

两种不同花色矮牵牛快繁体系的建立

李海权, 石少华, 苏一兰, 夏伟婕, 李建粤*

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 为了建立紫红花和紫花矮牵牛诱导不定芽途径, 以这两种矮牵牛为材料, 在 MS 基本培养基基础上, 添加不同浓度的 6-BA 和 IBA 激素, 共设计了 9 种培养基组合, 对两种花色矮牵牛叶片进行快繁研究. 试验结果表明: 不同品种矮牵牛快繁的激素组合是有差异的, 紫红花矮牵牛叶片诱导不定芽的最适培养基为 MS + 1.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IBA, 紫花矮牵牛叶片诱导不定芽最适培养基为 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA. 为今后以紫红花和紫花矮牵牛为受体进行遗传转化获得转基因植株的无性快繁建立有效再生体系.

关键词: 紫红花矮牵牛; 紫花矮牵牛; 叶片; 不定芽; 快繁体系

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2008)02-0189-05

0 引言

矮牵牛又名碧冬茄, 属茄科, 矮牵牛属, 草本花卉, 原产于南非, 由野生种杂交培育而成, 花色丰富多彩, 有红、白、紫、蓝等, 是常用的花坛布置或盆栽室内装饰布置、立体装饰的主要花卉. 如今, 由于在城市绿化所用植物种类中, 花卉的比重越来越大, 矮牵牛的市场需求量将有可能持续上升.

植物组织培养以其繁殖系数大、繁殖周期短、有利保持亲本性状、成本较低、可周年进行生产等优点, 为在较短时间内大量生产花卉植物, 满足市场需求提供了可能. 近年来, 尽管人们利用植物组织培养技术对矮牵牛进行快繁研究已有较多报道, 但大多采用 MS 为基本培养基, 附加不同浓度 6-BA 和 NAA, 通过诱导愈伤组织分化不定芽获得再生植株^[1-6].

利用组织培养技术对植物进行快繁, 通常可将外植体直接诱导形成不定芽, 或先诱导愈伤组织再分化产生不定芽两种途径. 陶妹英等人^[7]曾以白花矮牵牛叶片作为外植体, 研究了不同浓度的激素配比对叶片直接诱导不定芽、诱导愈伤组织分化不定芽的影响, 得到了最适的直接诱导不定芽培养基组成为: MS + 6-BA 1.5mg/L + IBA 0.5mg/L, 诱导愈伤组织分化不定芽的培养基组成是: MS + 6-BA 1.5mg/L + NAA 0.3~0.5 mg/L, 并认为直接诱导的不定芽比诱导愈伤组织分化的不定芽, 所需的快繁时间短, 且不定芽长势好、生根也快. 目前, 利用 MS + 6-BA 和 IBA 组合对彩色矮牵牛叶片快繁研究还未见报道.

为了探索利用 MS 为基本培养基添加 6-BA 和 +IBA 激素组合, 建立紫红花和紫花两种矮牵牛诱导不定芽途径, 本研究以这两种矮牵牛叶片为外植体, 在 MS 基本培养基基础上, 添加不同浓度的 6-BA 和 IBA 激素, 共设计了 9 种培养基组合, 对紫红花和紫花矮牵牛叶片进行快繁研究.

收稿日期: 2007-12-01

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(063919141).

作者简介: 李海权(1974-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生; 李建粤(1958-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

* 通讯作者.

1 材料与方法

1.1 植物材料

紫红花和紫花矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 无菌苗。

1.2 培养基

在 MS 基本培养基中按表 1 添加 6-BA 和 IBA 两种激素。

表 1 诱导不定芽的不同激素种类及浓度

mg/L

培养基编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6-BA	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0
IBA	0.1	0.2	0.5	0.1	0.2	0.5	0.1	0.2	0.5

1.3 方法

取本实验室紫红花和紫花矮牵牛无菌苗继代培养,切取约 2cm 单个小芽,转入不添加任何激素的 MS 培养基,1 周后,当小苗长到 4~5 对叶片时,选取生长健壮的叶片作试验材料.用无菌手术刀切去叶片四周,与叶片主脉垂直,将叶片横切成 2~3 段,大小约为 0.5cm×0.5cm,分别放入不同浓度 6-BA 和 IBA 组合(表 1)的 MS 培养基中.紫红花矮牵牛每个处理重复 5 次,每皿接种 14~15 块叶片,紫花矮牵牛每个处理重复 3 皿,每皿接种 17~18 块叶片.15d 换一次培养基,定期观察,并在 15d 和 30d 进行数据统计,记录长出愈伤组织及出芽的外植体数、出苗总数,计算出芽系数和分化率,并对苗的生长状况进行描述和拍照.培养温度为(25±1)℃,光照 16h/d.

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对紫红花矮牵牛叶片诱导不定芽的影响

接种紫红花矮牵牛叶片 5d 后,在各培养基中依然都有很少新的愈伤组织从与叶脉垂直的切口边缘长出,颜色较浅,多为淡绿.在 MS+0.5mg/L 6-BA+0.1mg/L IBA 培养基中,愈伤组织生长最慢;在 MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L IBA 和 MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L IBA 两种培养基中,愈伤组织生长相对较快.

紫红花矮牵牛叶片接种培养 10~15d 时,大多叶片变成黄色,与叶脉垂直的切口边缘处的愈伤组织块体积稍有些增大,颜色变绿,在叶片边缘逐渐有绿色的芽点产生.芽点分化主要集中在与叶片接触培养基最先长出愈伤组织的位置.比较 9 种诱导培养基,紫红花矮牵牛叶片外植体在 MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L IBA 和 MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L IBA 两种培养基中最先分化出绿色小芽点.对紫红花矮牵牛叶片外植体在 9 种培养基上长出愈伤组织及出芽的外植体数、出苗总数等进行数据统计,结果见表 2.紫红花矮牵牛叶片培养 30d 时,在 9 种培养基上的生长情况见表 3.

由表 2 分析可知,紫红花矮牵牛叶片外植体在 MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L IBA 和 MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L IBA 两种培养基中,其分化率分别达到 45.7% 和 47.1%,出苗数分别为 76 棵和 77 棵.虽然 MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L IBA 的分化率、出苗数均略高于 MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L IBA,但幼苗生长较弱,不利于继代生根.本试验表明:在 9 种培养基中,紫红花矮牵牛叶片诱导不定芽的最佳培养基为 MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L IBA.由表 2 分析还显示:当 6-BA 浓度较低时,紫红花矮牵牛叶片外植体出芽数较少;当 6-BA 浓度较高时,紫红花矮牵牛叶片外植体分化出芽数量增多.但是,当 6-BA 为 2.0 mg/L 时,分化形成的小苗容易出现叶片变黄现象.

表2 紫红花矮牵牛叶片外植体培养数据统计

培养基编号	接种总数	长出愈伤外植体数	出愈率 (%)	出芽外植体数	分化率 (%)	出苗总数	出苗系数
1	71	56	78.9	11	15.5	28	2.5
2	72	71	98.6	15	20.8	22	1.5
3	72	72	100	6	8.3	9	1.5
4	72	71	98.6	13	18.1	32	2.5
5	70	70	100	32	45.7	76	2.4
6	70	70	100	33	47.1	77	2.3
7	72	72	100	11	15.3	35	3.2
8	71	71	100	28	39.4	65	2.3
9	72	72	100	27	37.5	48	1.8

出愈率 = 长出愈伤外植体数/接种总数; 分化率 = 出芽外植体数/接种总数; 出苗系数 = 出苗总数/出芽外植体数

表3 紫红花矮牵牛在9种培养基上的生长情况

培养基编号	激素 (mg/L)		培养 30d 的生长情况
	6-BA	IBA	
1	0.5	0.1	愈伤很少, 叶片大多黄死, 苗小, 苗黄绿色
2	0.5	0.2	愈伤少, 叶片大多黄死, 苗较大但少, 苗绿色
3	0.5	0.5	愈伤较少且呈绿色, 苗很少但大, 苗黄绿色
4	1.0	0.1	愈伤少, 叶片大多黄死, 苗多但较小, 苗黄绿色
5	1.0	0.2	愈伤少, 叶片大多黄死, 苗多且大, 健壮, 苗绿色
6	1.0	0.5	愈伤较少, 叶片大多很黄, 苗多且大, 苗绿色
7	2.0	0.1	愈伤少, 叶片大多黄死, 苗多但较小, 苗黄绿色
8	2.0	0.2	愈伤少, 叶片大多黄死, 苗多且大, 苗黄色
9	2.0	0.5	愈伤少, 叶片大多黄死, 苗多且大, 苗叶片很黄

2.2 不同激素浓度对紫花矮牵牛叶片诱导不定芽的影响

分别接种紫花矮牵牛叶片外植体 5d 后, 外植体也都有很少新的愈伤组织形成, 但愈伤组织从接触培养基的叶脉处长出, 颜色较浅, 多为淡绿. 愈伤组织在 MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L IBA 和 MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.2mg/L IBA 培养基中生长较慢, 在 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.1mg/L IBA 和 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA 培养基中愈伤组织长得较快.

当外植体接种培养 10~15d 后, 愈伤组织块体积稍有变大, 绿色加深, 在叶脉产生愈伤组织部位的叶片上逐渐有绿色的小芽分化, 叶脉前端切口处最先长出小苗. 在 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.1mg/L IBA 和 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA 两种培养基中的外植体最先分化出绿色小芽点.

对紫花矮牵牛叶片外植体在 9 种培养基上长出愈伤组织及出芽的外植体数、出苗数等进行数据统计, 结果见表 4. 紫花矮牵牛叶片培养 30d 时, 在 9 种培养基上的生长情况见表 5.

由表 4 分析可知, 随着 6-BA 浓度升高, 苗分化数量也随着增加. 紫花矮牵牛叶片在 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA 培养基中, 分化率、出苗数和出芽系数都最高, 其次是 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.1mg/L IBA 培养基. 在 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.1mg/L IBA 培养基中, 出现较多的黄化苗, 而 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA 培养基中只有个别黄化苗. 综合考虑, 认为在 9 种诱导培养基中, 紫花矮牵牛叶片诱导不定芽的最佳培养基是 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA.

表4 紫花矮牵牛叶片外植体培养数据统计

培养基编号	接种总数	长出愈伤外植体数	出愈率(%)	出芽外植体数	分化率(%)	出苗数	出苗系数
1	54	54	100	26	48.1	59	2.3
2	54	53	98.1	17	31.5	32	1.9
3	54	54	100	41	75.9	143	3.5
4	54	50	92.6	23	42.6	76	3.3
5	54	54	100	35	64.8	148	4.2
6	59	59	100	35	59.3	144	4.1
7	52	50	96.1	46	88.5	229	5.0
8	54	54	100	36	66.7	128	3.6
9	54	54	100	48	88.9	432	9.0

出愈率 = 长出愈伤外植体数/接种总数;分化率 = 出芽外植体数/接种总数;出苗系数 = 出苗总数/出芽外植体数

表5 紫花矮牵牛在9种培养基上的生长情况

培养基编号	激素(mg/L)		培养30d的生长情况
	6-BA	IBA	
1	0.5	0.1	叶片大多黄死,苗少但大,苗黄绿色,苗叶缘焦黄
2	0.5	0.2	叶片大多黄死,苗很少且小,苗黄绿色,苗叶缘焦黄
3	0.5	0.5	叶片有些发黄,苗多但小,苗绿色
4	1.0	0.1	叶片大多黄死,苗多且大,苗绿色
5	1.0	0.2	叶片大多黄死,苗少且小,苗黄绿色
6	1.0	0.5	叶片大多黄死,苗多且大,苗黄绿色
7	2.0	0.1	叶片很绿,苗多且大,苗较健壮,苗黄绿色,但有较多黄化苗
8	2.0	0.2	叶片有些发黄,苗多且大,苗黄绿色
9	2.0	0.5	叶片有些发黄,苗多且大,苗黄绿色,有个别黄化苗

2.3 生根及移栽

切取高度约2cm的幼苗接入MS基本培养基中,3~4d后,在小苗茎段切口处逐渐长出不定根.15d后约有25~35条根密生于基部,较粗壮.两种花色矮牵牛小苗生根率均为100%,且长势良好.将生根后的两种花色矮牵牛植株放到室温炼苗3d后移入温室栽培,成活率高达90%以上.

3 讨论

目前,张颖等^[3]和刘丽娜等^[8]分别在对矮牵牛和香石竹外植体通过芽诱导建立快繁体系的研究中都发现,同一物种不同品种诱导芽分化的最适培养基激素浓度和比例存在差异.在本试验中,对紫红色和紫色矮牵牛的再生研究也发现了类似情况.

目前较多研究报道都采用在MS基本培养基基础上,添加6-BA和NAA组合诱导矮牵牛形成不定芽,以MS+6-BA和NAA组合对矮牵牛进行快繁,需要的时间相对较长.比如权宏^[2]同样以紫花矮牵牛叶片为外植体,采用6-BA和NAA诱导叶片形成不定芽时,需要27d培养获得不定芽,约40d多才能获得适合生根培养的小苗.本试验采用6-BA+IBA诱导叶片不定芽的发生,在叶片周围尽管也会形成很少的愈伤组织,但是分化出芽只需10~15d,25~30d就可获得适合生根培养的苗.张汉尧^[4]研究发现,组织培养的变异率随着继代数的增加而增加.因此,采用6-BA和IBA组合培养基对矮牵牛叶片直接诱导不定芽进行快繁研究,减少了继代数,这不仅简化了操作程序,缩短了组织培养时间,更重要

的是有可能防止植物愈伤组织细胞在离体培养环节中容易发生变异的不足, 为再生矮牵牛遗传稳定性提供了更为充分的保证。

传统的矮牵牛组织培养与快繁, 一般以侧芽、茎段为外植体, 利用侧芽或顶芽分化成苗或者先诱导愈伤组织, 然后再分化成苗。而矮牵牛植株最多的是叶片。因此, 采用叶片作为外植体进行诱导不定芽的探索研究, 将能够在较短的时间内获取更多的外植体, 并快繁出更多的再生后代。

崔广荣等^[9]研究矮牵牛生根时, 在 MS 基本培养基中添加了激素 NAA 或 IBA, 结果显示矮牵牛的根在低浓度激素下长的比高浓度环境中更好。因此, 本试验诱导矮牵牛幼苗生根时, 只采用 MS 基本培养基, 结果同样能够诱导生根, 这不仅降低了快繁的成本, 同时还减少了激素使用对环境的影响。矮牵牛不仅便于通过诱导不定芽进行再生培养, 同时, 它还容易进行根癌农杆菌介导的基因导入操作, 因而目前已成为转基因研究的重要模式植物之一。开展本试验, 还可为今后以紫红花和紫花矮牵牛为受体进行遗传转化获得转基因植株的无性快繁建立有效的再生体系。

参考文献:

- [1] 纪生疆. 转基因矮牵牛组培快繁技术[J]. 福建热作科技, 2003, 28(2): 25-26.
- [2] 权宏, 齐莹, 施和平. 紫色大花矮牵牛组织培养与植株再生[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(1): 51-52.
- [3] 张颖, 罗凤霞, 曾会明, 等. 3个香型矮牵牛品种的组织培养再生体系[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(4): 424-427.
- [4] 张汉尧, 刘小珍, 周健, 等. 矮牵牛组织培养及变异苗的 RAPD 分析[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 74-75.
- [5] 梁冰, 杨爱馥, 樊锐锋, 等. 矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm) 组织培养技术研究[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(4): 478-483.
- [6] 武术杰, 李邱华. 矮牵牛 Tidal Wave 品种遗传转化受体再生体系的建立[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(4): 14-15, 27.
- [7] 张瑞越, 季勤, 白莹, 等. 垂吊矮牵牛的组织培养和快速繁殖[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(10): 3003-3004.
- [8] 陶妹英, 贾彩红, 徐碧玉, 等. 直接诱导不定芽的矮牵牛再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 62-65.
- [9] 刘丽娜, 魏秀丽, 逯慧, 等. 香石竹茎段培养无菌芽及微繁研究[J]. 上海农业学报, 2006, 22(3): 63-67.
- [10] 崔广荣, 叶选怡, 刘跃成, 等. 激素种类及其浓度对矮牵牛试管苗增殖及生根率的影响[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 389-392.

Establishment of fast regeneration system for mauve and purple *Petunia hybrida*

LI Hai-quan, SHI Shao-hua, SU Yi-lan, XIA Wei-jie, LI Jian-yue

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: In order to establish a fast regeneration method by buds induction directly for mauve and purple *Petunia hybrida*, nine kinds of medium combinations on MS basic medium with different concentration of 6-BA and IBA were designed, and the leaves of two kinds of *Petunia hybrida* as explants were studied. Result showed that there were obvious differences in the requirement of hormone concentration on fast regeneration between the two *Petunias hybrida*, the most suitable culture medium was MS + 1.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IBA for mauve *Petunia hybrida*, and MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L IBA for purple *Petunia hybrida*. This research sets up the available system of fast regeneration for transgenic mauve and purple *Petunia hybrida*.

Key words: mauve *Petunia*; purple *Petunia*; leaf; adventitious bud; fast regeneration system

(责任编辑: 郁 慧)