

水花生愈伤组织的诱导及根的分化

袁 燕^{1,2} 生吉萍¹ 王捍东² 王宗元² 茹炳根¹

(1. 北京大学生命科学学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871;

2. 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009)

摘要: 在 1/2 MS 培养基上培养出水生花生的无菌苗, 然后将水花生不同器官的外植体接种在不同培养基和添加不同种类激素及其浓度配比的培养基中, 研究愈伤组织的诱导条件。结果表明: 茎、叶为适宜组培的器官, 苄基腺嘌呤 (BA)、萘乙酸 (NAA)、玉米素 (ZT)、吲哚乙酸 (IAA) 的几种对比对水花生茎和叶的愈伤组织诱导均产生良好效应, NAA 不变, 随 BA 浓度上升, 愈伤组织的诱导率上升。NAA/BA 的比值越大越有利于根的分化。

关键词: 水花生; 愈伤组织; 组织培养; 根分化

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)06-0622-07

水花生 (*Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb.), 苋科 (*Amaranthaceae*) 莲子草属 (*Alternanthera* Forsk) 中的一种, 俗名喜旱莲子草、革命草、空心苋, 多年生宿根性草本。水花生可作饲料和肥料, 是一种对某些环境胁迫有较强抗性的挺水植物^[1-3], 对垃圾污水具有较强的净化效果^[4, 5], 能够净化水体中的 N、P、Cl^[6], 对萘废水有较强的适应能力^[7], 并对重金属污染有一定的耐性。据报道, 水花生根、茎、叶中 Zn 含量可分别高达 1699.28mg/kg、1108.77mg/kg 和 753.08mg/kg, 根中 Mn 的含量达 1268.48mg/kg^[8], 对 Cu²⁺ 的耐受性明显比黑藻、水龙等苦草属和水车前属其他水生植物强, 对低浓度 Cu²⁺ (不大于 40mg/L) 显示了较强的抗性和净化能力^[2, 9]。利用水生植物净化污水中的重金属、有机磷农药、酚及其他有害污染物的研究国内外已有报道, 随着植物修复技术研究的深入及其植物基因工程的发展, 可通过对植物进行遗传工程改造, 在植物自身所具有的抗性基础上进一步提高其耐受力 and 富集能力, 用于环境污染的生物治理。因此, 水花生有可能在利用转基因植物进行环境治理方面发挥作用, 然而作为植物转基因研究的基础步骤, 有关水花生组织培养方面的研究尚未见报道。笔者以水花生不同器官作为外植体进行了愈伤组织诱导能力、愈

伤组织分化能力和生根能力等方面的研究, 为进一步的研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 无菌苗的培养 水花生取自江苏省扬州市郊区。取水花生植株, 流水冲洗干净, 留下长出腋芽的短缩茎段, 70% 乙醇中浸泡 60s, 后用 20% NaClO 10—20min 或 1% AgNO₃ 10—30min 或 0.1% HgCl₂ 1—10min 消毒处理, 无菌水洗 6 次, 1/2MS 培养基上培养, 生长成无菌苗, 同样取带腋芽的茎段无性繁殖, 形成无菌苗系统, 用作组织培养的起始材料。

1.2 愈伤组织的诱导及根的分化 在无菌条件下, 取水花生无菌苗的茎 (0.5—1cm)、叶 (0.5×1cm)、根尖 (0.5—1cm), 置于几种培养基及附加 BA、ZT、NAA、IAA 等激素的脱分化培养基上培养。每种处理 15 个以上外植体, 实验重复 3 次。

1.3 培养基及培养条件 培养基为 MS、1/2 MS、MS (1/2)、B₅ 4 种基本培养基, 1/2 MS 是指大量成分减半的 MS 培养基, MS (1/2) 是指大量、微量、铁盐、有机成分均减半的 MS 培养基, 4 种培养基均附加 2% 蔗糖, 0.9% 琼脂, 调 pH 为 5.8—6.0, 在 121℃ 和 1.1kg/cm² 的高温高压下灭菌 15—20min, 附加不同种类和不同浓度配比的激素: BA 0.5—5.0mg/L、ZT 0.5—

收稿日期: 2003-11-12; 修订日期: 2004-04-20

基金项目: “863” 项目 (863-103-21-09) 资助

作者简介: 袁 燕 (1979—), 女, 江苏省仪征市人; 硕士; 主要从事植物基因工程研究。张竞老师在工作中提出了宝贵意见, 特此致谢

通讯作者: 茹炳根, Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

4. 0mg/ L、NAA 0—0. 2mg/ L、IAA 0—0. 5mg/ L 等。
培养室温度为 25℃, 每天光照 16h, 光照强度为 1200—1500 lx。

2 结果

2.1 不同消毒处理对外植体的影响

对 3 种消毒剂处理的外植体培养 15d 后统计结果, 20% 的 NaClO 消毒 10—20min 无菌苗存活率平均在 10% 以下, 而染菌率高达 40%—50%。0. 1% HgCl₂ 和 1% AgNO₃ 的消毒效果见图 1、图 2。

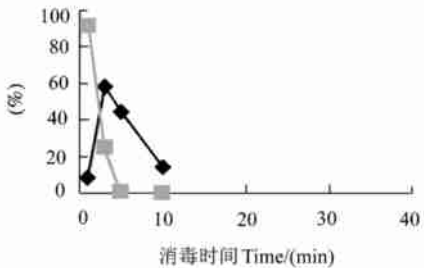


图 1 0. 1% HgCl₂ 不同时间消毒无菌苗存活率和染菌率

Fig. 1 The survival rate of aseptic seedlings and pollution rate of sterilization with 0. 1% HgCl₂ in different time

—◆—无菌苗存活率 —■—染菌率

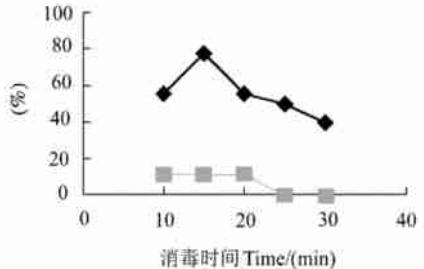


图 2 1% AgNO₃ 不同时间消毒无菌苗存活率和染菌率

Fig. 2 The survival rate of aseptic seedlings and pollution rate of sterilization with 1% AgNO₃ in different time

—◆—无菌苗存活率 —■—染菌率

从图 1 和图 2 可看出, 0. 1% HgCl₂, 消毒 3—5 min 时, 无菌苗存活率从 58. 3% 降至 44. 4%, 染菌

率从 25% 降至 0; 1% AgNO₃, 消毒 20—25min 时, 无菌苗存活率从 55. 6% 降至 50%, 染菌率从 11. 1% 降至 0。综合以上可以确定 0. 1% HgCl₂ 消毒 3—5min 或 1% AgNO₃ 消毒 20—25min 可杀死大多数微生物, 得到较多的无菌培养物。

2.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

将茎段分别接种在 MS、1/2 MS、MS(1/2)、B₅ 4 种培养基上, 附加相同浓度的 BA (2. 0mg/ L) 和 NAA (0. 05mg/ L), 结果见图 3, 表明 4 种培养基上总愈伤诱导率均达到 100%, 以 1/2 MS 诱导愈伤组织的效果最好, 两端愈伤率最高, 其次是 B₅、MS(1/2) 和 MS, 不同培养基之间稍有差别。

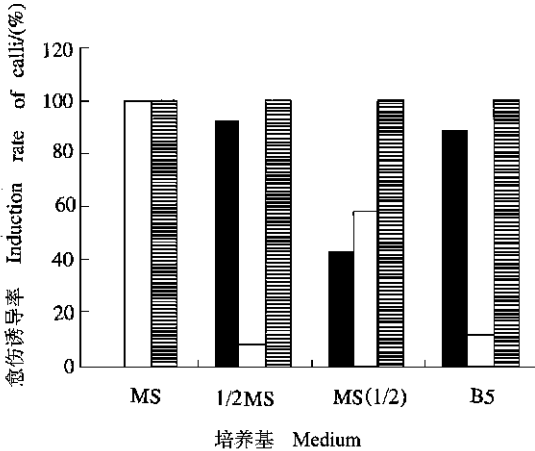


图 3 不同培养基对水花生愈伤组织诱导率的影响
Fig. 3 The induction rate of calli from *Alternanthera philoxeroides* in the different media

■两端愈伤率 □一端愈伤率 ▨总愈伤率

2.3 不同外源植物激素对比对诱导愈伤组织的影响

以 1/2MS 为基本培养基, 附加细胞分裂素 BA、ZT 和生长素 NAA、IAA, 研究了不同植物激素对比对茎、叶愈伤组织的影响, 结果见表 1、表 2。

2.3.1 BA 和 NAA 组合的诱导效果 茎和叶在不同浓度 BA 和 NAA 组合的培养基上接种 3d 后茎段开始膨大, 7d 左右形成愈伤组织, 诱导情况见表 1。BA 和 NAA 组合时, 愈伤组织诱导率均较高, 愈伤组织增长速度较快, 生长量较大, 呈青白色, 所有愈伤组织普

表 1 BA 和 NAA 组合对水花生茎和叶愈伤组织诱导率的影响

Tab. 1 Influence of different combination of BA and NAA on calli induction of the stem and leaf of *A. philoxeroides*

6 BA (mg/ L)	NAA (mg/ L)	茎段 Stem(%)				叶 Leaf(%)			
		总数(个)	两端愈伤 率	一端愈伤 率	总愈伤 率	总数(个)	两端愈伤 率	一端愈伤 率	总愈伤 率
0. 5	0	15	0	28. 6	28. 6	16	0	57. 1	57. 1
	0. 02	16	75	25	100	15	40	60	100

续表

6 BA (mg/ L)	NAA (mg/ L)	茎段 Stem(%)				叶 Leaf(%)			
		总数(个)	两端愈伤 率	一端愈伤 率	总愈伤 率	总数(个)	两端愈伤 率	一端愈伤 率	总愈伤 率
1.0	0.04	16	0	75	75	15	0	50	50
	0.1	18	55.6	44.4	100	18	0	50	50
	0.2	18	100	0	100	16	37.5	62.5	100
	0	20	0	75	75	15	33.3	66.7	100
	0.02	15	0	40	40	18	0	0	0
	0.04	18	22.2	55.6	77.8	22	36.4	1	37.4
2.0	0.1	18	100	0	100	16	80	20	100
	0.2	16	75	25	100	16	62.5	25	87.5
	0	16	0	100	100	17	80	20	100
	0.02	18	11.1	66.7	77.8	21	0	42.9	42.9
	0.04	15	0	80	80	16	0	0	0
	0.1	18	100	0	100	20	80	20	100
3.0	0.2	20	90	10	100	18	55.6	22.2	77.8
	0	15	0	100	100	17	0	87.5	87.5
	0.02	16	37.5	37.5	75	16	25	50	75
	0.04	18	0	100	100	16	0	50	50
	0.1	16	100	0	100	16	0	50	50
	0.2	20	100	0	100	20	90	10	100
4.0	0	17	0	100	100	15	0	58.3	58.3
	0.02	15	0	100	100	16	0	0	0
	0.04	20	0	100	100	20	20	20	40
	0.1	20	100	0	100	18	100	0	100
	0.2	18	100	0	100	20	90	10	100
	0	16	0	100	100	15	22.2	78.8	100
5.0	0.02	16	75	25	100	15	40	60	100
	0.04	15	100	0	100	15	60	40	100
	0.1	18	100	0	100	18	75	25	100
	0.2	16	100	0	100	18	55.6	33.3	88.9

遍较干燥, 松散性差, 无芽分化, 有些组合有根的分化。

由表 1 可知: 对于茎段, 无 NAA 时, 只有一端生成愈伤组织, 随 BA 浓度上升, 愈伤率上升, BA 高于 2.0mg/ L 时愈伤率达 100%。在有 NAA 的组合中, 两端不同程度有愈伤组织生成, 说明 NAA 有助于愈伤组织的形成。NAA 浓度较低时, 愈伤组织的诱导率低;BA 不变, 随 NAA 浓度上升愈伤组织的总诱导率和两端诱导率上升, 当 NAA 高于 0.1mg/ L 时总愈伤率均为 100%;NAA 不变, 随 BA 浓度上升, 愈伤组织的总诱导率和两端诱导率上升, BA 高于 4.0mg/ L 时总诱导率均为 100%, 但愈伤组织与培养基接触面易

于褐变。叶愈伤组织的诱导情况没有明显的规律性。

2.3.2 ZT 和 IAA 组合的效果 ZT 和 IAA 的各种组合中(表 2), 无 IAA 的激素组合茎段和叶外植体 5d 后膨大, 8d 左右开始形成愈伤; 而有 IAA 的激素组合外植体 5d 已从茎的一端形成愈伤, 10d 左右两端形成较多的愈伤组织, 说明 IAA 有利于其形成。有 IAA 的组合中, 对于茎段, IAA 为 0.25mg/ L 和 0.5mg/ L 时, BA 在 0.5—4.0mg/ L 之间总愈伤率均达 100%。叶愈伤组织的诱导情况没有明显的规律性。另外, 实验结果表明, 与 BA 和 NAA 组合相比, ZT 和 IAA 组合的培养基中, 愈伤组织生长速度相对慢得多, 生长量少, 呈深绿色, 无芽的分化。

表 2 ZT 和 IAA 组合对水花生茎和叶愈伤组织诱导率的影响
Tab. 2 Influence of different combination of ZT and IAA on calli induction of the stem and leaf of *A. philoxeroides*

ZT (ng/L)	IAA (mg/L)	茎段 Stem(%)				叶 Leaf(%)			
		总数(个)	两端愈伤 率	一端愈伤 率	总愈伤 率	总数(个)	两端愈伤 率	一端愈伤 率	总愈伤 率
0.5	0	56	1.8	50	51.8	28	7.1	92.9	100
1.0	0	20	0	75	75	15	33.3	54.4	87.7
2.0	0	15	0	75	75	16	27.3	63.7	91
4.0	0	58	5.2	94.8	100	22	90.9	9.1	100
0.5	0.25	15	93.7	6.3	100	16	100	0	100
1.0	0.25	24	41.7	58.3	100	19	10.5	89.5	100
2.0	0.25	40	27.5	72.5	100	27	94.1	5.9	100
4.0	0.25	15	100	0	100	16	100	0	100
0.5	0.5	17	100	0	100	15	100	0	100
1.0	0.5	15	33.3	66.7	100	15	53.7	27.3	81
2.0	0.5	16	66.7	33.3	100	15	63.7	0	63.7
4.0	0.5	15	100	0	100	15	80	0	80

由表 1、表 2 可以看出, 不同植物外源激素组合均有较高的愈伤组织诱导率。从实验结果还可知, 生长素和分裂素的不同组合, 在某一范围内要优越于单因子的作用。

2.4 不同外植体愈伤组织的诱导

将茎段、叶、根尖分别接种于相同培养基上, 茎段外植体接种 3d 后切口端开始膨大, 颜色变浅, 淡

白色, 水浸状, 7d 左右长出青白色愈伤组织, 叶接种后 3d 左右, 切口泛白, 然后长出青白色的愈伤组织, 一般先从叶脉处的切口生出, 培养一个月后统计结果。由表 1、表 2 和表 3 可知, 茎和叶的愈伤组织的诱导率均较高, 两者相比, 茎段所产生的愈伤组织较大而多, 茎段仍青, 叶所产生的愈伤组织较小, 且叶变枯黄, 未见根诱导出愈伤组织(图 4)。

表 3 水花生不同外植体愈伤组织的诱导频率
Tab. 3 The rates of calli induction from different explants of *A. philoxeroides*

外植体	总数(个)	愈伤率(%)		生长情况
		两端	一端	
茎段	40	82.5	17.5	愈伤大, 茎段仍青
叶	42	52.4	47.6	愈伤小, 叶枯黄
根	38	0	0	无变化

注: 培养基为 1/2 MS, 激素为 BA2mg/L, NAA0.05mg/L

2.5 外源植物激素对根分化的影响

由表 4 可知: 茎段在脱分化培养基上, 随着 NAA 与 BA 的比率从 20: 1 降至 1: 8, 根的分化率从 100% 降至 10%。BA 不变, 随 NAA 浓度上升, 不定根产生频率上升, 数量增多; NAA 不变, 随 BA 浓度上升, 不

定根产生频率下降, 数量减少。BA 与较高浓度的 NAA 结合使用, 对根的分化有利, 这说明, NAA 与 BA 的比率高, 有利于根的分化。叶外植体在 NAA 与 BA 较高比率的情况下(10—20)才有根的分化, 说明茎段比叶易于分化出根(图 4)。

表 4 外源植物激素对水花生根分化的影响
Tab. 4 Influence of exogenous phytohormone on rooting from *A. philoxeroides*

6-BA (ng/L)	NAA (mg/L)	茎			叶		
		总数(个)	发根率(%)	根数目(根)	总数(个)	发根率(%)	根数目(根)
0.1	0.1	30	25	2—3	33	0	0
	1.0	33	100	5—10	30	30	1—2
	2.0	32	100	10—30	31	77.8	10

续表

6 BA (mg/L)	NAA (mg/L)	茎			叶		
		总数(个)	发根率(%)	根数目(根)	总数(个)	发根率(%)	根数目(根)
0.2	0.05	28	0	0	26	0	0
	0.1	32	62.5	1—4	28	0	0
	0.2	27	88.9	2—8	31	0	0
0.4	0.05	28	10	1—2	34	0	0
	0.1	28	0	0	27	0	0
	0.2	33	36.4	2—3	29	0	0
0.6	0.05	27	0	0	32	0	0
	0.1	27	0	0	25	0	0
	0.2	27	77.8	1—2	28	0	0
1.0	0.05	30	0	0	31	0	0
	0.1	27	0	0	29	0	0
	0.2	30	10	2—3	27	0	0
2.0	0.05	31	0	0	25	0	0
	0.1	28	0	0	28	0	0
	0.2	35	0	0	30	0	0



图4 A. 水花生茎段愈伤组织诱导;B. 水花生叶愈伤组织诱导;C. 从茎段和愈伤组织上形成的根

Fig. 4 A. Induction of calli from stems of *A. philoxeroides*; B. Induction of calli from leaves of *A. philoxeroides*;
C. Roots from stems and calli of *A. philoxeroides*

3 讨论

植物组织培养中,外植体消毒的基本要求是既要杀死表面的全部微生物,使污染率降到最低,又要使外植体保持活力。因此,应当正确选择消毒剂的浓度和处理时间,以尽量减少组织的死亡。水花生带腋芽的短缩茎段表面具有纤毛,灭菌时极易在纤毛和溶液之间形成微小气泡而致使灭菌失败,引起污染。因此,在用 HgCl₂ 或 AgNO₃ 溶液灭菌前宜先将外植体在 70% 乙醇中浸泡,同时用镊子轻轻摇动外植体,以赶走附在其表面的小气泡。0.1% HgCl₂ 和

1% AgNO₃ 是较强的杀菌剂,分别在 10min、30min 内可有效地杀死附着在外植体表面的细菌, Hg²⁺ 和 Ag⁺ 的残留对外植体的毒害较大,因此,必须用无菌水彻底涮洗灭菌后的外植体,把残留量降低到最低限度。由本试验认为,对水花生外植体先用 70% 乙醇浸泡 60s,再以 0.1% HgCl₂ 消毒 3—5min 或 1% AgNO₃ 消毒 20—25min,无菌水洗 6 遍,能够取得令人较为满意的效果。

植物细胞分化是一个复杂的生理生化过程,在离体培养条件下,培养的材料由外植体自身的内源激素和培养基中添加的外源激素共同作用,诱导产

生愈伤组织, 实质上培养基中的外源激素是被植物吸收, 进入植物体内发挥作用。外植体愈伤组织的诱导与所用激素的种类、浓度及培养条件有关^[10-13]。在本试验所采用的 4 种基本培养基中, 以 1/2MS 对愈伤组织的诱导效果最佳, 两端愈伤率和总愈伤率较高; 水花生茎段和叶均能诱导出愈伤组织, 茎段与叶相比, 茎段愈伤组织数量较多, 生长量大, 且比叶易于分化出根, 是良好的组培材料。一般认为, 生长素促进细胞生长, 细胞分裂素促进细胞分裂。愈伤组织的形成, 是细胞不断分裂和生长的结果。在水花生愈伤组织的诱导过程中, 适量浓度的激素: BA 0.5—5.0mg/L, ZT 0.5—4.0mg/L, NAA 0—0.2mg/L, LAA 0—0.5mg/L 的各种组合均可启动外植体的脱分化过程, 导致叶和茎段愈伤组织的产生和增殖, 说明 BA、ZT、NAA、IAA 是诱导水花生叶和茎段愈伤组织形成的有效物质。根据 PIERIK^[14] 的研究, 细胞分裂素有促进细胞分裂和分化以及显著改变其他激素作用的特点。在本实验的激素组合中证明: 在生长素浓度(NAA、IAA) 相同的情况下, 施加较高浓度的分裂素(BA、ZT) 有利于水花生茎段愈伤组织的形成。谷瑞升等^[15] 认为: 植物离体培养过程中, 施用外源生长调节物质, 可以影响内源激素水平的变化。在烟草花枝外植体诱导花芽的培养中发现施用 IAA 可迅速提高内源 IAA 水平, 1d 后即可达到最高峰, 之后迅速下降; 施用 NAA 也表现出相同结果。IAA、NAA 水平在达到高峰后下降, 与其在植株体内的氧化分解有关。本文的实验结果也说明了这一点, 即添加适量的生长素有助于愈伤组织的形成。生长素与细胞分裂素配合使用时, 愈伤组织的诱导率明显高于单用细胞分裂素的处理, 生长势也有差异, 这一结果与赵洁等^[16] 的研究报道相同。在石刁柏、许智宏等^[17] 在烟草的组培中都得到与此相同的结果。而有关水花生愈伤组织再分化等问题则有待于进一步研究与探索。

参考文献:

- [1] Xia H P, Liu S Z, AO H X, Comparative study on salt resistance of *Vetiveria zizanioides*, *Paspalum notatum* and *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2000, 6(1): 7—17[夏汉平, 刘世忠, 敖惠修, 等. 香根草等三种植物的抗盐性比较. 应用与环境生物学报, 2000, (1): 7—17]
- [2] Yan S Z, Liang D, Peng X J. A research on the tolerance and purification ability of eight aquatic plants in heavy metal(Cu) contaminated sewage[J]. *China Environmental Science*, 1990, 10(3): 166—170[颜素珠, 梁东, 彭秀娟. 8 种水生植物对污水中重金属—铜的抗性 & 净化能力的探讨. 中国环境科学, 1990, 10(3): 166—170]
- [3] Li X B, He G Y, Wu Z B, *et al.* Studies on some phytosynthetic parameters and chilling resistant enzymes in *Eichhornia crassipes* and *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(4): 333—337[李学宝, 何光源, 吴振斌, 等. 凤眼莲、水花生若干光合作用参数与酶类的研究. 水生生物学报, 1995, 19(4): 333—337]
- [4] Xia H P, Q. L, Wang & G. H. Kong. Phyto toxicity of garbage leachates and effectiveness of plant purification for them [J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 1999, 23(4): 289—301[夏汉平, 王庆礼, 孔国辉. 垃圾污水的植物毒性和植物净化效果之研究. 植物生态学报, 1999, 23(4): 289—301]
- [5] Jia F Z, Xie P, Chen J L. Study of *alternanthera philoxeroides* for treating city sewage [J]. *Technology of Water Treatment*, 1998, 24(5): 308—310[贾凤芝, 谢平, 陈俊玲. 水花生对城市污水净化能力的研究. 水处理技术, 1998, 24(5): 308—310]
- [6] Xia H P. Uptake efficiency of *Vetiveria zizanioides* and *Alternanthera philoxeroides* to N, P, Cl in garbage leachates [J]. *Acta phytocologica Sinica*, 2000, 24(5): 613—616[夏汉平. 香根草和水花生对垃圾污水中 N、P、Cl 的吸收效果. 植物生态学报, 2000, 24(5): 613—616]
- [7] Liu J W, Lin F K, Wang Y. Study on purification ability of hydrophytes in Naphthalene contaminated water [J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2002, 21(7): 412—415[刘建武, 林逢凯, 王郁. 水生植物净化萘污水净化能力研究. 上海环境科学, 2002, 21(7): 412—415]
- [8] Guo S L, Huang C B, Bian Y. On absorption and accumulation of six heavy metal elements of six heavy metal elements of weeds in Jinhua suburb I Survey on content of six heavy metal elements in weeds and soil [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agriculture Science)*, 2002, 20(1): 22—29[郭水良, 黄朝表, 边媛. 金华市郊杂草对土壤重金属元素的吸收与富集作用(I)—6 种重金属元素在杂草和土壤中的含量分析. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(1): 22—29]
- [9] Zhou C F, Wu G R, Shi G X, *et al.* The role of antioxidant systems in Cu²⁺ Stress resistance in *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(4): 389—394[周长芳, 吴国荣, 施国新, 等. 水花生抗氧化系统在低 Cu²⁺ 胁迫中的作用. 植物学报, 2001, 43(4): 389—394]
- [10] Wang W J, Wang W F, Cao J J, *et al.* The induction of callus and plantlet regeneration from the leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Acta Bot. Boreo.-Occident. Sin*, 1998, 18(3): 401—405[王万军, 王文芳, 曹建军, 等. 小麦叶片愈伤组织及其再生植株的诱导. 西北植物学报, 1998, 18(3): 401—405]
- [11] Wemicke W, Mickovits L. Development of gradient in wheat leaves response of leaf segments in different genotypes cultured in vitro [J]. *Plant physiology*, 1984, 115: 49—58
- [12] Rajarskarank MB Kei. Endogenous growth regulators in leaves and tissue culture of *Pennisetum Purpureum scuum* [J]. *Plant Physiology*, 1987, 130: 13—25
- [13] Wemicke W, Mickovits L. Rates of take up and metabolism of include 3 acetic and 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid by cultured leaf segment

- at different stages of development in wheat[J]. *Plant Physiology*, 1987, **69**: 23—28
- [14] Pierik R. L. M. In vitro culture of Higher Plants[M]. Dordrech: Martinus Nijhoff Publishers, 1987, 187—229
- [15] Gu R S, Jiang X N, Guo Z C. Advances in the studies on the mechanism of plant organogenesis in vitro[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, **16**(3): 238—244[谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展. 植物学通报, 1999, **16**(3): 238—244]
- [16] Zhao J, Cheng J C. Effects of growth regulators on formation of callus, roots and bubs in *Asparagus officinalis* [J]. *Plant Physiology Communications*, 1991, **27**(4): 253—255[赵洁, 程井辰. 生长调节物质对石刁柏愈伤组织诱导及根芽分化的影响. 植物生理学通讯, 1991, **27**(4): 253—255]
- [17] Xu Z H, Wang X, Liu G Y. Studies on organogenesis in the culture of the leaf explant of *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Acta Phytophysiologia Sinica*, 1978, **4**(2): 177—182[许智宏, 王雄, 刘桂云. 烟草叶组织培养中器官形成的研究. 植物生理学报, 1978, **4**(2): 177—182]

CALLUS INDUCTION AND ROOT DIFFERENTIATION FROM *ALTERNANTHERA PHILOXEROIDES*

YUAN Yan^{1,2}, SHENG Ji Ping¹, WANG Han Dong²,
WANG Zong-Yuan² and RU Bing-Gen¹

(1. The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871; 2. College of Animal Science & Veterinary Medicine, YangZhou University, YangZhou 225009)

Abstract: With the development of modern industry and agriculture, a major problem faced by the modern world: environmental pollution. The lack of affordable, effective approaches to environmental remediation has created a major need for development of novel approaches. Plant have many endogenous genetic, biochemical, and physiological properties that make them ideal agents for soil and water remediation. Significant progress has been made in recent years in developing native or genetically modified plants for the remediation of environment contaminants. Improvement of plants by genetic engineering open up new possibilities for phytoremediation. Tissue culture is prerequisite to plant genetic engineering. *Alternanthera philoxeroides* may be useful in remediation of environmental pollutants by transgenic engineering. But there is no report on tissue culture of *Alternanthera philoxeroides*.

Alternanthera philoxeroides is dicotyledon. It was collected from the suburb of YangZhou in JiangSu Province. In this paper, it were studied that effect of NaClO, AgNO₃ and HgCl₂ solution to sterilization of *A. philoxeroides*. Contamination rate were from 40% to 50% and germination rate were below 10% after stems with axillary bud of *A. philoxeroides* were sterilized with 20% NaClO solution for 10—20 minutes. It was applicable to stems with axillary bud of *A. philoxeroides* to sterile with 1% AgNO₃ solution for 20—25 minutes. contamination rate of *A. philoxeroides* were from 11.1% to 0 and germination rate were from 55.6% to 50% or to sterile with 0.1% HgCl₂ solution for 3—5 minutes, contamination rate were from 25% to 0 and germination rate were from 58.3% to 44.4%. The results showed that the necessary time for killing bacteria contaminated in the tested material with 1% AgNO₃ was 20—25 minutes of with 0.1% HgCl₂ was 3—5 minutes.

This study examined the effects of explants, media and exogenous phytohormone on tissue culture of *Alternanthera philoxeroides*. The stems, leaves and roots were used as the explants to study tissue culture. Different basic media [MS, 1/2MS, MS(1/2), B₅], 0—0.5mg/L of indoleacetic acid(LAA), 0—0.2mg/L of naphthyl acetic acid(NAA), 0.5—5.0mg/L of 6-benzylaminopurine(6-BA) and 0.5—4.0mg/L of Zeatin(ZT) as additional compositions were used for inducing, differentiating and rooting tests. Induced results showed that 1/2 MS was more suitable for calli to grow and divide than B₅, MS(1/2) and MS. The stem and leaf of *Alternanthera philoxeroides* were suitable organs for tissue culture. Stem > leaf was observed on growth rate. The combinations of NAA and BA or IAA and ZT can induce calli of the stem and leaf of *Alternanthera philoxeroides*, and the rate of calli induction increases with the increase of BA concentration. The higher rate of NAA/BA, the more roots from the calli format.

It was thought that the results of this study could provide an useful basis for genetic transformation of *Alternanthera philoxeroides*.

Key words: *Alternanthera philoxeroides*; Callus; Tissue culture; Root differentiation