115-125.
- [8] 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(1): 71-74.
- [9] Malhotra S, Puchoo D, Goofoolye K. Callus induction and plantlet regeneration in three varieties of *Anthurium andraeanum* [J]. Revue Agricole et Sucriere de Maurice, 1998, 77(1): 25-32.
- [10] Sreelatha U, Nair S R, Rajmohan K. Factors affecting somatic organogenesis from leaf explants of *Anthurium* species [J]. Journal of Ornamental Horticulture, 1998, 1(2): 48-54.
- [11] Somaya K U, Narayamaswamy P, Jayaprasad K V. Micropropagation studies in *Anthurium andraeanum* Lind [J]. Karnataka June of Agricultural Science, 1998, 11(2): 466-470.
- [12] 赵云鹏. 花烛离体快繁关键技术及再分化有关机理探讨 [D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [13] 黄群声. TDZ和CPPU对红掌快速繁殖的影响[J]. 亚热带植物学报, 2004, 33(3): 39-41.
- [14] 徐彬. 几个花烛品种离体快繁体系的建立和离体叶色变异株系性状研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [15] 赵云鹏, 郭维明, 王广东, 等. 花烛离体培养中的壮苗 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 48-50.
- [16] Duncan D B. Multiple range and multiple F test [J]. Biometrics, 1955, 11: 1-42.
- [17] Pierik R L M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from cultivated *in vitro* [J]. Physiol Plant, 1976, 37: 80-82.
- [18] 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.
- [19] Joshi M, Sujatha K, Hazra S. Effect of TDZ and 2,4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2008, 94: 85-90.
- [20] Cui J, Liu J X, Deng M, et al. Plant regeneration through protocorm-like bodies induced from nodal explants of *Syngonium podophyllum* 'White Butterfly' [J]. HortScience, 2008, 43(7): 2129-2133.
- [21] Deroles S C, Seelye J F, Javellana J, et al. *In vitro* propagation of *Sandersonia aurantiaca* Hook using thidiazuron [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 102: 115-119.
- [22] Yu Y, Liu L, Liu J, et al. Plant regeneration by callus-mediated protocorm-like body induction of *Anthurium andraeanum* [J]. Hort Agricultural Sciences in China, 2009, 8(5): 572-577.
- [23] Lightbourn G J, Prasad P V D. *In vitro* techniques for rapid multiplication of four varieties of *Anthurium andraeanum* in Jamaica [J]. Proceedings of the Inter-american Society for Tropical Horticulture, 1990, 34: 3-5.
- [24] 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.
- [25] 姜蕾, 兰天, 黎扬辉, 等. 影响红掌愈伤组织诱导、增殖和芽分化的因素 [J]. 种子, 2006, 25(11): 26-30.
- [26] 李志芳, 叶秦, 赵贵林. 花烛的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(3): 197.
- [27] 肖三元, 梁国平. 红掌组织培养及快速繁殖 [J]. 云南热作科技, 2000, 23(3): 12-13.