

文章编号:1000-8551(2008)03-300-04

# 安祖花愈伤组织诱导及其分化的正交试验设计

宋英今<sup>1</sup> 季静<sup>1</sup> 刘海学<sup>2</sup> 王罡<sup>1</sup> 杨少辉<sup>1</sup> 王洁华<sup>1</sup>

(1. 天津大学农业与生物工程学院,天津 300072; 2. 天津农学院教务处,天津 300384)

**摘要:**用正交设计法研究了不同激素处理及不同外植体对安祖花愈伤组织诱导及分化的影响。结果表明,在本试验设计中,外植体是诱导安祖花愈伤组织的主要因素;以茎段为外植体诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS + 1.0mg/L NAA + 2.0mg/L 6-BA;愈伤组织不定芽诱导的主要因素是 6-BA;不定芽诱导分化的最佳培养基为 1/2MS + 0.5mg/L 2,4-D + 1.0mg/L 6-BA。

**关键词:**安祖花;正交设计;组织培养

## CALLUS INDUCTION AND DIFFERENTIATION IN *Anthurium Andraeanum* BY ORTHOGONAL DESIGN

SONG Ying-Jin JI Jing LIU Hai-xue WANG Gang YANG Shao-hui WANG Jie-hua

(1. Agriculture and Biology Engineering College, Tianjin University, Tianjin 300072;

2. Dean's Office, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

**Abstract:** Effects of various plant growth substances and different explants on callus induction and callus differentiation in *Anthurium andraeanum* were studied by orthogonal design statistic analysis. The results indicated that the main factor which influenced callus induction was explant, the optimal medium for callus induction was MS + 1.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA. The results also showed that the main factor which influenced callus differentiation was 6-BA and the optimal medium for callus differentiation was 1/2MS + 0.5mg/L 2, 4-D + 1.0 mg/L 6-BA.

**Key words:** *Anthurium andraeanum*; orthogonal design; tissue culture

安祖花(*Anthurium andraeanum*)是天南星科安祖花属,多年生常绿草本植物,又名红掌、火鹤花、花烛、大叶花烛、台灯花<sup>[1]</sup>。1896年由法国著名植物学家 Elouard Andr 自哥伦比亚西南部的热带雨林引种到欧洲,1983年由荷兰引入中国。安祖花是仅次于热带兰的第二大热带花卉,为多年生常绿草本植物,肉穗花序,具红色、粉红色、白色及五彩色的蜡纸佛焰苞。花朵鲜艳夺目,是热带观花类的代表;叶片有天鹅绒的金属光泽,又是相当珍贵的观叶植物<sup>[2]</sup>。安祖花一般以分株繁殖为主,偶尔也用扦插等方法繁殖,但速度很慢<sup>[3]</sup>,目前国外主要是用组织培养法进行繁殖<sup>[4,5]</sup>,国内的种苗也主要是来自国外的组培苗,为了满足安祖花的市场需求,国内许多学者对其快繁进行了大量的

研究<sup>[6-8]</sup>,但存在诱导率较低的问题<sup>[9,10]</sup>。本研究旨在利用正交试验设计与数据分析方法通过改进离体培养条件加速安祖花种苗的生产,以满足国内花卉市场的需求。此外,该组织培养体系的建立也为农杆菌介导的遗传转化<sup>[11,12]</sup>提供前提条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试安祖花由本实验室保存,品种为亚特兰大(Atlanta)。

### 1.2 试验设计与统计方法

对安祖花愈伤组织和不定芽诱导采用  $L_9(3^4)$  正交

收稿日期:2007-07-30 接受日期:2007-10-10

基金项目:农业科技成果转化与推广项目(04260);天津市科技发展计划项目(06YFGZNC01700);科技部农业科技成果转化资金项目(2006GB2A100013)。

作者简介:宋英今(1972-),女,吉林省长白县,博士,讲师,主要从事分子生物学研究。Tel:022-87401878;E-mail:songyingjin@yahoo.com.cn

通讯作者:季静(1965-),女,吉林省长春市,教授,主要从事植物基因工程研究。Tel:022-87402200;E-mail:jjingjtdx@163.com

表进行2个正交设计,每个设计安排组织9次试验。因子水平安排见表1、表2。其中E为NAA,F为6-BA,G为外植体,k为2,4-D,L为6-BA,M为基本培养基。每组接种20瓶,每瓶接种7块外植体。根据正交设计表,共9个处理,每处理重复3次。接种后30d,统计愈伤组织诱导率。愈伤组织的诱导率为产生愈伤组织的外植体块数占接种外植体总块数的百分率。将诱导后逐渐膨大的愈伤组织切成小块,在分化培养基中诱导不定芽。接种后35d左右,统计愈伤组织不定芽诱导分化率。分化率为分化出器官的愈伤组织块数占接种愈伤组织总块数的百分率。统计分析方法运用SPSS13.0软件进行正交设计和方差分析。

表1  $L^9(3^4)$ 愈伤组织诱导正交试验设计

Table 1 Design of orthogonal test  $L_9(3^4)$  for callus induction

水平 level	激素 hormone(mg/L)		G(外植体) explant
	E(NAA)	F(6-BA)	
1	0.5	0.5	叶片 leave
2	1.0	1.0	叶柄 petiole
3	1.5	2.0	茎段 stem segment

表2  $L_9(3^4)$ 不定芽诱导正交试验设计

Table 2 Design of orthogonal test  $L_9(3^4)$  for adventitious induction

水平 level	激素 hormone(mg/L)		M(培养基) medium
	K(2, 4-D)	L(6-BA)	
1	0	0.5	MS
2	0.1	1.0	1/2MS
3	0.5	1.5	1/3MS

### 1.3 接种方法和培养条件

MS为基本培养基,附加3%蔗糖、0.8%琼脂,pH为5.8~6.0。在无菌条件下取组培苗叶片、叶柄、去叶片后的茎小段进行愈伤组织诱导,28℃,光照1600lx,每天光照14-16h。

## 2 结果与分析

### 2.1 安祖花愈伤组织的诱导

外植体种类,NAA和6-BA浓度对愈伤组织诱导的影响(图1、图2、图3)结果见表3。经方差分析表明:不同外植体、不同NAA和6-BA浓度之间愈伤组织诱导率都存在极显著的差异( $P < 0.01$ )。就外植体、NAA和6-BA浓度对愈伤诱导率的影响进一步进行分析(表4)可知,1.0mg/L NAA水平下的愈伤组织诱导率极显著高于0.5和1.5mg/L水平,说明NAA浓度过高或过低都不利于愈伤组织的产生;浓度为2.0mg/L 6-BA的愈伤组织诱导率极显著高于1.0和0.5mg/L 6-BA;茎段的愈伤组织诱导率极显著高于叶片和叶柄。由于因素内水平极差(R)的大小能够说明该因素对试验结果的影响程度,因此由表4经计算便得到参试3因素NAA、6-BA、外植体的极差分别为39.6、18.1、53.3,因此,对安祖花愈伤组织诱导率影响的主次关系归纳为 $G > E > F$ ,即依次是外植体、NAA和6-BA,根据各因素水平的大小,可得到最优水平组合为: $E_2F_3G_3$ 。

表3 愈伤组织诱导的 $L_9(3^4)$ 正交试验方案与结果

Table 3 Plan and result of  $L_9(3^4)$  orthogonal design test for callus induction of *Anthurium*

序号 No.	因素 factors			愈伤诱导率 frequency of callus(%)
	E(NAA)	F(6-BA)	G 外植体 explant	
1	0.5	0.5	1	37.5
2	0.5	1.0	2	11.7
3	0.5	2.0	3	78.9
4	1.0	0.5	2	35.1
5	1.0	1.0	3	93.7
6	1.0	2.0	1	81.8
7	1.5	0.5	3	47.2
8	1.5	1.0	1	31.4
9	1.5	2.0	2	13.3

表4 外植体、NAA及6-BA浓度对愈伤组织诱导率的差异显著性测验

Table 4 The significance test for frequency of callus induced with NAA, 6-BA and explant

因素 factors		愈伤诱导率 frequency of callus(%)	显著性 significance								
E(mg/L)	F(mg/L)		E		F		G				
	G	E	F	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01		
1.0	2.0	茎段 stem segment	70.2	58.0	73.3	a	A	a	A	a	A
0.5	1.0	叶片 leave	42.7	45.6	50.2	b	B	b	B	b	B
1.5	0.5	叶柄 petiole	30.6	39.9	20.0	c	C	c	B	c	C

注:E为NAA,F为6-BA,G为外植体。Note:E means NAA,F means 6-BA,G means explant.

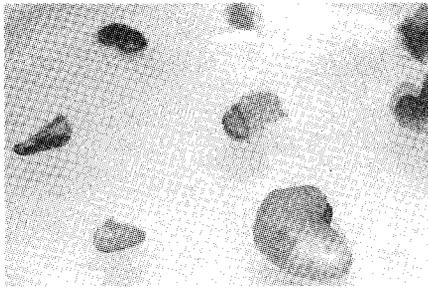


图1 安祖花叶诱导的愈伤

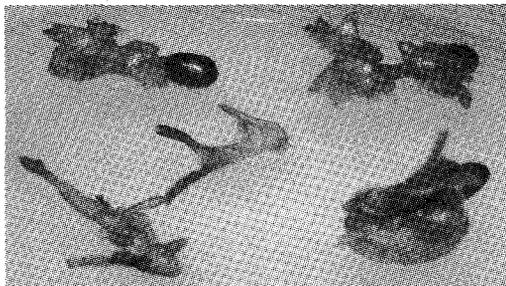
Fig.1 Callus formed from the leaves of *Anthuriur*

图2 安祖花茎段诱导的愈伤

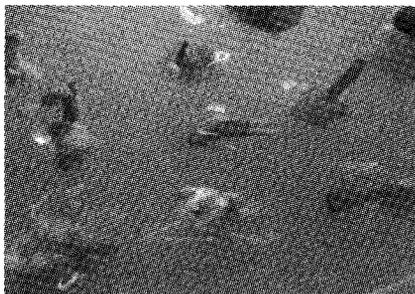
Fig.2 Callus formed from the stem segments of *Anthurium*

图3 安祖花叶柄诱导的愈伤

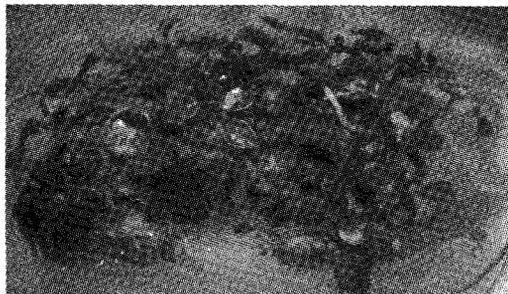
Fig.3 Callus formed from the petiole of *Anthurium*

图4 安祖花的分化

Fig.4 Adventitious bud of *Anthurium*

## 2.2 安祖花不定芽的诱导

以茎段愈伤组织为材料进行了MS基本培养基、2,4-D和6-BA浓度对安祖花不定芽诱导的影响试验(图4),其愈伤组织的不定芽诱导结果见表5。方差分析表明:不同MS基本培养基、不同2,4-D和不同6-BA浓度之间不定芽诱导率都存在极显著差异( $P < 0.01$ )。进一步就MS基本培养基、2,4-D和6-BA浓度对不定芽诱导率的影响进行分析(表6)可知,浓度为0.1mg/L 2,4-D的不定芽诱导率极显著高于0.5和0.0mg/L,说明2,4-D浓度过高或不添加都不利于不定芽的产生;1.0mg/L 6-BA的不定芽诱导率极显著高于1.5和0.5mg/L 6-BA;1/2MS基本培养基的不定芽诱导率极显著高于MS和1/3MS基本培养基。由于因素内水平极差(R)的大小能够说明该因素对试验结果的影响程度,由表6经计算便得到参试3因素2,4-D、6-BA和MS基本培养基的极差分别为25.2、11.4、28.2,因此,对安祖花不定芽诱导率影响的主次关系归纳为 $M > K > L$ ,即依次是MS基本培养基、2,4-D和6-BA,根据各因素水平的大小,可得到最优水平组合为: $K_3L_2M_2$ 。

表5 不定芽诱导 $L_9(3^4)$ 正交试验方案与结果Table 5 Plan and result of  $L_9(3^4)$  orthogonal design test for adventitious induction of *Anthurium*

序号 No.	因素 factors			不定芽诱导率 frequency of adventitious (%)
	K(2,4-D) (mg/L)	L(6-BA) (mg/L)	M(MS)	
1	0	0.5	1	48.9
2	0	1.0	2	84.1
3	0	1.5	3	46.9
4	0.1	0.5	2	97.5
5	0.1	1.0	3	81.4
6	0.1	1.5	1	76.8
7	0.5	0.5	3	57.5
8	0.5	1.0	1	72.8
9	0.5	1.5	2	88.7

注:K为2,4-D,L为6-BA,M为基本培养基。

Note:K means 2,4-D,L means 6-BA,M means medium. The same as follow.

## 3 讨论

### 3.1 茎段是安祖花种苗生产的理想受体

国内有使用盆栽苗叶片<sup>[13-16]</sup>、叶柄<sup>[14-16]</sup>、茎尖<sup>[17]</sup>、嫩茎切段<sup>[15-18]</sup>诱导安祖花愈伤组织的报道,国外在1975年便有成功诱导愈伤组织的报道<sup>[19]</sup>,本研究使用组培苗茎段诱导不定芽获得了较高愈伤组织和不定芽诱导率,值得注意的是,愈伤组织产生的部位是在叶柄与茎段的交界处,而不是其他部位。

表 6 基本培养基、2,4-D 及 6-BA 浓度对不定芽诱导率的差异显著性测验

Table 6 The significance test for frequency of adventitious induced with

因素 factors			愈伤诱导率 frequency of callus(%)			显著性 significance					
E(mg/L)	F(mg/L)	G	E	F	G	E		F		G	
						0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01
0.1	1.0	2(1/2MS)	85.2	79.4	90.1	a	A	a	A	a	A
0.5	1.5	1(MS)	73.0	70.8	66.2	b	B	b	B	b	B
0	0.5	3(1/3MS)	60.0	68.0	61.9	c	C	c	B	c	B

注:K 为 2,4-D,L 为 6-BA,M 为基本培养基。

Note:K means 2,4-D,L means 6-BA,M means medium.

### 3.2 培养基对愈伤组织和不定芽诱导率的影响

植物的细胞分化是一个复杂的生理生化过程,大量的试验表明,植物激素的种类、浓度以及它们之间的组合,将影响着愈伤组织的诱导、分化和生根。本研究中组培苗茎段诱导愈伤的最佳培养基为 MS + 1.0mg/L NAA + 2.0mg/L 6-BA,这与姚丽鹃等人<sup>[15]</sup>阐述的使用盆栽苗叶片诱导时 6-BA 和 NAA 的配合使用才有利于愈伤组织诱导的报道相一致,另外,也有研究者单独使用 6-BA 以及 2,4-D 和 6-BA 配合使用<sup>[18,19]</sup>进行愈伤组织诱导,可见愈伤组织诱导过程中 6-BA 是不可缺少的激素。1/2MS 比 MS 不定芽诱导率高,这一点和张桂和<sup>[18]</sup>的研究结果一致。但是,有的研究者用盆栽苗茎段作为外植体时,使用改良 MS(即调整大量元素的用量和配比)作为营养元素其不定芽诱导率高于 1/2MS<sup>[19]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 穆 鼎. 鲜切花周年生产. 北京:中国农业科技出版社, 1997, 183 ~ 192
- [2] 洪惠泽. 火鹤鸟的观赏和栽培. 武汉:花木盆景, 1995, (2):10
- [3] 北京市花卉研究所. 室内花卉 - 新引进的国外观叶植物. 北京:中国经济出版社, 1989, 128 ~ 130
- [4] Pierik R L M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lind. in liquid media. Neth J Agric Sci, 1975, 23(4):299 ~ 302
- [5] Piefik R L M. Anthurium plantlets from callus tissues cultivated in vitro. Physiol Plant, 1976, 37(1):80 ~ 82
- [6] 毛荣森, 张启明, 莫汗坤. 花烛的组织培养. 植物生理学通讯, 1991, 27(6):43
- [7] 岑益群, 蒋如敏, 邓志龙, 倪德祥. 安祖花离体增殖的形态发生与理化因子效应. 园艺学报, 1993, 20(2):187 ~ 192
- [8] 高遐虹, 李 梅. 安祖花叶片的离体培养. 北京农学院学报, 1995, 9(2):35 ~ 38
- [9] 李志芳, 叶 秦, 赵贵林, 曾绮玲, 黄定华, 刘仕康. 花烛的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 1997, 33(3):197.
- [10] 肖三元, 梁国平. 红掌的组织培养及快速繁殖. 云南热作科技, 2000, 23(2):12 ~ 13.
- [11] Chen F C, Kuehnl A R, Sugi N. Anthurium root for micropropagation and Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer. Plant Cell tissue Organ cult, 1997, 49(1):71 ~ 74
- [12] 贾永芳, 李名扬. 安祖花研究进展. 江苏林业科技, 2002, 29(4):43 ~ 45
- [13] 潘学峰, 潘 梅, 烘世军. 红掌叶片愈伤组织的诱导与植株再生. 海南大学学报自然科学版, 2000, 18(2):144 ~ 149
- [14] 岑益群, 蒋如敏. 安祖花离体增殖的形态发生与理化因子效应. 园艺学报, 1993, 20(2):187 ~ 192
- [15] 姚丽鹃, 徐晓薇, 陈香雪. 安祖花的组织培养和快速繁殖. 浙江农业科学, 2004, (4):190 ~ 192
- [16] 远凌威, 袁正仿, 张苏锋. 安祖花的组织培养及快速繁殖研究. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2004, 17(3):338 ~ 340
- [17] 浩仁塔本, 余伟莅. 安祖花的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 1995, (6):433
- [18] 张桂和, 徐碧玉, 彭存智, 陆 璐. 安祖花茎段培养与离体繁殖. 上海农业学报, 2001, 17(3):13 ~ 16
- [19] Pierik R L M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lind. in liquid media. Neth J Agric Sci, 1975, 23(4):299 ~ 302