

崔瑞峰, 杜娟, 马瑞霞. 红掌叶片愈伤组织诱导的研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 24-26.

红掌叶片愈伤组织诱导的研究

崔瑞峰, 杜娟, 马瑞霞

(安阳工学院生物与食品工程学院 河南安阳 455000)

摘要:以红掌叶片为外植体,对愈伤组织的诱导进行研究。结果表明,使用 0.1% 的 HgCl_2 对叶片进行消毒,浸泡 6~8 min 消毒效果较好;在 MS 培养基中添加 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 和 3% 蔗糖,放在 1 000 lx 左右的光照条件下进行培养,可获得较高的愈伤组织诱导率,诱导率可达 76.8%,且愈伤组织生长良好。

关键词:红掌;愈伤组织;培养基

中图分类号: 682.1⁺40.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0024-02

红掌(*Anthurium andraeanum*)别称安祖花、火鹤花、花烛、灯台花、红鹤芋,是天南星科花烛属多年生常绿草本植物。目前红掌在国际上非常流行,市场售价高,经济效益可观,市场潜力巨大。从全球花卉市场看,红掌销售额仅次于热带花卉兰花,列居第 2 位,已成为当前国际上流行的名贵切花材料与盆栽品种。红掌常规的繁殖方法主要是分株繁殖,而分株繁殖易产生变异,影响花的品质,并且繁殖率低、增殖速度慢,无法满足规模化生产的要求。利用植物离体培养技术,建立优化红掌再生体系,无疑为其快速繁殖提供了一种有效的新途径^[1]。

从世界范围来看红掌在组织培养方面的研究,欧洲水平较高,亚洲次之,非洲较差。欧洲现已开展育种等方面的研究,其他地区主要进行组培与栽培技术的探索,荷兰红掌研究居世界领先地位^[2]。我国从 1998 年开始研究,现已成功掌握了植株再生体系的建立、继代增殖培养、壮苗和生根培养、移栽和温室育苗等技术。但在研究过程中,由于采用的品种不同,外植体的种类、生理年龄也不一样,因此,报道的愈伤组织诱导和芽再生等最佳培养条件、再生频率及生长周期等结论存在较大差异^[3]。本试验在充分吸取前人研究工作的基础上,于 2011—2012 年在安阳工学院生物与食品学院植物组织培养试验室进行了一系列的研究探索,旨在利用红掌叶片为外植体,对其愈伤组织的诱导进行探索研究,为我国红掌的离体培养和工厂化育苗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试红掌品种为盆栽“亚丽桑娜”,由安阳工学院生物与食品学院园艺教研室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的表面消毒

取室内盆栽红掌抽出 1 周左右

的嫩叶片,在自来水下冲洗 1 h,置于超净工作台上,先用 70% 的乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 1 次,然后用 0.1% 的 HgCl_2 进行消毒,分别设消毒时间为 2、4、6、8、10 min,选择最佳消毒时间^[4],最后用无菌水涮洗 5~6 次,切成大小约为 0.5 cm² 的小块,无菌操作接种于培养基上。每隔 3 d 调查 1 次,观察期为 60 d,统计外植体的污染率及外植体的变化状况。外植体污染率 = (外植污染数/接种外植体数) × 100%^[5]。

1.2.2 愈伤组织的诱导

1.2.2.1 基本培养基对叶片愈伤组织诱导的影响 取初展的红掌叶片为外植体,叶背朝下,接种于培养基表面。采用 BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 的激素组合,以 MS、1/2MS、B5、N6、Nitsch 为 5 种基本培养基^[6],进行基本培养基的筛选。

1.2.2.2 不同激素组合对叶片愈伤组织诱导 将初展的叶片切成 0.5 cm² 的小块,接种到 6-BA、2,4-D 2 种不同激素组合的 MS 培养基中进行培养,研究不同激素组合对红掌叶片愈伤组织诱导效果的影响。

1.2.2.3 不同蔗糖浓度对叶片愈伤组织的诱导 将初展叶片接种在含有蔗糖 15、30、45 g/L 激素组合为 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 的 MS 培养基中,了解不同蔗糖浓度对叶片愈伤组织诱导效果的影响。

1.2.2.4 光照强度对愈伤组织诱导的影响 取初展的红掌叶片为外植体,叶背朝下,接种在 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 的 MS 培养基表面,放在暗培养、1 000、1 500、2 000、3 000 lx 这 5 种光照模式下进行培养,观察光照强度对愈伤组织诱导的影响。

在愈伤组织诱导试验中,每隔 3 d 观察 1 次,观察期为 90 d,统计愈伤组织的诱导率和分化率。愈伤组织诱导率 = (诱导出愈伤的外植体数/接种外植体数) × 100%;愈伤组织分化率 = (分化出不定芽的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数) × 100%;愈伤组织发生时间为愈伤组织诱导率达到 50% 时的天数。

1.3 培养条件

将接种好的培养瓶放入培养室中,基本培养基全部为 MS 培养基,琼脂 7 g/L、葡萄糖 30 g/L,培养温度为 (25 ± 2) °C, pH 值为 5.8,光照时间为 12 h/d,光照强度为 1 500~2 000 lx,空

收稿日期:2013-02-18

基金项目:河南省安阳市科技攻关项目(编号:2011-46-106)。

作者简介:崔瑞峰(1977—),女,山西吕梁人,硕士,讲师,现从事植物生物技术相关教学与科研工作。E-mail: xiaocui0126@126.com。

通信作者:马瑞霞,硕士,教授,主要从事植物组织培养教学和科研工作。E-mail: mrx329@yahoo.com.cn。

气相对湿度 80% 左右。每个处理 10 瓶,每瓶接种 3 个外植体,3 次重复。

2 结果与分析

2.1 外植体的表面消毒

由表 1 可知,随着 0.1% HgCl₂ 消毒时间的延长,初代培养物的污染率下降。消毒 4~6 min 时,污染率急剧下降,当消毒时间达到 8~10 min 时,绝大多数的污染病菌已被杀死,说明随着消毒时间的延长对菌类的杀伤力也越来越强。但从消毒 4 min 开始,随着时间的延长,对叶片的伤害也越来越大,消毒 10 min 时,叶片的死亡率达到了 55%。因此,从低污染、高成活率来考虑,用 0.1% HgCl₂ 消毒,6~8 min 是最适宜的消毒时间。

表 1 0.1% HgCl₂ 不同消毒时间对外植体的影响

消毒时间 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	死亡率 (%)
2	50	44	88	0
4	50	30	60	0
6	50	12	34	2
8	50	8	16	10
10	50	2	4	55

2.2 愈伤组织的诱导

2.2.1 不同培养基对叶片愈伤组织诱导的影响 由表 2 可知,MS、1/2MS、Nitsch 3 种培养基愈伤组织诱导率明显比 B5、N6 培养基高,MS 培养基上的诱导率最高达到 93.9%,而 B5 培养基诱导愈伤组织最差,诱导率只有 30%。在愈伤组织平均发生时间上,同样的培养条件下,MS、B5 能较早诱导叶片愈伤组织的发生,愈伤组织平均发生时间为 48、50 d,而 1/2MS、Nitsch 次之,N6 诱导愈伤组织时间最长,需要 78 d。通过全面比较得出,诱导红掌叶片产生愈伤组织以 MS 培养基较适合。

表 2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基类型	愈伤组织诱导率 (%)	愈伤组织发生时间 (d)
MS	93.9	48
1/2MS	80.6	63
B5	30.0	50
N6	61.1	78
Nitsch	86.2	58

2.2.2 不同激素组合对叶片愈伤组织诱导的影响 由表 3 可知,通过对 6-BA 和 2,4-D 不同浓度配比试验证明,以配方 5 愈伤组织诱导率最高,达到 73.3%,其次是配方 6,最差的是配方 1、4。说明愈伤组织诱导培养基中,6-BA 和 2,4-D 共同作用有利于植物细胞进行脱分化,培养基中加入单一成分,愈伤组织诱导率较低。因此在 MS 培养基中添加 6-BA 1.0 mg/L 和 2,4-D 0.1 mg/L 为最佳组合,有利于叶片愈伤组织的诱导。

2.2.3 不同蔗糖浓度对愈伤组织的诱导 在培养基中,添加不同浓度的蔗糖,对红掌叶片愈伤组织的形成影响效果不同^[1]。

表 3 不同激素配比对叶片愈伤组织诱导的影响

编号	激素(mg/L)		接种数 (个)	愈伤组织数 (个)	愈伤组织诱导率 (%)
	6-BA	2,4-D			
1	0.5	0	30	7	23.3d
2	0.5	0.1	30	16	53.3c
3	0.5	0.2	30	15	50.0c
4	1.0	0	30	5	16.7d
5	1.0	0.1	30	22	73.3a
6	1.0	0.2	30	18	60.0b

由表 4 可知,添加 30 g/L 蔗糖时,最有利于愈伤组织的形成,愈伤组织的诱导率最高;而添加 20 g/L 蔗糖时,愈伤组织诱导率最低;这可能因为培养基中蔗糖浓度较低,满足不了愈伤组织诱导时所需能量的需求,会影响细胞生长,细胞脱分化进行得较慢,不利于愈伤组织的形成;蔗糖浓度增加到 40 g/L 时,愈伤组织诱导率并没有增加,反而偏低,只有 53.3%,和添加 20 g/L 蔗糖相比,差异不明显;这可能由于蔗糖浓度较高时,虽然培养基中营养物质较多,但培养基的渗透压较高,影响细胞对养分的吸收,从而影响其生长。通过比较,说明选用在培养基中添加 30 g/L 的蔗糖浓度较为理想。

表 4 不同蔗糖浓度对愈伤组织诱导的影响

蔗糖浓度 (g/L)	外植体数 (个)	愈伤组织数 (个)	愈伤组织 诱导率(%)	愈伤组织 生长状况
20	30	13	43.3	黄色、少、小
30	30	22	73.3	淡黄色、大、多
40	30	16	53.3	淡黄色、小、多

2.2.4 光照强度对愈伤组织诱导的影响 由表 5 可知,在暗箱培养条件下愈伤组织诱导率最低,只有 7%,而 1 000 lx 的光照条件下诱导效果最好,诱导率可达 76.8%;在培养过程中,通过观察发现,光照强度超过 1 000 lx,随着光照强度的增加,诱导率逐渐降低,在 3 000 lx 光照条件下,诱导率为 14.3%。试验证明愈伤组织的形成需要适量的光照条件,但光照强度过高会抑制愈伤组织的形成。

表 5 光照条件对愈伤组织诱导的影响

处理	暗培养	1 000 lx	1 500 lx	2 000 lx	3 000 lx
诱导率(%)	7	76.8	65	51.3	14.3

3 结论与讨论

3.1 红掌外植体表面消毒

使用 0.1% 的 HgCl₂ 对叶片进行消毒,浸泡 6~8min 消毒效果较好,污染率低,死亡率也较低。用药剂对外植体消毒,一般随着时间的加长,对菌类的杀伤力越来越强,外植体污染率越来越低,而对外植体的伤害也越来越高,外植体的成活率越来越低。消毒时间太短或太长都会影响消毒的效果。

3.2 红掌愈伤组织的诱导

本试验结果表明:适合红掌叶片愈伤组织诱导的最佳基本培养基为 MS 培养基,但也有报道称 1/2MS 培养基有利于愈伤组织的产生,本试验结果与之有所不同。

试验中在以 MS 为基本培养基的基础上,适宜的激素组

李永俊,赵希子,郭相和,等. 马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的 RT-PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):26-27.

马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的 RT-PCR 检测

李永俊¹, 赵希子¹, 郭相和¹, 全英姬¹, 李平¹, 金松爱²

(1. 延边职业技术学院, 吉林延吉 133001; 2. 吉林省敦化市农业技术推广中心, 吉林敦化 133700)

摘要:以马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)检测试剂盒提取的 2 种不同材料的 mRNA 为模板,进行 cDNA 合成及 PCR 扩增,从感病组织中扩增得到一段长 360 bp 的特异 PCR 扩增产物,而健康的试管苗中则无此扩增产物。以感染 PSTVd 的马铃薯试管苗、块茎和健康的马铃薯试管苗、块茎为材料,用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的 PSTVd 检测试剂盒提取试管苗、块茎这 2 种不同材料中的 mRNA。结果表明,试剂法可对马铃薯不同材料进行 PSTVd 检测,60 min 内即可分离出 mRNA,整个诊断时间为 4 h,方法简便、快捷、灵敏度高,因此可以作为马铃薯种薯生产早期 PSTVd 诊断及品种引进的快速、有效的检测手段。

关键词:马铃薯纺锤块茎类病毒;RT-PCR;mRNA

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0026-02

马铃薯纺锤块茎病害是由类病毒引起的,是危害我国北方马铃薯生产和实生种子品质的重大病害。据报道,马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)强系减产可达 60%,弱系减产约 20%~35%,常常因此造成较大的经济损失^[1]。马铃薯类病毒是马铃薯种薯检疫规程中的主要检疫对象,具有广泛的传播途径,是唯一不能通过茎尖剥离、组织培养而汰除的病毒,必须通过严格的检测而将其汰除。据报道,控制 PSTVd 传染的有效方法仅有依赖于 PSTVd 的早期鉴定^[2]。目前主要采用指示植物、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术、核酸斑点杂交技术等方法进行检测。随着 PCR 技术的产生,RT-PCR 技术已经被越来越广泛地应用在 RNA 病原的鉴定上,应用 RT-PCR 技术检测植物病原具有快速、灵敏、简便、特异性强等优点,而且可以检测出植物组织中含有量极低的病毒 RNA^[3-4]。本研

究使用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的 PSTVd 检测试剂盒,旨在通过试验说明使用该试剂盒提取植物 mRNA 具有方法简便、省时、灵敏度高等优点,而且可以对不同的马铃薯材料进行检测,检测结果准确可靠、重复性好。

1 材料与方法

1.1 试验材料

感染 PSTVd 的马铃薯试管苗、块茎由俄罗斯哈巴农业科学研究院马铃薯研究所提供;健康的马铃薯试管苗、块茎由延边农业科学研究院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 植物 mRNA 的提取 以感染 PSTVd 的马铃薯试管苗、块茎和健康的马铃薯试管苗、块茎为试验材料,采用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的植物病原 RNA 提取试剂盒,该试剂盒中包含的 mRNA 提取操作步骤在以下简称为“试剂法”。具体操作过程为:称取 100 mg 样品放入 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L Pre-Buffer 将样品捣碎;然后加入

收稿日期:2013-02-23

作者简介:李永俊(1959—),男,吉林和龙人,副教授,研究方向为马铃薯脱毒、病毒检测、新品种选育。E-mail:leelkc@163.com.

合为 6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L,添加 3% 蔗糖有利于促进愈伤组织的形成,愈伤组织诱导率可达到 76.8%。蔗糖浓度为 2% 时,培养基营养偏少,不能满足植物细胞生长的需要蔗糖,浓度达到 4% 时,虽然营养增加了,但培养基的渗透压也随着增加了,也不利于植物细胞对养分的吸收,从而影响其生长。

试验结果表明,完全黑暗条件不利于愈伤组织的形成,适宜的光照条件能刺激叶片细胞脱分化,加快愈伤组织的形成,最适宜的光强为 1 000 lx 左右,光线过强,不利于红掌的愈伤组织形成,这与岑益群等、陈华林等的结果^[7-8]相同,而与王进茂等的结果^[9]相反,所以对于红掌组培中适宜的光照条件,还有待于进一步研究与探索。

参考文献:

[1] 兰芹英,李启任,何惠英,等. 红掌愈伤组织诱导和芽的分化[J]. 园艺学报,2003,30(1):107-109.

[2] 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.

[3] 潘学峰,潘梅,洪世军. 红掌叶片愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 海南大学学报:自然科学版,2000,18(2):144-149.

[4] 朱饱卿,柴向华,李军,等. 红掌的花序培养及快速繁殖技术的研究[J]. 中国农学通报,2004,20(4):223-224.

[5] 王桂兰,陈超,李朝霞,等. 红掌气生根根段再生快繁体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):297-301.

[6] 刘振祥,廖旭辉. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2007:85-87.

[7] 岑益群,蒋如敏,邓志龙. 安祖花增殖的形态与理化因子效应[J]. 园艺学报,1993,20(2):187-192.

[8] 陈华林. 不同培养条件和外植体处理对红掌品种组培效果的影响[J]. 西南园艺,2003,31(4):35-37.

[9] 王进茂,郑均宝,高秀丽,等. 花烛组织培养的研究[J]. 河北林果研究,2000,15(1):69-74.