

培养基和植物激素对非洲菊叶片愈伤组织诱导的研究^{*}

张素勤¹, 邹志荣¹, 耿广东¹, 吴正景²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 园林系, 河南 洛阳 471003)

[摘 要] 为了完善非洲菊组培快繁体系和推动非洲菊种苗工厂化生产, 本试验以非洲菊叶片为外植体, 对影响非洲菊愈伤组织诱导的基本培养基、激素种类及其浓度等关键因素进行了研究。结果表明, 基本培养基以MS诱导愈伤组织效果最好, 诱导率可达78.3%; 2, 4-D比NAA和BA能够较快地诱导叶片产生愈伤组织, 其中以1.0 mg/L 2, 4-D诱导率最高, 可达100%, 且形成愈伤组织多; 6-BA诱导愈伤组织的效果优于KT和TDZ, 2.0 mg/L 6-BA的诱导率为89.7%; 叶片在6-BA 2.5 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L培养基上愈伤组织诱导率最高, 诱导出的愈伤组织生长快, 并可分化出不定芽。

[关键词] 非洲菊; 叶片; 培养基; 植物激素; 组织培养

[中图分类号] S682.1+10.4+3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)10-0029-04

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)为菊科扶郎花属多年生常绿草本植物, 又称“扶郎花”, 为世界著名切花^[1], 可采用分株、播种和组织培养等多种方式进行繁殖。但非洲菊种子寿命很短, 发芽率极低^[2], 而分株繁殖速度缓慢, 因此, 采用组织培养技术迅速获得大量优质、无病毒的种苗对生产具有重要意义。

有关非洲菊组织培养的报道多以花托为外植体^[1, 3-5], 以茎尖^[6, 7]、子房^[8]和无菌种子萌发的幼苗^[9, 10]为外植体的也有报道。以花托为外植体时, 芽发生的速度缓慢。以茎尖为外植体时, 剥取较大的茎尖常会导致严重污染, 剥取较小的茎尖则不易成活。本试验拟以非洲菊叶片为外植体, 对影响愈伤组织诱导的基本培养基、激素种类及其浓度等因子进行了研究, 探索一条高效的组培快繁新方法, 以期推动非洲菊种苗的工厂化生产, 并为通过基因转化等生物技术手段进行非洲菊育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 外植体准备

非洲菊叶片于2000-09~2002-02取自陕西杨凌新天地设施农业有限公司的连栋温室, 以非洲菊植株上部还未完全展开的幼嫩叶片为试材。叶片取下后用自来水反复冲洗, 然后用毛刷蘸洗洁精洗1

遍后用自来水冲洗干净, 再用体积分数70%乙醇消毒15 s, 用无菌水冲洗2次, 用质量分数0.1%的升汞消毒8 min, 随后用无菌水反复冲洗3~5次, 然后在超净工作台上将叶片切成4 mm × 4 mm的方块接种到预先配好的培养基中。每处理接种10个三角瓶, 每瓶接3块外植体, 试验重复3次。

1.2 筛选基本培养基

在MS, ER, SH, B₅和N₆5种基本培养基中均加入2.0 mg/L 6-BA和0.5 mg/L NAA, 再附加30 g/L蔗糖, 6 g/L琼脂和300 mg/L水解酪蛋白(CH), 用1 mol/L盐酸或1 mol/L氢氧化钠溶液调节培养基pH值至5.8, 观察愈伤组织的生长情况。

1.3 生长素和细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

以MS为基本培养基(下同), 生长素选用2, 4-D, NAA和BA, 其质量浓度均设为0.5, 1.0和1.5 mg/L; 细胞分裂素选用6-BA, KT和TDZ, 其中6-BA和KT的质量浓度均设为1.0, 2.0和3.0 mg/L, TDZ的质量浓度设为0.1, 0.3和0.5 mg/L; 并设空白对照。

1.4 6-BA与2, 4-D, NAA组合对愈伤组织诱导的影响

采用正交设计, 6-BA质量浓度设为1.5, 2.0和2.5 mg/L, 2, 4-D质量浓度设为0.5, 1.0和1.5

^{*} [收稿日期] 2003-08-26

[基金项目] 陕西省“十五”科技攻关项目(99K04-G7)

[作者简介] 张素勤(1974-), 女, 河南太康人, 在读博士, 主要从事设施园艺研究。

mg/L, NAA 质量浓度设为 0, 0.2 和 0.4 mg/L。

1.5 培养条件

培养室温度 (24 ± 1) , 光照强度 1 500~2 000 lx, 光照时间 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 培养基类型对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可见, 不同培养基对愈伤组织的诱导效

果不同, 其中以 MS 基本培养基诱导愈伤组织的效果最好; 而在 ER, SH, B₅ 和 N₆ 培养基上, 叶片逐渐干枯死亡, 不能诱导出愈伤组织。MS 培养基与 ER, SH, B₅ 和 N₆ 培养基相比, 其氨态氮和硝态氮含量以及 NH₄⁺/NO₃⁻ 比值都高于后 4 种培养基, 这可能是 MS 培养基诱导非洲菊叶片产生愈伤组织效果最好的原因。

表 1 不同类型培养基对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different media on callus induction of leaves

培养基 Media	诱导率/% Induction rate	诱导效果 Induction effect
MS	78.3	叶片浓绿, 膨大, 2 周后产生黄绿色愈伤组织 Leaves were deep green and swelled Light green calli appeared after 2 weeks
ER	0	1 周后 30% 叶片黄化, 4 周后叶片干枯死亡 30% of leaves etiolated after 1 week Leaves blasted after 4 weeks
SH	0	1 周后 80% 叶片黄化, 3 周后叶片干枯死亡 80% of leaves etiolated after 1 week Leaves blasted after 3 weeks
B ₅	0	1 周后 10% 叶片黄化, 4 周后叶片干枯死亡 10% of leaves etiolated after 1 week Leaves blasted after 4 weeks
N ₆	0	1 周后 90% 叶片黄化, 3 周后叶片干枯死亡 90% of leaves etiolated after 1 week Leaves blasted after 3 weeks

2.2 生长素对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可以看出, 2, 4-D 能够较快地诱导叶片产生淡绿色米粒状的愈伤组织, 诱导率最高, 形成的愈伤组织量最多。NAA 诱导愈伤组织所需时间较长, 当 NAA 为 0.5 mg/L 时, 诱导出愈伤组织需要 26 d。NAA 诱导产生的愈伤组织量少, 而且愈伤组织生长慢, 为暗绿色米粒状。BA 不能诱导产生愈伤

组织, 叶片接种 2 周后逐渐变褐死亡。2, 4-D 和 NAA 诱导产生愈伤组织的部位也不同, 前者在切口表面和外植体上表面形成, 后者则在切口表面和外植体下表面形成。诱导愈伤组织因生长素种类不同, 所需浓度也不同。2, 4-D 以 1.0 mg/L 诱导效果最好, 浓度升高, 产生的愈伤组织量减少, 而浓度降低, 诱导率则下降。

表 2 2, 4-D, NAA 和 BA 对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of 2, 4-D, NAA and BA on callus induction of leaves

生长素种类 Auxin	质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	形成时间/d Time to form calli	诱导率/% Induction rate	形成部位 Where to form	颜色和形状 Color and form
2, 4-D	0.5	15	95.2	切口, 上表面 Cut, top surface	淡绿色, 米粒状 Light green, grain shape
2, 4-D	1.0	15	100	切口, 上表面 Cut, top surface	淡绿色, 米粒状 Light green, grain shape
2, 4-D	1.5	13	94.3	切口, 上表面 Cut, top surface	淡绿色, 米粒状 Light green, grain shape
NAA	0.5	26	67.4	切口, 下表面 Cut, bottom surface	暗绿色, 米粒状 Dark green, grain shape
NAA	1.0	22	54.8	切口, 下表面 Cut, bottom surface	暗绿色, 米粒状 Dark green, grain shape
NAA	1.5	22	41.9	切口, 下表面 Cut, bottom surface	暗绿色, 米粒状 Dark green, grain shape
BA	0.5		0		
BA	1.0		0		
BA	1.5		0		
CK	0		0		

注: 6-BA 浓度均为 2.0 mg/L。

Note: 6-BA concentration is 2.0 mg/L in all treatments

2.3 细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

由表 3 可见, 6-BA 对叶片愈伤组织诱导率最高, 颜色为绿色, 且质地紧密。KT 对愈伤组织的诱

导率略低于 6-BA。从诱导出愈伤组织所需的时间和诱导率来看, 6-BA 和 KT 分别以质量浓度为 2.0 mg/L 和 3.0 mg/L 为好。TDZ 和对照不能诱导出

愈伤组织, 培养 16 d 时外植体上长出白色短粗的根, 随着时间延长, 叶片开始变黄, 最后干枯死亡。

2.4 6-BA 与 2, 4-D, NAA 组合对愈伤组织诱导的影响

由表 4 可见, 6-BA 与 2, 4-D 和 NAA 组合均能诱导叶片产生愈伤组织。在 6-BA 2.5 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L 培养基上产生的愈

伤组织为黄绿色, 诱导率达到 100%, 且这些愈伤组织长势旺, 生长快。在 6-BA 2.0 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L 培养基上, 愈伤组织诱导率最低, 仅为 58.7%, 在此培养基上产生的淡黄色愈伤组织的量也少。不加任何生长素和细胞分裂素的对照, 叶片未膨大, 不能产生愈伤组织, 在接种 7 d 后逐渐变黄, 最终干枯死亡。

表 3 6-BA, KT 和 TDZ 对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of 6-BA, KT and TDZ on callus induction of leaves

细胞分裂素 Cytokinins	质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	形成时间/d Time to form calli	诱导率/% Induction rate	形成部位 Where to form	颜色和形状 Color and form
6-BA	1.0	19	63.5	切口, 底部 Cut, bottom	绿色, 米粒状 Green, grain shape
	2.0	19	89.7	切口, 底部 Cut, bottom	绿色, 米粒状 Green, grain shape
	3.0	17	67.4	切口, 底部 Cut, bottom	绿色, 米粒状 Green, grain shape
KT	1.0	21	46.9	切口 Cut	淡黄色, 小米粒状 Light green, small grain shape
	2.0	18	58.2	切口 Cut	淡黄色, 小米粒状 Light green, small grain shape
	3.0	16	59.1	切口 Cut	淡黄色, 小米粒状 Light green, small grain shape
TDZ	0.1		0		
	0.3		0		
	0.5		0		
CK	0		0		

注: NAA 浓度均为 0.5 mg/L。
Note: NAA concentration is 0.5 mg/L in all treatments

表 4 6-BA 和 2, 4-D, NAA 组合对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of combinations of 6-BA with 2, 4-D and NAA on callus induction of leaves

6-BA/ (mg · L ⁻¹)	2, 4-D/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	诱导率/% Induction rate	愈伤组织的量 Amount of calli
1.5	0.5	0.2	64.1	+
1.5	1.0	0	70.9	+
1.5	1.5	0.4	73.2	+
2.0	0.5	0	58.7	+
2.0	1.0	0.4	69.3	+
2.0	1.5	0.2	81.0	+
2.5	0.5	0.4	100	++
2.5	1.0	0.2	80.4	++
2.5	1.5	0	83.7	+
0	0	0	0	

注: “+”和“++”分别表示愈伤组织的量, 后者大于前者。
Note: “+” and “++” indicate the amount of calli, and the latter is larger

3 结果与讨论

基本培养基能保证培养物的生存和最低生理活动的需要, 非洲菊叶片在 MS 基本培养基上诱导愈伤组织的效果最好, 其原因可能是非洲菊愈伤组织诱导需要较高的氨态氮和硝态氮, 这与前人的研究结果是一致的^[5, 11~13]。

前人多用非洲菊的花托进行组织培养^[1, 3~5], 本试验以非洲菊叶片为外植体, 这样不但易于灭菌, 且材料丰富, 取材不受植株生长时期的限制。非洲菊叶片对激素种类和浓度的反应差别甚大, 2, 4-D 诱导叶片愈伤组织的作用显著, NAA 诱导效果大幅度下降, 而 BA 则完全不能诱导出愈伤组织。目前国内还未见到用 2, 4-D 诱导非洲菊愈伤组织的报

道。非洲菊叶片在 $6\text{-BA } 2.5\text{ mg/L} + 2,4\text{-D } 0.5\text{ mg/L} + \text{NAA } 0.4\text{ mg/L}$ 培养基上愈伤组织诱导率最高,愈伤组织质量高,可以分化出不定芽。

[参考文献]

- [1] 张文珠,林德钦,李梅.非洲菊的快繁技术研究[J].福建农业科技,2002,(1):17-18
- [2] 唐前瑞,谭艳云,于晖.多效唑对非洲菊试管苗的影响[J].湖南农业大学学报,1996,22(1):29-32
- [3] 裘文达.利用菊花花瓣组织培养获得新类型(初报)[J].浙江农业大学学报,1983,9(3):243-246
- [4] 刘丽君,顾迎春.切花菊组织培养及移栽[J].农业科技通讯,1998,(11):17
- [5] 鲁雪华,郭文杰,林勇.几种因素对非洲菊离体培养再生植株的影响[J].植物生理学通讯,1999,35(5):372-374
- [6] 王玉芹,王喜军.非洲菊的组织培养[J].中国林副特产,2000,(2):25
- [7] Murashige T. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture[J]. Hort Sci, 1974, 9: 175-176
- [8] Miyoshi K, A sakura N. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(1): 1-5
- [9] 余显荣,李艳,罗晓玲.非洲菊组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,1999,35(3):208-209
- [10] 王晓红,谭晓风,石明旺.非洲菊 F_1 的组织培养[J].中南林学院学报,2003,23(5):45-48
- [11] 管和.菊花花托培养生成植株时细胞组织学研究[J].植物学报,1981,23(5):355-357
- [12] 黄济明.几种花卉的组织培养[J].植物生理学通讯,1983,(3):45-46
- [13] 刘伟,张明鹏.微型盆菊商品生产技术研究[J].园艺学报,1996,23(3):269-273

Effects of media and plant hormones on callus induction of gerbera leaves *in vitro*

ZHANG Su-qin¹, ZOU Zhi-rong¹, GENG Guang-dong¹, WU Zheng-jing²

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Gardening, Henan Sci-Tech University, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: The effects of the basic media, the types and concentrations of plant hormones on callus induction of gerbera leaves were studied in order to develop the gerbera tissue culture system and drive its young plants industrialization. The results showed that MS medium was the best on callus induction, induction rate was 78.3%; 2,4-D was faster on callus induction than NAA and BA, thereinto, the medium of $1.0\text{ mg/L } 2,4\text{-D}$ was the highest, its induction rate was 100%, and leaves formed more callus. 6-BA had better effect than KT and TDZ, the induction effect of $2.0\text{ mg/L } 6\text{-BA}$ was 89.7%. Leaves had the highest induction rate of callus on the medium of $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.5\text{ mg/L} + 2,4\text{-D } 0.5\text{ mg/L} + \text{NAA } 0.4\text{ mg/L}$. These calli grew fast. Adventitious buds could be obtained from these calli quite well.

Key words: gerbera; leaf; medium; plant hormone; tissue culture