

文章编号:1001-4829(2008)03-0779-04

非洲菊再生体系的建立

黄丽云^{1,2}, 李杰^{1,2}, 陈雄庭^{2*}, 张秀娟²

(1. 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

摘要:以非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)大红花品种花托为外植体, 选用MS为基本培养基, 附加激素6-BA、NAA和IBA, 研究了不同激素浓度组合对外植体愈伤诱导及不定芽分化的影响。结果表明, 诱导愈伤时, MS+6-BA 10 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 5.5 g·L⁻¹的效果最佳, 培养30 d后转接到MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+AD(硫酸腺嘌呤) 5 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 5.5 g·L⁻¹的培养基上诱导芽的分化。增殖培养以MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 5.5 g·L⁻¹为佳。生根培养是以1/2MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 5.5 g·L⁻¹的培养基最好。

关键词:非洲菊; 组织培养; 再生体系

中图分类号:S682.1⁺1 **文献标识码:**A

Establishment of the regeneration system in *Gerbera jamesonii*

HUANG Li-yun^{1,2}, LI Jie^{1,2}, CHEN Xiong-ting^{2*}, ZHANG Xiu-juan²

(1. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Hainan Wenchang 571339, China; 2. Institute of tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Hainan Haikou 571101, China)

Abstract: Adventitious shoots were induced from receptacle explants of 'Dahonghua' in this study. According to the research of the effects of different hormone compositions on callus induction and regeneration of shoots from receptacle explants, efficient regeneration system was established. The results indicated that the optimized medium for receptacle explants containing Murashige & Skoog basal medium supplemented with BA 10 mg·L⁻¹+NAA mg·L⁻¹ was used for inducing the callus, and the medium containing MS+BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+AD 5.0 mg·L⁻¹ mg·L⁻¹ was used for inducing the bud after 30 days. MS+BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹ was used for multiplying the bud. 1/2 MS basic medium containing 0.2 mg·L⁻¹ IBA was good for root induction. the kanamycin at 30 mg·L⁻¹ was added in the medium.

Key words: *Gerbera jamesonii* Bolus; tissue culture; regeneration system

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)又名扶郎花, 属菊科扶郎花属, 多年生宿根草本观赏植物, 非洲菊花朵硕大, 花梗挺拔, 花色多样, 开花周期长, 切花观赏期长, 同时盆栽或庭院栽培亦受人们青睐, 是目前国际市场畅销名花之一。非洲菊的常规繁殖是种子繁殖或无性繁殖, 但种子繁殖后代变异性大, 不能保持其良种特性, 而常规的无性(分株)繁殖繁殖系数很低, 1株母株1年仅能分5~6株, 难以满足花卉市

场需求^[1-3]。而采用试管繁殖法繁殖良种, 则可以有效地克服前二者的缺点^[4]。20世纪80年代, 中国开始花卉组织培养工厂化育苗的实践^[5]。20世纪90年代进行了非洲菊组织培养、快速繁殖的探索, 并就非洲菊愈伤组织诱导分化、芽苗增殖与生根、小苗的移栽等进行了较深入研究。研究了非洲菊再生体系的建立, 为通过基因转化等生物技术手段进行非洲菊育种打下了基础, 对深入研究非洲菊的生长发育及生理生化特性有重要的理论意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

幼嫩的非洲菊花朵取于华南热带农业大学园艺所花圃, 品种为非洲菊大红花品种。

收稿日期: 2007-07-12

作者简介: 黄丽云(1980-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 分子植物育种, 电话: 0898-63330917, E-mail: hyunl2003@126.com, *为通讯作者: 陈雄庭, E-mail: cxt66988063@163.com。



图1 诱导愈伤组织
Fig. 1 Inducing the calli

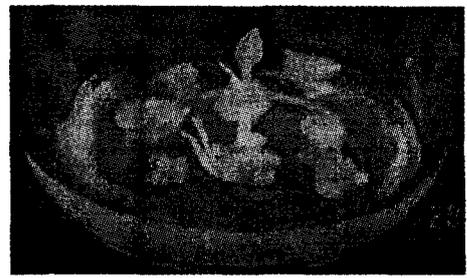


图2 诱导不定芽
Fig. 2 Inducing bud

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒与接种 晴天早晨取回幼嫩的非洲菊花朵(直径为0.5~0.7cm),按以下程序进行消毒:流水冲洗5 min→加中性洗涤剂漂洗2 min→75%酒精30 s→0.2%升汞溶液10 min→无菌水冲洗4~6次。然后切取花托分成4小块接种于愈伤组织诱导培养基上(图1)。

1.2.2 培养基的配制 以MS为基本培养基,蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $5.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,根据外植体不同培养阶段对植物生长调节剂的不同要求,设计了多种不同激素的组合和配比。pH 5.8,121℃高压灭菌20 min。

1.2.3 培养条件 光照强度约为1500~2000 lx ($12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$),培养温度为 $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 诱导愈伤组织

以花托为外植体,分别接种在YS1~YS12共12种不同激素配比的培养基上,培养1周左右开始出现愈伤组织。3周后统计在不同培养基上形成的愈伤组织块数,计算愈伤组织诱导率(表1)。

表1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different culture medium on the inducing calli

培养基	激素($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		外植体数	愈伤组织块数	诱导率(%)	褐化程度
	6-BA	NAA				
YS ₁	12	2.0	20	14	70.0	较严重
YS ₂	12	1.5	20	14	70.0	较严重
YS ₃	10	1.0	20	16	80.0	较轻
YS ₄	10	0.5	20	18	95.0	轻
YS ₅	8	2.0	20	17	85.0	-
YS ₆	8	1.5	20	16	80.0	-
YS ₇	8	1.0	20	14	70.0	-
YS ₈	8	0.5	20	13	65.0	-
YS ₉	6	2.0	20	12	60.0	-
YS ₁₀	6	1.5	20	13	65.0	-
YS ₁₁	6	1.0	20	12	60.0	-
YS ₁₂	6	0.5	20	11	55.0	-

从表1可以看出,不同激素组合对愈伤组织的诱导有较大差异,其中YS4培养基的诱导率高于其他培养基,其次为YS5,诱导率最低的培养基为YS12,6-BA浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,不仅愈伤组织诱导率高,而且长势旺盛(图2)。

这一结果与鲁雪华等人^[6]的研究结果一致。当6-BA浓度高于 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 容易使愈伤组织块褐化,而6-BA浓度较低时虽然褐化较轻,但诱导率偏低。

2.2 不定芽的诱导

将在诱导愈伤组织培养基上培养了30 d的组织块转接到CY1~CY12的不定芽诱导培养基中,培养10 d左右开始出现的绿色芽点(图3),4周后统计芽点数目及芽的分化率(表2)。

从表2可以看出,愈伤组织在不同的培养基中都能诱导出不定芽。但不同的培养基存在较大差异,其中含6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CY6培养基对不定芽的分化率均高于其他培养基,其次为CY5。相对而言,分化率最差的为CY1和CY12。出芽培养基6-BA浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时诱导效果最好,当6-BA的浓度过高或过低时

表 2 不同激素对比对不定芽形成的影响

Table 2 Effects of different extrinsic hormone combination on the inducing bud

培养基编号	激素 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			愈伤组织块数	出芽率 (%)	分化率 (%)
	BA	NAA	AD			
CY2	4.0	1.0	5.0	50	41	82.0
CY3	4.0	0.5	3.0	50	35	70.0
CY4	4.0	0.5	1.0	50	40	80.0
CY5	2.0	1.0	10.0	50	45	90.0
CY6	2.0	1.0	5.0	50	49	98.0
CY7	2.0	0.5	3.0	50	43	86.0
CY8	2.0	0.5	1.0	50	40	80.0
CY1	4.0	1.0	10.0	50	28	56.0
CY9	1.0	1.0	10.0	50	36	72.0
CY10	1.0	1.0	5.0	50	33	66.0
CY11	1.0	0.5	3.0	50	32	64.0
CY12	1.0	0.5	1.0	50	28	56.0

表 3 增殖培养基对不定芽增殖的影响

Table 3 Effects of different culture medium on the multiplying bud

培养基编号	激素 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		接种不定芽数	新增不定芽数	增殖倍数	玻璃化程度
	BA	NAA				
ZZ1	4.0	1.0	60	210	3.5	较严重
ZZ2	2.0	0.5	60	282	4.7	较轻
ZZ3	1.0	0.2	60	185	3.0	-

表 4 IBA 浓度对生根的影响

Table 4 Effects of extrinsic hormone (IBA) on the inducing root

培养基编号	IBA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	插条数	生根的植株数	百分率 (%)	不定根的生长情况
SG1	0	20	0	0	不长根
SG2	0.2	20	18	90	长而粗壮,根多
SG3	0.3	20	15	75	短而细,根多
SG4	0.5	20	10	50	长而细,根较少

效果都不佳。此外,高浓度的 6-BA 与高浓度 AD 配合使用抑制不定芽的分化,见 CY1 处理;低浓度的 6-BA 与高浓度 AD 配合使用促进不定芽的分化,见 CY9 处理;而中高浓度的 6-BA 与中浓度 AD 配合使用对不定芽的分化效果最佳,见 CY6 处理。

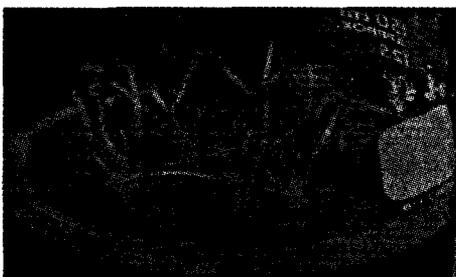


图 3 不定芽的增殖

Fig. 3 Multiplicating bud

2.3 不定芽的增殖培养

将约 1.5 cm 高的不定芽从外植体上完整切下,转接到 ZZ1 ~ ZZ3 的增殖培养基上使其增殖,结果见表 3。

从表 3 可以看出,含 6-BA 2.0 的 ZZ2 对不定芽的增殖率高于其他 2 种培养基。从表 3 可以看出,虽然 ZZ2 培养基中有较轻的玻璃化现象,而 ZZ3 无此现象,但是 ZZ2 的增殖率比 ZZ3 高得多,6-BA 与 NAA 的浓度分别为 2.0 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增殖效果较好(图 4)。

6-BA 与 NAA 的浓度过高容易导致玻璃化现象,而 6-BA 与 NAA 的浓度偏低时,其增殖率偏低。

2.4 生根培养与移栽

当不定芽长到 3 ~ 4 cm 高,并有 2 ~ 3 片叶时,



图4 诱导生根

Fig.4 Inducing root

将不定芽切下并转入生根培养基中,基本培养基为1/2MS,附加不同浓度的IBA,30 d后观察生根情况(表4)。

从表5可以看出,培养基中不含IBA,植株不生根。当IBA浓度为0.2 mg/L的培养基中,植株生根率高达90%,根系粗壮。

IBA浓度大于0.2 mg/L时生根率下降。因此,培养基IBA浓度为0.2 mg/L是较的生根培养基。当根长到3~4 cm时,在室温下炼苗一星期左右。然后取出小苗,洗净根上的培养基后,移栽到沙土中,植株生长健壮(图5)。

3 讨论与小结

非洲菊组织培养中褐化问题较为严重。本试验中,在组织培养各阶段外植体都存在不同程度的褐化现象,特别是在诱导愈伤培养基中,高于10 mg/L浓度的BA浓度容易使得愈伤块褐化,随着浓度的升高褐化现象趋向严重。而在较低浓度BA条件下,愈伤诱导率下降,该实验中,BA浓度的筛选为10 mg/L是较为适宜的。由于外源激素的累积现象,在继愈伤组织的后培养阶段,相应的对外源激素的加入进行逐步的递减。加入PVP及Vc对于减轻褐化亦有较好的效果。当然所选材料的年龄、取材部位、材料的大小及外植体受伤害程度等均会对褐变产生影响。

玻璃化现象产生的主要原因是激素浓度过高(特别是6-BA浓度过高引起的)。由于在非洲菊的组培过程中,其体内在各个阶段积累了高浓度的激素,所以导致在后期体内激素浓度过高而产生玻璃



图5 植株移栽

Fig.5 Transplanting

化现象。本实验中也专门针对玻璃化现象进行了研究,发现BA 2.0 mg/L+0.5 mg/L激素组合时芽增殖率高同时玻璃化现象也相对较轻。刘丽荣等^[7]认为植物试管苗玻璃化现象在非洲菊组织培养中普遍存在,特别是在7、8月高温、多湿季节里更容易发生试管苗玻璃化问题。目前较多使用塑料薄膜封口,要注意薄膜的通透性或改用透气膜^[8]。通过降低6-BA浓度来达到减轻玻璃化的作用。

非洲菊高效再生体系的建立为非洲菊的良种繁育和规模化生产与开发利用提供了科学依据,同时也为非洲菊在组织、细胞和分子水平的进一步研究提供了支撑平台。

参考文献:

- [1]王红梅.非洲菊地组培快繁技术研究[J].甘肃农业科技,2000(10):42-43.
- [2]张小玲.非洲菊组织培养快速繁殖[J].温州农业科学,1997(1):32-34.
- [3]唐前瑞,谭艳云,丁晖.多效唑对非洲菊试管苗生根的影响[J].湖南农业大学学报,1996,22(1):29-32.
- [4]裴文达.园艺植物组织培养[M].上海:上海科学技术出版社,1986.38-42.
- [5]张涛,于水亮.花卉组织培养研究概况[J].河北林学院学报,1994,9(4):358-362.
- [6]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,1999,10:372-374.
- [7]刘丽荣,苏荣德,李忠丽,等.非洲菊组织培养繁殖德试验研究[J].辽宁农业职业技术学院学报,2002,4(3):13-15.
- [8]JOM H, HAM I K. Effects of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets invitro[J]. Journal of the Korean Society for Horticulture Science,2002,43(2):133-136.

(责任编辑 李洁)