

6-BA 浓度对安祖花愈伤组织与试管苗生长重现性的影响

杨小玲¹, 杨少辉² (1. 天津市农业科学院, 天津 300192; 2. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072)

摘要 同一块安祖花愈伤组织长期连续继代于含有不同浓度 6-BA 的 4 种培养基中, 分析每代愈伤组织生长量、试管苗分化率及所分化试管苗大小, 结果表明: 不同培养批次间不同处理重现性较差。所以, 在筛选植物适宜培养基时, 应把握不同植物的适宜生长温度, 并采用多次连续继代培养的方法, 以增加结果的可靠性。

关键词 6-BA; 愈伤组织; 试管苗; 组培; 重现性

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)31-09888-02

Effects of BA Concentration on the Reproducibility of Callus and Test-tube Seedling of *Anthurium andraeanum* Lind

YANG Xiao-ling et al (Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300192)

Abstract The same callus of *Anthurium andraeanum* Lind were subcultured in 4 kinds of medium contained different concentrations of 6-BA to analyze the growth amount of callus, the differentiation rate of test-tube seedlings and the size of the differentiated seedlings of every generation. The result showed that the reproducibility of different treatments in different subculture times were worse. Therefore, for screening out the suitable plant medium, the optimum growth temperature of different plants should be mastered and the method of continuous and multi-time subculture should be used in order to improve the reliability of the results.

Key words 6-BA; Callus; Test-tube seedling; Tissue culture; Reproducibility

国内外报导了许多有关植物组织培养适宜培养基配方筛选的文章, 其适宜培养基配方均为一次性实验筛选的结果^[1-4]。对于同种植物, 不同文章所报导的适宜培养基配方不同^[5-9], 这说明组培重现性差。同时, 在植物组织培养中, 外植体均能经过长期继代产生数百株完整植株, 而每一次继代, 外植体生理状况发生不同程度的变化。外植体生理状况及培养条件的差异, 均能使同种培养基产生不同的结果, 从而导致重现性差。该试验采用安祖花的同一块愈伤组织在同种培养基中连续继代培养的方法, 分析连续继代中同种处理却产生不同试验结果的原因, 以期对组培筛选适宜培养基配方时提出可重复的试验方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料 选取亚历桑娜安祖花愈伤组织。该愈伤组织是由 MS + 0.10 mg/L NAA + 0.50 mg/L 6-BA 培养基诱导幼嫩叶片而产生。切净愈伤组织表面小芽点和突起, 留无芽点、质地紧密的愈伤组织块。

1.2 试验方法 将质地紧密的愈伤组织块平均分成 4 份, 称重 (G_1), 接种于 4 种不同处理的培养基中。基本培养基为 MS + 0.10 mg/L NAA + 30.00 g/L 白糖 + 7.00 g/L 琼脂粉 (pH 值 5.8~6.0)。4 种处理培养基中 6-BA 含量不同, 即处理① 0.25 mg/L 6-BA, 处理② 0.50 mg/L 6-BA; 处理③ 0.75 mg/L 6-BA, 处理④ 1.00 mg/L 6-BA。每个处理重复 18 次。愈伤组织置于温度随季节变化、但光照强度不变的培养室培养 75 d 后, 称重 (G_2), 然后切下每块愈伤组织分化的苗, 计算愈伤组织增长倍数和单苗重。

$$\text{增长倍数} = (G_2 - G_1) / G_1 \quad (1)$$

将切除苗的愈伤组织再次称重后继代于原来培养基中, 培养 75 d 后用相同的方法计算增长率和单苗重。然后, 每 75 d 采用相同的方法处理计算增长率和单苗重, 连续 6 次继代培养时间见表 1。

1.3 培养温度 培养温度由空调调节。但空调控温存在一定的局限性。培养温度变化情况见表 2。

表 1 连续 6 次继代培养时间

继代批次	培养开始时间	培养结束时间
1	2005-07-15	2005-09-30
2	2005-10-01	2005-12-15
3	2005-12-16	2006-02-28
4	2006-03-01	2006-05-15
5	2006-05-16	2006-07-30
6	2006-08-01	2006-10-15

表 2 不同月份培养温度

月份	不同月份培养温度		℃
	白天	黑夜	
1~2	20	16	
3~4	24	18	
5~6	28	23	
7~9	31	26	
10	26	20	
11	23	18	

1.4 数据处理 数据采用单因素多组群的方差分析法进行处理。

2 结果与分析

2.1 温度对试验重现性的影响 图 1 表明, 4 种处理连续 6 次继代培养, 愈伤组织增殖倍数变化趋势相同。5 月中下旬至 10 月中下旬愈伤组织生长快, 增长倍数在 2.00~7.25 倍; 11 月上旬至翌年 5 月上旬愈伤组织生长缓慢, 增殖倍数在 1.50~2.63 倍。产生这种差别的主要原因可能是由于培养温度的差异。

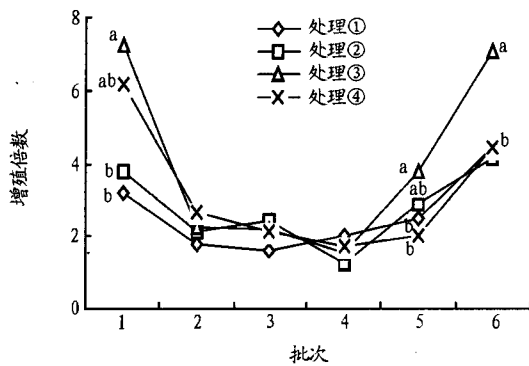
一些文章报导, 安祖花叶片愈伤组织诱导需要较高的细胞分裂素 (大于 1.00 mg/L 6-BA)。一旦愈伤组织形成, 就减少细胞分裂素含量, 有利于愈伤组织增殖和分化, 特别是随着继代数增加, 6-BA 浓度不应高于 0.20 mg/L 6-BA^[7]。试验表明, 5 月中下旬至 10 月中下旬, 培养室温度白天 26℃ 以上, 晚上 20℃ 以上, 6-BA 浓度为 0.75 mg/L 时, 愈伤增殖倍数最高, 分别为 7.25、3.82 和 7.06 倍, 与处理①和处理②相比, 达到 0.05 显著差异。这与一些文章所报导的适宜增殖培养基有一定的差距^[2,7]。11 月至翌年 5 月上旬, 培养室温度较低, 白天低于 25℃, 晚上低于 18℃, 4 种处理的愈伤组织增长倍数之间没有明显差异。由于培养温度的差异产

基金项目 天津市科技计划项目 (05YCFNC03000 和 07ZHTCC00800)。

作者简介 杨小玲 (1968-), 女, 福建建宁人, 副研究员, 从事植物组培与快繁技术的研究。

收稿日期 2007-06-06

生了 6-BA 增殖效应的差异,出现不同培养批次间显著性差异不同的结果。



注:不同大小写字母表示在 0.01、0.05 水平存在差异。下同。

图 1 6-BA 对愈伤生长的影响

2.2 影响试验重复性的其他因素 安祖花愈伤组织在含有细胞分裂素和生长素的培养基中培养一段时间后,较容易分化试管苗。经统计,4 次继代后每克愈伤组织分化的试管苗总数在 21.1~30.5 株,不同 6-BA 处理之间没有显著差异。但是,不同继代批次间试管苗分化情况不同。由图 2 可知,第 1 批次与第 3 批次,低浓度的 6-BA (≤ 0.5 mg/L) 在 0.05 水平显著促进愈伤组织分化试管苗,而第 2 批次与第 4 批次,各处理间愈伤组织的分化程度没有显著差异。由此可见,连续继代过程中,不同培养批次间 6-BA 对愈伤组织分化苗量的影响不同,重现性差。

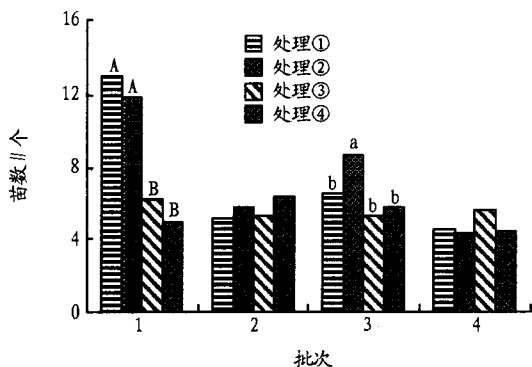


图 2 6-BA 对愈伤苗分化量的影响

愈伤组织分化试管苗的数量并不是越多越好。有些愈伤组织所分化的试管苗虽然很多,但苗小,苗与苗之间相互竞争,抑制生长。单苗重是衡量愈伤组织所分化苗的质量指标之一。经过长期的组培试验与苗移栽后生长状况观察,发现单苗重越高,脱离愈伤组织后,苗生长快而且移栽成活率高。

图 3 表明,6-BA 对试管苗单苗重的影响与 6-BA 对愈伤分化量的影响有类似之处,即第 1 批次与第 3 批次,不同处理间单苗重达到 0.05 显著差异,第 2 批次与第 4 批次各处理间单苗重没有显著差异。不同的是,第 1 批次虽然低浓度的 6-BA (≤ 0.50 mg/L) 在 0.05 水平显著地促进愈伤组织分化试管苗,但每株试管苗苗小,单苗重在 0.05 水平显著小于高浓度 6-BA 培养基中愈伤组织所分化试管苗的单苗重;而第 3 批次,6-BA 浓度对愈伤组织所分化的试管苗数量及单苗重的影响效果相同,即低浓度的 6-BA 不仅促进愈伤组织分化,且分化的试管苗单苗重在 0.05 水平显著大于高浓度 6-BA 培养基中愈伤组织所分化的试管苗。值得一提的

是,当 6-BA 浓度为 0.75 mg/L 时,每一批次愈伤分化量较稳定,且每次分化的试管苗单苗重均一。

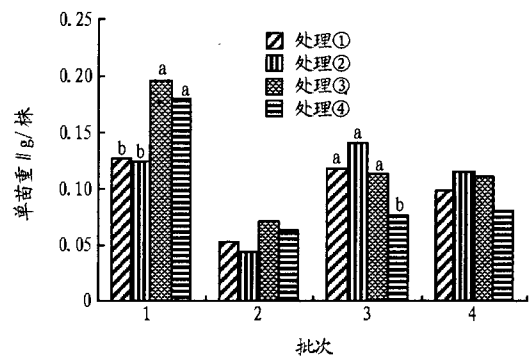


图 3 6-BA 对单苗重的影响

从不同批次试验数据可知,6-BA 对试管苗单苗重的影响效应也同样出现了重现性偏差。笔者认为造成这种现象的原因可能有 2 个。一是植物愈伤组织生长可能存在周期性,愈伤组织经历快速分化阶段之后会经历较慢的分化阶段。该试验愈伤组织所分化的试管苗单苗重出现大一小一大一小的生长趋势。二是继代初期愈伤组织内源激素含量较低。外源激素影响效应可能较好。随着继代次数增加,内源激素含量增加,外源激素的影响效应可能减弱。

3 讨论

(1) 温度自动调控的培养箱培养面积小、光照强度不均一、价格昂贵等因素限制了其在工厂化植物组织培养中的应用。国内许多科研及生产单位主要采用空调调控的培养室生产试管苗,然而空调控温有一定的局限性,往往无法满足生产所需的温度。从安祖花长期继代的试验中发现,每一批次 6-BA 对安祖花愈伤组织增长量的影响不同。培养温度低时,不同处理间没有明显差异;培养温度较高时,0.75 mg/L 的 6-BA 明显地促进愈伤组织增长。因此,试验结果随温度的变化出现了重现性偏差。建议组织培养试验过程中要把握好不同植物生长的最适温度,避免出现试验误差。

(2) 植物生长有昼夜和季节周期性。该周期性引起植物生长的快慢。植物组织培养中可能由于培养基含有调节植物生长的植物激素,且温、光等环境因素人为控制,试管苗生长的周期性表现不明显。

(3) 笔者在 6-BA 对安祖花愈伤组织分化程度及所分化试管苗单苗重的影响试验中发现,愈伤组织和试管苗的生长可能也存在周期性,但其周期性与自然界生长的植物周期性有所差别。植物组培周期性可能也是产生组培试验重现性偏差的原因之一。因此,建议筛选某种植物组织培养适宜培养基时,最好采用长期继代试验方法,提高试验的可重现性,避免因某一次试验产生的偶然性结果。

(4) 该试验表明,适宜的温度条件下 0.75 mg/L 6-BA 明显促进愈伤组织增殖与分化,每代所分化的试管苗大小较均一、整齐,是较适宜的细胞分裂素浓度。

参考文献

- [1] 李川,张盛林,高启国,等.火鹤不同品种组织培养研究[J].上海农业科技,2004(4):14-15.
- [2] 远凌威,袁正仿,张苏锋,等.安祖花的组织培养及快速繁殖研究[J].信阳师范学院:自然科学版,2004,17(3):338-340.
- [3] 何欢乐,阳静,蔡润,等.草莓茎尖培养快繁体系研究[J].上海交通大学学报:农业科学版,2003(21):61-65.

身所带的细菌所造成的污染,称为内生菌污染),造成表面消毒时间不易掌握所引起的。因此,对材料的选择也要仔细。为防止内生细菌的滋生,试验将外植体用洗衣粉清洗后,又放入500 mg/L的安素菌毒清试剂中消毒5 min。这种措施在一定程度上抑制了内生细菌的滋生,减少了后期污染。

(2)试验发现野百合鳞茎接种方位对诱导培养有较大影响,诱导能力依次是:内层>中层>外层,外层鳞片积累营养多,但出苗时间迟缓,可能与其处于休眠状态有关^[12]。内层的诱导能力较强,主要是由于内层存在更多的分生组织。而杭玲等(2001)^[13]对在龙牙百合的组织培养的研究和王刚等(2002)^[14]对兰州百合鳞片的组织培养研究认为,鳞片诱导芽的能力从强到弱依次为外层、中层、内层,这刚好与野百合的相反,可能是由于品种差异导致的。在研究不同的部位对鳞茎芽形成的影响时发现,不同部位鳞茎芽的形成差异很大,其鳞茎芽的形成能力依次是:基部>中部>上部,这与Robb(1957)^[15]发现鹿子百合的鳞片基部最易结鳞茎、中部较难分化及结鳞茎而上部不能结鳞茎的结论类似。同一鳞片的不同部位增殖系数不同,带基部的鳞片增殖系数最高,这可能是由于鳞片的分生组织在基部,分裂的细胞经伸长,分化直至成熟,由基部向后推进,距离基部愈远愈成熟。此外,整片的鳞茎有完好的基部,其形成鳞茎芽的能力也较大,因此,在野百合的繁殖过程中,整片或切取鳞茎的基部效果都差不多,但选取基部浪费的材料较少。

(3)试验结果表明,培养基的激素成分和配比也是影响野百合鳞茎芽形成的重要因素,野生百合在含有不同激素的培养基上形成不定芽的数量存在着差异。在MS添加6-BA 1.5 mg/L和NAA 0.5 mg/L组合的培养基上,其鳞茎的萌芽率最高,可以得到大量健壮的野生百合试管苗,是诱导野百合鳞茎芽较好的激素组合。在高浓度的激素组合中,发现诱导的鳞茎芽容易发生变异,产生变态苗,这可能与激素的生理特性有关。

(4)鳞茎芽的继代增殖培养的激素组合中,6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.05 mg/L比较好,虽然在单独使用NAA时,浓度在0.04 mg/L时繁殖系数也很高,但生长的苗比较矮小,

叶子的颜色呈黄褐色,同时也有大量的不定根产生。从苗的质量和增殖倍数两个方面考虑,以MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.05 mg/L作为继代培养基较好。在野百合的工厂化生产中,应适当控制激素的浓度,太高影响苗木质量,部分出现有轻微玻璃化现象和畸形苗;过低则影响繁殖系数。

参考文献

- [1] 王红霞.通江百合的组织培养[J].植物生理学通讯,2000(2):132-137.
- [2] MARINANGELI P A, HERNANDEZ L F, PELLEGRINI C P, et al. Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum* [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2003, 128(3): 324-329.
- [3] HARUKI K, YAMADA K, HOSOKI T, et al. Effects of sugar and temperature on the growth of miniature bulbs of *Lilium japonicum* Thunb cultured on a rotary shaker [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1996, 65(2): 363-371.
- [4] 龙雅宜, 张金政, 张兰年, 等. 百合——球根花卉之王 [M]. 北京: 金盾出版社, 1999.
- [5] 张延龙, 徐炎, 李峰, 等. 秦岭野百合鳞片植株再生体系的建立 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1315-1318.
- [6] 龙雅宜. 观赏植物种质资源与品种改良. 中国花卉科技二十年 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [7] 余朝秀, 关文灵. 野百合组织培养的研究 [J]. 西部林业科学, 2005, 34(2): 76-78.
- [8] LIRA S, SEON J H, PAEK K Y, et al. Development of pilotscale process for mass production of *Lilium* bulblet in vitro [J]. Acta Hort, 1998, 461: 237-241.
- [9] 黄家福, 陈振光. 百合快速繁殖条件的优化 [J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(2): 152-156.
- [10] 阮少宁, 杨华, 梁一池, 等. 香水百合组织培养的试验研究 [J]. 福建林学院学报, 2001, 21(2): 142-145.
- [11] 赵蓬晖, 张江涛, 马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策 [J]. 河南林业科技, 2001(2): 27-28.
- [12] 盛玉萍, 周琼, 何龙飞, 等. 百合试管苗的移栽对比试验 [J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(3): 187-189.
- [13] 杭玲, 苏宾, 陈丽新, 等. 龙牙百合组培快繁技术研究 [J]. 广西农业科学, 2001(4): 183-184.
- [14] 王刚, 杜捷, 李桂英, 等. 兰州百合和野百合组织培养及快速繁殖研究 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2002, 38(1): 69-71.
- [15] ROBB S M. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* [J]. Thun J Exp Bot, 1957, 8: 348-352.

(上接第9891页)

- [4] 牛西午, 詹海仙, 畅志坚, 等. 不同激素浓度对柠条茎段组织培养及植株再生的影响 [J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 35-37.
- [5] 浩仁塔本, 余伟荏. 安祖花的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(6): 133.
- [6] 高遐虹, 李梅. 安祖花叶片的离体培养 [J]. 北京农学院学报, 1995,

10(2): 35-37.

- [7] 夏时云, 麦瑜玲, 许继勇, 等. 提高红掌叶片愈伤组织诱导和植物分化及壮苗率的技术研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 45-48.
- [8] 蔡能, 易自力, 黄丽芳. 安祖花离体培养快速繁殖技术的优化 [J]. 中南林学院学报, 2005, 25(3): 85-88.
- [9] 赵博生, 刘涛. 安祖花组织培养快繁技术研究 [J]. 淄博学院学报: 自然科学与工程版, 2000, 2(3): 68-70.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率), 单位名缩略语 IIRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时), 则可取各主要词首字母写成缩写, 但需在第一次出现处写出全称, 表及图中则用注解形式在下方注明, 以便读者理解。