

粉菠萝体细胞植株再生体系的研究

许早时, 卜基保

(安徽省林业高科开发中心, 合肥 230001)

摘要: 以粉菠萝冠芽、幼叶为外植体材料, 采用外加不同梯度浓度激素的完全培养基 (MS) 进行组织培养研究。结果表明, MS+BA1.0 mg·L⁻¹+IBA0.1 mg·L⁻¹ 为最佳丛生芽培养基; MS+BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ 为最佳芽增殖培养基; 1/2 MS+NAA0.5 mg·L⁻¹ 为最佳生根培养基。通过对再生植株的分子标记研究表明, 基因组没有发生变化, 表明通过粉菠萝体细胞植株再生苗同粉菠萝原生苗没有明显的差别。

关键词: 组织培养; 体细胞; 粉菠萝

中图分类号: S68

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0116-04

Study on tissues culture system with somatic cell in *Aechmea fasciata* cv

XU Zao-shi, BO Ji-bao

(Institution of Anhui Forestry High-tech Development Center, Hefei 230001)

Abstract: The shoots and young leaves of *Aechmea fasciata* cv were used as cell culture material with MS medium plus different concentration hormones. The results show that MS+BA1.0 mg·L⁻¹ + IBA 0.1 mg·L⁻¹ is the best medium for shoots induction; MS+BA 0.2 mg·L⁻¹ +NAA 0.1 mg·L⁻¹ is the best medium for shoot propagation, whereas 1/2MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹ is suitable medium for roots induction. PCR amplification shows that genomic DNA of regenerated plants is not obviously different from original *Aechmea fasciata* cv.

Key words: tissue culture; somatic cell; *Aechmea fasciata* cv

粉菠萝 (*Aechmea fasciata* cv), 又称粉凤梨、蜻蜓凤梨、美叶光萼荷等。凤梨亚科、萼凤梨属, 原产巴西东南部, 自 20 世纪 80 年代初引入我国。其苞片粉红色, 披针形, 有 15~20 片叠生状似星塔, 小花白色。由于花序粉红美丽, 市场上又名“粉佳人”, 花期春季, 观赏期达半年之久, 是新一代室内盆栽植物^[1]。

目前市场上的粉菠萝, 多为杂交品种, 因此很难产生种子, 给传统的通过种子繁殖方法, 造成了困难, 对于扩大生产非常不利。基于粉菠萝独特的生物学特点, 传统的方法采用分割吸芽繁殖, 或分蘖繁殖法, 但这种方法生产成本低, 生产速度慢, 且繁殖系数低。为了克服这一缺陷, 近年来先后采用了切割花柱授粉法和胎盘授粉法来克服传统授粉的缺陷^[2], 但这些方法往往会引入新基因型。通过离体繁殖的方法既能够保证基因型的稳定性, 又能

够实现快速繁殖。国外已经有通过幼叶和花组培的报道^[3-4], 然而我国对粉菠萝的快速繁殖还处于初步的研究阶段, 相关的研究还没有形成完成体系^[5-6]。基于此, 本研究采用冠芽及幼叶为材料, 通过筛选不同激素及浓度的组合, 最终选择最佳激素配比的繁殖体系, 并通过对再生苗的分子标记, 对组织培养苗进行了分子鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料类别及培养条件

当年生粉菠萝小苗的冠芽、幼叶, 作为外植体。愈伤诱导及丛生芽增殖率试验用培养基是在完全培养基 MS 中分别加入不同浓度 6-BA (细胞分裂素)、NAA (萘乙酸) 和 IBA (吲哚丁酸); 生根培养实验是在 1/2MS 培养基中分别加入不同浓度的生长素。以上各培养基中均加蔗糖 25 g·L⁻¹ 和琼脂粉 6.8

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 调至 5.8~6.2。培养温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照度 $1\ 000\sim 1\ 500\ \text{lx}$, 光照时间为 $14\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.2 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

CTAB 法提取基因组, 如已经发表的结果所述^[5], PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min, 然后 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s 35 个循环后, 72°C 延伸 5 min, 扩增后, 取 15 mL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并拍照。

PCR 引物: 5S rDNA 基因 PCR 扩增引物的上游引物为: ATCCTTTGCAGACGACTTGA, 下游引物为: AGCTTGACTTCGCAGATCGG; PKK 基因 PCR 扩增的上游引物为: CTGCAGATCCGCAGAA GAAATATG, 下游引物为: GGGTATGAGCATG TCAATTCCTCCC。

2 结果与分析

2.1 丛生芽诱导培养

取粉菠萝的冠芽和幼叶进行诱导, 形成愈伤(图 1A), 再将培养 3~4 周的愈伤, 采用不同浓度的激素诱导产生丛生芽, 结果表明, 随着细胞分裂素浓度的提高, 对出芽有着较大的抑制作用, 在较低浓度的细胞分裂素的情况下, 吲哚丁酸和萘乙酸的浓度对出芽率起抑制作用; 而在中等浓度的细胞分裂素情况下, 萘乙酸促进幼芽的形成, 而吲哚丁酸浓度对出芽率影响很小; *T*-检验结果显示, $\text{MS}+\text{BA}1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA}0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的培养基出芽率最高(图 1B), 与其它培养基的出芽率有显著差异(见表 1)。

表 1 不同激素组合对粉菠萝愈伤组织器官分化的影响(外植体块数 $n=30$)

Table 1 Calli differentiation in different hormones

MS 培养基激素种类 及浓度配比 MS medium plus hormones	愈伤组织块数/m Calli number	形成不定芽的愈伤 组织块数 Shooting calli number	平均每块愈伤组织 产生的不定芽数 Shoots number from each callus	形成不定芽的频率 Induced shoot ratio
1.BA1.0+NAA0.1	42	4	1.5	9.52%
2.BA1.0+NAA0.5	39	1	1.0	2.56%
3.BA1.0+NAA1.0	18	0	0.0	0
4.BA1.0+IBA0.1	40	22	2.8	55.00%
5.BA1.0+IBA0.5	36	9	0.9	25.00%
6.BA1.0+IBA1.0	21	2	1.5	9.52%
7.BA2.0+NAA0.5	58	22	1.8	37.93%
8.BA2.0+NAA1.0	63	21	1.2	33.33%
9.BA2.0+NAA2.0	33	2	1.5	6.06%
10.BA2.0+IBA0.5	46	6	1.2	13.04%
11.BA2.0+IBA1.0	39	4	1.3	10.26%
12.BA2.0+IBA2.0	18	2	0.5	11.11%
13.BA3.0+NAA1.0	24	2	0.5	8.33%
14.BA3.0+NAA1.5	64	8	1.4	12.50%
15.BA3.0+NAA3.0	30	0	0.0	0
16.BA3.0+IBA1.0	93	7	0.9	7.53%
17.BA3.0+IBA1.5	78	5	1.2	6.41%
18.BA3.0+IBA3.0	42	0	0.0	0
19.KT4.0+IAA1.0	44	10	1.8	22.73%
20.KT4.0+NAA1.0	10	0	0.0	0

注: 经对形成不定芽的频率进行 *T*-检验: 4 号培养基上形成不定芽的频率与 7 号培养基上形成不定芽的频率差异不显著; 4 号与其他各号培养基上形成不定芽的频率差异存在显著性。基本培养基为 MS, 其中加琼脂 $7\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蔗糖 $25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用 1 M 浓度的 NaOH 或 HCl 将 pH 调至 5.8~6.2 之间

Note: *T*-test was used in ratio of shoot generation; induced shoots ratio is not significantly different between medium of number 4 and number 7. However, medium of number 4 is much better than the others.

2.2 增殖培养

不同浓度的激素对生芽增殖情况研究发现, 随

着细胞分裂素和萘乙酸浓度的增加, 丛生苗的数量逐渐减少(表 1), 结果表明 $\text{MS}+\text{BA}0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}$

0.1 mg·L⁻¹ 为较为合适的芽增殖培养基。

表 2 不同激素配比与粉菠萝愈伤组织培养幼苗增殖率的关系

Table 2 Relationship between shoots propagation and hormones concentration

培养基激素种类及浓度配比 MS medium plus hormones	芽块转接(n=30) Calli number (n=30)	
	均丛生苗数 (x±s) Average shoot number	生长状况 Growth situation
1.BA0.2+NAA0.1	22.53±2.09	丛生芽粗壮, 少数有黄化苗
2.BA0.5 +NAA0.1	26.53±2.26	丛生芽细弱, 紧密, 较多黄化苗
3.BA1.0 +NAA0.1	3.93±1.21	芽少且呈细弱状, 同时基部愈伤化
4.BA0.2 +IBA0.2	12.3±1.30	渐呈水渍状, 部分苗有玻璃化现象
5.BA0.5 +IBA0.2	16.8±1.88	苗细弱, 较多玻璃化苗
6.BA1.0 +IBA0.2	3.03±0.91	芽短而粗, 叶子短小渐呈愈伤化
7.BA0.5 +NAA1.0	3.97±1.08	芽短而粗, 叶子短且宽, 为非正常苗
8.BA1.0 +NAA1.0	3.3±0.94	基部愈伤化, 愈伤组织呈水渍状
9.BA2.0 +NAA1.0	2.13±0.72	愈伤化
10.BA0.5 +IBA1.0	0.47±0.67	愈伤化, 几乎不分化芽
11.BA1.0 +IBA1.0	1.03±1.05	愈伤化
12.BA2.0 +IBA1.0	1.33±1.27	愈伤化

注: 经 *T*-检验, 最佳增殖培养基 B1 与其他各号培养基上产生的均丛生苗数存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

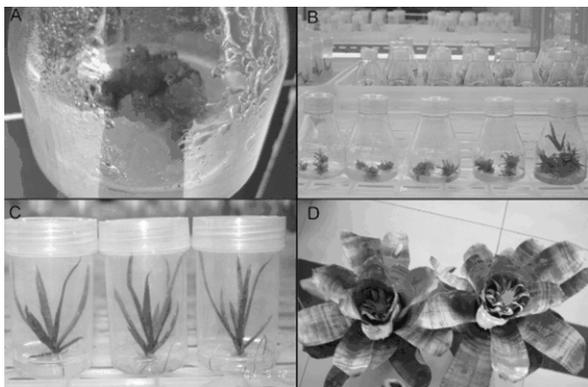
Note: *T*-test results show that the shoots propagation number has significant difference between B1 medium and the others ($P < 0.01$).

表 3 不同生长素及浓度对粉菠萝生根的影响

Table 3 Roots generation in different medium plus hormones

培养基编号 Medium number	根的生长状况 Roots growth situation		嫩茎的生长情况 Shoots Growth situation
	培养物生根百分率/% Root generation ratio	根的生长情况 Roots growth situation	
1	83.3	不定根 3~5 根, 生长较健壮	生长较慢, 叶稍有卷曲
2	96.7	不定根 5~8 根, 生长健壮	生长旺盛, 抽生快, 可得壮苗
3	73.3	不定根不甚发达细弱	生长慢, 苗矮小
4	76.7	不定根少而粗短	生长稍慢, 抽生不快

1: 1/2 MS+NAA0.1; 2: 1/2 MS+NAA0.5; 3: 1/2MS+IBA0.1; 4: 1/2MS+IBA0.2. $n=30$; 25 d 观察统计; $n=30$, observation for 25 days.



A. 诱导的愈伤组织; B. 丛生芽的分化过程; C. 生根培养; D. 开花的粉菠萝
A. Induced calli; B. Induced shoots; C. Induced roots; D. Flowering stage

图 1 不同时期的粉菠萝组培苗

Figure 1 *Aechmea fasciata* cv in different growth stages

2.3 生根培养

不同浓度激素对生根的影响研究表明, 与吲哚丁酸相比, 萘乙酸更有利于幼苗的不定根的形成(图 1C)。生根实验所有激素及浓度和其生长情况见表 3。

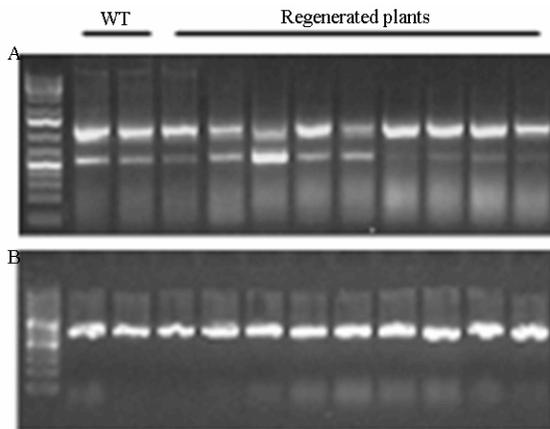
2.4 炼苗移栽

将生根培养 30~40 d、根长 1.5~2.5 cm、苗长 7~9 cm 的组培苗先于培养室无光处炼苗 2 d, 再移到温室炼苗 3 d。移植后 7 d 内, 叶面喷雾保湿, 使叶面相对湿度达 90% 左右。7~15 d 每日喷雾 3~4 次, 约 15 d 后新根长出即可成活, 移栽成活率达 95% 以上。待新根长出即可转入温室正常管理, 第 2 年即可开花(图 1D)。

2.5 再生苗的 PCR 分子鉴定

5srDNA 基因广泛用于亚物种分类的分子标

记^[8-10], 采用 5 s rDNA 引物, 对再生苗和原生苗基因组进行 PCR 扩增, 随机挑选的 9 棵再生苗与 2 棵原生苗对照, 结果表明扩增的条带大小一致, 没有在组培苗中发现多余的条带 (图 2A), 显示再生苗和对照的基因组没有明显的差别。为了进一步证实研究的可靠性, 扩增了 PPK 基因, PPK 是一个低拷贝的核基因, 编码着磷酸核酮糖激酶, 调节光合作用二氧化碳的吸收, 在不同菠萝亚种中, 基因的大小不一的特点, 用于菠萝的亚种分类^[11], 利用这一基因的引物进行 PCR 扩增, 结果显示新生苗与再生苗扩增结果一致 (图 2B)。表明通过组织培养所得的再生粉菠萝与亲本具有相同的基因型, 具有稳定遗传学特征, 组织培养是一种有效的再生手段。



WT: 野生型; Regenerated plants: 再生苗. A. 5 s rDNA 的 PCR 扩增产物; B. PPK 基因的 PCR 扩增产物

WT: Wild type; Regenerated plants: Plants regenerated from calli. A. PCR products of 5 s rDNA; B. PCR products of PPK

图 2 原生苗和再生苗基因组的 PCR 扩增

Figure 2 PCR amplification of genomic DNA between original plant and regenerated plants

3 讨论

粉菠萝是一种重要的观花植物, 具有良好的观赏性和经济学价值^[1], 然而由于其特殊的生物学特征, 导致不能大量生产。本研究利用不同培养基, 筛选出体细胞再生的组织培养方法, 建立了粉菠萝的再生体系, 为解决这生物学难题提供了积极的探索。通过组织培养的方法, 对不能产生种子的植株进行繁殖, 是现代生物技术的一种快速有效手段。

在组织培养过程中, 紫叶酢浆草的染色体结构

及 DNA 甲基化均发生改变^[7], 在水稻的组织培养中, DNA 甲基化也相应的减少^[12]。为了应证再生苗的 DNA 序列没有发生改变, 利用 PCR 技术, 利用特定引物对 5 s rDNA 和 PPK 基因进行扩增, 结果表明随机选择的组织苗, 相应的基因大小没有改变。现代分子生物技术, 被广泛应用于再生苗的检测中, 如杨树及粉菠萝的组织培养^[3-4], 通过 PCR 技术, 为再生苗的鉴定提供有效的分子证据。

参考文献:

- [1] 洪燕萍, 林顺权, 林庆良. 四种观赏凤梨的离体繁殖[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 63-68.
- [2] Vervaeke I, Parton E, Maena L, et al. Pre-fertilization barriers between different Bromelioideae[J]. Euphytica, 2001, 118: 91-97.
- [3] Feuser S, Meler K, Daquinta M, et al. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 72: 221-227.
- [4] Huang P L, Liao L J, Tsai C C, et al. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, 105:73-78.
- [5] 许早时. 粉菠萝组织培养与快速繁殖研究[J]. 安徽林业, 2007(4): 40.
- [6] 刘国民, 李传龙, 邱瑜. 粉菠萝组培快繁的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2005, 23(3): 250-256.
- [7] 许早时. 组织培养紫叶酢浆草 DNA 甲基化的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34 (4): 567-569.
- [8] Lachance M A, Daniel H M, Meyer W, et al. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4(3): 253-258.
- [9] Scorzetti G, Fell J W, Fonseca A, et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions[J]. FEMS Yeast Research, 2002, 2(4): 495-518.
- [10] 刘占林, 张大明, 王晓茹. 裸子植物 5S rRNA 基因序列变异及二级结构特征[J]. 遗传学报, 2003, 30(1): 88-96.
- [11] Schulte K, Barfuss M H, Zizka G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily[J]. Mol Phylogenet Evol, 2009, 51(2): 327-39.
- [12] Ding Y, Wang X, Su L, Zhai J, et al. SDG714, a histone H3K9 methyltransferase, is involved in Tos17 DNA methylation and transposition in rice[J]. Plant Cell, 2007, 19(1): 9-22.