

红龙草叶片的组织培养及其植株再生

权 宏 施和平*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

摘 要: 建立了红龙草叶片再生体系。叶片外植体在培养基 MS + 6-BA 1.0 mg/L + 4-PU 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 上形成浅绿色愈伤组织, 20 d 后愈伤组织诱导率达 100%。约 45.31% 的愈伤组织在添加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.4 mg/L 的 MS 培养基上分化出紫红色的不定芽, 约 6% 的愈伤组织在该培养基上产生出细小叶片和绿色变异幼芽。所产生的紫红色不定芽在 1/2 MS + NAA 0.4 mg/L 的培养基上可全部生根, 长成完整植株。再生植株的移栽成活率达 85% 以上。

关键词: 红龙草; 叶片; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 04-0735-03

Tissue Culture of *Altemanthera ficoidea* 'Ruliginosa' Leaf Explants and Its Plantlet Regeneration

Quan Hong and Shi Heping*

(Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: An efficient regeneration protocol was developed through shoot regeneration from leaf explants of *Altemanthera ficoidea* 'Ruliginosa'. The results showed that light green calli could be formed from all the leaf explants of cultured in vitro for 20 days on MS medium containing 6-BA 1.0 mg/L, 4-PU [N-phenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl) urea] 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L. Adventitious shoots in purple could be developed from the calli at the frequency of 45.31% on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA and 0.4 mg/L NAA. About 6% of the regenerated variants buds with green leaf-colour and tiny leaves were also observed to form on the same medium. Adventitious purple shoots could be rooted and formed regenerated plants on 1/2 MS medium supplemented with 0.4 mg/L NAA. The survival rates of regenerated plants were more than 85%.

Key words: *Altemanthera ficoidea*; Leaf; Tissue culture; Plantlet regeneration

1 目的、材料与方法

红龙草 (*Altemanthera ficoidea* 'Ruliginosa') 为苋科多年生草本观赏植物, 在我国南方园林绿化中广泛栽培。作者通过红龙草叶片组织培养获得再生植株, 为快繁种苗提供参考。

取盆栽红龙草的幼嫩叶片, 75% 酒精浸泡 20 s, 0.05% HgCl₂ 溶液消毒 10 ~ 20 min, 无菌水漂洗 5 ~ 6 次后切成 1.5 ~ 2.0 cm² 的小块, 分别接种在添加 6-BA、NAA 或 4-PU [N-苯基-N'-(2-氯-4-吡啶基) 脲] 的愈伤组织诱导培养基 (表 1) 及幼芽分化培养基 (表 2) 中。在幼芽分化培养基中补加 GA₃ 1 mg/L, 以促进叶片愈伤组织分化形成绿色变异芽体。不定芽生根培养基为添加 NAA 0 ~ 0.4 mg/L 的 1/2 MS 或 MS 培养基。所有的培养基均添加 3.0% 蔗糖, 1% 琼脂, pH 5.8, 121 高压蒸气灭菌 20 min。昼夜培养温度 25 / 16, 光照 2 000 lx, 16 h/d, 3 次重复。采用 DPSV 3.01 软件进行统计分析。

收稿日期: 2004 - 09 - 16; 修回日期: 2004 - 12 - 01

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (003062)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shihp@snu.edu.cn)

2 结果分析与讨论

2.1 叶片愈伤组织的诱导

培养 14 d 后, 在不含任何植物生长调节剂的 MS 培养基中, 叶片外植体未产生明显的愈伤组织, 仅观察到部分外植体的叶脉切口处略微膨大, 也有部分外植体逐渐褐化, 直至坏死。而在添加不同浓度植物生长调节剂的 MS 培养基中叶片外植体的切口边缘处则逐渐增厚或膨大, 20 d 后形成颗粒状愈伤组织。其中在添加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基上, 约 98.4% 的叶片外植体形成致密的愈伤组织 (表 1), 大部分为浅黄绿色, 表面为紫红色 (图版, A); 而在 MS+6-BA 1.0 mg/L +4-PU 1.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L 培养基上, 形成略疏松的浅绿色愈伤组织; 随后逐渐变成紫红色, 并可形成少量的幼芽 (图版, B)。在同时添加 6-BA、4-PU 和 NAA 的 MS 培养基中, 叶片外植体产生的愈伤组织比在仅添加 6-BA 和 4-PU 组合中高得多。这表明适当浓度的生长素和细胞分裂素组合更有利于愈伤组织的形成。

2.2 不定芽的诱导

由表 2 可见, 红龙草叶片愈伤组织在幼芽分化培养基中培养 42 d 后, 在无植物生长调节剂或仅添加 NAA 的培养基中不能分化不定芽。在添加 6-BA 和 NAA 的培养基中可诱导不定芽, 其中以添加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.4 mg/L 的 MS 培养基的诱导率最高, 约 45.31% (图版, C), 其次是 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为 26.56%; 而当 6-BA 浓度增加至 2.0 mg/L 时, 不定芽诱导率反而降低。此外, 叶片愈伤组织在添加不同浓度激素配比的培养基中都不同程度地生根, 其中以在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 ~ 0.4 mg/L 中的生根率较高, 达到 43.75% ~ 50%。

绝大部分愈伤组织分化出的幼芽呈紫红色, 具 2~5 片小叶, 质地脆硬 (图版, B、C)。一周

后幼芽长大、伸长, 幼叶中部呈现少量浅绿色, 叶片呈紫红色, 接近野生植株的形态和色泽。约 6% 的叶片愈伤组织在添加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.4 mg/L 的 MS 培养基中分化出完全绿色的芽体 (图版, D)。将该芽体置于幼芽分化培养基上继续培养 3 周后, 绿色芽体仍能明显增殖, 但始终没有明显茎的分化, 且叶片细小, 呈团块状的叶状体 (图版, E)。将该绿色团块状的叶状体幼芽接种于添加 GA₃ 1 mg/L 的 MS 培养基中培养 5 周后, 也未见明显茎的分化; 增殖后的绿色不定芽仍呈球状, 翠绿, 其细小叶片也未见变化 (图版, F)。剥开球状体, 内部呈浅黄绿色, 中空, 具小叶片的芽体紧密排列在周围。该芽体在继代过程中无论置于白光还是蓝光下, 均未见明显茎的分化, 且始终保持绿色, 不能转变成紫红色。

2.3 生根诱导及移栽

将高约 3 cm 的紫红色幼芽切下, 接种于生根培养基中, 约 10 d 后从幼芽基部产生白色的根, 且

表 1 不同培养基对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Callus induction of *A. litemanthera ficoidea*

'Rulignosa' leaf explants		
培养基 Medium (mg/L)	外植体数 Number	愈伤组织诱导率 Callus induction of explants (%)
MS	96	0 d
MS+4-PU 0.5+NAA 0.1	96	64.0 bc
MS+4-PU 1.0+NAA 0.2	96	71.9 b
MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	96	68.8 bc
MS+6-BA 0.5+4-PU 0.5+NAA 0.2	96	92.2 a
MS+6-BA 0.5+4-PU 1.0	96	57.8 bc
MS+6-BA 1.0+NAA 0.2	96	98.4 a
MS+6-BA 1.0+4-PU 0.5	96	52.8 c
MS+6-BA 1.0+4-PU 1.0+NAA 0.1	96	100 a

注: 不同字母表示差异显著, 下表同。

Note: Different letters within columns represent significant at 5% level. The same below.

表 2 不同培养基对不定芽诱导的影响

Table 2 Adventitious buds induction of *A. litemanthera*

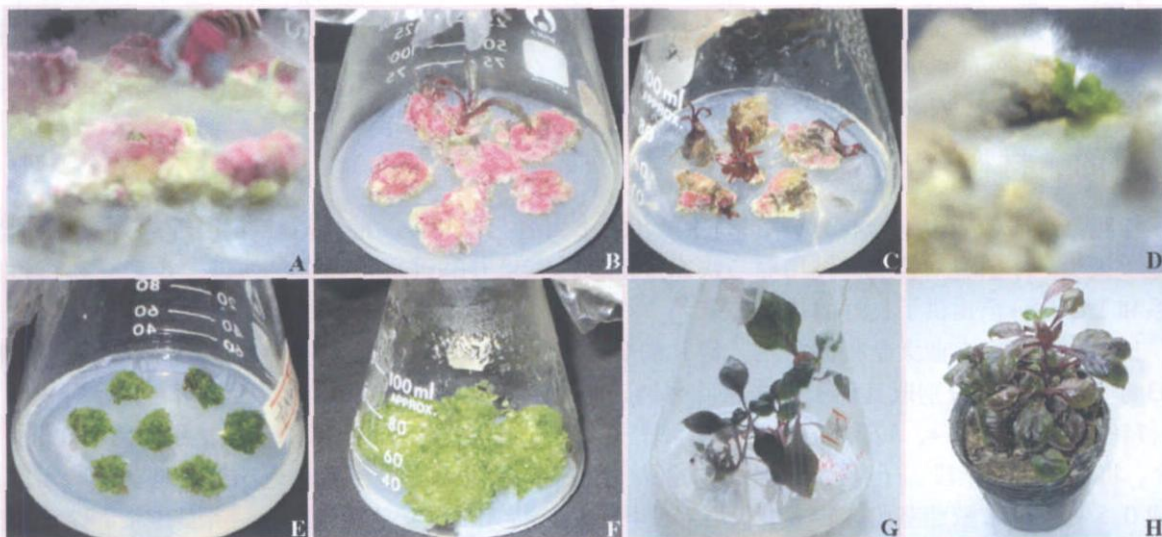
ficoidea 'Rulignosa' leaf calli		
培养基 Medium (mg/L)	外植体数 Number of explants	不定芽诱导率 Adventitious shoot induction (%)
MS	96	0 h
MS+NAA 0.1	96	0 h
MS+NAA 0.2	96	0 h
MS+NAA 0.4	96	0 h
MS+6-BA 0.5	96	7.81 fg
MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	96	17.20 cd
MS+6-BA 0.5+NAA 0.2	96	14.60 de
MS+6-BA 0.5+NAA 0.4	96	21.88 bc
MS+6-BA 1.0	96	6.25 fg
MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	96	10.94 ef
MS+6-BA 1.0+NAA 0.2	96	26.56 b
MS+6-BA 1.0+NAA 0.4	96	45.31 a
MS+6-BA 2.0	96	4.69 gh
MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	96	10.94 ef
MS+6-BA 2.0+NAA 0.2	96	14.06 de
MS+6-BA 2.0+NAA 0.4	96	15.63 de

培养基的 NAA 浓度越高, 幼芽生根率也越高。1/2MS 培养基更有利于红龙草幼芽生根, 尤以 1/2MS + NAA 0.4 mg/L 培养基生根效果最好, 达 100% (图版, G)。待生根的幼苗长至 5 cm, 根长至 3~4 cm 时, 将幼苗种植于经过消毒处理的菜园土和椰糠等体积混合的基质中, 10 d 后移栽成活率达 85% 以上 (图版, H)。

有关红龙草的组织培养及其植株再生的研究, 国内外至今未见报道。一些研究表明, 培养基中的植物生长调节剂能引起再生植株产生变异, 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^[1]。也有报道证实, 培养基中较高浓度的细胞分裂素能促进 *Gerbera jamesonii* 的快速繁殖, 但也会导致产生矮丛状 (Bushiness) 的异常植株^[2]。Zhu 等报道, 五彩芋属 *Caladium* 'Pink Cloud' 的叶片外植体在同时添加 NAA 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 BA 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS 培养基上培养也能产生叶色变异的再生植株^[3,4]。而在我们的试验中少数红龙草叶片愈伤组织 (约 6%) 分化产生出叶色改变和叶形态大小变异的芽体, 我们推测, 这种绿色变异芽体的产生可能与培养基中所使用的植物生长调节剂有关, 但其机理则尚待进一步研究。

参考文献:

- 1 Ahmed E U, Hayashi T, Yazawa S Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants Scientia Horticulturae, 2004, 100: 153 ~ 159
- 2 Topoonyanont N, Ampawan R, Debergh P C Bushiness in *Gerbera jamesonii*: abnormal shoot development during micropropagation J. Hort Sci Biotech, 1999, 74: 675 ~ 679
- 3 Zhu Y, Yazawa S, Asahira T Varietal differences in leaf color variation of plants regenerated from in vitro culture of leaf blade in *Caladium* cultivars Jpn Soc Hort Sci, 1993, 62: 431 ~ 435
- 4 Zhu Y, Takemoto T, Yazawa S Leaf color of plants regenerated through in vitro culture from variegated leaf segments of *Caladium*. Jpn Soc Hort Sci, 1993, 62: 619 ~ 624



图版说明: A. 红龙草叶片外植体产生的愈伤组织; B 和 C 愈伤组织分化的紫红色不定芽; D. 叶片愈伤组织分化的绿色变异芽体; E 绿色变异芽体在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L 培养基上培养 21 d; F 绿色变异芽体在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L 培养基上培养 35 d; G 幼芽在 1/2MS+NAA 0.4 mg/L 培养基上生根; H 盆栽的再生植株。

Explanation of plates: A. Callus from *Altenanthera ficoidea* 'Ruliginosa' leaf explants; B and C Purple shoots from calli of leaf explants; D. Variant green buds from calli of leaf explants; E Variant green buds on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L for 21 days; F Variant green buds on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L for 35 days; G Adventitious buds rooted on 1/2MS+NAA 0.4 mg/L; H. Pot-grown regenerated plants