

细胞分裂素对红掌愈伤组织不定芽分化与增殖的影响

王晶, 牛瑞鹤, 祁伟, 张萍萍, 陈驰, 谈建中*

(苏州大学建筑与城市环境学院, 苏州市建筑与城市环境重点实验室, 江苏苏州 215123)

摘要 [目的]研究细胞分裂素对红掌组培苗繁殖速度及质量的影响。[方法]以继代培养第6代的愈伤组织为试验材料,探讨了ZT、TDZ、6-BA 3种细胞分裂素及其浓度对不定芽分化及变异的影响。[结果]在使用浓度2.0~8.0 mg/L的范围内,随着细胞分裂素浓度的增加,正常不定芽的分化数及叶片数呈下降趋势,而异常不定芽分化逐渐增多,且随着培养时间的延长,这种影响变得更加明显;3种细胞分裂素的培养效果具有显著差异,ZT和6-BA添加浓度分别在2.0和4.0 mg/L以下时,其正常不定芽分化较多,不良变异率较少,而TDZ在0.5 mg/L时已显著抑制了正常不定芽的分化,同时易产生异常不定芽。[结论]3种细胞分裂素作用的强弱依次为TDZ > ZT > 6-BA;在红掌愈伤组织继代培养诱导不定芽过程中,应避免使用高浓度细胞分裂素。

关键词 红掌;细胞分裂素;不定芽;分化;变异

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)20-06542-04

Effects of Cytokinins on Differentiation and Propagation of Adventitious Bud of *Anthurium andraeanum* Callus

WANG Jing, TAN Jian-zhong et al (School of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract [Objective] In order to investigate the effects of cytokinins on propagation and quality of *Anthurium andraeanum* plantlets *in vitro*. [Method] Using the sixth subcultured callus as experimental material, the effects of ZT, TDZ, 6-BA and its concentration on adventitious bud differentiation and variation were studied. [Result] The results showed that, the number of leaves and adventitious buds was decreased along with the increase of cytokinins concentration in the range of 0.5–8.0 mg/L, on the contrary abnormal adventitious buds were increased gradually, with the prolongation of culture time, this effect became more obvious. The effects of three kinds of cytokinin were significantly different. The normal adventitious buds were more with less adverse mutation rate when respectively added ZT and 6-BA below 2.0 mg/L and 4.0 mg/L. But 0.5 mg/L TDZ had inhibited the differentiation of normal adventitious buds significantly, also easy to produce abnormal buds. [Conclusion] The effects of the three kinds of cytokinin followed the order TDZ > ZT > 6-BA. We should avoid using high concentration of cytokinin in adventitious buds differentiation process of *Anthurium andraeanum* callus subculture.

Key words *Anthurium andraeanum*; Cytokinin; Adventitious buds; Differentiation; Variation

红掌(*Anthurium andraeanum*),又名花烛、安祖花,为天南星科花烛属多年生常绿草本植物^[1],因其花型奇特、花色艳丽、花期长而备受人们关注,目前已在国内外花卉市场上占据重要地位。目前红掌种苗生产已采用大规模的组培快繁技术,但与其他无性繁殖方法相比,在组培生产过程中,由于再生途径的不同而产生不同程度的变异^[2],如果过于追求繁殖速度,也会影响到苗木的品质,如出现组培苗玻璃化^[3]、脱毒不完全^[4]、体细胞无性系变异^[5]等现象。研究表明,培养环境、激素条件、培养代数都会影响组培苗的变异等品质相关指标,黄小荣等^[6]在采用组织培养技术保存金花茶种质资源过程中,前3年未发现明显变异现象,之后陆续出现外植体退化和死亡。而不合理的使用激素往往带来更为严重的后果,高红兵等^[7]研究表明,当培养基中6-BA浓度为0.5 mg/L时,组培苗未出现玻璃化苗;当培养基中6-BA浓度为3.0 mg/L时,组培苗玻璃化率高达95%。王玲等^[8]研究表明,在一定浓度范围内,添加6-BA能够促进蝴蝶兰花梗腋芽的增殖,但升高到10.0 mg/L时,个别芽出现变异情况。可见在愈伤组织培养过程中,在不合理的激素条件下,对繁殖系数与壮苗率等技术指标产生不良的影响。

激素条件在植物组织培养过程中发挥着重要作用,为了

从质量上保证组培苗,笔者研究不同细胞分裂素对红掌愈伤组织不定芽分化的影响,以期红掌组培过程中细胞分裂素的使用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试红掌品种为红色系盆栽品种,购自苏州市花卉市场(编号为YNG-01)。选取经叶片培养诱导的、继代培养第6代的愈伤组织,切除已分化出的芽,保留未完全分化的芽点,切成直径约2 cm的愈伤组织块为外植体用于试验。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计。根据对前人研究结果^[9]的分析,以1/2MS + NAA 0.1 mg/L为基本培养基,细胞分裂素选用ZT、TDZ、6-BA,添加浓度均设为0.5、2.0、4.0和8.0 mg/L 4个浓度梯度,添加蔗糖3%、琼脂粉0.7%,pH为5.8。每组处理12瓶,每瓶接种3个外植体,每组重复3次。接种后置于培养架上,培养温度为(25±2)℃,光照时间为12 h/d,光照强度为1 500~2 000 lx,分别在培养30和60 d后进行调查。

1.2.2 调查内容与方法。30 d后剔除污染瓶数,取出50%的外植体用于不定芽分化状况的调查:①统计正常不定芽的分化数、叶片生长数;②观察不定芽的茎色、叶色以及叶片形态特征等;③统计异常不定芽数,其中包括生长点异常:不定芽无生长点;叶形异常:叶片呈勺型、狭长、扭曲等畸形;色素异常:幼叶或幼茎由正常的红色变为绿色(其中全株变绿、生长良好的称为绿色变异株)。

另50%外植体转入相同培养基中,继代培养30 d后再次调查、统计上述性状。

基金项目 苏州市建筑与城市环境重点实验室开放课题(AKL-N13001)。

作者简介 王晶(1989-),女,江苏苏州人,硕士研究生,研究方向:园林植物生物技术。*通讯作者,教授,从事园林植物资源与生物技术方面的研究。

收稿日期 2014-06-16

1.3 数据处理 根据调查的不定芽分化数、叶片数、各种形态变异的不定芽数,利用 Excel 进行统计与分析,其中变异率 = 各种形态变异不定芽数 / (正常不定芽数 + 异常不定芽数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 细胞分裂素对红掌愈伤组织不定芽分化及生长的影响

2.1.1 细胞分裂素对红掌愈伤组织不定芽分化的影响。由图 1~3 可知,随着 ZT、TDZ 添加浓度的增加,正常不定芽的分化数呈减少趋势。继代培养 30 d 时,ZT 浓度达到 8.0 mg/L 时,不定芽分化数下降非常明显;6-BA 区的不定芽分化数则呈先增加后减少的趋势,在 2.0 mg/L 时,不定芽分化数达到 15.75 个,高于 ZT 和 TDZ 区,而在 8.0 mg/L 条件下急剧下降到 3.25 个,可见在 0.5~4.0 mg/L 的浓度范围内,6-BA 对愈伤组织的再分化都有很好的促进作用。与 ZT、6-BA 不同,TDZ 区不定芽分化数的下降幅度较小,但其不定芽分化数始终处于较低水平,可能是 TDZ 有非常强的细胞分裂素活性,这与李浚明^[10]的研究结果一致,认为 TDZ 的使用浓度比其他细胞分裂素要低得多,通常在 0.002~0.200 mg/L。

继代培养 60 d 后,3 种细胞分裂素的培养效果显示上述相同的变化趋势。

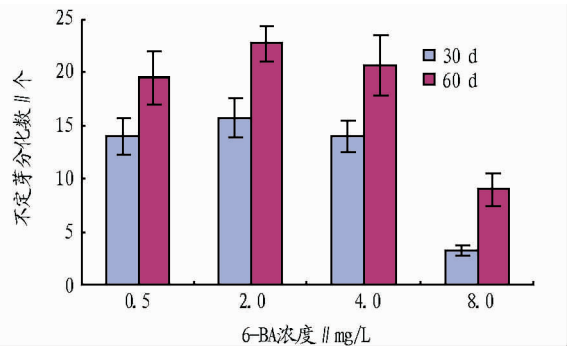


图3 细胞分裂素 6-BA 对不定芽分化数的影响 使用浓度应更低,该研究中 0.5 mg/L 时就已抑制了不定芽的分化及生长。

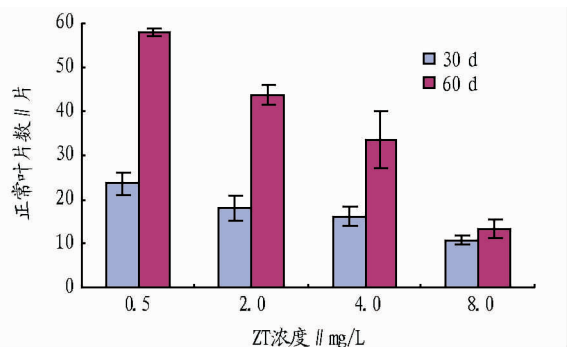


图4 细胞分裂素 ZT 对正常不定芽叶片数的影响

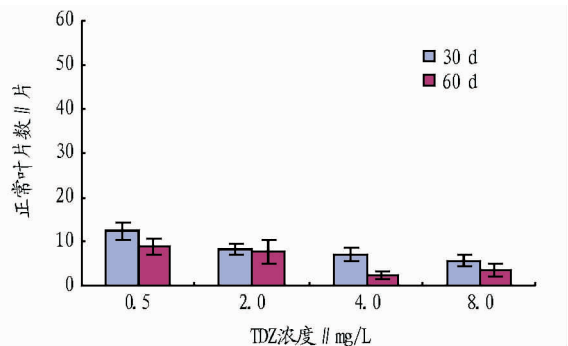


图5 细胞分裂素 TDZ 对不定芽叶片数的影响

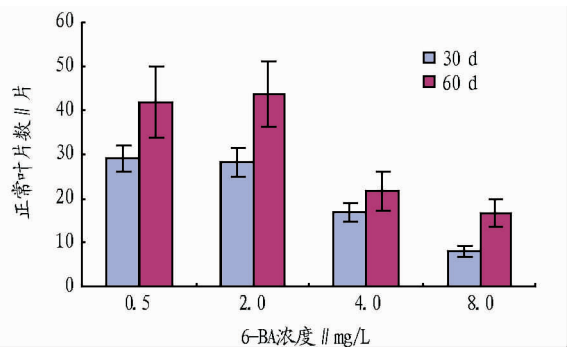


图6 细胞分裂素 6-BA 对不定芽叶片数的影响

2.2 细胞分裂素对红掌愈伤组织不定芽形态变异的影响 供试红掌品种 YNG-01 的正常试管苗幼茎为红色;叶片幼嫩时绿中带红,成熟后变为深绿。为了分析细胞分裂素对不定芽变异的影响,首先以幼茎及嫩叶作为调查对象,将茎色和叶色各分为 3 个等级:不定芽的茎色正常者(红色)为 3

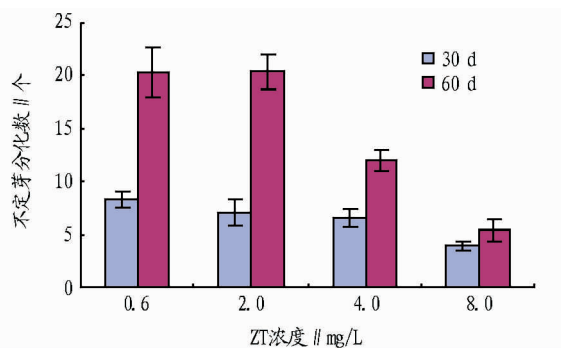


图1 细胞分裂素 ZT 对正常不定芽分化数的影响

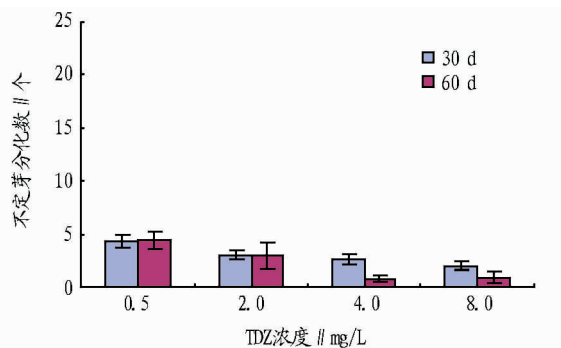


图2 细胞分裂素 TDZ 对不定芽分化数的影响

2.1.2 细胞分裂素对红掌愈伤组织不定芽生长的影响。由图 4~6 可知,不同细胞分裂素对不定芽叶片生长的影响与不定芽的趋势较一致,叶片数随着 ZT、TDZ 添加浓度的增加而减少,而 6-BA 则显示先增加后下降的变化趋势,在超过 4.0 mg/L 时会产生抑制作用。综合来看,在红掌愈伤组织继代培养过程中,细胞分裂素 ZT 在 2.0 mg/L 以下、6-BA 在 4.0 mg/L 以下时,对红掌愈伤组织不定芽分化及其生长具有促进作用,过高浓度将不利于不定芽的分化与生长。而 TDZ 的

级,茎色嵌合、偏红稍带绿色者为2级,茎色嵌合、偏绿带红色者为1级;叶色正常者(深绿有光泽)为3级,叶片绿色者

为2级,叶色黄绿者为1级(图7)。



图7 红掌不定芽茎色、叶色差异与分级

供试品种正常试管苗的叶片为心形,有光泽(图8-a)。但在继代培养过程中,还观察到多种类型的异常不定芽,如没有生长点,虽然有生1~3片叶,但其节间极短,几乎无伸长生长(图8-b)。异常不定芽的另一种形态表现为叶片畸

形,如勺型(图8-d,叶片不伸展,呈勺形)、狭长(图8-e,心形叶较正常细长)、扭曲(图8-f,叶片不伸展,叶缘扭曲)。通过调查、分析上述异常不定芽的发生情况,判断细胞分裂素种类及浓度对红掌愈伤组织再分化的影响程度。



图8 红掌愈伤组织培养分化的不定芽形态类型

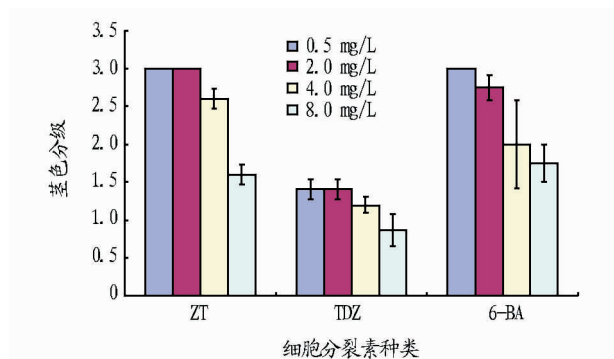


图9 细胞分裂素种类及浓度对不定芽茎色的影响

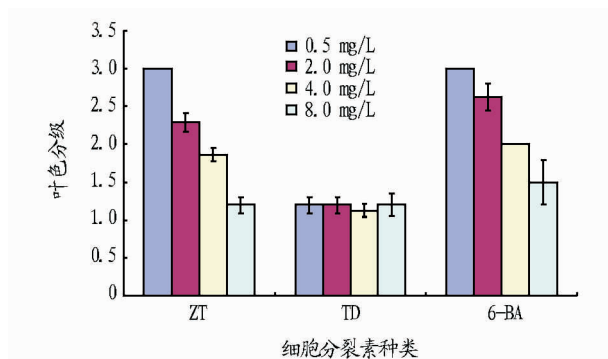


图10 细胞分裂素种类及浓度对不定芽叶色的影响

2.2.1 细胞分裂素对不定芽叶色、茎色的影响。在红掌愈伤组织继代培养诱导分化的不定芽中,不同种类及浓度的细胞分裂素对茎、叶颜色的影响存在显著差异。由图9可知,继代培养30 d后,细胞分裂素添加浓度较高时,红掌不定芽

茎色的红色变淡、变绿,3种细胞分裂素都表现相同的倾向,ZT浓度从0.5 mg/L上升到8.0 mg/L时,茎色指数从3.0下降到1.6;6-BA浓度从0.5 mg/L上升到8.0 mg/L时,茎色指数从3.0下降到1.75;在使用细胞分裂素TDZ的情况下,茎

色指数显著低于 ZT 与 6-BA。可见 ZT 的作用效果略高于 6-BA,而 TDZ 的作用最强;继代培养 60 d 后,茎色指数进一步下降。

由图 10 可知,细胞分裂素对叶色的影响与茎色基本一致,叶色指数表现为 ZT、6-BA > TDZ,且随使用浓度的增加而下降,继代培养 30 d 与 60 d 之间差异不大。可见高浓度细胞分裂素不利于组培苗的正常生长,甚至引起茎色、叶色的变化,从而降低组培苗的质量。因此,在红掌愈伤组织再分化培养过程中,应避免使用活性较强或高浓度的细胞分裂素。

2.2.2 细胞分裂素对不定芽生长点的影响。3 种细胞分裂素的使用浓度设置为 0.5、2.0、4.0 和 8.0 mg/L,红掌愈伤组织继代培养的不定芽分化数较多,但同时观察到异常不定芽的发生率也较高,且随着使用浓度的增加而呈上升趋势。由表 1 可知,继代培养 60 d 后,当 ZT 浓度从 0.5 mg/L 增加到 8.0 mg/L,无生长点的异常不定芽发生率从 0.54% 上升到

41.97%,TDZ 区由 57.14% 急剧上升到了 84.93%,6-BA 区的发生率也达到 43.64%。

2.2.3 细胞分裂素对不定芽叶形变异的影响。与生长点异常相比,畸形叶的发生率较低,但随着 3 种细胞分裂素浓度的增加,叶形变异率呈上升趋势。继代培养 60 d 后,在 ZT、6-BA 浓度为 8.0 mg/L 时,叶形变异率也分别达到 10.47% 和 18.93%;而 TDZ 各浓度条件下的畸叶率都较高,可能是激素使用量过高造成的。

2.2.4 细胞分裂素作用与绿色变异株的发生。供试品种正常组培苗的茎与嫩叶都呈现红色,但在继代培养过程中,从 ZT 和 TDZ 低浓度区、6-BA 高浓度区还发现了一类绿色变异株(图 8-c),其全株茎、叶都呈绿色,株型及生长状态良好,且在后续继代培养过程中能够稳定遗传,可以认为这是一种体细胞无性系变异,称其为绿色变异株(表 1),这类变异在新品种选育或种质资源研究中具有一定的应用价值。

表 1 细胞分裂素种类及浓度对异常不定芽发生率的影响

细胞分裂素种类	添加浓度 mg/L	不定芽调 查数//个	生长点 异常//%	叶片调查数 片	叶形异常 %	绿色变 异株//%
ZT	0.5	183	0.54 d	521	1.33 c	0.44 b
	2.0	204	2.86 d	438	1.63 c	1.43 ab
	4.0	24	27.27 c	67	3.01 bc	0 b
	8.0	54	41.94 bc	134	10.47 bc	0 b
TDZ	0.5	31	35.42 cd	63	29.81 ab	6.67 a
	2.0	27	57.14 b	69	30.78 ab	0 b
	4.0	20	78.95 ab	45	38.58 a	0 b
	8.0	33	84.93 a	129	40.85 a	0 b
6-BA	0.5	39	0 d	84	0 c	0 b
	2.0	91	4.21 d	175	3.15 bc	0 b
	4.0	35	7.41 cd	65	2.78 bc	4.17 ab
	8.0	36	43.64 bc	67	18.93 b	4.72 ab

3 结论与讨论

在红掌愈伤组织继代增殖过程中,适宜的激素条件既有利于愈伤组织的不定芽分化,又会促进不定芽的生长发育,因此需要掌握细胞分裂素的使用浓度。该研究表明,在红掌愈伤组织继代培养过程中,ZT 的使用浓度应在 2.0 mg/L 以下,TDZ 的使用范围要低于 0.5 mg/L,6-BA 的使用浓度也要低于 4.0 mg/L。若细胞分裂素的浓度过高,则异常不定芽的发生率就会增加,且随着培养时间的延长而加剧,使得分化的不定芽大多呈无生长点或畸形叶形态,这与赵斌等^[11]的研究有相同之处,其认为当 6-BA 浓度大于 2.0 mg/L 时,不定芽分化率虽然有所上升,但分化出的不定芽矮小,且生长缓慢。对于这些异常不定芽,若转入低浓度都适宜继代培养基后能否恢复正常形态还有待进一步研究。

综合该试验结果,可以认为 3 种细胞分裂素的作用依次为 TDZ > ZT > 6-BA,这种差异可以体现在不定芽分化数、茎色、叶色及叶形等方面。如 TDZ 浓度在 0.5 mg/L 时,分化形成的不定芽茎色、叶色已发生了显著变化,ZT 浓度高于 2.0 mg/L 时会产生不良影响,而 6-BA 高于 4.0 mg/L 才形成

较多的异常不定芽,这与前人的研究结果^[2],即细胞分裂素的作用为 TDZ > ZT > 2ip > 6-BA > KT 是一致的,而在红掌组织培养中此前尚少报道。TDZ 是一种高效细胞分裂素,在较短时间内能有效促进植株再生^[12],因此在红掌愈伤组织增殖培养中应避免使用 TDZ 与高浓度激素,以利于提高组培苗品质。

高浓度的细胞分裂素往往会加剧红掌异常不定芽的分化,且大多为不良变异,但也获得了茎、叶发生绿色变异而生长良好的绿色变异株,由于在后续继代培养中能够稳定遗传,因此是一种体细胞无性系变异。对此前人也有类似的报道,如丁爱萍等^[13]在红掌盆栽品种‘Avo-Gloria’的组培苗中发现,在 MS + 2,4-D 0.2 mg/L + 6-BA 8 ~ 10 mg/L 的脱分化培养基上培养后,经 MS + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 继代培养时,可产生 3% ~ 7% 的红叶变异,可能也是与初代培养时高浓度的激素条件有关,且经过长期继代培养之后,再生植株中出现变异的可能性更大^[14]。因此,对于上述绿色变异株的遗传稳定性还需要进一步观察、分析。

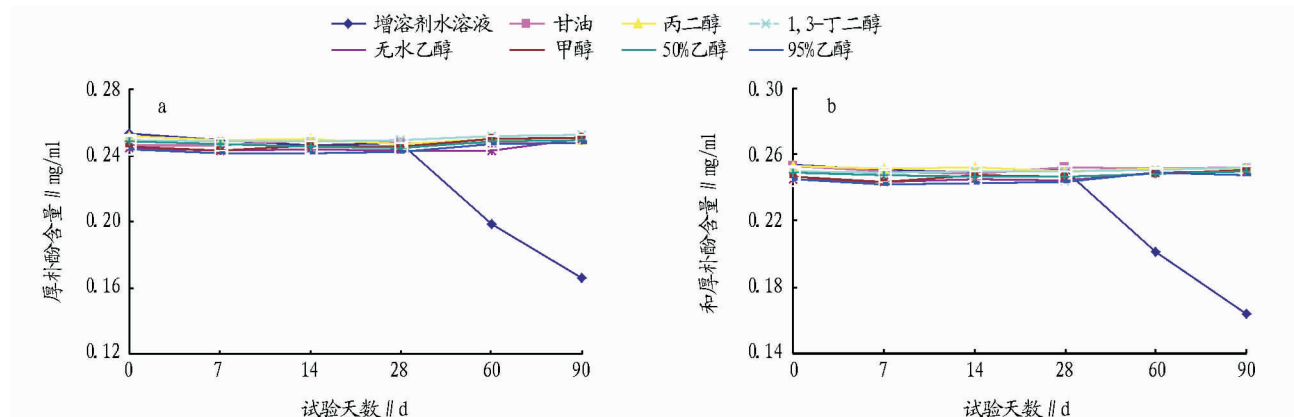


图1 8种溶液中厚朴酚(a)、和厚朴酚(b)的含量变化

二醇中稳定。

2.2 溶液颜色与澄清度 试验前,8种溶液均为无色、透明、澄清液体。3个月后观察,8种溶液的颜色有不同程度的加深,颜色变化由深至浅依次为增溶剂水溶液>丙二醇>50%乙醇>无水乙醇>甲醇>95%乙醇>甘油>1,3-丁二醇,其中1,3-丁二醇和甘油溶液的颜色相对于试验前无明显差异。8种溶液中,增溶剂水溶液、甘油、50%乙醇在试验3个月后发现浑浊,其他溶液仍为澄清状。

3 小结与讨论

(1)由于增溶剂水溶液、甘油、丙二醇、1,3-丁二醇溶液的粘稠度较大,导致无法采用精密量取的方法给予定量。笔者采用重量法,精密称定样品,计算有效成分含量。

(2)厚朴提取物在1,3-丁二醇中稳定,试验前后溶液颜色、澄清度及有效成分含量无显著变化,以1,3-丁二醇为溶剂开发含厚朴提取物的相关产品,能有效提高产品的稳定性和品质。厚朴提取物溶液的颜色变化可能是由于活性成分的氧化聚合或重组导致,抑或是由杂质成分发生化学反应所致。

(3)8种溶液中,增溶剂水溶液、甘油、50%乙醇在试验3个月后发现浑浊,可能是由于3组溶剂的溶解性不够所致。

参考文献

- [1] 吕雪斌,罗安东,胡家敏,等. 厚朴药材研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011,39(16):9614-9615.
- [2] 殷帅文,何旭梅,郎锋祥,等. 厚朴化学成分和药理作用研究概况[J]. 贵州农业科学,2007,35(6):133-135.
- [3] HO K Y, TSAI C C, CHEN C P, et al. Antimicrobial Activity of Honokiol and Magnolol Isolated from *Magnolia officinalis*[J]. *Phytotherapy Research*, 2001,15(2):139-141.
- [4] WANG J H, SHIH K S, LIOU J P, et al. Anti-Arthritic Effects of Magnolol in Human Interleukin 1 β -Stimulated Fibroblast-Like Synoviocytes and in a Rat Arthritis Model[J]. *Plos One*, 2012,7(2):31368.
- [5] MUNROE M E, BUSINGA T R, KLINE J N, et al. Anti-inflammatory effects of the neurotransmitter agonist Honokiol in a mouse model of allergic asthma[J]. *The Journal of Immunology*, 2010,185(9):5586-5597.
- [6] 吴春,韩玲. 厚朴提取物对芝麻油的抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2004,25(2):32-34.
- [7] 刘丽. 和厚朴酚的抗肿瘤作用研究进展[J]. 华西医学,2006,21(3):629-630.
- [8] ZHANG W W, LI Y, WANG X Q, et al. Effects of magnolol and honokiol derived from traditional Chinese herbal remedies on gastrointestinal movement[J]. *World J Gastroenterol*, 2005,11(28):4414-4418.
- [9] YANG J Y, DELLA-FERA M A, RAYALAM S, et al. Enhanced Effects of Xanthohumol Plus Honokiol on Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2008,16(6):1232-1238.
- [10] AGOSTA C, ATLANTE M, BENVENUTI C. Randomized controlled study on clinical efficacy of isoflavones plus *Lactobacillus sporogenes*, associated or not with a natural anxiolytic agent in menopause[J]. *Minerva Ginecologica*, 2011,63(1):11.

(上接第6545页)

参考文献

- [1] 鱼胜胜,孙宏选. 红掌生产实用技术问答[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2007:2.
- [2] 陈丽文,何贵整. 红掌茎段侧芽离体快繁技术研究[J]. 亚热带植物科学,2011,40(2):42-43.
- [3] 刘庆昌,吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2003:31,44-45.
- [4] 裘文达. 园艺植物组织培养[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:97-98.
- [5] 张硕,张明方,杨景华. 体细胞无性系变异在园艺植物育种中的应用[J]. 北方园艺,2006(5):48-50.
- [6] 黄小荣,韦鹏霄. 金花茶种质资源的组织培养保存[J]. 广西林业科学,2004,33(4):190-194.
- [7] 高红兵,唐晓杰,孟庆繁. 高浓度6-BA诱导酸樱桃苗的玻璃化苗内源

激素含量变化[J]. 林业科学研究, 2006,19(4):488-490.

- [8] 王玲,陈发棣,陈凤,等. 不同细胞分裂素及使用浓度对蝴蝶兰花梗芽增殖生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2013,41(2):49-51.
- [9] 周丽丽. 红掌组织培养与植株再生技术的研究[D]. 苏州:苏州大学,2012.
- [10] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业出版社,2002:25-26.
- [11] 赵斌,李英丽,方正. 红掌组织培养中不定芽诱导和增殖的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(8):4447-4449.
- [12] 秦静远. TDZ在植物组织培养中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005,4(2):19-20.
- [13] 丁爱萍,史正军. 6-BA对红掌组织培养中红叶变异的影响[J]. 植物生理学通讯,2010,46(6):571-574.
- [14] 丰先红,李建,罗孝贵. 植物组织培养中体细胞无性系变异研究[J]. 中国农学通报,2010,26(14):70-73.