

非洲菊再生体系的建立

乔永旭, 张永平, 张红心, 陈超, 王桂兰, 袁晓龙

(唐山师范学院 生命科学系, 河北 唐山 063000)

摘要:以非洲菊幼嫩花托为外植体,以 MS 为基础培养基,研究了添加 6-BA 和 NAA 的培养基对愈伤组织诱导、丛生芽发生和丛生芽生根的影响。结果表明:花托的大小影响到愈伤组织的诱导和褐化,0.8 cm 的花托愈伤组织的诱导率高且褐化率低;愈伤组织诱导和芽分化的适宜培养基为 MS+6-BA 10 mg/L+NAA 0.2 mg/L,丛生芽增值的适宜培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,生根培养基为 1/2 MS+IAA 0.2 mg/L。

关键词:非洲菊;花托;愈伤组织;芽分化

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)18-0130-03

非洲菊(*Gerbera jameson*)为菊科大丁草属多年生宿根花卉,别名扶郎花,非洲菊花大色美,娇姿悦目,花色丰富,切花率高,条件适宜可以周年供应。随着鲜花产业及市场的不断发展,非洲菊已成为世界五大切花之一^[1],其繁育工作也逐步受到科研工作者的重视。由于非洲菊多年栽培,其花朵的品质和产量逐年下降,严重影响到生产者的积极性,因此采用组织培养的方法繁育脱毒苗已成为目前重要的繁殖手段^[2];另外,以再生体系为平台,进行分子育种也逐步提上日程。基于此,该试验以非洲菊幼嫩花托为外植体,接种在添加 6-BA 和 IAA 培养基中,筛选最适合的外植体诱导与分化的最佳培养基,以期建立高效稳定的再生体系,为培育优良的非洲菊品种奠定基础。

第一作者简介:乔永旭(1978-),男,硕士,副教授,研究方向为植物细胞工程和植物资源开发与利用。E-mail:qiaoyxl23@163.com。

基金项目:唐山市科技局科研资助项目(10150202A-10)。

收稿日期:2012-05-18

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用唐山市西郊苗圃日光温室内的非洲菊花蕾为外植体。2 个切花品种:黄瓣黑蕊、红瓣黄蕊。花瓣直径分别为 0.8 cm 左右、1.5 cm 左右。

1.2 试验方法

1.2.1 不同消毒时间的比较 采用大小一致且直径为 0.8 cm 左右的花蕾作为外植体,将采取的花蕾用洗衣粉溶液浸泡 5 min,再用自来水反复冲洗 30 min,75%的酒精溶液浸泡 30 s,然后分 2 个处理,①0.1% HgCl₂ 溶液处理 5 min;②0.1% HgCl₂ 溶液处理 10 min。之后用无菌水冲洗 4~6 次,用滤纸将花蕾表面水分吸干,备用。将经过 2 种灭菌时间处理后的花蕾剥去苞片及花瓣,留下花托,并将花托一分为二,花托朝下,花序朝上接种于 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基中,培养 1 个月,每 3 d 观察 1 次,记录试验结果。

1.2.2 花蕾大小对非洲菊诱导分化效果的比较 将直

Study on the Technique of Tissue Culture and Rapid Propagation of *Aristolochia contorta* Bunge

SHAO Hong, SUN Rui, ZHANG Li-min, ZHANG Wei-dong, WANG Zhen
(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: *Aristolochia contorta* Bunge was used as materials for rapid propagated by plant tissue culture technique, and the plant regeneration system was established. The results showed that the optimal explants for callus induction were leaves, the medium of MS+IBA 0.4 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L for callus induction was better; the optimal medium for differentiation of clumpy bud was MS+IBA 0.4 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L; the better medium for root induction was MS+IBA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L.

Key words: *Aristolochia contorta* Bunge; tissue culture; callus; clumpy bud

径 0.8 cm 左右、1.5 cm 左右 2 种花托,经第 2 种方法灭菌后接种于培养基 MS+6-BA 10 mg/L+NAA 0.2 mg/L 中培养,每周观察 1 次,每 30 d 继代 1 次,直至幼苗产生。

1.2.3 不同培养基对愈伤组织诱导、分化、丛生芽增殖及生根的影响 将一批花托直径为 0.8 cm 左右花托作为外植体,经灭菌后接种到 10 种不同的分化培养基(表 3)中进行培养,进行试验记录,每周观察 1 次,每 30 d 继代 1 次。当外植体产生丛生芽时,移至增殖培养基内进行增殖,之后进行生根、移栽。以 1/2MS 为基本培养基,添加 0.2 mg/L 的 NAA,蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L,pH 5.8,121℃ 高压灭菌 17 min,制备 10 种培养基(表 3)。培养温度 25℃,环境湿度 65%~85%,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对灭菌效果影响

由表 1 可知,经 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 10 min 的花托的污染率明显低于 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 5 min 的花托,但长时间的消毒促使褐化率有所升高,且在组培的各个阶段均存在不同程度的褐化现象。

表 1 不同消毒时间灭菌效果比较

Table 1 Effect of different sterilization time

消毒时间/min	花蕾数/个	污染数/个	污染率/%	褐化数/个	褐化率/%
5	40	24	60.0	2	5.0
10	40	13	32.5	5	12.5

2.2 花蕾大小对非洲菊诱导分化的影响

由表 2 可知,2 种花托的愈伤组织诱导有较大差异,直径为 1.5 cm 的花托分化困难,并且愈伤组织形成缓慢,很多都成乳白色,经多次继代仍未见分化,另外直径 0.8 cm 的花托愈伤组织中也有乳白色现象产生。直径 0.8 cm 的花托的愈伤组织,愈伤大多呈深绿色,而且在 25 d 时花托的边缘有直接长出来的芽。同时在观察中还发现 2 种非洲菊品种中,黄瓣黑蕊的花托更容易诱导出丛生芽。

表 2 花蕾大小对非洲菊诱导分化的影响

Table 2 Effect of buds size on induced callus and buds differentiation on gerbera

花蕾直径/cm	接种数/个	污染数/个	愈伤数/个	愈伤诱导率/%	芽分化数/个	分化率/%
1.5	40	27	24	60.0	4	10.0
0.8	40	34	32	80.0	15	37.5

2.3 不同激素浓度对比对非洲菊外植体愈伤组织和芽诱导的影响

观察发现,接种 1 周后,花托的边缘膨大,接种时未除尽的花丝逐渐生长。2 周后,7~10 号培养基中均出现少量愈伤组织,但其它培养基愈伤组织不太明显。3 周后愈伤组织继续增多,但 1~6 号培养基中愈伤组织生长缓慢且有的呈乳白色,9 号培养基中花托边缘直接

长出嫩芽。4 周后,愈伤组织上有颗粒状突起产生,花托边缘长出来的嫩芽增多。由表 3 可知,当 6-BA 浓度为 10 mg/L,NAA 为 0.2 mg/L 时,诱导效果最佳。在一定范围内,当 NAA 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的升高,外植体的愈伤组织诱导率及丛生芽分化率也呈升高的趋势,说明 6-BA 在非洲菊外植体愈伤组织和芽诱导阶段起关键作用,从而可推出在诱导分化愈伤组织方面,需要高浓度的 6-BA,同时当 6-BA 浓度一定时,随着 NAA 的浓度升高,外植体的愈伤组织诱导率呈下降趋势,而芽的分化率略有升高,说明 NAA 对愈伤组织诱导中作用不太明显,并且高浓度的 NAA 对愈伤组织诱导还有抑制作用。另外,在试验中发现 6-BA 浓度在 6 mg/L 以上时均有玻璃化苗的出现。在观察中同样发现黄瓣黑蕊的花托比红瓣黄蕊更容易诱导出丛生芽。

表 3 不同激素浓度对比对非洲菊外植体愈伤组织和芽诱导的影响

Table 3 Effect of hormone concentrations on induced callus and buds differentiation on gerbera

编号	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	花托个数/个	愈伤数/个	愈伤诱导率/%	分化数/个	分化率/%
1	2	0.2	20	13	65.0	1	5.0
2	2	0.5	20	10	50.0	3	15.0
3	4	0.2	20	17	85.0	1	5.0
4	4	0.5	20	14	60.0	2	10.0
5	6	0.2	20	18	90.0	3	15.0
6	6	0.5	20	15	75.0	5	25.0
7	8	0.2	20	18	90.0	7	35.0
8	8	0.5	20	13	65.0	9	45.0
9	10	0.2	20	19	95.0	13	65.0
10	10	0.5	20	17	85.0	12	60.0

2.4 丛生芽的增殖

试验结果表明,6-BA 浓度过大时,分化出的丛生芽个数较少,且易呈玻璃化,进一步分化的可能性较小,而 6-BA 浓度较低时,分化出的丛生芽较多且颜色、叶片大小均正常,所以在增殖分化阶段选取 2 种低浓度的 6-BA 进行试验。

表 4 不同激素浓度对比对非洲菊丛生芽增殖的影响

Table 4 Effect of hormone concentrations on buds breeding of gerbera

编号	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	调查数/个	增殖数/个	增殖率/%	平均株高/cm
11	1.0	0.2	10	85	8.5	3.52
12	1.0	0.5	10	60	6.0	3.67

将带有诱芽外植体移至①MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;②MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 2 种培养基中进行增殖,培养 4 周后发现,较低浓度的 NAA 更有利于丛生芽的增殖,并且株高稍低,幼苗较为健壮。因此 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为适宜的丛生芽增殖培养基。

2.5 生根与移栽

将增殖培养基中的苗丛分成单株移栽到生根培养基 $1/2$ MS+IAA 0.2 mg/L 上,10 d 后根陆续长出,同时幼苗不断变壮。将生根的试管苗置于育苗室练苗 2~3 d,移至蛭石:草炭=1:1 的基质中养护。



图1 非洲菊再生体系的诱导

注:A.愈伤组织;B.芽的分化;C.芽的增殖;D.芽的生长;E.芽的生根;F.养护的幼苗。

Fig.1 Regeneration system of Gerbera

Note: A. Callus; B. Bud differentiation; C. Bud proliferation; D. Bud growth; E. Bud of the root; F. Curing seedlings.

3 讨论

直径在 1 cm 以上的花蕊裸露,为灭菌带来困难,培养中容易污染,因此,外植体应选用直径为 0.8 cm 左右的幼嫩花蕾。另外,外植体用 HgCl_2 浸泡的时间应为 10 min 左右,消毒时间过短,消毒不彻底,污染率大幅度上升,消毒时间过长,褐化严重,易导致坏死。 HgCl_2 消毒时间过长可能是褐化原因的一个方面,植物材料基因

型、材料大小、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^[3]。

在外植体诱导分化阶段,6-BA 起主要作用,应处于较高的浓度。该试验得出的最适培养基为 MS+6-BA 10 mg/L+NAA 0.2 mg/L,这一结果与鲁雪华等^[4]的研究结果较为一致。该试验发现在 25 d 左右花托的边缘有直接长出来的芽,直接分化的苗比经过愈伤组织分化的苗诱导分化周期短,性状更稳定,但在增殖分化阶段增殖倍数较低,如何提高直接分化苗的繁殖效率,尚无报道,有待进一步研究。在该试验中发现,当 6-BA 浓度较高时易出现玻璃化苗,这可能与外植体本身所含的内源激素的种类、浓度水平差异和对外源激素的反应灵敏性不同有关^[5],另外,该试验在 7~8 月份进行,高温、多湿的环境更易导致试管苗玻璃化,与刘丽荣等^[6]的报道相一致。

参考文献

- [1] 黄继明. 花卉快速繁殖[M]. 上海:上海科技出版社,1989.
- [2] 龙雅宜. 切花生产技术[M]. 北京:金盾出版社,1994.
- [3] 夏小环,王静,尹梅,等. 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.
- [4] 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.
- [5] 杨继涛,邹志荣,张素勤,等. 植物激素对非洲菊花托愈伤组织诱导的研究[J]. 西北农业学报,2003,12(3):133-135.
- [6] 刘丽荣,苏荣德,李忠丽. 非洲菊组织培养繁殖的试验研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报,2002,4(3):13-15.

(该文作者还有姚红涛,单位同第一作者。)

Establishment of Regeneration System of Gerbera

QIAO Yong-xu, ZHANG Yong-ping, ZHANG Hong-xin, CHEN Chao, WANG Gui-lan, YUAN Xiao-long, YAO Hong-tao

(Department of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: 'Gerbera' receptacle was used as explant, the effect of callus, buds and roots induction at different concentration in 6-BA and NAA were studied. The results showed that 0.8 cm receptacle callus induction rate was high but browning was low. The best callus and buds induction mediums was MS+6-BA 10 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The best buds breeding mediums was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. Root occurred mediums was $1/2$ MS+IAA 0.2 mg/L.

Key words: gerbera; receptacle; callus; buds occurring