TDZ对仙客来不同外植体再生的影响*

周连霞[1], 马锋旺[1], 陈登文[2], 秦静远[2], 程瑞红[1]
(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;
2 杨凌职业技术学院 农学系, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 在无菌条件下培养仙客来种子, 并以无菌萌发植株的子叶节、子叶、叶片及叶柄为外植体进行芽分化诱导。试验结果表明, 不同浓度TDZ对各外植体的诱导效果不同, 用子叶节、子叶、叶片及叶柄均可诱导出再生芽, 但以叶片为材料的诱导效果最佳, 其中1.0 mg/L TDZ对叶片再生芽的诱导效果最好, 而子叶以0.5 mg/L TDZ、子叶节和叶柄以0.2 mg/L TDZ诱导再生芽的效果较好。

[关键词] 仙客来; TDZ; 外植体; 植株再生
[中图分类号] S682.2+62.04+7 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)04-0039-04

仙客来(*Cyclamen persicum* Mill.)别名萝卜海棠、一品冠、兔耳花[1], 为报春花科仙客来属球茎花卉。仙客来叶片浓绿美丽、花型独特多彩, 花期长达4~5个月, 且在百花凋零的冬季盛开, 因此是圣诞节、春节期间的观赏佳品。仙客来通常以种子繁殖, 但利用种子繁殖不仅速度慢, 且品种的优良特性易退化, 而通过组织培养繁殖则可避免上述问题。迄今为止, 国内外虽有仙客来再生的报道[2-4], 但芽的再生率低, 一般直接再生率在50%以下。因此, 仙客来的组织培养苗生产尚未进入商品化阶段。TDZ(Thidiazuron, 噻重氮苯基脲)是一种人工合成的苯基脲衍生物, 能有效诱导多种离体材料的再生[5]。本试验对仙客来优良品种的种子在无菌条件下进行培养, 并以无菌苗为材料, 研究了TDZ对仙客来不同外植体再生的效果, 旨在为仙客来的遗传转化奠定基础, 并为以组织培养方式大规模快速繁殖仙客来优良品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

试材为天津园林科学研究所培育的仙客来品种"鲜红1011"的种子。

1.2 方 法

1.2.1 种子的无菌萌发 在超净工作台上将仙客来种子用体积分数70%的酒精浸泡30 s, 再用1 g/L的升汞浸泡8 min, 然后用无菌水冲洗5~6遍, 最后浸于无菌水中, 14 h后在无菌条件下接种于1/2 MS(大量元素减半的MS培养基)培养基中。培养基内附加蔗糖30 g/L, 琼脂6 g/L, pH为5.8~5.9。将接种好的材料置于黑暗及温度为15~18 ℃的培养箱中培养[6]。

1.2.2 再生芽诱导 以无菌萌发植株的子叶节、子叶、叶片及叶柄为材料, 将叶片、子叶切成0.5 cm×0.5 cm的方块, 每一方块中背部划几刀, 背面朝向培养基放置; 叶柄、子叶节切成0.5 cm长的小段, 平放在培养基上。再生培养基选用MS基本培养基, 附加0.2 mg/L的NAA和不同浓度的TDZ, 另附加蔗糖30 g/L, 琼脂6 g/L, 将pH值调至5.8~5.9, 每处理7瓶, 接种28~42个外植体。接种后进行10 d左右的遮光处理[7], 然后转入光照培养箱中, 培养温度20~22 ℃, 光照1 500~2 000 lx, 45 d后统计其分化情况。再生频率计算公式如下:

再生频率/% = (再生出不定芽的外植体数/接种的总外植体数)×100%。

1.2.3 数据处理方法 试验数据均采用邓肯氏多重比较。

2 结果与分析

2.1 TDZ对仙客来子叶节再生的影响

由表1可知, 在培养基中附加0.2 mg/L NAA的条件下, 不同浓度TDZ对仙客来子叶节的再生影响差异显著, 其中以0.2 mg/L TDZ的再生效果最

* [收稿日期] 2005-08-10
[基金项目] 教育部留学回国人员科研基金(2003-14); 西北农林科技大学"拔尖人才支持计划"
[作者简介] 周连霞(1979-), 女, 黑龙江海伦人, 在读硕士, 主要从事花卉生理与生物技术研究。
[通讯作者] 马锋旺(1964-), 男, 山东汶上人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事园艺植物抗性生理与生物技术改良研究。E-mail: fwm64@sina.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

好,其再生频率和再生芽数均显著高于其他浓度。随着TDZ浓度升至0.5mg/L,仙客来子叶节的再生频率和再生芽数下降;当浓度达到1.0mg/L时,再生频率和再生芽数再次升高,但诱导的芽子质量差,玻璃化现象较为严重。

表1 不同浓度TDZ对仙客来子叶节再生芽的影响

Table 1 Effect of TDZ concentration on bud regeneration of *Cyclamen persicum* from hypocotyl

TDZ浓度/(mg·L⁻¹) TDZ concentration	接种数 No. of explant	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud No. per explant
0.2	42	100	68.5 a	8.4 a
0.5	37	100	36.2 c	3.9 c
1.0	36	100	51.1 b	5.7 b
1.5	40	100	49.8 b	5.4 b

注:同列数据后标有不同字母者表示在5%水平上差异显著。下表同。

Note: The different letters in each column indicated the significant difference at 5% level. The following tables are the same.

2.2 TDZ对仙客来子叶再生的影响

由表2可知,不同浓度的TDZ对仙客来子叶再生的影响不同,其中以0.5mg/L TDZ的再生效果最好,再生频率和再生芽数均最高,且再生频率与1.0和1.5mg/L TDZ间差异显著,再生芽数与0.2和1.5mg/L TDZ间差异显著。随着TDZ浓度继续升高,再生频率和再生芽数呈下降趋势,且诱导的芽子生长不良,畸形苗和玻璃化现象较为严重。

表2 不同浓度TDZ对仙客来子叶再生芽的影响

Table 2 Effect of TDZ concentration on bud regeneration of *Cyclamen persicum* from cotyledon

TDZ浓度/(mg·L⁻¹) TDZ concentration	接种数 No. of explant	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud no. per explant
0.2	38	100	21.1 a	2.1 b
0.5	29	100	23.6 a	3.5 a
1.0	36	100	10.7 b	3.2 a
1.5	30	100	6.2 b	1.4 c

2.3 TDZ对仙客来叶片再生的影响

由表3可以看出,不同浓度的TDZ对仙客来叶片再生的影响显著,随着TDZ浓度升高,仙客来叶片再生频率和再生芽数呈递增趋势,当浓度达1.0mg/L时,叶片再生芽的诱导效果最好,其再生频率可达92.3%,每一外植体再生芽数高达16.2个。但浓度达1.5mg/L则无芽的分化,仅有黄绿色的愈伤组织生成。

表3 不同浓度TDZ对仙客来叶片再生芽的影响

Table 3 Effect of TDZ concentration on bud regeneration of *Cyclamen persicum* from leaf

TDZ浓度/(mg·L⁻¹) TDZ concentration	接种数 No. of explant	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callu	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud no. per explant
0.2	32	100	56.4 c	6.4 c
0.5	35	100	68.3 b	11.9 b
1.0	28	100	92.3 a	16.2 a
1.5	32	100	0 d	0 d

2.4 TDZ对仙客来叶柄再生的影响

由表4可知,TDZ对仙客来叶柄再生的影响以浓度为0.2mg/L时效果最好,其再生频率和再生芽数均显著高于其他浓度。随着TDZ浓度升高,仙客来叶柄再生频率和再生芽数呈下降趋势,且诱导的芽子质量差,叶柄粗壮,叶片卷曲。

表4 不同浓度TDZ对仙客来叶柄再生芽的影响

Table 4 Effect of TDZ concentration on bud regeneration of *Cyclamen persicum* from petiole

TDZ浓度/(mg·L⁻¹) TDZ concentration	接种数 No. of explant	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud no. per explant
0.2	29	100	53.2 a	6.7 a
0.5	33	100	35.3 b	3.3 b
1.0	37	100	24.0 c	1.4 c
1.5	30	100	14.3 d	0.8 c

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5　不同仙客来外植体诱导再生芽的差异

由表5可以看出, 外植体不同, 其最适的TDZ 浓度亦不同, 较高浓度的TDZ 会抑制子叶节和叶柄的再生, 但可促进叶片的再生。不同外植体的诱导再生效果差异显著, 其诱导效果依次为叶片> 子叶节> 叶柄> 子叶, 其中叶片的再生频率可达92.3%, 每一外植体再生芽数高达16.2个。子叶节、子叶、叶柄虽然也能再生出芽, 但再生频率和再生芽数显著低于叶片, 且再生出的芽褐化现象较严重。

表5　不同仙客来外植体诱导再生芽的差异

Table 5　Effect of explant type on bud regeneration of *Cyclamen persicum*

外植体类型 Explant type	适宜的TDZ 浓度/(mg·L^{-1}) Suitable concentration of TDZ	再生频率/% Regeneration frequency	再生芽数 Bud no. per explant
子叶节 Hypocotyl	0.2	68.5 b	8.4 b
子叶 Cotyledon	0.5	23.6 d	3.5 c
叶片 Leaf	1.0	92.3 a	16.2 a
叶柄 Petiole	0.2	53.2 c	6.7 b

3　讨　论

本研究结果表明, 不同浓度TDZ 对仙客来不同外植体再生芽的诱导效果差异显著, TDZ 浓度为0.2 mg/L 时对子叶节和叶柄再生芽的诱导效果最好, 在浓度为0.5 mg/L 时对子叶再生芽的诱导效果最好, 而叶片则以1.0 mg/L TDZ 再生芽的诱导效果最好。Karam 等[8]的研究表明, TDZ 在0.22 mg/L 时对仙客来叶片的再生诱导效果最好, 这与本试验结果差异较大。据报道, TDZ 对各种外植体芽的再生诱导效果好[9-10], 但浓度大时易玻璃化和畸形[11]。国内研究者在仙客来组培试验中所用的细胞分裂素多以6-BA 为主, 但再生频率和再生数量较低[12-14]。笔者在试验中也曾以不同浓度的6-BA 对不同外植体诱导再生, 但外植体材料大部分褐化死去, 未获得再生芽, 这与Karam 等[15]的试验结果一致。造成这种结果的原因可能与品种的基因型有关, 可见不同的仙客来品种对激素的种类和浓度要求不同。

在试验过程中还发现, 仙客来叶片、子叶、子叶节和叶柄的部位不同, 其诱导再生效果亦不同, 其中叶片(子叶)基部带有中脉接近叶柄(子叶节)处分化芽较早, 并且再生频率高, 数量较多, 易分化成苗; 叶片(子叶)中部分化芽较晚, 较难成苗, 再生频率较低, 数量也少; 叶片(子叶)外部、尖部不能分化芽。子叶节(叶柄)上部易分化芽, 中部次之, 下部基本不分化, 这与Karam 等[15]和李会宁[16]的报道一致。这种现象应与组织的发育程度和物质积累等有关。

仙客来诱导再生的芽以5种类型存在[17], 并依外观形状和特征分为: 类型1. 不定芽芽点; 类型2. 多芽球茎; 类型3. 愈伤组织上着生的多芽新梢; 类型4. 单芽球茎; 类型5. 愈伤组织上着生的片状结构, 其上边缘裂开呈多芽状, 称之为叶片状芽丛。本试验观察发现, 子叶节多分化多芽球茎, 易成苗; 叶片多分化不定芽芽点, 成苗能力次之; 各种外植体愈伤组织再生器官以多芽新梢为主, 但成苗难。

试验中还发现, 所获得的再生芽在含TDZ 的培养基上不能生根, 仙客来生根适宜的培养基为1/2 MS+ 0.5 mg/L IBA, 生根率为60%。如何提高生根率还需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 康黎芳, 王云山. 仙客来[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[2] Dillen W, Dijkstra I, Oud J. Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill[J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 545-548.

[3] Ando T, Murasaki K. *In vitro* propagation of cyclamen by the use of etiolated petioles[J]. Technical Bulletin of the Faculty of Horticulture, Chiba University, 1983, 32: 1-5.

[4] 侯喜林. 仙客来实生黄化叶柄培养的研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(1): 81-86.

[5] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227-237.

[6] 林　艳, 王春荣, 毕　君, 等. 仙客来种子的无菌萌发及再生芽诱导[J]. 河北林业科技, 2003(2): 3-4.

[7] 庞基良, 林　波, 梁海曼. 激素、光照对仙客来叶片愈伤组织诱导、分化及试管苗生长的影响[J]. 园艺学报, 1994, 21(1): 103-104.

[8] Karam N S, Al-Majathoub M. Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill using seedling tissue[J]. Scientia Horticulturae, 2000, 86: 235-246.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[9] Geier T. Morphogenesis and plant regeneration from culture organ fragments of *Cyclamen persicum* [J]. Acta Hort, 1977, 78: 167-174.

[10] Bretagne B, Chupeau M, Chupeau Y, et al. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source[J]. Plant Cell Rep, 1994, 14: 120-124.

[11] Huetteman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody pant tissue culture[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1993, 33: 105-119.

[12] 周光蓉, 任雅君. 仙客来快速繁殖技术研究[J]. 北方园艺, 2003(1): 34-35.

[13] 周余华, 葛晋刚. 仙客来组培技术优化研究[J]. 江苏农业科学, 2003(5): 69-70.

[14] 曲复宁, 龚雪琴, 由翠荣, 等. 利用仙客来种苗组培快繁建立单株无性系的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(3): 81-87.

[15] Karam N S, Al-Majathoub M. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill[J]. Scientia Horticulturae, 2000, 86: 323-333.

[16] 李会宁. 仙客来的离体无性试管繁殖研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 21-23.

[17] 曲复宁, 由翠荣, 龚雪琴, 等. 仙客来组织培养中再生器官类型及增殖稳定性比较[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 559-564.

Effect of TDZ on bud regeneration from different explants in *Cyclamen persicum*

ZHOU Lian-xia[1], MA Feng-wang[1], CHEN Deng-wen[2], QIN Jing-yuan[2], CHENG Rui-hong[1]

(1 *College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;

2 *Department of Agronomy, Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: Bud regeneration of *Cyclamen persicum* was studied by using aseptic seedling's hypocotyls, cotyledon, leaf and petiole from the seeds. The results showed that thidiazuron (TDZ) concentration and explant type significantly affected bud regeneration. Bud formation was observed in media containing TDZ regardless of explant type and the highest percentage of bud formation and bud number was obtained when cultured on media containing 1.0 mg/L TDZ from leaf explant. The high percentage of bud regeneration was obtained from cotyledon explants cultured on media supplemented with 0.5 mg/L, and both hypocotyls and petiole with 0.2 mg/L TDZ.

Key words: *Cyclamen persicum*; thidiazuron; explant; regeneration

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net