

蔡小东, Zhanao Deng. 彩叶芋愈伤组织的诱导、增殖及植株再生[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 75-77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.021

彩叶芋愈伤组织的诱导、增殖及植株再生

蔡小东¹, Zhanao Deng²

(1. 长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025;

2. Gulf Coast Research and Education Center, Department of Environmental Horticulture, University of Florida, FL 33598, USA)

摘要:以 Tapestry 彩叶芋 (*Caladium × hortulanum* Birdsey) 未展开叶片和叶柄薄层切片为外植体, 研究了不同激素浓度配比对 Tapestry 彩叶芋愈伤组织的诱导、增殖及植株再生的影响。结果表明: 在 4 种愈伤组织诱导培养基上均能产生愈伤组织, 其中 2 mg/L TDZ 和 1 mg/L 6-BA 是彩叶芋愈伤组织诱导的最佳激素配比; 叶柄薄层切片是诱导愈伤组织的理想外植体, 其愈伤组织诱导率均在 90% 以上; 愈伤组织在 MS 基本培养基上增殖率最高, 愈伤组织质地致密, 呈颗粒状; 诱导的愈伤组织分化能力很强, 在附加有 1 mg/L 6-BA 和 1 mg/L NAA 的 MS 培养基上再生了许多幼苗。

关键词:彩叶芋; 愈伤组织诱导; 横切薄层培养; 植株再生

中图分类号: S682.360.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0075-03

彩叶芋 (*Caladium × hortulanum* Birdsey) 为天南星科彩叶芋属多年生草本观叶植物, 又称花叶芋、五彩芋, 原产南美洲热带地区。因其叶色、脉色、条纹、斑块艳丽夺目, 观赏期较长, 常常用于盆栽观赏、花圃栽培, 在美化城市方面效果极佳^[1-3]。为改良彩叶芋园艺性状, 增加其观赏价值, 培育新品种, 常常采用商业品种与育种系列进行有性杂交^[1-2]。然而, 彩叶芋花偏少、花期不固定、花粉及种子寿命短等因素极大地影响了有性杂交育种效率^[4]。而且, 目前有性杂交育种最大的问题是, 即使大量增加杂交后代数量, 杂交后代群体中新类型也越来越缺乏^[1]。因此, 有必要采用新的育种手段来培育彩叶芋新类型。

愈伤组织是快速繁殖、种质保存、体细胞诱变、原生质体培养和融合、遗传转化及有用化合物生产等研究的理想起始材料。建立彩叶芋愈伤组织诱导、增殖及再生体系, 通过转化或体细胞杂交等方法进行彩叶芋品种的遗传改良, 在彩叶芋生物技术研究中具有重要的意义。本试验对彩叶芋愈伤组织的诱导、增殖及小苗再生进行了研究, 以期将来彩叶芋生物技术育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Tapestry (*Caladium × hortulanum* Birdsey) 彩叶芋是块茎繁殖苗, 种植于美国佛罗里达大学海湾沿岸研究教育中心 (the University of Florida's Gulf Coast Research and Education Center, Wimauma, Florida, U. S. A.) 温室中。从温室中剪取生长良好的彩叶芋未展开叶片和未展开叶的叶柄备用。

1.2 外植体的处理

取 Tapestry 彩叶芋未展开叶片和叶柄, 在自来水下冲洗 30 min 后先用 75% 乙醇浸泡 15 s, 再用 0.5% 二氯异氰尿酸钠 (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, Kansas, U. S. A.) 外加 2~3 滴吐温-20 浸泡 20 min, 其间轻轻振荡 4~5 次。消毒处理后叶片叶柄分别用无菌水冲洗 3 次, 再用无菌滤纸吸干叶片和叶柄表面的水分。然后在超净工作台上用手术刀片将消毒后的叶片切成约 0.5 cm × 0.5 cm 小块, 叶柄则被横切成 1.5~2.0 mm 厚的薄片。

1.3 愈伤组织的诱导

以 MS 为基本培养基, 在前人的研究^[5-9]基础上共设计了 4 种培养基用于 Tapestry 彩叶芋 2 种外植体愈伤组织的诱导, 分别为 CI1: MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D; CI2: MS + 1 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA; CI3: MS + 2 mg/L TDZ + 1 mg/L BA; CI4: MS + 1 mg/L TDZ + 1 mg/L 2,4-D。所有培养基均添加 20 g/L 蔗糖和 7.0 g/L 琼脂, pH 值为 5.8。每培养基接种 10~12 个叶片切块或 18~20 个叶柄薄层切片, 试验重复 3 次。接种后放入培养箱中进行暗培养, 培养温度 (25 ± 2) °C。60 d 后统计愈伤组织诱导率。

1.4 愈伤组织的增殖

以 MS 为基本培养基, 附加水解乳蛋白 0.5 g/L 及不同浓度的 TDZ 和 KT, 共设计 5 种培养基用于愈伤组织的增殖。将愈伤组织从原来的外植体上剥离下来, 切成固定大小, 称取约 0.5 g 愈伤组织分别接种于愈伤组织增殖培养基上, 每种培养基接种 5 瓶。接种后进行暗培养, 培养温度 (25 ± 2) °C。30 d 后统计愈伤组织增殖率。

愈伤组织增殖率 = (增殖后质量 - 增殖前质量) / 增殖前质量 × 100%。

1.5 植株再生

挑选直径在 0.4 cm 左右的愈伤组织块, 转入含有 1 mg/L 6-BA 和 1 mg/L NAA 的分化培养基中, 在光照条件下培养, 光照度为 2 000 lx 左右, 光—暗周期 16 h—8 h, 温度 (25 ± 2) °C。

收稿日期: 2015-07-19

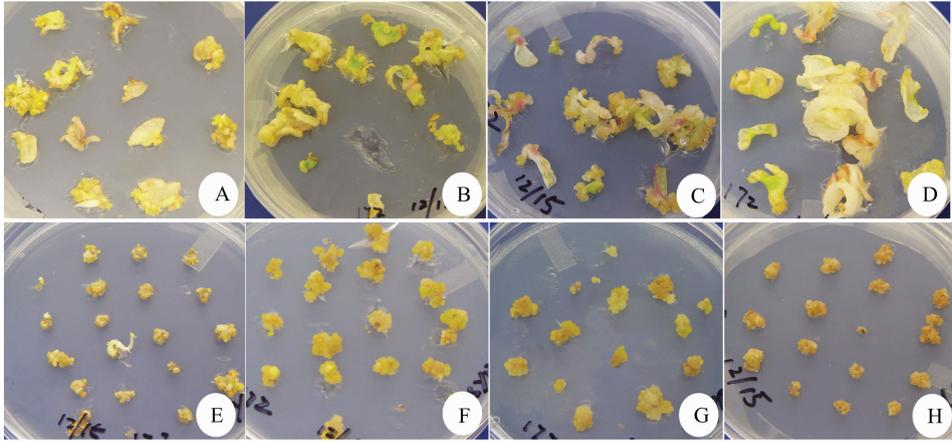
基金项目: The 2012 Florida Legislature Appropriation for *Caladium* Research, U. S. A.

作者简介: 蔡小东 (1978—), 男, 湖北浠水人, 博士, 副教授, 从事园艺植物生物技术育种研究。Tel: (0716) 8066262; E-mail: caixiao.dong@163.com。

2 结果与分析

2.1 2种外植体愈伤组织形成的过程

外植体接种7 d后开始观察愈伤组织的形成过程,结果如图1所示:虽然不同培养基均能诱导彩叶芋2种外植体产生愈伤组织,但这2种外植体愈伤组织形成过程各不相同。Tapestry彩叶芋未展开叶片切块在愈伤组织诱导培养基上培养10 d后,叶片边缘慢慢向上拱起,切口边缘处颜色渐渐变淡,开始膨大。培养1个月后,部分叶片切口附近开始出现淡黄色愈伤组织。培养2个月后,在添加有2 mg/L TDZ和1 mg/L BA的C13培养基上叶片切口处再生了大量淡黄色颗粒状愈伤组织(图1-C),而在其他3种培养基上只再生了少量致密的愈伤组织(图1-A、B、D)。叶柄薄层切片愈伤组织发生时间要早10 d左右,培养20 d后,叶柄薄层切片边缘就开始出现愈伤组织。培养至2个月时,在这4种培养基上,叶柄薄层切片四周及表面即布满了大量淡黄色愈伤组织(图1-E、F、G、H)。并且在附加0.5 mg/L和0.1 mg/L 2,4-D的C11培养基上(图1-A、E),2种外植体诱导的愈伤组织有少量分化出胚状体,甚至有芽和根的再生。这些在C11培养基上再生的愈伤组织继续培养1个月后,愈伤组织体积继续增大,部分分化为胚状体,并且再生了许多具有根和芽的小苗。



A~D—未展开叶片诱导的愈伤组织,培养基分别为C11(A)、C12(B)、C13(C)和C14(D);
E~H—叶柄薄层切片愈伤组织的诱导,培养基分别为C11(E)、C12(F)、C13(G)和C14(H)

图1 彩叶芋2种类型外植体在不同激素配比培养基上培养2个月后诱导的愈伤组织

2.2 不同激素组合对愈伤组织诱导率的影响

激素的种类及其浓度组合是调控外植体产生愈伤组织的主导因素。外植体接种在愈伤组织诱导培养基上2个月后,统计愈伤组织诱导率,结果如表2所示:这2种外植体在不同种类和浓度激素的诱导下,都能产生愈伤组织,但对不同种类激素的反应不同。对于未展开叶片切块,C13培养基中愈伤组织诱导率高达92.8%,显著高于其他处理($P < 0.05$)。对

于叶柄薄层切片,所设计的4种培养基中愈伤组织诱导率均在90%以上,其中C13培养基中愈伤组织诱导率也是最高,达到97.9%,但这4种培养基愈伤组织诱导率之间没有显著性差异。这表明彩叶芋愈伤组织的诱导对激素的适应范围比较广,是很容易诱导愈伤组织的单子叶植物。叶柄薄层切片愈伤组织诱导效果优于叶片切块,而2 mg/L TDZ和1 mg/L 6-BA是彩叶芋愈伤组织诱导的理想激素组合。

表1 不同激素组合对Tapestry彩叶芋未展开叶片及叶柄薄层切片愈伤组织诱导的影响

培养基	激素组合(mg/mL)				幼嫩叶片切块愈伤组织诱导率(%)	叶柄切片愈伤组织诱导率(%)
	6-BA	NAA	2,4-D	TDZ		
C11	0.5	0	0.1	0	61.2 ± 2.1b	92.8 ± 2.4a
C12	0	1	0	1	74.2 ± 5.2b	95.8 ± 3.6a
C13	1	0	0	2	92.8 ± 5.3a	97.9 ± 3.6a
C14	0	0	1	1	64.5 ± 5.1b	94.4 ± 5.6a

表2 不同培养基对彩叶芋愈伤组织增殖的效果

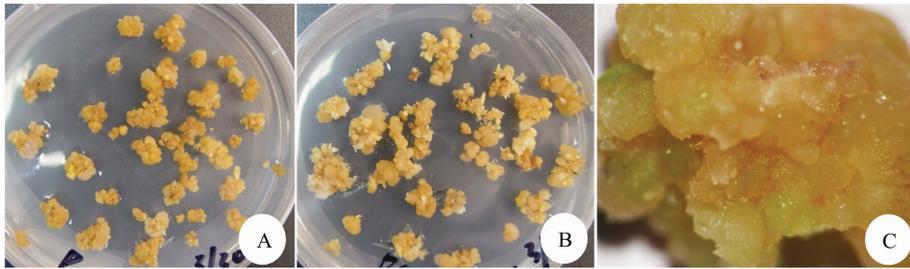
培养基	激素组合(mg/mL)		增殖前平均质量(g)	增殖后平均质量(g)	愈伤组织增殖率(%)
	TDZ	KT			
CP1	0	0	0.51	3.15	517.1a
CP2	1	1	0.50	2.75	450.7b
CP3	2	1	0.50	2.46	344.9c
CP4	1	2	0.49	2.77	465.1b
CP5	2	2	0.51	2.78	444.6b

2.3 不同激素组合对愈伤组织增殖的影响

虽然本研究中2种外植体在适宜的培养基上均能形成愈

伤组织,但数量相对较少。为获得状态良好、足够数量的彩叶芋愈伤组织,需进行增殖培养。试验比较了不同浓度TDZ和NAA组合对彩叶芋愈伤组织增殖的影响。表2结果显示,培养1个月后,愈伤组织在这些培养基上均实现了不同程度的增殖。其中未添加任何激素的CP1培养基上,愈伤组织增殖率达到517.1%,显著高于其他处理。然而,如图2-A和2-B所示,这些愈伤组织在所有这些培养基上虽然能够快速增殖,但是愈伤组织仍然呈现颗粒状。少数愈伤组织再生了胚状体,甚至还再生了芽或根(图2-A),这可能是由于添加一定浓度的TDZ和NAA促使愈伤组织发生了分化。在解剖显

显微镜下观察发现,这些愈伤组织大多呈颗粒状,结构较致密 (图2-C)。



A—在MS基本培养基上培养(CP1)1个月后的愈伤组织; B—在包含2 mg/mL TDZ和2 mg/mL KT的CP5培养基上生长1个月后的愈伤组织; C—解剖显微镜下观察到的颗粒状致密愈伤组织

图2 彩叶芋愈伤组织的增殖

2.4 小苗的再生

愈伤组织在附加有1 mg/L 6-BA和1 mg/L NAA的MS培养基上培养1个月,再生了大量带有根和芽的小苗。所有愈伤组织块均再生了带有芽和根的幼苗,且单个愈伤组织块可分化出多棵小苗。这些小苗叶片是绿色的,没有彩色叶脉和彩色斑点。当小苗长满培养瓶时,培养基表面还生长有大量愈伤组织和胚状体。



图3 彩叶芋愈伤组织再生植株

3 讨论

愈伤组织的产生是不同种类及浓度激素相互作用的结果。6-BA、2,4-D、TDZ等是外植体诱导愈伤组织所常采用的激素,6-BA能刺激愈伤组织的形成,2,4-D在诱导脱分化和细胞增殖方面效果较为明显,而TDZ是一种具有很强细胞分裂素活性的激素,具有促进愈伤组织生长的作用。前人研究表明,彩叶芋在组织培养中对生长调节剂的适应范围比较广^[5-10]。如王颖等在试验中发现,彩叶芋在不同组合的激素培养下都能产生愈伤组织,再生出小植株,但是愈伤组织启动时间、愈伤组织诱导率和愈伤组织分化率不同^[7]。本研究发现,在4种不同激素配比的愈伤组织诱导培养基中均能产生愈伤组织,这与前人的研究结果是一致的。

此外,植物叶片、茎尖、叶柄、叶脉及子叶等是愈伤组织诱导常用的外植体。彩叶芋一般以叶片为外植体进行组织培养研究,叶柄薄层切片作为外植体在彩叶芋离体培养中鲜见报道^[11]。横切薄层培养(transverse thin cell layer culture, tTCL)是指将外植体横切成大约1 mm厚的切片进行培养的方法。

本研究中以彩叶芋未展开叶片和叶柄薄层切片为外植体,结果发现,叶柄薄层切片是诱导愈伤组织的理想外植体,其愈伤组织诱导率均在90%以上。这可能是由于薄层培养具有组织结构简单、对调控因子敏感、培养易成功等优点^[12]。

优良的愈伤组织应具备质地疏松、增殖迅速、分化容易等特点^[13]。状态良好的愈伤组织是原生质体操作、体细胞杂交、转基因、植株再生等的重要基础。本研究获得的愈伤组织大多颗粒较大,结构致密,易于分化成苗,适合于组培快繁,但不适合于原生质体培养等研究。因此,彩叶芋愈伤组织在继代保存、愈伤组织悬浮系的建立等方面仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Deng Z A. *Caladium* genetics and breeding; recent advances [J]. Floriculture and Ornamental Biotechnology, 2012, 6: 53-61.
- [2] Wilfret G J. *Caladium* [M]//de Hertogh A, le Nard M. The physiology of flower bulbs. Amsterdam; Elsevier, 1993: 239-247.
- [3] 周肇基. 观叶新宠彩叶芋[J]. 花木盆景: 花卉园艺, 2000(12): 4.
- [4] Cai X D, Cao Z, Xu S X, et al. Induction, regeneration and characterization of tetraploids and variants in 'Tapestry' *Caladium* [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2015, 120(2): 689-700.
- [5] 王颖. 彩叶芋的组培扩繁及其抗寒性研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013: 10-13.
- [6] 梁国平. 彩叶芋的组培快速繁殖[J]. 热带农业科技, 1994(1): 33.
- [7] 王颖, 陆国权. 彩叶芋组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2012(12): 196-198.
- [8] Thongpukdee A, Thepsithar C, Chiensil P. Somaclonal variation of *Caladium bicolor* (Ait.) Vent. 'Jao Ying' after *in vitro* culture propagation [J]. Acta Hort, 2010, 55: 281-288.
- [9] 曹谷云, 唐效蓉, 程玉兰. 花叶芋的组织培养[J]. 湖南林业科技, 1993(1): 9-12.
- [10] 李维强, 刘静. 花叶芋组培快繁的应用研究[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2004, 24(4): 260-261.
- [11] 周祖富, 艾素云. 彩叶芋薄层培养及胚状体发生的组织学研究[J]. 广西农业生物科学, 1992, 11(2): 20-24.
- [12] 王鹤鸿, 黄学林. 薄层培养的应用现状与前景[J]. 植物学报, 1999, 16(6): 631-635.
- [13] 周宜君, 周生闯, 刘玉, 等. 植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2007, 16(1): 23-28.