

文章编号:1004-8820(2008)03-0221-05

彩色马蹄莲叶片愈伤组织培养体系的建立

龚雪琴,曲复宁,由翠荣,孙婉婷,王 萌

(烟台大学 化学生物理工学院,山东 烟台 264005)

摘要: 采用彩色马蹄莲(*Zantedeschia* spp cv Pink Giant) 的叶片为外植体,运用正交设计方法,对诱导马蹄莲愈伤组织培养基进行了预试验,并对影响马蹄莲愈伤组织诱导的因素进行了定量分析;在正交试验基础上,设计了 14 种不同激素种类和配比的配方,进行了诱导愈伤组织体系的建立. 对愈伤组织发生过程中形态学和细胞学结构进行了动态观察. 结果表明:在 MS 基本培养基中添加 6-BA 和 2,4-D 对以叶片外植体的愈伤诱导率有显著影响;对初代诱导的愈伤组织进行的两次继代培养结果表明,继代和愈伤组织继续发生的最佳培养基为 MS 附加 2,4-D 2.0 mg/L 和 BA 2.0 mg/L.

关键词: 彩色马蹄莲;愈伤组织诱导;愈伤培养体系;植物激素

中图分类号: :TQ027

文献标识码: A

彩色马蹄莲,英文又名 Calla lily 或 Arum lily, 属天南星科(Araceae) 马蹄莲属(*Zantedeschia*) 多年生草本球根植物. 最初的 Calla Lilies 均为黄颜色(*Zantedeschia elliottiana*) 但是经与其他种比如 *Zantedeschia rehmannii*, 的杂交获得了很宽的颜色范围,是倍受人们青睐的高档花卉. 彩色马蹄莲原产于南非,但其主要商业化栽培和生产国家为荷兰、新西兰和日本等. 近年来,我国的台湾及其内地陆续引进了不同品种的彩色马蹄莲种球. 彩色马蹄莲传统上采用分割块茎的方法进行繁殖,不仅繁殖系数较低,而且易感染软腐病、芋头花叶病毒及苜蓿花叶病毒等多种细菌和病毒病害,影响了植株生长和种球产量,同时导致花畸形而丧失商品价值. 利用组织培养和脱毒技术进行快速繁殖,可在短期内生产出大量无毒组培苗,其植株长势强、开花整齐、产花量高,且花色均匀一致,从而可以很好地保持新品种的特性. 马蹄莲的组织培养技术已有十几年的研究历史^[1,2],主要是通过不定芽的增殖途径进行培养,分别对其生长调

节物质、光照、温度等各因素对试管小植株的增殖、生长、小球的生长发育等的研究^[3-8]. 日本在近两年来对其利用光和自养微繁殖系统和大容器产业化培养技术进行了研究^[9,10]. 但是,由于在不定芽的增殖中植物激素特别是细胞分裂素的使用,连续继代后获得的试管苗在后来的栽培性状上,出现了由于试管培养带来的综合症,诸如多叶、花柄短缩、苞叶小,开花延迟等,在微繁后的第二个生长季表现出明显的灌木化(bushiness),并直接影响开花数量和质量^[11].

如何在引进国外优质花卉种苗的基础上,实现种球种苗的国产化是我国目前面临的一个很重要的问题,通过体细胞胚发生途径的植物微繁殖技术,实现植物人工种子的生产较之器官发生途径具有若干优越性. 作者对从新西兰引进的彩色马蹄莲品种通过与国内外不同的途径——体细胞胚发生途径的离体培养技术进行了初步研究,拟在探索通过体细胞悬浮培养和体细胞胚发生途径的微繁殖技术路线.

收稿日期:2006-07-28

基金项目:山东省科技厅攻关项目(2007GG20002019).

作者简介:龚雪琴(1965-),女,甘肃兰州人,实验师,主要从事植物组织培养及细胞学研究;通讯联系人:曲复宁(qfnzp@ytu.edu.cn),副教授.

1 材料与方 法

试验材料为彩色马蹄莲品种 (*Zantedeschia* spp cv Pink Giant), 首先选用正交试验表 L16(4⁵) 试验, 分别设计了 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、激动素(KT)和奈乙酸(NAA)共 4 个因素, 各个因素为 4 个水平, 基本培养基为 MS 培养基^[12]对诱导马蹄莲胚性愈伤组织的激素种类、浓度和配合进行了初步筛选; 在预试的基础上, 又对生长素和细胞分裂素的种类和用量以及配比进行了重复性筛选. 对试验各个配方均配制 1000 mL 的培养基, pH 值为 5.8, 分装在 4 个 500 mL 的三角瓶中, 灭菌后倒平板待用. 取叶片切成 2 cm × 2 cm 方块, 经自来水冲洗后, 在无菌操作台上用 0.1% HgCl₂ 灭菌 5-8 min 或 10% 的次氯酸钠灭菌 30 min, 再用无菌水冲洗 4-6 次. 叶片切割成 0.5 cm × 0.5 cm 大小, 接种到培养皿中, 每个配方接种 20 个培养皿, 每一培养皿 10-12 片, 培养温度(25 ± 2)℃, 暗培养. 对愈伤组织启动及形态进行动态的观察和统计愈伤启动数据, 并进行数量性分析, 正交试验设计和数据分析参照生物统计学的方法^[13]. 将初培养诱导

产生的愈伤组织进一步继代于原配方上, 90 d 左右愈伤组织周围开始形成米黄色的颗粒状愈伤, 取此愈伤组织用 1 mol · L⁻¹ HCl 离析, 醋酸洋红染色, 显微观察进行愈伤性质的鉴定.

2 结果与分析

2.1 对愈伤组织诱导预试验结果的极差分析

通过对正交设计的预试验结果(表 1, 2)的愈伤发生率进行了不同水平之间极差的分析, 可以看出 $R_{(2,4-D)} > R_{(BA)} > R_{(NAA)} > R_{(KT)}$, 2,4-D 因子的极差最大, 为 121.92, 是影响马蹄莲愈伤组织启动的关键性因素, 其次是 6-BA ($R = 88.41$) 和 NAA ($R = 63.53$), KT ($R = 35.78$) 是影响较小的因子.

2.2 不同激素水平选优与组合选优

综合分析本实验设计各正交因子(激素)不同水平的愈伤组织发生率可以看出: 配方 MS + 2, 4-D 4.0 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L, 为预试验中彩色马蹄莲叶片愈伤组织诱导的适宜配方, 愈伤发生率可以达到 96.80%.

表 1 愈伤组织诱导的正交试验

Tab. 1 Orthogonal design on callus inducement

| No. | 2,4-D(A) | | BA(B) | | KT(C) | | NAA(D) | | 愈伤诱导率/ % |
|-----|----------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|--------|-------------------------|-------------|
| | 水平 | 含量/mg · L ⁻¹ | 水平 | 含量/mg · L ⁻¹ | 水平 | 含量/mg · L ⁻¹ | 水平 | 含量/mg · L ⁻¹ | |
| 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 0 | 2 | 0.2 | 2 | 0.2 | 2 | 0.2 | 3.75 |
| 3 | 1 | 0 | 3 | 0.5 | 3 | 0.5 | 3 | 0.5 | 1.74 |
| 4 | 1 | 0 | 4 | 1.0 | 4 | 1.0 | 4 | 1.0 | 0.82 |
| 5 | 2 | 2.0 | 1 | 0 | 2 | 0.2 | 3 | 0.5 | 12.93 |
| 6 | 2 | 2.0 | 2 | 0.2 | 1 | 0 | 4 | 1.0 | 25.78 |
| 7 | 2 | 2.0 | 3 | 0.5 | 4 | 1.0 | 1 | 0 | 11.02 |
| 8 | 2 | 2.0 | 4 | 1.0 | 3 | 0.5 | 2 | 0.2 | 12.50 |
| 9 | 3 | 4.0 | 1 | 0 | 3 | 0.5 | 4 | 1.0 | 34.75 |
| 10 | 3 | 4.0 | 2 | 0.2 | 4 | 1.0 | 3 | 0.5 | 61.29 |
| 11 | 3 | 4.0 | 3 | 0.5 | 1 | 0 | 2 | 0.2 | 96.80 |
| 12 | 3 | 4.0 | 4 | 1.0 | 2 | 0.2 | 1 | 0 | 74.50 |
| 13 | 4 | 8.0 | 1 | 0 | 4 | 1.0 | 2 | 0.2 | 25.65 |
| 14 | 4 | 8.0 | 2 | 0.2 | 3 | 0.5 | 1 | 0 | 37.57 |
| 15 | 4 | 8.0 | 3 | 0.5 | 2 | 0.2 | 4 | 1.0 | 45.18 |
| 16 | 4 | 8.0 | 4 | 1.0 | 1 | 0 | 3 | 0.5 | 56.02 |

表2 胚性愈伤组织诱导的方差分析

Tab.2 Analysis of variance on embryonic callus inducement

| 变异来源 | df | SS | Ms | F | $F_{0.05}$ | $F_{0.01}$ |
|-------|----|---------|---------|-------|------------|------------|
| 2,4-D | 3 | 185.81 | 185.81 | 3.455 | 9.28 | 29.46 |
| BA | 3 | 97.7 | 97.7 | 1.817 | 9.28 | 29.46 |
| KT | 3 | 15.998 | 15.998 | <1 | 9.28 | 29.46 |
| NAA | 3 | 50.45 | 50.45 | <1 | 9.28 | 29.46 |
| 试验误差 | 3 | 53.78 | 53.78 | | | |
| 总变异 | 15 | 403.738 | 403.738 | | | |

2.3 不同激素因子对愈伤组织诱导率影响的方差分析

在对不同配方愈伤组织诱导率直观分析的基础上,对愈伤组织诱导的结果又进行方差分析,以确定各激素同配方间处理因素的差异显著性,以消除随机误差(表2).将 F 值小于1的变异项的平方和和自由度与误差项的平方和和自由度合并,作为试验差平方和的估计值(SSe'),合并后的试验误差平方和为: $SSe' = SSe + SSc + SSd = 53.78 + 15.998 + 50.45 = 120.228$,而自由度为9,合并后的方差分析结果如表3所示.由表3看出,2,4-D和BA因素的 F 值均达到 $P < 0.01$ 的显著水平.

表3 愈伤组织诱导正交配方的调整方差分析

Tab.3 Rectified analysis of variance on callus inducement

| 变异来源 | df | SS | Ms | F | $F_{0.05}$ | $F_{0.01}$ |
|-------|----|---------|--------|---------|------------|------------|
| 2,4-D | 3 | 185.81 | 185.81 | 13.877* | 3.29 | 5.42 |
| BA | 3 | 97.71 | 97.71 | 7.297* | 3.29 | 5.42 |
| 试验误差 | 9 | 120.228 | 13.39 | | | |
| 总计 | 15 | | | | | |

* : $P < 0.01$.

2.4 彩色马蹄莲愈伤诱导体系的建立

在对预备试验影响因子筛选的基础上,以MS培养基为基本成分设计了2,4-D、6-BA和NAA 3种激素各3个水平(0,2,4 mg/L)的14种随机配比的配方,进行了胚性愈伤的诱导(表4)和2次继代培养.结果表明对马蹄莲叶片愈伤组织的初代诱导培养6-BA和2,4-D是必需的;继代培养的最佳培养基为MS附加2,4-D 2.0 mg/L + BA 2.0 mg/L或者NAA 2.0 mg/L + BA 2.0 mg/L.也

就是说,对于彩色马蹄莲愈伤组织的继代增殖和胚性的转化,细胞分裂素6-BA仍然是必需的,但是,生长素2,4-D和NAA具有同样的效果(图1).

表4 愈伤组织诱导的配方选择

Tab.4 The selection of edium for callus induction $mg \cdot L^{-1}$

| 培养基 No. | 2,4-D | NAA | 6-BA | 培养基 No. | 2,4-D | NAA | 6-BA |
|---------|-------|-----|------|---------|-------|-----|------|
| | 1 | 4.0 | 0.0 | | 4.0 | 8 | 0.0 |
| 2 | 4.0 | 0.0 | 2.0 | 9 | 0.0 | 2.0 | 2.0 |
| 3 | 4.0 | 0.0 | 0.2 | 10 | 0.0 | 0.2 | 2.0 |
| 4 | 2.0 | 0.0 | 2.0 | 11 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| 5 | 0.2 | 0.0 | 2.0 | 12 | 0.0 | 2.0 | 0.2 |
| 6 | 0.0 | 4.0 | 4.0 | 13 | 4.0 | 0.0 | 2.0 |
| 7 | 0.0 | 4.0 | 2.0 | 14 | 0.0 | 4.0 | 2.0 |

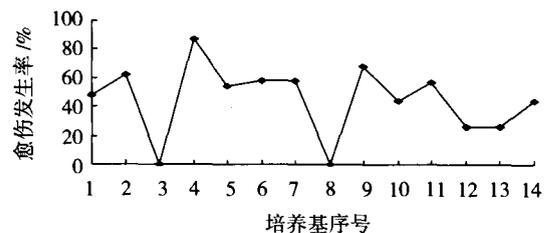


图1 不同激素种类和浓度组合处理得愈伤诱导率

Fig.1 Induction ratios of different treatments

2.5 愈伤组织形成过程中的形态学和细胞学观察

图2为彩色马蹄莲品种(*Zantedeschia* spp cv Pink Giant)叶片外植体在本实验设计中愈伤组织形成过程中的形态学变化.叶片外植体的愈伤启动部位为非接触培养基的一面,随培养的时间整体逐渐膨大,绿色逐渐减退,外植体背向培养基的表面部分形成淡黄色的松散状态愈伤组织,但是边缘切口处看不出的愈伤生长.大约培养30 d后,不膨大的组织逐渐变褐和褐红色,膨大的组织中部膨胀远离培养基表面,而切口处依然与培养基密切接触,转接培养20 d左右,在愈伤组织的外缘形成淡黄色的透明的松散愈伤,从第一次诱导培养经过两次继代培养,可以得到均匀松散的愈伤组织(图2d).此时如果将其转移到诱导体细胞胚的培养基上,组织中大量的细胞转向不均等分裂,向体细胞胚的方向进行发育(图3).

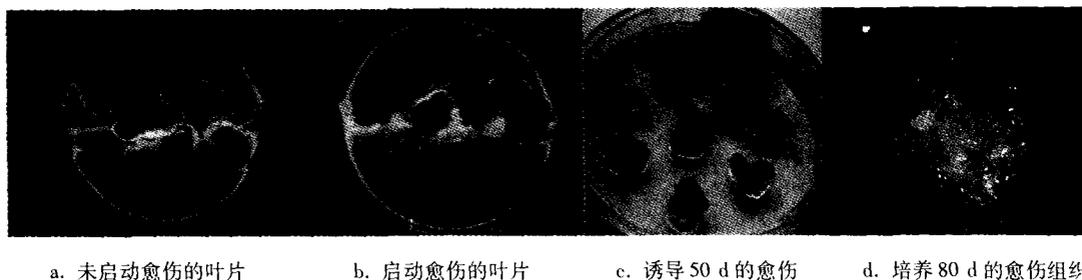
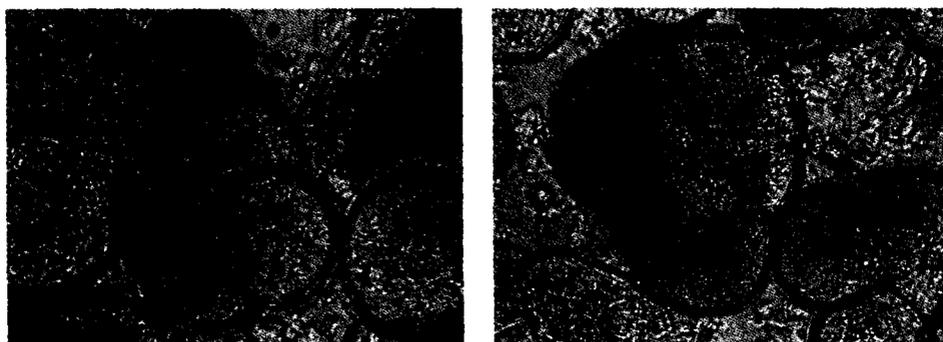


图 2 彩色马蹄莲胚性愈伤组织发生的形态学观察

Fig. 2 Morphological observation during callus induction



a. 愈伤组织中的四细胞期

b. 愈伤组织中的多细胞原胚期

图 3 彩色马蹄莲愈伤组织内细胞学观察

Fig. 3 Cells observation to embryonic callus

3 结 论

(1) 运用正交设计方法,对彩色马蹄莲(*Zantedeschia* spp cv Pink Giant)叶片愈伤组织的诱导进行了研究,筛选出诱导马蹄莲胚性愈伤组织的最佳配方,并对影响马蹄莲愈伤组织诱导的因素进行了定量的分析.一次性筛选出适宜于胚性愈伤诱导的最佳培养基,建立起了彩色马蹄莲愈伤组织的培养体系.

(2) 通过正交设计及统计分析认为,2,4-二氯苯氧乙酸和6-苄基腺嘌呤是诱导彩色马蹄莲胚性愈伤组织的主要影响因子.且不同激素的配比是诱导彩色马蹄莲胚性愈伤组织的关键因素.

(3) 体细胞胚发生和不定器官发生是植物组织和细胞离体培养下,再生植株形态发生的两条途径,从细胞全能性表达理论上,前者表达的完全性已是定论的;从利用组织和细胞离体培养进行植物无性增殖技术上,体细胞胚发生途径难于不定器官发生途径,但是,前者细胞的起源单一,繁殖后代的遗传稳定性高,在人工种子生产技术的实现上,较之后者有着毋庸置疑的优势,本实验通过愈伤组织培养体系的建立,诱导体细胞胚发生

的彩色马蹄莲无性繁殖的技术路线尚未见报道.

参考文献:

- [1] Ebrahim M K, Comparison H. Determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of in vitro cultured calla explants[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 101 (3): 305-313.
- [2] Ruizsifre G, Rosamarquez E, FloresOrtega C E. *Zantedeschia aethiopica* propagation by tissue culture[J]. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 1996, 80 (3): 193-194.
- [3] Kubo T, Mori G, Oda M, et al. Multiple proliferation of *Zantedeschia hybrida* 'Hazel Mary' by shoot tip culture of axillary buds[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2002, 71 (1): 123-126.
- [4] Kubo T, Mori G, Oda M. Factors affecting the formation and growth of microtubers in *Zantedeschia* plantlets [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2005, 74 (1): 47-50.
- [5] Jao R C, Lai C C, Fang W, et al. Effects of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets in vitro and tuber formation using light-emitting diodes[J]. Hortscience, 2005, 40 (2): 436-438.

- [6] Ngamau K. Development of an *in vitro* culture procedure using seeds from *Zantedeschia aethiopica* Green Goddess as explants [J]. *Gartenbauwissenschaft*, 2001, 66 (3): 133-139.
- [7] Chang H S, Chakrabarty D, Hahn E J, et al. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-plant*, 2003, 39 (2): 129-134.
- [8] Chen J J, Liu M C, Ho H Y. Size of *in vitro* plantlets affects subsequent tuber production of acclimated calla lily [J]. *Hortscience*, 2000, 35 (2): 290-292.
- [9] Kozai T, Xiao W, Nguyen Q T, et al. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation systems for large-scale commercialization [J]. *Propagation of Ornamental Plants*, 2005, 5 (1): 23-34.
- [10] Xiao Y L, Kozai T. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: Plantlet growth and production cost [J]. *Hortscience*, 2004, 39 (6): 1387-1391.
- [11] D'Arth S M, Simpson S I, Seelye J F, et al. Bushiness and cytokinin sensitivity in micropropagated *Zantedeschia* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2002, 70 (1): 113-118.
- [12] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol plant*, 1962, 15: 473-497.
- [13] 李春喜,王志和,王文林. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 149-153.

Establishment of Callus Induction System from Leaves in *Zantedeschia*

GONG Xue-qin, QU Fu-ning, YOU Cui-rong, SUN Wan-ting, WANG Meng

(Chemistry and Biology College, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: By the orthogonal design the medium is tested for callus induction from leaf explants in calla lily. The effect of the plant growth regulators on initiation and culture of callus is confirmed. 14 selections of different hormones and ratios for the medium are designed based on the orthogonal test, and the callus culture system is established. The morphological and cytological structures are observed dynamically during callus induction. The results show that MS media supplemented with 6-BA and 2, 4-D is favorable to the induction ratio for leaf callus. The optimum media for callus subculture is MS media supplemented with 2, 4-D 2.0 mg/L and BA 2.0 mg/L or with NAA 2.0 mg/L and BA 2.0 mg/L.

Key words: Calla Lily (*Zantedeschia*); callus induction; callus culture system; plant growth regulator

(责任编辑 周雪莹)