

非洲菊不同发育时期的花托诱导愈伤组织的研究

陈海霞, 李茂娟

(湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128)

摘要:采用处于不同发育时期的非洲菊花托作为外植体,以 1/2MS + 6-BA 10mg/L + NAA 1mg/L 为诱导分化培养基进行组织培养研究。结果表明,花托的发育期直接影响愈伤组织的分化,以处于显蕾初期直径为 0.7cm 以下的头状花序的花托诱导效果最好,随着花序直径的增大,分化诱导率降低,感染率增高。

关键词:非洲菊;发育时期;组织培养;愈伤组织

中图分类号:S682.1⁺9

文献标识码:A

文章编号:1002-8161(2008)01-0001-05

Study on callus induction of *Gerbera jamesonii* receptacle developed at different stages

CHEN Hai-xia, LI Mao-juan

(College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Flora receptacles of *Gerbera jamesonii* developed at different stages were used as explants, and 1/2MS + 10mg/L 6-BA + 1.0mg/L NAA medium was applied on the callus induction. The results showed that the developmental stage of floral receptacle affected the differentiation of callus, and the best effect was floral receptacle of inflorescence which diameter was below 0.7 cm at early stage of bud appearance; with the increase of inflorescence diameter, the inducing rate of differentiation decreased, while the infecting rate increased.

Key words: *Gerbera jamesonii*; developmental stage; tissue culture; callus

非洲菊(*Gerbera jamesonii*)又名扶郎花,是菊科扶郎花属多年生宿根草本花卉,原产南非,喜温暖、湿润气候。非洲菊花朵硕大、绚丽多彩、清秀挺拔、切花率高、水养期长,兼具色、形、韵之美,具有非常高的观赏价值。目前非洲菊位居世界切花销售量的第5位^[1],其栽培面积不断扩大,消费量和价格都在不断增长^[2]。非洲菊传统的繁殖方法是种子繁殖和分株繁殖,但这两种方法均存在繁殖速度慢、繁殖系数低、成本高、品种退化等缺点,不能满足日益增长的市场需求^[3]。目前对非洲菊优良品种进行组织培养是主要繁殖方法^[4]。采用这种方法繁殖非洲菊,不仅能在短时间内获得大量优良种苗,而且避免了分株繁殖和种子繁殖所带来的品种退化问题。Pierik^[5]首先用非洲菊离体花托和花萼诱导出芽, Murashige^[6]用非洲菊的生长点离体培养得到侧芽,

黄济明等^[7]以花托为材料,研究了非洲菊离体培养诱导成苗和消除试管植株突变的问题。现有大量研究均侧重于非洲菊立体培养时外植体的选取和培养基的选择^[8-15]。本试验以处于不同发育时期的非洲菊花托为外植体进行组织培养,研究花托的不同发育时期对愈伤组织产生的速度、数量以及外植体褐化的影响,旨在确定最佳发育时期的花托外植体,为非洲菊的花托培养提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

湖南农业大学花卉基地简易大棚内地栽的红瓣黑心非洲菊品种‘Bellezza’。

1.2 方法

1.2.1 分等级 采集生长健壮、无病虫害的非洲菊

收稿日期:2007-10-11

基金项目:湖南农业大学青年基金项目(04QN23)

作者简介:陈海霞(1976-),女,在读博士,讲师,研究方向为观赏植物资源及遗传育种。

头状花序,参照葛皓等^[16]的划分标准,分别以处于显蕾初期、蕾发育期和舌状花露瓣期的花托为试验材料。按照花蕾直径大小,将非洲菊的头状花序分为 5 个等级,显蕾初期(0.7cm 以下,0.7~1.0cm);蕾发育期(1.0~1.5cm,1.5~2cm);舌状花露瓣期(2cm 以上),并相应设为处理 I、II、III、IV、V(见图 1)。

1.2.2 消毒与接种 将 5 个不同大小的头状花序分别置于烧杯中,于自来水下冲洗 30min,随后在超净工作台将花托放入无菌容器中,用 75% 的酒精浸泡 30s,并用无菌水冲洗一次,然后在 0.1% HgCl₂ 溶液中处理 8min,用无菌水冲洗 3~5 次,转入无菌滤纸中充分吸干水分,用无菌镊子剥去萼片及小花,再用无菌刀片将花托切成相同大小的 4 块,接种于诱导培养基中,每个培养基接种 4 块,每个处理每次接 24 块。

1.2.3 培养条件 参照曾长立等^[17]提供的配方,即以 1/2MS 为基本培养基,加入 3% 的蔗糖、0.7% 的琼脂,调节 pH 5.8~6.2,同时添加 10mg/L 的 6-BA 和 1mg/L 的 NAA。光照时间为 8~10h/d,培养温度 25~28℃,光照强度 1500~2000lx。

1.2.4 观察与记录 接种后,每隔 2d 进行一次观察与记录,分别记录不同处理花托小切块的生长状况,同时统计分化、感染及褐化数量;及时清理感染材料,每隔一段时间须将外植体转入新的培养基中,

防止外植体大量褐化。

1.2.5 数据统计及处理 每个处理调查 24 块,按接种的次数重复 5 次,分别统计愈伤组织分化率、接种感染率、褐化率。取 5 次的平均值,运用 Duncan 新复极差法分析处理 I、II、III、IV 和 V 之间的差异显著性。

$$\text{诱导率} = \frac{\text{分化的愈伤组织块数}}{\text{接种总块数}} \times 100\%$$

$$\text{感染率} = \frac{\text{感染的块数}}{\text{接种总块数}} \times 100\%$$

$$\text{褐化率} = \frac{\text{褐化块数}}{\text{接种总块数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 不同发育时期的花托对愈伤组织产生速度的影响

在非洲菊花托愈伤组织诱导的过程中,处理 I、II、III 的花托小切块 5d 左右明显膨大,25d 左右在切口边缘产生白色、致密的愈伤组织,如图 2、3、4 所示。处理 IV、V 的花托小切块无明显膨大,30d 左右时仅有少量白色愈伤组织产生,色泽稍黄,如图 5、6 所示。

从表 1 可以看出,在接种后的第 26d,处理 I 的花托小切块最先有愈伤组织出现,处理 II、III 最早发生愈伤组织的时间分别为培养后第 28d 和第 31d,处理 IV、V 的花托切块培养至第 35d 和第 41d 时才有少量愈伤组织出现。

表 1 不同发育时期的花托对愈伤组织产生速度的影响

Table 1 Effects of receptacle at different developmental stages on callus forming speed

发育时期 Developmental stage	处理 Treatment	花蕾直径 Flower bud diameter (cm)	接种总数(块) Inoculation number	愈伤组织发生 时间 Callus emergence time (d)	丛芽萌发时间 Cluster-buds emergence time (d)
显蕾初期 Early stage of bud emergence	I	0.7cm 以下	120	26	32
蕾发育期 Bud development stage	II	0.7~1.0	120	28	39
	III	1.0~1.5	120	31	45
	IV	1.5~2.0	120	35	
舌状花露瓣期 Emergence stage of ligulate flower petal	V	2.0cm 以上	120	41	

从愈伤组织中分化出丛芽的时间也因花托发育时期不同而有差异。处理 I、II、III 的花托小切块最早在愈伤组织上萌发丛芽的天数分别为第 32d、第 39d 和第 45d,如图 7、8、9 所示。处理 IV 与处理 V 的花托小切块仅有愈伤组织出现,随着培养时间的延长,愈伤组织出现部分褐化并逐渐死亡,没有丛芽的萌发。由此可见,花托的发育时期影响愈伤组织形

成的速度,且以显蕾初期的花托诱导分化速度最快,舌状花露瓣期的花托小切块分化速度最慢。

2.2 不同发育时期的花托对愈伤组织诱导的影响

从表 2 可看出,处理 I 的花托小切块愈伤组织诱导率最高,平均诱导分化率达 80.4%;处理 II 与处理 III 的花托小切块愈伤组织诱导率分别为 75.8% 和 69.6%;处理 II 的诱导分化率与处理 I、

图 1~10:

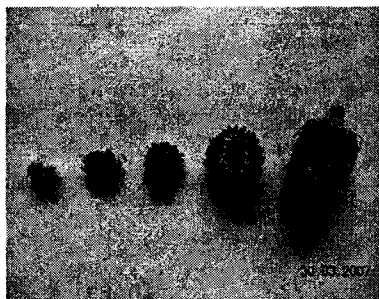


图 1 5个不同处理的花蕾

Fig.1 The flower buds of five treatments



图 2 处理 I 的愈伤组织

Fig.2 The callus of treatment I



图 3 处理 II 的愈伤组织

Fig.3 The callus of treatment II



图 4 处理 III 的愈伤组织

Fig.4 The callus of treatment III



图 5 处理 IV 的愈伤组织

Fig.5 The callus of treatment IV



图 6 处理 V 的愈伤组织

Fig.6 The callus of treatment V



图 7 处理 I 的丛芽

Fig.7 The bud of treatment I



图 8 处理 II 的丛芽

Fig.8 The bud of treatment II



图 9 处理 III 的丛芽

Fig.9 The bud of treatment III



图 10 褐化了的外植体

Fig.10 The browned explant

处理Ⅲ无显著差异,但处理Ⅰ与处理Ⅲ有显著差异;处理Ⅳ与处理Ⅴ的花托小切块诱导率明显降低,平均诱导分化率仅为53.3%和31.7%,与处理Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ存在极显著差异。可见花托不同发育时期及直径大小对愈伤组织的诱导有显著影响,处于显蕾初期的花托诱导效果最好,蕾发育期次之,舌状花露瓣期最差。另外,在蕾发育期内,随着花序直径的增大,诱导分化率逐渐降低。

表2 不同发育时期的花托对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of receptacle at different developmental stages on callus induction

发育时期 Developmental stage	处理 Treatment	花蕾直径 Flower bud diameter (cm)	接种总数 (块) Inoculation number	分化的数量 (块) Differential number	诱导率(%) Induction rate
显蕾初期 Early stage of bud emergence	I	0.7cm 以下	24	19.3	80.4aA
蕾发育期 Bud development stage	II	0.7~1.0	24	18.2	75.8aA
	III	1.0~1.5	24	16.7	69.6bA
	IV	1.5~2.0	24	12.8	53.3cB
舌状花露瓣期 Emergence stage of ligulate flower petal	V	2.0cm 以上	24	7.6	31.7dC

注:不同大、小写英文字母分别表示0.01、0.05的差异显著性。下同。

Note: Different capital and small letters represent significance of differences at $P=0.05$ and $P=0.01$, respectively.

2.3 不同发育时期的花托对外植体褐化的影响

褐化现象是指外植体在培养过程中切口产生的多酚类物质被氧化成褐色的醌类物质毒害植物自身,导致培养材料褐变死亡的现象。褐化现象不仅影响外植体与继代植株的正常生长与分化繁殖,而且影响愈伤组织的诱导^[18]。从表3可知,处理Ⅰ的花托小切块没有出现褐化现象,处理Ⅱ和处理Ⅲ中出现了少量褐化,褐化率仅为1.7%和5.4%。处理Ⅳ、处理Ⅴ的花托小切块褐化现象比较严重,平均褐化率分别达到了23.8%和39.2%:初接种时,外植体呈现绿色,3d以后逐渐转为褐色,转入新的培养基中也不分化并逐渐死亡,如图10所示。对5个处理的平均褐化率进行显著性分析得知,处理Ⅳ、Ⅴ与处理Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ之间有极显著差异,处理Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ之间没有显著差异。由此可见,随着花托发育时期的延长,褐化现象愈加严重,而且蕾发育期花托直径越大,褐化率越高。

表3 不同发育时期的花托对外植体褐化的影响

Table 3 Effect of receptacle at different developmental stages on explants browning

发育时期 Developmental stage	处理 Treatment	花蕾直径 Flower bud diameter (cm)	平均接种量 (块) Inoculation average	褐化数量 (块) Browning number	平均褐化率 Average browning rate(%)
显蕾初期 Early stage of bud emergence	I	0.7cm 以下	24	0	0aA
	II	0.7~1.0	24	0.4	1.7aA
蕾发育期 Bud development stage	III	1.0~1.5	24	1.3	5.4aA
	IV	1.5~2.0	24	5.7	23.8bB
舌状花露瓣期 Emergence stage of ligulate flower petal	u	2.0cm 以上	24	9.4	39.2bB

3 小结与讨论

本试验采用不同发育时期的非洲菊花托作为外植体进行组织培养,成功诱导了愈伤组织。试验结果表明,花托的发育时期对愈伤组织的诱导分化有很大的影响。花托处于显蕾初期,诱导分化效果较好;处于同一时期的花托,诱导分化率随着直径的增大而降低,直径越小,形成愈伤组织速度越快,诱导分化效果越好。究其原因,可能是因为显蕾初期的花托细胞分裂旺盛,所含生长素浓度较高,有利于诱导愈伤组织产生和分化。杨桂芬等^[19]指出,选用直径为0.7~1.2cm花蕾作外植体进行组织培养易成功;郑秀芳等^[20]以4个非洲菊重瓣切花品种为材料进行不同部位的培养,结果表明,以直径小于1cm的幼花托为外植体最为适宜;鲁雪华等^[21]研究得出,花托的大小直接影响愈伤组织芽的分化,其中直径为0.5~0.7cm的花托小切块效果最好。以上结论与观点均与本试验结果大致相符。

本研究同时表明,花托所处的发育时期与外植体褐化率之间存在相关性,花托所处的发育时期越晚,褐化率越高。夏小环等^[22]研究表明,植物材料基因型、培养条件、培养基成分可能共同影响着非洲菊外植体的褐化。本试验中,褐化产生的原因可能是培养条件的不适宜或者培养基成分不利于该品种的诱导分化。具体的机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 龙雅宜. 切花生产技术[M]. 北京:金盾出版社,1994:1-3.
- [2] 何小弟. 非洲菊[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2000:1-3.
- [3] 王春彦,高年春,张效平,曹荣祥,邵和平,张宁宁. 非洲菊幼花托离体培养研究[J]. 江苏农业科学,2003,(1):47-49.
- [4] 北京林业大学园林系花卉教研组. 花卉学[M]. 北京:中国林业出版社,1990:481-483.
- [5] Pierik R L M. Gerbera plantlets from in vitro cultivated capitulum explant[J]. Scientia Horticulture, 1973,(1):117-120.
- [6] Murashige T. Clonal multiplication of Gerbera through tissue culture[J]. HortSci,1974,9:175-180.
- [7] 黄济明,倪跃之,林满江. 非洲菊的快速繁殖[J]. 园艺学报,1987,14(2):125-128.
- [8] 郑秀芳,李名扬. 非洲菊花托培养和植株再生[J]. 西南农业大学学报,2001,3(2):171-179.
- [9] 许彩霞,孙成林,薛炜,张继武. 非洲菊组织培养离体快速繁殖[J]. 内蒙古林业科技,2001(增刊):116.
- [10] 李启任,王云强,夏从龙. 非洲菊组培快繁技术研究[J]. 云南大学学报,1998,20(4):560-563.
- [11] 谭晓风,石明旺. 非洲菊 F1 的组织培养[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):45-48.
- [12] 杨波,唐明. 非洲菊组培快繁技术研究[J]. 湖北农业科学,2000,(2):48-49.
- [13] 刘福平,林丽仙. 非洲菊组织培养[J]. 亚热带植物通讯,2000,29(2):52.
- [14] 黄丽云,陈雄庭. 非洲菊组织培养研究进展[J]. 福建热作科技,2006,31(2):26-28.
- [15] 王春,余有祥. 盆栽非洲菊的组织培养及快速繁殖[J]. 浙江林业科技,2001,21(3):30-31.
- [16] 葛皓,邱德勃,罗丽娟,郑玉. 非洲菊头状花序发育时期的划分与最佳采切期[J]. 热带作物学报,2006,27(2):29-33.
- [17] 曾长立,陶婷,陈禅友. 非洲菊的组织培养与快速繁殖[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2005,33(4):35-38.
- [18] 张俊琦,罗晓芳. 牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-724.
- [19] 杨桂芬,王毓,丁红光. 非洲菊组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2000,36(4):333.
- [20] 郑秀芳,王桔红,李名扬. 影响非洲菊离体培养器官分化的因素[J]. 江苏林业科技,2002,29(1):29-31.
- [21] 鲁雪华,林勇,郭文杰. 非洲菊小花托的离体培养[J]. 亚热带植物通讯,1996,25(2):21-24.
- [22] 夏小环,王静,尹梅,陈志伟,陈善娜. 非洲菊叶外植体组培中影响褐化因素及机理初探[J]. 西南农业学报,2006,19(1):136-138.

(责任编辑 林 涛)