

doi:10.11937/bfyy.20170803

## 不同消毒方式及激素配比对 毛桃愈伤组织形成的影响

宋启玲, 王贵元, 孟想想, 叶家保, 张威威, 许 锋

(长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

**摘要:**以毛桃品种“春美”当年生枝的茎段以及嫩叶为外植体,采用单因子试验方法,研究了在不同消毒方法下接种的2种外植体的污染率和愈伤组织形成率,以及不同激素种类和浓度配比下2种外植体的愈伤组织形成率,以期为建立毛桃再生体系以及毛桃的遗传转化提供参考依据。结果表明:毛桃茎段的表面消毒以75%酒精30 s+2.5% NaClO 10 min为佳;适合茎段的最佳初代培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,毛桃叶片的表面消毒以75%酒精30 s+2.5% NaClO 6 min+0.5% NaClO 10 min最佳,适合叶片的最佳初代培养基为1/2MS+TDZ 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>。

**关键词:**毛桃;茎段培养;叶片培养;消毒方法;激素配比

**中图分类号:**S 662.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0061-06

桃(*Prunus persica* (L.) Batsch)属蔷薇科多年生木本植物,广泛分布于亚、美、非等大洲,起源于我国西部,是我国最古老的树种之一<sup>[1]</sup>。桃可分为食用桃和观赏桃两大类,食用桃果肉细腻多汁,营养丰富,不仅用于鲜食,还可以加工成桃汁、桃干和桃罐头等,深受人们喜爱;观赏桃花色鲜艳、开花繁茂,在美化城市景观以及提高人民生活质量上都具有重要的作用<sup>[2]</sup>。我国是桃第一生产大国,面积和产量均居世界首位,同时也是世界上最大的桃遗传多样性中心<sup>[3]</sup>。在我国,毛桃是应用最广泛的桃树树种之一,主要是由于毛桃具有比较发达的根系,而且与栽培品种嫁接时具有较高的亲和力而被广泛用于嫁接砧木<sup>[4-5]</sup>。同时,毛桃耐寒、耐旱,对土壤要求不严等优点都值得研究<sup>[6-7]</sup>。国外主要集中于桃中酚类物质及花青素

抗氧化活性等方面的研究,而国内主要集中于育种方面的研究,如病虫害的管理与控制以及果实品质的提高,特别是关于如何提高果实储存品质,如何延长储存时间和如何减少采后腐烂等问题,但是这些育种的方法周期长、工作量大<sup>[8]</sup>,而通过现代生物技术可以缩短桃的育种时间,提高育种效率。

桃组织培养是遗传转化的基础,根据国内外的研究现状发现,桃树在转基因方面停滞不前,主要是由于桃树没有稳定、高效的再生体系<sup>[9]</sup>,因此建立桃树高效、稳定的以成熟基因型无性组织为外植体的再生体系是遗传转化的关键一步。该研究以毛桃的茎段和叶片2种外植体进行离体组织培养,研究了不同消毒方式及激素对比对愈伤组织形成的影响,以期在短期内较好地保持植物遗传的稳定性,并为桃树遗传转化及改变单个基因的性状提供参考依据。

**第一作者简介:**宋启玲(1994-),女,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:song70@126.com

**责任作者:**许锋(1979-),男,博士,教授,现主要从事药用植物次生代谢等研究工作。E-mail:xufeng198@126.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31300574)。

**收稿日期:**2017-04-06

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试桃品种为湖北省长江大学落叶果树基地

中的毛桃(*P. persica* (L.) Batsch)“春美”。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 外植体的处理与接种

于2015年4—7月从长江大学落叶果树基地剪取毛桃树树势健壮、无病虫害、长势一致的当年生新梢和枝梢上嫩叶,用保鲜膜保湿带回实验室,并于当天进行接种试验。采回来的外植体在接种前先用无磷洗涤剂清洗,洗净后再用自来水冲洗20~30 min,之后用无菌水清洗2~3次,放在灭菌的烧杯中用无菌水浸泡,转移至超净工作台上,茎段用75%的酒精浸泡30 s,嫩叶浸泡20 s;再用不同浓度的次氯酸钠(NaClO)浸泡处理,最后用无菌水冲洗3~5遍,并用无菌滤纸吸干材料表面水分。用灭菌的镊子、刀片将各节间茎段切成长度为0.5~1.0 cm后,用刀片在茎段上轻划几道伤口,将叶片切成0.5 cm<sup>2</sup>的叶块,叶背划细小伤口。最后将切割后的嫩茎接种于MS培养基上,嫩叶正面朝下接种于1/2MS培养基上。所有培养基于121℃高温灭菌20 min,灭菌前pH调至5.8。嫩茎的消毒处理方法如表1所示,嫩叶

表1 茎段不同消毒方法处理组合

Table 1 Treatment combinations of different disinfection methods of stem segments

处理 Treatment	消毒方法 Disinfection methods
1	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 5 min
2	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 8 min
3	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 10 min
4	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 15 min
5	75%酒精30 s + 0.5% NaClO 10 min
6	75%酒精30 s + 0.5% NaClO 15 min
7	75%酒精30 s + 0.5% NaClO 20 min
8	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 6 min + 0.5% NaClO 15 min

表2 叶片不同消毒处理方法组合

Table 2 Treatment combinations of different disinfection methods of leaves

处理 Treatment	消毒方法 Disinfection methods
1	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 5 min
2	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 8 min
3	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 10 min
4	75%酒精30 s + 0.5% NaClO 10 min
5	75%酒精30 s + 0.5% NaClO 15 min
6	75%酒精30 s + 0.5% NaClO 20 min
7	75%酒精30 s + 2.5% NaClO 6 min + 0.5% NaClO 10 min

表3 茎段的不同外源激素种类和浓度处理组合

Table 3 Different types and concentrations of exogenous hormones treatment combinations of stem segments

处理 Treatment	激素 Hormones/(mg·L <sup>-1</sup> )		
	6-BA	IBA	GA <sub>3</sub>
A1	0.5	0.2	0.5
A2	0.5	0.2	1.0
A3	0.5	0.5	0.5
A4	0.5	0.5	1.0
B1	1.0	0.2	0.5
B2	1.0	0.2	1.0
B3	1.0	0.5	0.5
B4	1.0	0.5	1.0

表4 叶片的不同外源激素种类和浓度处理组合

Table 4 Different types and concentrations of exogenous hormones treatment combinations of leaves

处理 Treatment	激素 Hormones/(mg·L <sup>-1</sup> )		
	TDZ	6-BA	NAA
A1	1.5	1	0.0
A2	1.5	2	0.0
B1	1.5	0	0.1
B2	1.5	0	0.5

的消毒处理方法如表2所示。每个处理接种25瓶,每瓶接3个外植体,重复3次。嫩茎的外源激素种类和浓度组合见表3,嫩叶分化培养基的外源激素种类和浓度见表4。每个处理接种25瓶,每瓶接3个外植体,重复3次。

### 1.2.2 培养条件

上述外植体接种后转到人工气候培养箱中,嫩茎于24~25℃黑暗中培养1周后转到培养室,温度为24~25℃,嫩叶在温度为24~25℃的培养箱中黑暗条件下培养2周后转到培养室,温度为24~25℃,光照强度均为1000~2000 lx,光照时间为16 h·d<sup>-1</sup>的环境下培养。

## 1.3 项目测定

接种1周后统计污染率,污染率(%)=接种外植体污染数/接种外植体总数×100;接种30 d后统计愈伤组织形成率,接种愈伤组织形成率(%)=形成愈伤的数/接种总数×100。

## 1.4 数据分析

采用SPSS统计分析软件,利用Duncan多重比较分析,以P≤0.05水平上进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒方法对茎段愈伤组织形成的影响

外植体消毒是获得无菌苗的关键,消毒方法直接影响外植体的萌发率,茎段接种 1 周左右的茎段边缘及伤口处有膨胀的迹象,转至 16 h/8 h 光周期的人工智能培养箱,继续培养 1 周后,开始形成愈伤组织(图 1)。培养 30 d 后观察愈伤组织,并统计不同的消毒方法对茎段愈伤组织形成的影响。由图 2 可知,处理组合 2 的污染率最低,仅为 11.41%,处理组合 3 的污染率较低,为 13.33%。处理组合 1 污染率最高为 35.41%,与其它消毒方法之间存在显著性差异。同时,处理组合 3 的愈伤组织形成率最高为 83.26%,处理组合 5 的最低为 55.56%,比较分析可得,各处理组合间存在显著性差异。综上,对于茎段选用的消毒方法以 75% 酒精 30 s + 2.5% NaClO 10 min 最佳。

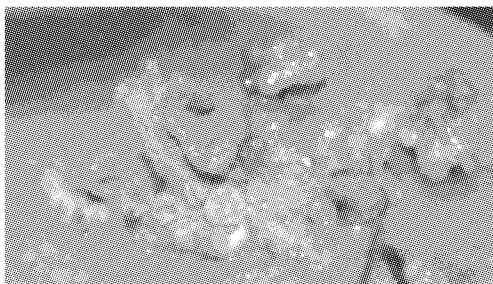
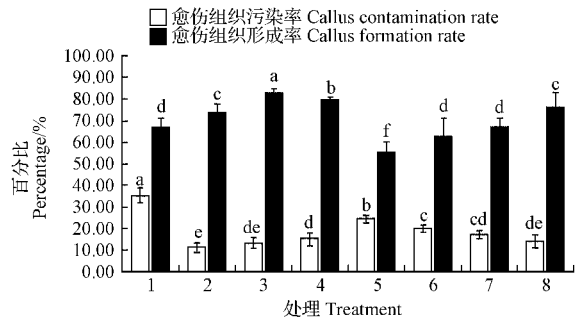


图 1 最佳消毒方法处理下毛桃的茎段愈伤组织  
Fig. 1 Callus derived from stem segments of *P. persica* (L.) Batsch under optimal disinfection method

### 2.2 不同外源激素种类和浓度对茎段愈伤组织形成的影响

接种后 1 周左右,接种的茎段有膨胀的迹象,转至 16 h/8 h 光周期的人工智能培养箱,继续培养 1 周后,茎段边缘以及伤口处开始形成愈伤组织(图 3)。培养 30 d 后观察不同激素种类和浓度处理下愈伤组织的形成率。由图 4 可知,A3、B1、B3、B4 处理的激素种类和浓度诱导茎段外植体时,愈伤组织形成率比较高,分别为 75.11%、78.22%、83.30%、75.56%。其中 B3 的愈伤组织形成率最高达 83.30%,A2 的愈伤组织形成率



注:不同小写字母表示差异显著( $P \leq 0.05$ )。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 2 不同消毒方法对茎段愈伤组织形成的影响

Fig. 2 Effects of different disinfection methods on callus formation of stem segments

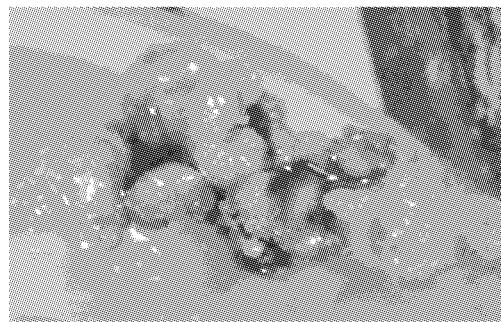


图 3 最佳外源激素种类和浓度处理下毛桃的茎段愈伤组织

Fig. 3 Callus derived from stem segments of *P. persica* (L.) Batsch under optimal types and concentrations of exogenous hormones

最低为 56.44%。通过分别比较 3 种外源激素浓度对愈伤组织形成率的影响可知,当 6-BA 与 IBA 的浓度不变研究  $GA_3$  对愈伤组织形成率的影响时,茎段的愈伤组织形成率是随着  $GA_3$  浓度的增加而减小的;当 6-BA 与  $GA_3$  的浓度不变研究 IBA 对愈伤组织形成率的影响时,茎段的愈伤组织形成率是随着 IBA 浓度的增加而增加的;当 IBA 与  $GA_3$  的浓度不变研究 6-BA 对愈伤组织形成率的影响时,茎段的愈伤组织形成率是随着 6-BA 浓度的增加而增加的。综合考虑,B3 处理最适合茎段诱导愈伤组织的形成,其次为 B1 处理,即最佳的激素种类和浓度处理组合为 MS + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  +  $GA_3$   $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

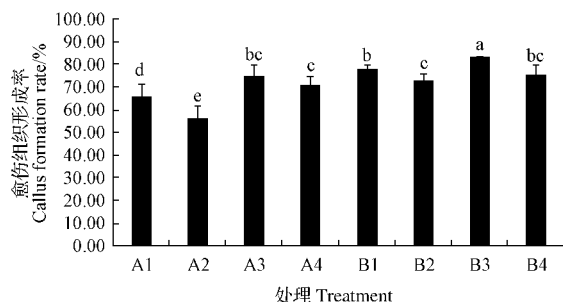


图4 不同外源激素种类和浓度的处理组合对茎段愈伤组织形成的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of exogenous hormones on the callus formation of stem segments

### 2.3 不同消毒方法对叶片愈伤组织形成的影响

接种后,暗培养1周,叶片没有明显的愈伤组织,暗培养2周后,叶片边缘以及伤口处开始形成愈伤组织。由图5可知,处理组合7的污染率最低为6.67%,处理组合2的污染率较低为8.00%,处理组合1的污染率最高为12.00%,同时处理组合7的愈伤组织形成率是最高的为82.22%。不同消毒方法处理的叶片,污染率的显著性差异不明显,但是对于愈伤组织形成率的影响很大,并且存在显著性差异。因此,综上所述,最佳的消毒方法采用75%酒精30s+2.5%NaClO6min+0.5%NaClO10min。

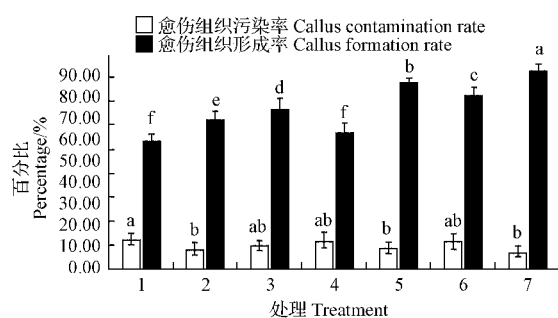


图5 不同消毒方法对叶片愈伤组织形成的影响

Fig. 5 Effect of different disinfection methods on callus formation of leaves

### 2.4 不同外源激素种类和浓度对叶片愈伤组织形成的影响

噻二唑苯基脲(TDZ)是一种人工合成的苯基脲衍生物之一,微溶于水。TDZ作为一种新型的

植物生长调节剂,最初被用作棉花的脱叶剂<sup>[10-11]</sup>。通过对不同植物的离体研究,发现在植物组织细胞的培养中TDZ具有生长素和细胞分裂素双重作用,可以单独或其它生长调节物质配合对植物细胞起作用<sup>[12]</sup>。同时研究表明,TDZ可以使植物组织在较短的时间内能有效的刺激植株的再生<sup>[13-14]</sup>。DECLERCK等<sup>[15]</sup>通过对桃树叶片愈伤组织的生长和形态的研究表明,在1/2MS培养基中加入TDZ可以诱导出绿色、结构致密的愈伤组织。参照之前的研究结果,使用不同外源激素种类与浓度对愈伤组织的影响,结果如图6所示,A1、A2、B1、B2处理诱导叶片外植体时,愈伤组织形成率分别为75.84%、70.96%、84.03%、79.24%。分别比较6-BA和NAA激素浓度对愈伤组织形成率的影响发现,当添加6-BA时,A1处理优于A2,二者存在显著性差异;当添加NAA时,B1处理优于B2,二者也存在显著性差异;比较6-BA与NAA的处理对愈伤组织形成率的影响,发现B处理效果明显优于A处理。同时,观察2种激素诱导出的愈伤组织(图7),6-BA仅仅诱导出了少量的愈伤组织,而NAA诱导出了结构较为致密的愈伤组织。综上所述,TDZ与NAA配合使用能更好的诱导毛桃叶片愈伤组织的形成<sup>[16-17]</sup>。因此,该研究采用1/2MS+TDZ 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>的激素种类和浓度进行叶片的初代培养。

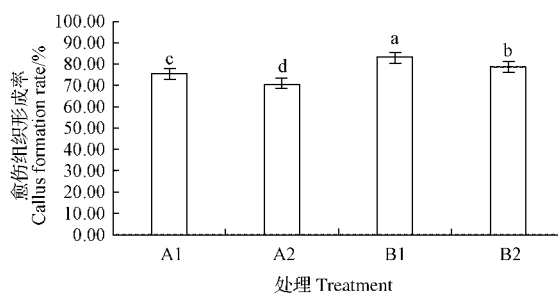
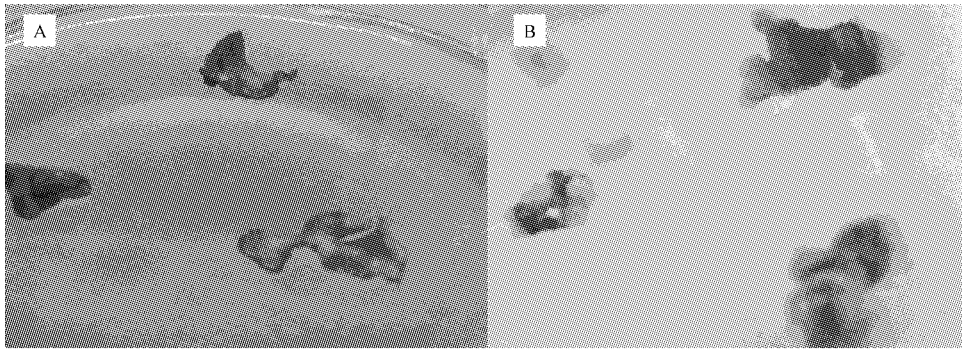


图6 不同外源激素种类和浓度的处理组合对叶片愈伤组织形成的影响

Fig. 6 Effect of different concentrations of exogenous hormones on the callus formation of leaves

## 3 结论与讨论

该研究选用树势健壮、生长势强、无病虫害、长势一致的当年生新梢以及嫩叶作为外植体进行



注: A. TDZ 与 6-BA 激素处理; B. TDZ 与 NAA 激素处理。

Note: A. TDZ and 6-BA hormone treatment. B. TDZ and NAA hormone treatment.

图 7 不同外源激素种类处理下毛桃的叶片愈伤组织

Fig. 7 Callus derived from leaves of *Prunus persica* (L.) Batsch under different exogenous hormones

愈伤组织培养,并于摘取当天进行接种试验。对外植体进行表面消毒是获得无菌苗的关键,也是建立桃再生体系的重要环节,消毒方法直接影响外植体的萌发率。通过 75%酒精浓度再结合不同浓度的次氯酸钠对 2 种外植体进行表面消毒,根据接种外植体的污染率和愈伤组织的形成率筛选出最适消毒方式。在茎段培养时,比较 8 种消毒方法的影响,结果表明,消毒方法之间存在显著性差异,最佳的消毒方法为 75%酒精 30 s + 2.5% NaClO 10 min。在叶片培养时,比较 7 种消毒方法的影响,不同消毒方法处理的叶片,污染率的显著性差异不明显,但是对于愈伤组织形成率的影响很大,并且存在显著性差异;因此叶片最佳消毒方法是采用 75%酒精 30 s + 2.5% NaClO 6 min + 0.5% NaClO 10 min。综上所述,外植体的污染率与外植体取材部位以及消毒所用的次氯酸钠浓度和时间有关,因为长时间使用高浓度的 NaClO 消毒会杀死幼嫩的组织细胞使其失去再生的能力,从而影响了愈伤组织的形成。有研究表明,不同部位的外植体表面消毒处理的时间也不相同<sup>[18-19]</sup>,所以选择合适的外植体及其表面消毒方法是建立桃高效离体培养的首要环节。

接种所用的培养基添加的激素种类及其浓度的配比对植物愈伤组织的形成有着关键作用。研究表明,生长素和细胞分裂素二者的浓度配比都合适的情况下才能在诱导芽时起到良好的效果<sup>[8,20-21]</sup>。在茎段的培养中,当 6-BA 与 IBA 的浓度不变,茎段的愈伤组织形成率与 GA<sub>3</sub> 的浓度呈

负相关;当 6-BA 与 GA<sub>3</sub> 的浓度时,茎段的愈伤组织形成率与 IBA 浓度呈正相关;当 IBA 与 GA<sub>3</sub> 的浓度不变时,茎段的愈伤组织形成率与 6-BA 浓度呈正相关,因此,茎段最佳的激素种类和浓度配比组合为:MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> 0.5 mg · L<sup>-1</sup>。在叶片的培养中,在培养基中添加一种新型的植物生长调节剂 TDZ 可加快愈伤组织的形成,最佳的激素种类和浓度配比组合为 1/2 MS + TDZ 1.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>。

近年来对于桃叶片诱导愈伤组织形成无病毒苗的实例较少<sup>[22]</sup>,使用叶片做外植体的愈伤组织形成的过程较慢,同时叶片长出的愈组织比较小且零散,愈伤组织生长过程中容易褐化。该研究分析了毛桃初代培养时,茎段以及叶片的最佳消毒方法以及茎段诱导分化时最佳的激素种类和浓度配比情况,为毛桃继代培养时所用的最佳激素种类和浓度配比以及最佳的生根培养所用的激素种类和浓度提供了参考依据,为进一步建立一整套完整的无病毒苗的再生体系以及桃的遗传转化体系奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 龙兴桂. 现代中国果树栽培(落叶果卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 235.
- [2] DEBEAUJON I, LÉONKLOOSTERZIEL K M, KOORNNEEF M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2000, 122(2): 403-414.

- [3] 柴春燕,胡东旭. 宜兴百合特性及高产栽培技术[J]. 广西园艺, 2003(3): 24-25.
- [4] 周平,郭瑞,廖汝玉,等. 2011-2013年度国外桃遗传育种与生产研究进展[J]. 中国南方果树, 2014, 43(4): 34-37.
- [5] 罗克明,万明长,罗孝明,等. 毛桃砧嫁接桃、杏、李的亲合力研究[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(5): 20-21.
- [6] 叶航,简恒,朱立新,等. 4种桃砧木对南方根结线虫抗性研究[J]. 中国果树, 2006(4): 39-42.
- [7] 王雯君,贾克功,朱立新,等. 毛桃对北方根结线虫的抗性研究[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(4): 71-76.
- [8] 许建兰,马瑞娟,俞明亮,等. ‘银河’蟠桃果实性状遗传评价及育种利用探讨[J]. 果树学报, 2014(5): 769-775.
- [9] 闫承璞. 桃离体培养及叶片再生体系的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [10] MOK M C, MOK D W S, TURNER J E, et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems[J]. Hort Science, 1987(22): 1194-1197.
- [11] 王旭炜,付杰,王青,等. TDZ在木本植物再生中的应用趋势及桑树中的前景[J]. 蚕学通讯, 2014(1): 22-30.
- [12] 徐晓峰,黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学报, 2003, 20(2): 227-237.
- [13] HUTCHINSON M J, SAXENA P K. Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium* × *Hortorum* Bailey) tissue cultures[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(7): 512-515.
- [14] VISSER C, QURESHI J A, GILL R, et al. Morphoregulatory role of thidiazuron; Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures[J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1704-1707.
- [15] DECLERCK V, KORBAN S S. Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch)[J]. Journal of Horticultural Science, 1996, 71(1): 49-55.
- [16] 刘燕,龙成昌,巫华美,等. 贵州金丝桃组培快速繁育技术研究[J]. 种子, 2011, 30(10): 40-42.
- [17] ZHOU H C, MING L, XIA Z, et al. Plant regeneration from *in vitro* leaves of the peach rootstock ‘Nemaguard’ (*Prunus persica* × *P. davidiana*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 101(1): 79-87.
- [18] 郭伟伟,孟庆杰,黄勇,等. ‘黄金冠’桃组织培养的初步研究[J]. 北方园艺, 2010(19): 142-144.
- [19] 孙俊,孙其宝,俞飞飞. 桃快速繁殖技术体系的研究[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(5): 731-732.
- [20] 任凝辉,武荣花,王献,等. 矮生一品红苞片外植体组织培养技术研究[J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(3): 239-240.
- [21] STYER D J, CHIN C K. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation [J]. Horticultural Reviews, 2010(5): 221-227.
- [22] SAN B, LI Z, HU Q, et al. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaf explants of peach rootstock Guardian®, is significantly enhanced by silver thiosulfate [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 120(2): 757-765.

## Effect of Different Disinfection Methods and Hormone Ratio on Callus Formation of *Prunus persica* (L.) Batsch

SONG Qiling, WANG Guiyuan, MENG Xiangxiang, YE Jiabao, ZHANG Weiwei, XU Feng  
(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

**Abstract:** The stem segments and tender leaves which were current-year branches of *Prunus persica* (L.) Batsch were used as explants. Using the single factor design, the effects of different disinfection methods on the inoculated of two explants contamination rate and callus formation rate, and the rate of callus formation under different hormone types and concentration ratio were studied, in order to lay a foundation for the regeneration system and genetic transformation of *P. persica*. The results showed that the optimal surface disinfection of the stem segments of *P. persica* was 75% alcohol 30 seconds + 2.5% NaClO 10 minutes; the optimum medium for stem segments was MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + IBA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> 0.5 mg · L<sup>-1</sup>. And the optimal surface disinfection of the tender leaves of *P. persica* was 75% alcohol 30 seconds + 2.5% NaClO 6 minutes + 0.5% NaClO 10 minutes; the optimum medium for tender leaves was 1/2MS + TDZ 1.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>. In this study, the regeneration system from stem segments and leaves of *P. persica* was established, which laid the foundation for the genetic transformation of peach.

**Keywords:** *Prunus persica* (L.) Batsch; culture of stem segment; culture of tender leaves; disinfection methods; types and concentrations of hormones