

红姬凤梨离体培养植株再生关键技术研究

孟艳琼¹, 张志平², 何琬璐¹, 傅松玲^{1*}

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 安徽合肥230036; 2. 安徽农业大学园艺学院, 安徽合肥230036)

摘要 [目的] 建立红姬凤梨组织培养快繁体系。[方法] 以MS培养基为基本培养基添加植物生长调节剂, 对红姬凤梨叶片进行愈伤组织诱导, 并进行芽分化、芽的继代增殖和生根培养。[结果] 叶鞘愈伤组织诱导以MS+2,4-D 0.5 ng/L+BA 3.0 ng/L+KT 2.0 ng/L培养基最好, 愈伤组织诱导率和分化率分别达82.4%和40.2%; 丛生芽诱导以MS+2,4-D 0.2 ng/L+NAA 0.05 ng/L+BA 3.0 ng/L+KT 2.0 ng/L培养基增殖效果最佳, 增殖倍数达9.72; 生根诱导以1/2 MS+NAA 3.0 ng/L培养基诱导生根效果最好, 平均每株生根12.12条。[结论] 采用组织培养可有效去除病毒, 增加繁殖系数。

关键词 红姬凤梨; 叶片培养; 诱导; 植株再生

中图分类号 S682.39 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)12-05364-03

Key Technologies in vitro Plant Regeneration of Tissue Culture of *Gyptanthus bromelioides*

MENG Yan qiong et al (College of Forestry and Gardening, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The research aimed to establish rapid propagation system of *Gyptanthus bromelioides* 'Ticolor'. [Method] The leaves of *Gyptanthus bromelioides* 'Ticolor' were carried on callus induction, bud differentiation, bud subculture proliferation and rooting culture with the MS culture medium added hormones. [Result] The results showed that MS medium supplemented with 2,4-D 0.5 ng/L, BA 3.0 ng/L, KT 2.0 ng/L was best for callus induction in which the induction rate and differentiation rate of callus were 82.4% and 40.2% respectively. MS medium supplemented with 2,4-D 0.2 ng/L, NAA 0.05 ng/L, BA 3.0 ng/L, KT 2.0 ng/L was best for clump shoots induction in which proliferation times was 9.72. 1/2 MS medium supplemented with NAA 3.0 ng/L was best for root induction in which the mean number of roots was 12.12. [Conclusion] Tissue culture could effectively remove the virus and increase propagation coefficient.

Key words *Gyptanthus bromelioides* 'Ticolor'; Leaf culture; Induction; Plant regeneration

红姬凤梨(*Gyptanthus bromelioides* 'Ticolor')属凤梨科姬凤梨属, 原产于南美热带地区, 主要分布在巴西的原始森林中, 我国南方有盆栽种植。由于其株形规则, 色彩绚丽, 观赏性强, 花期长, 易管理, 是优良的室内观叶植物, 具有较好的发展前景。红姬凤梨属多年生单子叶植物, 叶片呈莲座状密集丛生, 几乎无茎, 主要靠蘖芽扦插繁殖, 但繁殖系数较低, 造成苗木供不应求^[1]。笔者旨在通过叶鞘直接诱导产生不定芽或诱导愈伤组织产生不定芽, 并在此基础上探索最佳培养程序, 以期短期内快速繁殖优质苗木, 大大加快育苗进程。

1 材料与方

1.1 材料 试验材料为红姬凤梨幼嫩叶片, 购自安徽省合肥市裕丰花市。

1.2 方法

1.2.1 材料处理。 挑选生长健壮、无病虫害幼叶, 自基部剥下, 用自来水冲洗, 再用5%洗洁精溶液浸泡20 min, 然后用自来水冲洗30 min。沥干水后, 将材料切成约3 cm×3 cm的小块, 在超净工作台上进行表面灭菌处理, 其处理方法为: 75%酒精漂洗30 s, 无菌水漂洗1次, 0.1%HgCl₂消毒液浸泡10 min, 无菌水漂洗5~6次。沥干水, 切割成0.5 cm×0.5 cm的小块备用。

1.2.2 诱导分化。 采用4因素3水平的正交设计L₉(3⁴) (表1)。诱导培养以MS为基本培养基, 添加不同浓度的植物生长调节剂, 琼脂0.7%, 蔗糖3%。培养温度为(25±2)℃, 暗培养6 d后转入光周期12 h/d的光培养, 光照强度1500~2000 lx。每处理接种50个外植体, 培养30 d后统计外植体愈伤组织的诱导率和分化率。

1.2.3 继代培养。 采用4因素3水平的正交设计L₉(3⁴) (表2)。将获得的愈伤组织块和不定芽接种于继代增殖培养基上培养, 继代培养以MS为基本培养基, 培养基中均添加蔗糖30 g/L、琼脂6 g/L, pH值5.8。每个处理接种40个外植体, 30 d后调查增殖情况, 找出影响增殖的显著因子及各因素的适用量和配比。

1.2.4 生根培养与移栽。 将2 cm以上的芽苗切割接入生根培养基, 以1/2 MS为基本培养基, 添加不同含量的NAA、IAA、IBA(表3), 每处理接种40个无根单苗, 30 d后统计生根情况。

1.2.5 培养条件。 光照强度约为2000 lx, 温度控制在(25±2)℃, 光照12 h/d(8:00~20:00)。

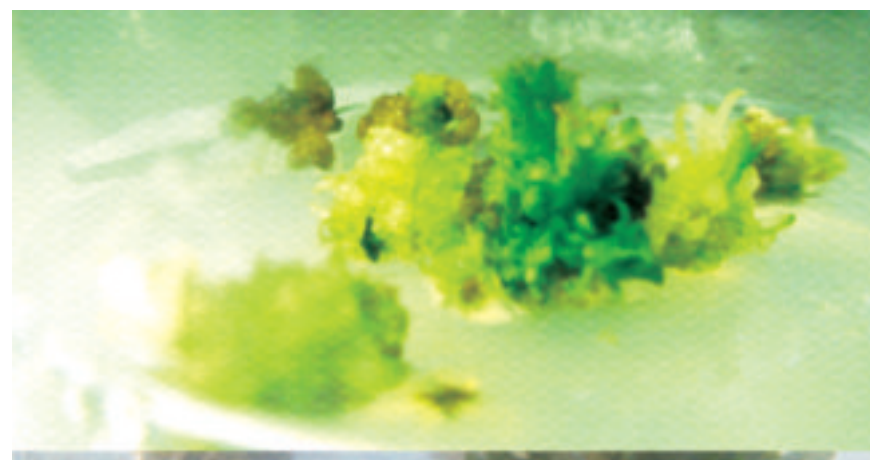


图1 红姬凤梨叶鞘外植体产生的愈伤组织

Fig.1 The bud body from callus of sheath explants

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对红姬凤梨愈伤组织和不定芽的诱导 将消毒好的外植体接种于诱导培养基中, 7 d后部分外植体基部开始膨大, 随后逐渐形成黄绿色颗粒状的愈伤组织, 20 d后部分早期形成的愈伤组织开始分化出小丛芽, 而未分化出小丛芽的外植体基部愈伤组织生长较迅速, 部分愈伤组织变成黄褐色(图1)。从表1可以看出, 愈伤组织的形成和分化受生长调节剂种类及浓度的影响, 其植物生长调节剂的

基金项目 安徽省教育厅青年教师基金项目(2004JQ153); 安徽农业大学校长青年基金(校科字2005]9号)。

作者简介 孟艳琼(1973-), 女, 安徽萧县人, 在读博士, 讲师, 从事观赏植物学研究。* 通讯作者

收稿日期 2009-02-14

最佳组合为 A₇, 愈伤组织诱导率和分化率分别达 82.4% 和 40.2%。因此, 红姬凤梨愈伤组织诱导和分化的最佳培养基

为 A₇, 即 MS + 2,4-D 0.5 ng/L + BA 3.0 ng/L + KT 2.0 ng/L, 其次是 A₃ 和 A₅ 培养基。

表1 不同植物生长调节剂对比对红姬凤梨叶片诱导分化的影响

Table 1 Effects of different growth regulator ratio on callus induction and buds differentiation of *Cryptanthus bromelioides* 'Ticolor' leaf

试验号 Est number	浓度 ng/L Concentration				存活叶鞘数 Number of survived sheath	诱导率 % Induction rate	分化率 % Differentiation rate
	2,4-D	NAA	BA	KT			
A ₁	0	0	1.0	1.0	36	38.9	8.3
A ₂	0	0.5	2.0	2.0	39	51.3	25.6
A ₃	0	1.0	3.0	3.0	47	76.6	38.3
A ₄	0.2	0	2.0	3.0	42	61.9	31.0
A ₅	0.2	0.5	3.0	1.0	49	75.5	38.6
A ₆	0.2	1.0	1.0	2.0	48	56.3	10.8
A ₇	0.5	0	3.0	2.0	50	82.4	40.2
A ₈	0.5	0.5	1.0	3.0	47	68.1	34.0
A ₉	0.5	1.0	2.0	1.0	45	68.9	8.9

2.2 植物生长调节剂浓度对红姬凤梨丛生芽增殖的影响

将诱导出的芽转入继代培养基中进行丛生苗诱导。培养中发现由叶基部直接分化的小丛芽增殖率和变异率均较低, 仅个别出现黄色变异, 而以愈伤组织分化出的丛生芽增殖培养分化率和变异率均较高。从表2 可以看出, 9 种培养基上诱导出的丛生苗均存在芽苗的不同变异现象, 其中 C₇ 培养基

增殖倍数较高, 达 9.72, 增殖芽的变异率也较高, 达 45.6%; 其次是 C₃ 培养基也有较高的增殖倍数和变异率。因此, 红姬凤梨增殖培养的最佳培养基为 C₇, 即 MS + 2,4-D 0.20 ng/L + NAA 0.05 ng/L + BA 3.0 ng/L + KT 2.0 ng/L。经增殖培养基诱导后多数叶片边缘平滑, 叶色变异出现红色(图2)、黄色(图3)、绿色(图4)和彩色(图5)4 种趋向。

表2 不同植物生长调节剂对红姬凤梨丛生芽增殖的影响

Table 2 Effects of different growth regulator on the proliferation of *Cryptanthus bromelioides* 'Ticolor'

试验号 Est number	浓度 ng/L Concentration				新增芽数 Buds number	平均增殖倍数 Average propagation multiple	芽变异率 % Mutational rate of bud
	2,4-D	NAA	BA	KT			
C ₁	0.05	0.05	1.0	1.0	210	5.25 ± 0.70	31.9
C ₂	0.05	0.10	2.0	2.0	294	7.33 ± 1.15	31.7
C ₃	0.05	0.20	3.0	3.0	352	8.80 ± 0.56	44.5
C ₄	0.10	0.05	2.0	3.0	296	7.40 ± 0.60	40.3
C ₅	0.10	0.10	3.0	1.0	254	6.33 ± 0.58	40.2
C ₆	0.10	0.20	1.0	2.0	232	5.78 ± 0.64	36.8
C ₇	0.20	0.05	3.0	2.0	388	9.72 ± 1.84	45.6
C ₈	0.20	0.10	1.0	3.0	152	3.78 ± 0.63	39.4
C ₉	0.20	0.20	2.0	1.0	286	7.17 ± 0.35	51.3



图2 紫色变异芽体在 1/2 MS + NAA 3.0 ng/L 培养基上培养 30 d

Fig 2 Purplish variation bud cultured on 1/2 MS + NAA 3.0 ng/L medium for 30 d

2.3 试管苗生根诱导 切取继代培养中高 2 cm 的壮苗接种到生根培养基上进行生根诱导, 4 d 后芽苗基部切口处开始突起, 7 d 后开始形成白色的小根。从表3 可以看出, 添加不同浓度的 NAA、IAA 或 IBA 对红姬凤梨不定根的诱导具有较好的促进作用, 30 d 后 9 种培养基上平均生根数、平均根长及茎平均高度均明显高于对照组。其中 D₃ 和 D₆ 培养基上的试管苗平均生根数量多且生根整齐、健壮、多呈辐射状伸长, 平均每株根数分别达 12.12 和 11.08 条, 平均根长分别达 2.80 和 2.94 cm, 平均茎高达 3.85 和 3.94 cm。因此, D₃(1/2

MS + NAA 3.0 ng/L) 和 D₆(1/2 MS + IAA 3.0 ng/L) 为生根诱导最佳培养基。



图3 黄色变异芽体在 1/2 MS + NAA 3.0 ng/L 培养基上培养 30 d

Fig 3 Yellow variation bud cultured on 1/2 MS + NAA 3.0 ng/L medium for 30 d

2.4 生根苗移栽 将发育良好的生根苗移出培养室, 在室温散射光下培养 3 d, 打开瓶盖于温室中预培养 2 d(图6), 洗去根部培养基, 移栽于经高温消毒的泥炭和苔藓(1:1)为基质的营养钵中, 3 cm 以上小苗移栽 30 d 后成活率达 95% 以上(移栽 320 株, 成活 304 株)(图7)。

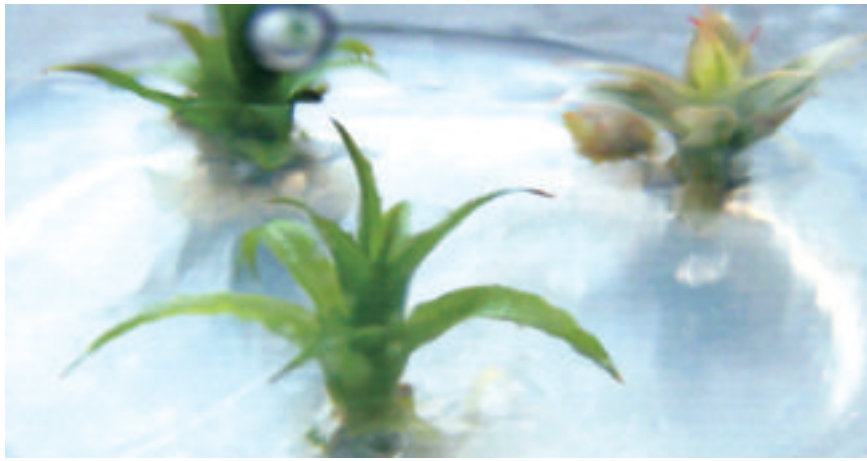


图4 绿色变异芽体在1/2 MS+ NAA 3.0 ng/L 培养基上培养20 d
Fig.4 Variant green bulblet cultured on 1/2 MS + NAA 3.0 ng/L medium for 20 d

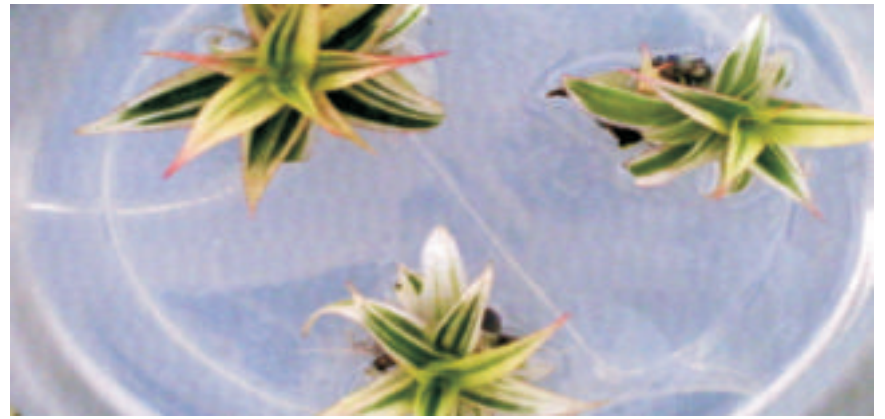


图5 叶鞘外植体产生的不定芽在1/2 MS+ NAA 3.0 ng/L 培养基上培养20 d
Fig.5 Adventitious bulbs from sheath explants cultured on 1/2 MS + NAA 3.0 ng/L medium for 20 d

表3 不同激素浓度对红姬凤梨幼芽不定根的诱导

Table 3 Effects of different hormone concentrations on plumle adventitious rooting of *Cryptanthus bromelioides* 'Ticolor'

试验号	浓度 ng/L Concentration			平均根数 条	平均根长 cm	平均茎高 cm	叶色
Test number	NAA	IAA	IBA	Average number of root	Average length of root	Average length of stem	Color of leaf
D ₁	1.0	0	0	7.93 ±0.43	2.67 ±0.21	2.87 ±0.26	绿色 Green
D ₂	2.0	0	0	9.07 ±0.24	2.73 ±0.32	3.08 ±0.18	红绿彩纹 Red and green
D ₃	3.0	0	0	12.12 ±0.36	2.80 ±0.10	3.85 ±0.21	黄绿彩纹 Yellow and green
D ₄	0	1.0	0	7.33 ±0.67	1.73 ±0.15	2.85 ±0.16	绿色 Green
D ₅	0	2.0	0	9.76 ±0.81	2.57 ±0.15	3.26 ±0.32	红绿彩纹 Red and green
D ₆	0	3.0	0	11.08 ±0.60	2.94 ±0.35	3.94 ±0.25	红绿彩纹 Red and green
D ₇	0	0	1.0	5.46 ±0.70	1.37 ±0.21	2.39 ±0.14	绿色 Green
D ₈	0	0	2.0	6.98 ±0.48	1.93 ±0.15	2.74 ±0.32	黄绿彩纹 Yellow and green
D ₉	0	0	3.0	9.29 ±0.58	2.23 ±0.23	3.07 ±0.24	绿色 Green
CK	0	0	0	2.90 ±0.45	0.61 ±0.10	2.07 ±0.31	绿色 Green

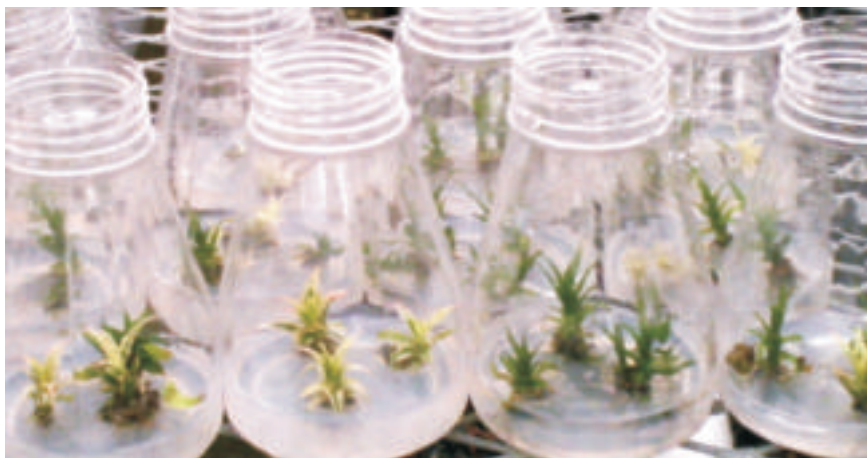


图6 生根苗预培养

Fig.6 Rooting seedlings pre culture

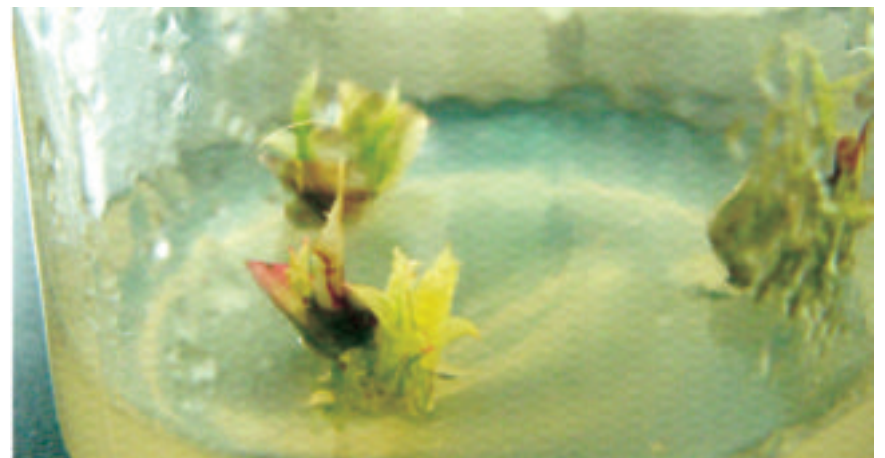


图8 红姬凤梨叶鞘外植体产生的不定芽

Fig.8 Adventitious bulbs from *Cryptanthus bromelioides* 'Ticolor' sheath explants



图7 盆栽30 d 的再生植株

Fig.7 Pot culture regenerated plants for 30 days



图9 愈伤组织分化的芽体

Fig.9 Callus from *Cryptanthus bromelioides* 'Ticolor' sheath explants

3 讨论

在诱导培养试验中发现,红姬凤梨不定芽的发生有两种类型:一是叶鞘基部直接分化出不定芽,且直接分化出的不定芽呈红、乳白、绿3种彩色条纹(图8);二是叶鞘基部形成

的愈伤组织经较长时间才分化出不定芽,经愈伤组织分化出的不定芽叶色有不同程度的变异,多为绿色或黄色(图9)。

(下转第5425页)

麦叶片氮素在冠层内的垂直分布具有较清晰的层次性,叶片含氮量随冠层层次降低而降低,垂直梯度分明,不同施氮处理间,不同生育时期梯度大小不同。秦晓东等^[11]的研究也表明,各生育时期小麦叶片氮素含量随叶位降低而降低,但各叶位氮素含量均随施氮水平的提高而提高。

4 施氮对氮素利用效率的影响

4.1 氮素利用率定义 Moll 等^[12]认为,氮素利用率是单位有效氮所生成的籽粒产量,并进一步将氮效率分解为氮吸收效率和生理利用效率,氮素吸收效率是作物成熟期地上部植株氮积累量与土壤供氮量之比;氮素生理利用效率是作物籽粒产量与成熟期地上部植株氮积累量之比。李韵珠等^[13]提出,氮素吸收利用效率是指消耗1个单位土壤氮所生产的经济产量。另外还有其他氮素利用效率评价指标,指标如N收获指数、N生产力、氮流效率等。研究者可根据不同的研究目的使用不同的评价指标。

4.2 氮肥运筹对氮素利用率的影响 提高肥料中养分利用率是合理施肥的核心问题,肥料利用率的高低反映了施肥对作物生长影响的大小。从环境角度来看,在某一特定农业生产条件下,氮效率的高低主要受土壤供氮水平或施氮量及氮肥施用方式的影响。

一般来说,随着施氮量的增加,小麦吸氮量和作物产量明显增加,但氮素利用率显著降低。赵俊晔等^[14]研究认为,随施氮量的增加,小麦对氮素的吸收效率和利用效率降低,氮素回收率也显著降低。氮肥利用率不仅与施氮量和施肥时期有关,而且还受底追比例的影响。赵广才等^[15]利用¹⁵N示踪技术研究不同施氮比例和时期对冬小麦氮素利用率的影响,结果表明,增加底肥比例和分次追肥处理的植株氮素利用率较高。夏明等^[16]研究淮北地区高产小麦氮肥最佳运筹方式,认为最佳施氮方式为50%~70%氮素基施,50%~

30%氮素拔节追施较好。马兴华等^[4]研究表明,相同施氮量条件下增加追肥氮的比例,可提高氮肥的农学效率和吸收利用效率。

参考文献

- [1] 赵俊晔,于振文,李延奇,等.施氮量对土壤无机氮分布和微生物量氮含量及小麦产量的影响[J].植物营养与肥料学报,2006,12(4):166-472.
- [2] 刘学军,巨晓棠,张福锁.基施尿素对土壤剖面中无机氮动态的影响[J].中国农业大学学报,2001,6(5):63-68.
- [3] 巨晓棠,刘学军,张福锁.冬小麦夏玉米轮作中NO₃⁻-N在土壤剖面的累积及移动[J].土壤学报,2003,40(4):538-546.
- [4] 马兴华,于振文,梁晓芳,等.施氮量和底追比例对土壤硝态氮和铵态氮含量时空变化的影响[J].应用生态学报,2006,17(4):630-634.
- [5] 杜金哲,李文雄,胡尚连,等.春小麦不同品质类型氮的吸收转化利用及与籽粒产量和蛋白质含量的关系[J].作物学报,2001,27(2):253-260.
- [6] 韩燕来,介晓磊,谭金芳,等.超高产冬小麦氮磷钾吸收、分配与转规律的研究[J].作物学报,1998,24(6):908-915.
- [7] 孙振元,韩碧文,刘书兰,等.小麦子粒充实期氮素的吸收和再分配及6-苄氨基嘌呤的调节作用[J].植物生理学报,1996,22(3):258-264.
- [8] 周春菊,张嵩午,王林权,等.冷型小麦氮素吸收积累特性的研究[J].植物营养与肥料学报,2006,12(2):162-168.
- [9] 潘庆民,于振文,王月福,等.公顷产9000kg小麦氮素吸收分配的研究[J].作物学报,1999,25(5):541-547.
- [10] HROSET, WERGER MJ A. Maximizing daily canopy photosynthesis with respect to the leaf nitrogen allocation pattern in a canopy[J]. Oecologic, 1987, 72:520-526.
- [11] 秦晓东,戴廷波,荆奇,等.冬小麦叶片氮含量时空分布及其与植株氮营养状况的关系[J].作物学报,2006,32(11):1717-1722.
- [12] MOLL R H, KAMPRATH E J, JACKSON W A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization[J]. Agron J, 1982, 74:562-568.
- [13] 李韵珠,黄元仿.冬小麦的氮素利用率和供水关系M//李韵珠,陆锦文,罗远培.土壤水和养分的有效利用.北京:北京农业大学出版社,1994:139-148.
- [14] 赵俊晔,于振文.不同土壤肥力条件下施氮量对小麦氮肥利用和土壤硝态氮含量的影响[J].生态学报,2006,26(3):815-822.
- [15] 赵广才,李春喜,张保明,等.不同施氮比例和时期对冬小麦氮素利用的影响[J].华北农学报,2000,15(3):99-102.
- [16] 夏明,张建勋.淮北地区高产小麦氮肥最佳运筹方式研究[J].安徽农学通报,2001,7(3):36-37.

(上接第5366页)

有研究表明,组织培养中某些再生植株变异叶的出现与其培养基中较高浓度的生长素有关^[2],而且含有多种生长调节剂的诱变率大于单一生长调节剂诱变率,复合生长调节剂诱变率又大于其单一生长调节剂的诱变率^[3]。Zhu 等报道,五彩芋属 *Caladium* 'Pink Cloud' 的叶片在同时添加 NAA 5 μmol/L 和 BA 4.5 μmol/L 的 MS 培养基上能产生叶色变异的再生植株^[4]。该研究表明,通过愈伤组织途径产生的再生植株出现高频变异芽,可能与培养基中所使用的植物生长调节剂有关,至于其变异机理及变异性状稳定性,尚待进一步研究。栽培中还发现红姬凤梨的彩色条纹与施肥种类有关,当 N 肥充足时,绿色占优势;当 N 肥含量低时,彩色条纹明显,因此在不影响正常生长时可适当降低 N 肥含量。

参考文献

- [1] 王玉国.观叶植物的栽培与装饰M.北京:科学技术文献出版社,

2002:148-149.

- [2] AHMED E U, HAYASH T, YAZAWA S. Auxins increase the occurrence of leaf color variants in *Cladium* regenerated from leaf explants[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 100:153-159.
- [3] 曾少玲,容世清,梁庆华,等.香蕉组织培养中变异的发生与控制的途径[J].云南热作科技,2001,24(4):36-37.
- [4] ZHUY, YAZAWA S, ASAHARA T. Varietal differences in leaf color variation of plants regenerated from in vitro culture of leaf blade in *Cladium* cultivars[J]. Jpn Soc Hort Sci, 1993, 62:431-435.
- [5] 桂意云,林纬,陶劲,等.擎天凤梨离体培养快繁试验[J].广西农业科学,2005,36(6):509-510.
- [6] CAO Y L, LUO Q, ZHANG X Y, et al. Effects of different culture conditions on vitification of *Lyxium barbarum* L. plantlets in tissue culture[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):30-32, 115.
- [7] 刘松涛,郭军战,白睿.凤梨组织培养研究[J].西北林学院学报,2007, 22(4):95-98.
- [8] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its in vitro rooting technique[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5):47-49, 52.