

非洲菊试管苗叶柄愈伤组织的诱导与分化研究

周俊^{1,2}, 张美¹, 曾宋君^{1*}, 吴坤林¹, 陈之林¹

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)品种‘Sunanda’试管苗幼叶的带叶叶柄为材料,研究了培养基、外植体类型和继代次数等因素对愈伤组织诱导及分化的影响。结果表明:培养基上附加不同植物生长调节剂所诱导出的愈伤组织在形态和分化能力上存在显著差异,叶柄基部诱导愈伤组织的最适培养基是MS+TDZ 0.3 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹。外植体以叶片长度>0.5 cm,叶片已舒展,颜色嫩绿的幼叶最佳,继代培养基以MS+KT 1.0 mg L⁻¹较适宜,愈伤组织在分化培养基MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹上分化出芽的同时还会增殖,分化率达87.4%,继代培养2次的愈伤组织分化率可提高至95%。不定芽在生根培养基1/2MS+IBA 0.6 mg L⁻¹上的生根率达100%,试管苗移栽45 d后,成活率达97%以上。

关键词:非洲菊;切花;组织培养;外植体;培养基

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2009)03-0254-07

Studies on Regeneration System from Petiole of *Gerbera jamesonii* Bolus ‘Sunanda’ *in vitro*

ZHOU Jun^{1,2}, ZHANG Mei¹, ZENG Song-jun^{1*}, WU Kun-lin¹, CHEN Zhi-lin¹

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The rapid propagation system has been established for *Gerbera jamesonii* Bolus ‘Sunanda’ using leaves with petiole as explants. The results showed that the medium with different plant growth regulator had significantly different effects on callus morphology and differentiation capability. The optimum medium for inducing callus from the base of petioles was Murashige and Skoog (MS) medium containing TDZ 0.3 mg L⁻¹ and NAA 0.1 mg L⁻¹. The optimum explants was unfolded, light green leaves with length > 0.5 cm. The subculture medium was MS supplemented with KT 1.0 mg L⁻¹, and the induction rate was 65.9%. The adventitious bud could differentiate cultured on MS supplemented with 6-BA 2.0 mg L⁻¹ and NAA 0.1 mg L⁻¹, and the differentiation rate was 87.4% in the first differentiation culture, and above 95% in the second. The half-strength MS medium supplemented with IBA 0.6 mg L⁻¹ was optimum for inducing root and the rooting was up to 100%. When plantlets with well-developed root system were transferred for 45 days, survival was up to 97%.

Key words: *Gerbera*; Cut flower; Tissue culture; Explant; Medium

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)俗称扶郎花,为菊科扶郎属多年生宿根草本观赏花卉,是世界上著名的五大鲜切花品种之一,具有相当高的商业价值。由于各种病毒、微生物的侵害使非洲菊的品质受到严重影响,有必要利用各种育种方法培育抗性好的优良品种。通过植物离体培养和遗传转化技

术进行非洲菊的遗传改良,已成为非洲菊育种的重要途径。目前,非洲菊遗传转化研究多以叶柄直接出芽的方式获得再生转基因植株^[1-4],而以叶柄愈伤组织再生的转化受体系统比叶柄直接出芽系统具有转化效率高、转化效果稳定等特点^[5]。但非洲菊叶柄愈伤组织分化产生再生植株的难度较大,不

收稿日期:2008-05-07 接受日期:2008-07-30

基金项目:广州市科技计划项目(2006J1-C01312)资助

* 通讯作者 Corresponding author

同品种、不同外植体、不同培养条件之间存在巨大差异,再生体系不理想,严重制约了植物基因工程技术在非洲菊中的应用^[5-8]。本研究旨在前人工作基础上,研究试管苗继代培养基、愈伤组织诱导和分化培养基中植物生长调节剂的种类与浓度,叶柄外植体的生理状态和愈伤的继代次数等因素对愈伤组织诱导及分化的影响,以期建立高效、稳定的非洲菊叶柄愈伤再生体系,为今后通过基因工程改良性状奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

非洲菊 (*Gerbera janesonii* Bolus) 切花品种 'Sunanda' 的无菌苗由广东省农业科学院花卉研究所提供。

所有培养基均附加蔗糖 30 g L⁻¹, 用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调节 pH 值至 5.8, 琼脂 6 g L⁻¹, 分装到 50 ml 的锥形瓶中, 每瓶 25 ml, 121℃ 高压 (1.2 kg cm⁻²) 湿热灭菌 20 min。在组织培养温室中培养, 温度为 25±1℃, 光照时间为 16 h d⁻¹, 光照强度为 30~40 μmol m⁻²s⁻¹。

1.2 愈伤组织的诱导

以在继代增殖培养基 (MS + 6-BA 0.1 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹) 上培养 20 d 的无菌苗幼叶的叶柄为材料, 刮去叶柄基部可能残留的生长点, 将带部分叶片 (约 1 mm × 1 mm) 的叶柄接种于以 MS 为基本培养基附加不同种类的生长调节剂的 3 组培养基中: I. 2,4-D 和 NAA 4 个浓度水平的组合 (2,4-D 1 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹, 2,4-D 2 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹, 2,4-D 2 mg L⁻¹ + NAA 0.5 mg L⁻¹, 2,4-D 4 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹); II. 6-BA (1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mg L⁻¹) 和 NAA (0.1、0.5 mg L⁻¹) 10 个浓度水平的组合 (表 1); III. TDZ (0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mg L⁻¹) 和 6-BA (0、1.0、2.0 mg L⁻¹) 及 NAA (0.01 mg L⁻¹) 11 个浓度水平的组合 (表 2), 对照均为 MS 培养基。每种培养基接种 10 瓶, 每瓶接种 6 个外植体, 每处理 3 次重复。20 d 后统计愈伤组织诱导率, 筛选出诱导愈伤组织的最佳培养基。

1.3 愈伤组织的分化

将带有愈伤组织的叶柄转移到附加 NAA 0.1 mg L⁻¹ 与 2,4-D (1、2 mg L⁻¹)、6-BA (1、2、4、8 mg L⁻¹)、TDZ (0.1、0.3 mg L⁻¹) 的 MS 培养基中 (表

3), 观察愈伤组织的分化情况, 20 d 继代 1 次, 并统计愈伤组织分化率, 筛选出愈伤组织分化的最佳培养基。

1.4 外植体类型和继代培养基对愈伤组织诱导和分化的影响

按照叶片的伸展程度、颜色及叶片 (含叶柄) 长度, 将叶片分为 4 种类型: (1) 长度 < 0.5 cm, 未伸展, 嫩绿的幼叶; (2) 长度 0.5~1.5 cm, 未伸展, 嫩绿的幼叶; (3) 长度 > 0.5 cm, 舒展, 嫩绿的幼叶; (4) 长度 ≥ 1.5 cm, 舒展, 深绿的老叶。分别接种于最佳的愈伤组织诱导培养基上, 每种外植体接种 12 瓶, 每瓶接种 5 个外植体, 每处理 3 次重复。20 d 后统计愈伤组织诱导率。

将无菌苗在 MS 培养基中继代培养两次后, 再继代培养于附加不同生长调节剂 (见文中) 的 MS 培养基中培养 20 d 后, 取生长的无菌苗幼叶的叶柄接种于筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基上, 20 d 后统计愈伤组织的诱导率。

将愈伤组织接种到分化培养基上, 20 d 后继代培养 1 次, 并观察愈伤组织的分化情况。

1.5 不定芽的生根与移栽

将从生芽分成单株接种至生根培养基中, 生根培养基以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 附加 NAA (0.1、0.2 mg L⁻¹) 和 IBA (0.3、0.6 mg L⁻¹), 每处理 2 次重复, 每个重复 30 株, 30 d 后观察生根情况。当试管苗长至 5 cm 左右, 并有数条根时, 开瓶炼苗 1 周, 洗净根部培养基, 移栽到泥炭土栽培基质中, 初次浇透水, 以后适当浇水, 45 d 后统计成活率。

1.6 数据处理

愈伤组织诱导率 (%) = 诱导出愈伤组织的外植体数 / 接种外植体数 × 100%

愈伤组织分化率 (%) = 分化出芽的愈伤组织数 / 接种的愈伤组织数 × 100%

试验结果均采用 SPSS 软件进行统计分析, 以平均值 ± 标准误差 (SD) 表示, 以邓肯氏新复级差测验法 (Duncan) 进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 不同生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响

叶柄在含 2,4-D 和 NAA 组合的 4 种培养基中, 8 d 后在叶柄的基部、叶片切口处以及外植体的上表面开始出现愈伤组织, 呈絮状、湿润、松软, 乳白

色,20 d 的愈伤组织诱导率均在 90% 以上,愈伤组织量大,生长快,但此类愈伤组织在随后的培养中均不能分化出芽。

叶柄在含 6-BA 和 NAA 组合的培养基 5 d 后外植体边缘膨大,10~15 d 产生两种类型的愈伤组织,I 类为干燥、致密、灰绿色或黄褐色、颗粒状、无光泽,出现的时间早,分布在外植体的表面及切口处,达 90% 以上,但在继培养中,不能增殖或增殖缓慢,继代一到两次后褐化死亡;II 类为黄绿色或浅黄色,间或有白色,质地松软、湿润、有光泽、颗粒

状(图版 I: 1),出现的时间晚,在附加 6-BA 和 NAA 的培养基上均能形成,以在含 6-BA 2.0 mg L⁻¹ 和 NAA 0.1 mg L⁻¹ 的培养基上的诱导率最高,达 40.6%。培养过程中,部分外植体可直接分化出不定芽,以在含 6-BA 1.0 mg L⁻¹ 和 NAA 0.1 mg L⁻¹ 的培养基上不定芽直接分化率最高,可达 51.4% (表 1)。

对照的叶柄未膨大,不能产生愈伤组织,在接种 10 d 后干枯死亡。

表 1 6-BA 和 NAA 组合对叶柄直接出芽和愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 6-BA and NAA on adventitious and callus induced from petiole

6-BA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Rate of callus induced (%)		不定芽分化率 Rate of adventitious bud (%)
		I 类 I type	II 类 II type	
0	0	0c	0g	0e
1	0.1	90.1 ± 4.87b	26.9 ± 3.39bcd	51.4 ± 1.84a
1	0.5	92.5 ± 5.51ab	30.0 ± 3.60bc	48.5 ± 2.19a
2	0.1	94.3 ± 3.54ab	40.6 ± 5.94a	48.0 ± 2.33a
2	0.5	95.9 ± 3.74ab	33.5 ± 2.26ab	46.8 ± 2.26a
4	0.1	96.1 ± 3.68ab	28.1 ± 4.31bcd	34.7 ± 7.57b
4	0.5	99.1 ± 1.27a	24.5 ± 5.37bcd	30.8 ± 6.29bc
6	0.1	100 ± 0.00a	21.7 ± 1.13cdef	26.4 ± 2.97bc
6	0.5	100 ± 0.00a	19.3 ± 3.11def	22.8 ± 5.02c
8	0.1	100 ± 0.00a	14.7 ± 5.09f	11.6 ± 1.27d
8	0.5	100 ± 0.00a	15.8 ± 2.26ef	8.9 ± 0.49d

同一列数字后不同字母表示差异显著($P < 0.05$, 邓肯氏新复极差法)。表 2~5 同。Data followed different letters within the same column present significant difference ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range. The same for Tables 2 to 5.

表 2 TDZ、6-BA 和 NAA 组合对出芽率和愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of TDZ, 6-BA and NAA on adventitious and callus induced from petiole

6-BA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Rate of callus induced (%)		不定芽分化率 Rate of adventitious bud (%)
			I 类 I type	II 类 II type	
0	0	0	0	0 ± 0g	0
0	0	0.1	100	46.6 ± 3.39bcd	11.4
0	0	0.3	100	59.4 ± 4.38a	7.6
0	0	0.5	100	56.1 ± 4.52ab	6.2
0	0	0.7	100	46.3 ± 5.02cd	0
0	0	0.9	100	30.5 ± 4.38ef	0
0	0.1	0.3	100	61.5 ± 5.51a	2.2
2	0.1	0.5	100	57.8 ± 2.26a	9.0
2	0	0.3	100	47.2 ± 4.10bcd	3.1
2	0	0.5	100	36.5 ± 0.84ef	0.7
2	0.1	0.3	100	52.1 ± 1.41abc	3.4
2	0.1	0.5	100	43.3 ± 3.96cde	3.6

叶柄在 TDZ 与 6-BA, NAA 组合的培养基中, 4 d 左右可见明显肿胀增大, 8 d 在外植体的表面、切口处出现干燥、致密的 I 类愈伤组织, 12 d 后叶柄基部出现 II 类愈伤组织。20 d 时 I 类愈伤组织的诱导率均可达 100%, 但继代 2~3 次后褐化死亡; 在 TDZ 0.3 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹ 的 MS 培养基上形成 II 类愈伤组织比在培养基 MS + 6-BA 2.0 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ 上提前 3 d, 诱导率达 61.5%。但在含 TDZ 的培养基中不定芽分化率明显比不含 TDZ 的培养基的少, 分化率均在 15% 以下(表 2)。

2.2 不同生长调节剂组合对愈伤组织分化的影响

将带不同类型愈伤组织的叶柄转移到含 NAA 0.1 mg L⁻¹ 与 2,4-D (1, 2 mg L⁻¹)、6-BA (1, 2, 4, 8 mg L⁻¹)、TDZ (0.1, 0.3 mg L⁻¹) 的分化培养基中, 结果在含 2,4-D 培养基上诱导的絮状、湿润、松软、乳白色愈伤组织和在含 TDZ、6-BA 培养基上诱导的 I 类愈伤组织在所有分化培养基中培养 20 d, 都未能分化出不定芽。

而在含 TDZ、6-BA 的培养基上诱导的 II 类愈伤组织, 在含有 2,4-D (1, 2 mg L⁻¹) 的分化培养基中转变为致密的白色愈伤组织, 也不能分化出不定芽。在含有 TDZ (0.1, 0.3 mg L⁻¹) 的培养基中增殖缓慢, 并迅速褐化, 分化率低。在含有 6-BA (1, 2, 4, 8 mg L⁻¹) 的培养基中, 愈伤组织表面逐渐变为绿色, 6 d 分化出绿色芽点(图版 I: 2), 在芽点继续分化为肉眼可见的独立芽的同时, 愈伤组织增殖速度加快, 形态也发生转变, 形成由许多白色的大颗粒

愈伤组织构成的半致密的有光泽的愈伤组织团, 并不断产生新的芽点, 分化出新的不定芽(图版 I: 3), 在同一愈伤组织团上可以看到处于不同发育时期的不定芽(图版 I: 4)。每个外植体上诱导出的愈伤组织团增殖能力不尽相同, 大小不等, 为 1.0~3.0 cm, 在不同浓度的 6-BA 中, 愈伤组织分化率均在 75% 以上, 以 6-BA 2 mg L⁻¹ 时的分化率最高, 为 87.4%(表 3)。

将尚未分化出芽点的愈伤组织团切成直径 0.5 cm 左右的愈伤组织块, 在 MS + 6-BA 2.0 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ 上继代培养, 愈伤组织增殖速率减慢, 不定芽分化率显著提高, 20 d 时达 95% 以上。不定芽数多达 10~15 个, 有的可达 20 个以上。

在愈伤组织的分化过程中, 不定芽的玻璃化率随培养基中 6-BA 浓度的增加而升高, 当 6-BA 为 8 mg L⁻¹ 时, 不定芽的玻璃化率达 43.9%, 形成水渍化的叶状体, 无法正常发育。在低浓度 6-BA (1.0, 2.0 mg L⁻¹) 培养基中, 分化出的不定芽多数生长正常。玻璃化程度不高的试管苗在不加任何激素的 MS 培养基中再次继代培养后, 可恢复正常生长。

2.3 外植体类型对愈伤组织诱导和分化的影响

4 种类型的外植体, 在 MS + TDZ 0.3 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ 上进行愈伤组织诱导, 结果表明外植体对愈伤组织的诱导有显著影响, III 类外植体, 即叶片已伸展的幼叶叶柄, 愈伤组织诱导能力最强, 达到 65.9%, IV 类外植体, 即叶片长度 ≥ 1.5 cm, 舒展, 深绿的老叶最弱, 而叶片尚未伸展的幼叶叶柄介于两者之间(表 4)。

表 3 2,4-D、TDZ、6-BA 分别与 NAA 0.1 mg L⁻¹ 组合对 II 类愈伤组织分化的影响

Table 3 Effects of 2,4-D, TDZ, 6-BA and NAA 0.1 mg L⁻¹ on differentiation of callus II

生长调节剂 Growth regulators (mg L ⁻¹)	愈伤组织状态 Status of callus	愈伤组织分化 Differentiation of callus		
		分化率 Differentiation rate (%)	分化时间 Days of differentiation	玻璃化率 (%) Hyperhydration rate
2,4-D 1.0	致密可增殖 Compact and proliferation	10.0 ± 6.65d	15	0d
2,4-D 2.0	致密可增殖 Compact and proliferation	7.6 ± 2.54d	18	0d
6-BA 1.0	保持原状态并增殖 Keep original state and proliferation	76.5 ± 3.96b	8	8.1 ± 0.99c
6-BA 2.0	保持原状态并增殖 Keep original state and proliferation	87.4 ± 3.81a	6	9.7 ± 2.26c
6-BA 4.0	保持原状态并增殖 Keep original state and proliferation	82.1 ± 1.27ab	6	24.3 ± 3.68b
6-BA 8.0	保持原状态并增殖 Keep original state and proliferation	78.3 ± 4.52ab	7	43.9 ± 6.65a
TDZ 0.1	保持原状态, 增殖缓慢, 10d 后出现褐化 Keep original state and proliferate slowly, browning after 10 days	42.8 ± 6.08c	12	25.9 ± 3.11b
TDZ 0.3	保持原状态, 增殖缓慢, 8 d 后出现褐化 Keep original state and proliferate slowly, browning after 8 days	35.9 ± 4.94c	14	36.5 ± 3.68a

4 种类型外植体的愈伤组织分化率没有显著差别,以 II 类外植体的愈伤组织分化率最高,为 89.2%,IV 类最低,为 84.1%。

表 4 不同外植体对愈伤组织诱导及分化的影响

Table 4 Effects of explants on induction and differentiation of callus

外植体类型 Explant type	II 类愈伤诱导率 Callus II induction rate (%)	分化率 Differentiation rate (%)
I	52.5 ± 3.04b	85.7 ± 5.09a
II	57.7 ± 2.26ab	89.2 ± 2.83a
III	65.9 ± 3.39a	88.8 ± 2.26a
IV	34.7 ± 4.53c	84.1 ± 3.25a

2.4 继代培养基的影响

无菌苗在无生长调节剂的培养基中继代培养两次后,再在含生长调节剂的培养基中培养 1 代,叶片进行愈伤组织诱导和分化。来源于不同继代培养基的无菌苗叶柄在培养基 MS + TDZ 0.3 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ 上培养,愈伤组织的诱导率明显不同,以在含 KT 1.0 mg L⁻¹ 和 6-BA 0.05 mg L⁻¹ 的继代培养基上的试管苗的带叶叶柄的诱导率最高(表 5),在 MS + 6-BA 2.0 mg L⁻¹ + NAA 0.5 mg L⁻¹ 上继代培养的无菌苗叶柄基部产生大量的愈伤组织,产生的叶片簇生、叶片狭长、黄色卷曲、易碎,此种叶片在 MS + TDZ 0.3 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ 愈伤诱导培养基上叶柄愈伤组织的诱导率为 0。将上述实验中获得的愈伤组织在 MS + 6-BA 2.0 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ 上分化培养,分化率均在 80% 以上。

2.5 不定芽的生根与移栽

当不定芽生长至 3 cm 左右,分成单芽,进行生根培养。不定芽在以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,

附加 NAA (0.1、0.2 mg L⁻¹)、IBA (0.3、0.6 mg L⁻¹) 的培养基中均能生根,以 1/2MS + IBA 0.6 mg L⁻¹ 出根时间短,根系粗壮,生根率 100%,平均不定根数达 10.5 条。将生根苗移栽到经消毒处理的湿润蛭石基质或泥炭土的混合基质中,成活率达 97% 以上,且生长健壮(图版 1: 6)。

3 讨论

通过叶柄诱导愈伤组织并分化出芽建立非洲菊再生体系已有不少报道,黄衡宇等^[7]以非洲菊叶柄为外植体,在附加 6-BA 和 NAA 的培养基上培养的愈伤组织诱导率最高仅为 5%;郑秀芳等^[11]用叶柄仅诱导出愈伤组织而难以分化成芽;陈玉华等^[6]用非洲菊 3 个品种的叶柄进行离体培养,只有 1 个品种诱导出的愈伤组织能分化出苗,分化率为 60%,平均不定芽数为 6.11;Orlikowska 等^[8]报道非洲菊 3 个品种的叶柄愈伤组织经过 3 次继代培养(每次 28 d)的分化率最高,分别为 99.6%,67.2%,59.3%;平均再生不定芽数分别为 7.3,3.1,3.7。在本实验中,用非洲菊品种‘Sunanda’的叶柄能诱导出湿润、有光泽的颗粒状愈伤组织,初次培养和继代培养的周期仅 20 d,分化率分别达到 87.4% 和 95% 以上,每块直径 0.5 cm 左右的愈伤组织所分化的不定芽数多达 10~15 个,有效提高了非洲菊的再生频率。

植物生长调节剂是植物组织培养中的关键物质,在组织培养中起着重要的调节作用。在本研究中,TDZ 在 0.1~0.9 mg L⁻¹ 的范围内,无论是单独作用,还是与 6-BA 和 NAA 共同作用,都能诱导出愈伤组织,TDZ 0.3 mg L⁻¹ 与 0.1 mg L⁻¹ NAA 协同

表 5 无菌苗继代培养基对愈伤组织诱导和分化的影响

Table 5 Effects of subculture medium on induction and differentiation of callus

继代培养基中的生长调节剂 Growth regulators (mg L ⁻¹)	增殖倍率 Multiplication times	无菌苗状态 Plantlet status	II 类愈伤组织诱导率 Rate of callus II induced (%)	分化率 Differentiation rate (%)
0	1.2	叶色深绿, 苗弱 Plantlets slender with dark-green leaves	37.9 ± 3.75c	81.7 ± 3.67a
6-BA 0.05	4.5	叶色深绿, 苗壮 Plantlets strong with dark-green leaves	59.9 ± 4.53a	89.3 ± 1.41a
6-BA 0.1	7.8	叶色浅绿, 苗壮, 少数叶片玻璃化 Plantlets strong with light-green leaves, a few leaves hyperhydric	48.0 ± 3.04b	87.7 ± 2.83a
6-BA 0.2 + NAA 0.2	10.5	苗壮, 叶色浅绿, 狭长, 部分玻璃化 Plantlets strong with light-green, long-narrow leaves, some leaves hyperhydric	34.0 ± 3.46c	86.8 ± 3.25a
KT 1.0	4.8	叶色深绿, 苗壮 Plantlets strong with dark-green leaves	63.3 ± 2.55a	88.0 ± 5.37a
6-BA 2.0 + NAA 0.5	-	叶簇生, 黄绿色, 狭长, 卷曲, 易碎 Leaves yellow-green, rosette, crisp, long and narrow	0d	-

作用的效果更佳(表3),比在培养基MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹上的诱导率高出20个百分点,这与Nhut等^[12]认为在愈伤组织诱导上TDZ比6-BA更有效的结果相一致;但陈玉华等^[6]认为培养基中仅附加TDZ时叶柄不能诱导出愈伤组织,这可能是品种、外植体和外植体的生理状态不同导致对TDZ的敏感性不同。

前人对非洲菊叶柄再生体系的研究主要集中在不同品种对植物生长调节剂组合的反应,但是对培养条件、母株的生长状态以及外植体的生理状态等影响因素的研究不多。本研究较为系统地研究了外植体的生理状态、继代培养基以及培养条件等因素对愈伤组织诱导和分化的影响,并筛选了最适的继代培养基和培养条件。

Reynoid等^[13]在叶片再生体系的研究中,按叶片的长度(不含叶柄)将叶片分为4类,认为当叶片长度≤2 mm时,叶片处在发育早期,通过愈伤组织分化出芽的能力最强;Orlikowska等^[8]认为仅以叶片的长度判断叶片的发育时期缺乏科学依据,尚未伸展的幼叶叶柄最适合进行愈伤组织诱导。本实验综合了叶片长度、伸展情况以及颜色等因素,将外植体分为4类,结果表明这4类外植体的愈伤组织诱导能力存在显著差异,叶片长度>0.5 cm,叶片已伸展,颜色嫩绿的幼叶叶柄的愈伤组织诱导能力最强,叶片尚未伸展的次之,这说明外植体的生理状态对愈伤组织的诱导有显著影响。

在植物组织培养中,植物的内源激素对基因活动起调控作用,从而影响一系列代谢过程,最终影响植物的形态发生^[14]。本研究结果表明,除了培养基中的激素种类和浓度对愈伤组织的诱导有明显影响外,继代培养基中激素种类和浓度也有显著影响。这与王关林等^[15]在樱桃(*Prunus pseudocerasus*)砧木叶片再生体系建立的研究结果相似,可能是继代培养基中的激素除了直接影响母株的生长状况外,还可能会在试管苗的器官中积累,使外植体的内源激素含量产生差异,从而在愈伤组织诱导过程中影响外植体细胞的脱分化。

参考文献

[1] Elomaa P, Honkanen J, Puska R, et al. *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation [J]. *Biol Techn*, 1993, 11: 508-511.
[2] Nagaraju V, Srinivast G S L, Lakshmi S G. *Agrobacterium*-mediated

genetic transformation in *Gerbera hybrida* [J]. *Curr Sci*, 1998, 74 (7): 631-634.
[3] Zheng L P(郑丽屏), Liu J M(刘继梅), Wang L X(王玲仙), et al. *Agrobacterium*-mediated transfer of flavonoid 3'5'-hydroxylase cDNA to *Gerbera hybrida* modifies flower colour [J]. *J Nanjing Univ (Nat Sci)*(南京大学学报:自然科学版), 2003, 39(5): 516-521.(in Chinese)
[4] Yin M(尹梅), Cheng Z Q(程在全), Xia X H(夏小环), et al. Construction plasmid about a cold resistant gene (*GPAT*) and transformation into *Gerbera hybrida* [J]. *SW J Agri Sci*(西南农业学报), 2007, 20(1): 91-94.(in Chinese)
[5] Orlikowska T, Nowak E. Factors affecting transformation of *Gerbera* [J]. *Acta Hort*, 1997, 447: 619-621.
[6] Chen Y H(陈玉华), Chen Z L(陈之林), Duan J(段俊), et al. The induction and proliferation of calli in *Gerbera jamesonii* Bolus [J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 2006, 14(3): 222-228.(in Chinese)
[7] Huang H Y(黄衡宇), Li L(李鹂), Yang S H(杨胜辉). Tissue culture of *Gerbera jamesonii* Bolus [J]. *J Jishou Univ (Nat Sci)*(吉首大学学报:自然科学版), 2001, 22(1): 4-6.(in Chinese)
[8] Orlikowska T, Nowak E, Marasek A, et al. Effects of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from *Gerbera petioles* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1999, 59: 95-102.
[9] Zhang J H(张建华), Chen H Y(陈火英), Zhuang T M(庄天明), et al. Studies on optimum hormone levels for the plant regeneration from leaf explants cultured *in vitro* of *Gerbera jamesonii* Bolus [J]. *Northern Hort*(北方园艺), 2002(4): 60-61.(in Chinese)
[10] Piao Y Z(朴曰子), Cao H N(曹后男), Zhu B(朱波), et al. High frequency plant regeneration system of *Gerbera jamesonii* Bolus tissue culture [J]. *J Agri Sci Yanbian Univ*(延边大学农学学报), 2004, 26(1): 32-36.(in Chinese)
[11] Nhut D T, Teixeira D S, Le J A, et al. Thin cell layer morphogenesis as a powerful tool in ornamental plant micropropagation and biotechnology [M]// Nhut D T, Le B V, Tran T V K, et al. *Thin Cell Layer Culture System*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003: 247-284.
[12] Zhang S Q(张素勤), Zou Z R(邹志荣), Geng G D(耿广东), et al. Effects of media and plant hormones on callus induction of *Gerbera* leaves *in vitro* [J]. *Northwest Sci Techn Univ Agri For (Nat Sci)*(西北农林科技大学学报:自然科学版), 2004, 32(10): 29-32.(in Chinese)
[13] Reynoid J P, Chriqui D, Noin M, et al. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 33: 203-210.
[14] Li X M(李雪梅), Liu R S(刘熔山). Effect of endogenous hormones on induction and differentiation of the embryogenic calli of wheat young inflorescences [J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 1994, 30: 255-260.(in Chinese)
[15] Wang G L(王关林), Xia X Y(夏秀英), Zhong W T(钟文田), et al. Regeneration and antibacterial peptide gene transformation of

cherry leaves [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2003, 30(2): 209-211.(in Chinese)

图版说明

图版 I

- 1. 在含 2,4-D 和 NAA 的培养基上诱导的乳白色、絮状、湿润愈伤组织;
- 2. 干燥、致密的 I 类愈伤组织;
- 3. 湿润、有光泽、颗粒状的 II 类愈伤组织;
- 4. 愈伤组织分化出绿色芽点;
- 5. 愈伤组织继续增殖并分化出不定芽;
- 6. 同一愈伤组织上有不同发育期的不定芽;
- 7. 愈伤组织分化出芽;
- 8. 移栽成活的非洲菊试管苗。

Explanation of plate

Plate I

- 1. Milk white, flocculent, wetted callus cultured on the MS medium supplemented with 2,4-D and NAA;
- 2. Dry, compact callus I;
- 3. Light yellow, wetted, soft callus induced from the base of petiole;
- 4. Green bud spots differentiated from calli;
- 5. Calli proliferate and adventitious buds regenerated at the same time;
- 6. Adventitious buds at different stages differentiated from the same calli;
- 7. Adventitious buds differentiated from calli;
- 8. Regenerated plantlets after transplantation.

