

影响非洲菊愈伤组织诱导和增殖的因素

陈玉华^{1,2}, 陈之林¹, 段俊^{1*}, 曾宋君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 100039)

摘要:以非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus) 7个品种的叶片和带叶叶柄为外植体, 接种到附加 0.5、1.5 和 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基上培养, 各品种均能诱导出愈伤组织并增殖。愈伤组织的诱导和增殖状况均是叶片好于叶柄, 但各品种之间存在显著差异。将品种 F30 和 II 的叶片和带叶叶柄接种到含不同浓度单一细胞分裂素(6-BA、TDZ、KT) 的 MS 培养基上培养, 均未能诱导出愈伤组织, 而在含 2.0 mg L⁻¹ 6-BA+0.5 mg L⁻¹ NAA 的培养基上可以诱导出愈伤组织, 且由品种 II 叶柄诱导产生的愈伤组织可再分化出芽, 品种 F30 诱导的愈伤组织却不能分化, 但在其叶柄基部可直接出芽。以上结果说明, 生长素是非洲菊愈伤组织诱导和增殖所必须的, 非洲菊愈伤组织诱导、增殖和芽再生方式受品种及外植体类型的影响。

关键词: 非洲菊; 菊科; 组织培养; 生长调节剂

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)03-0222-07

The Induction and Proliferation of Calli in *Gerbera jamesonii* Bolus

CHEN Yu-hua^{1,2}, CHEN Zhi-lin¹, DUAN Jun^{1*}, ZENG Song-jun¹

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

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Leaves and petioles of seven varieties of *Gerbera jamesonii* Bolus (Compositae) cultured on MS medium supplemented with 0.5, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D could produce and proliferate calli in all the varieties. The callus induction by leaf explants is better than by petioles, although there are differences among varieties. No callus could be induced from leaf or petiole explants of varieties F30 and II cultured on MS medium if supplemented alone with 6-benzyladenine (6-BA) or thidiazuron (TDZ), or kinetin (KT). However, the calli were induced on MS medium containing 2.0 mg L⁻¹ 6-BA and 0.5 mg L⁻¹ NAA (α -naphthaleneacetic acid), and the calli derived from petioles of variety II could produce redifferentiated shoots, but of variety F30 could not. The later could only produce shoots directly from the base of the petioles. It is obvious that callus induction and proliferation of gerbera need growth regulators, and are influenced by varieties and explants of different parts of the plants.

Key words: *Gerbera jamesonii*; Compositae; Tissue culture; Growth regulators

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)是一种重要的观赏花卉, 可作盆花和切花^[1]。传统上以杂交育种为主, 然而, 由于非洲菊种内的遗传变异相对有限, 所以培育具有新花色的新品种也相应受到限制^[2]。随着生物技术的发展, 目前为止, 成功地进行非洲菊遗传转化的报道不多^[2-4], 且都是利用叶柄直接出

芽(丛生芽)作为转化体系。一般来说, 在植物转基因过程中以丛生芽为受体的转化体系的转化效率较低, 并且转化效果不稳定^[1-5], 而采用愈伤组织为转化受体不仅可以提高转化效率^[6], 还能有效地降低嵌合体的发生频率^[7]。因此, 建立高效的非洲菊愈伤组织培养和再生体系, 在进行外源基因导入等遗

收稿日期: 2005-11-04 接受日期: 2006-03-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B20901012)资助

* 通讯作者 Corresponding author

传操作过程中具有重要的意义。但是,愈伤组织的诱导在许多非洲菊品种上还存在困难,目前研究结果差异较大^[8-10],这在很大程度上限制了非洲菊遗传转化的研究进展。本文以非洲菊7个品种为材料,探讨不同外植体在不同培养基上的愈伤组织诱导、增殖及出芽状况,为建立以愈伤组织为转化受体的非洲菊基因转化体系提供参考。

1 材料和方法

1.1 外植体

供试非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)品种为广东省珠海市园艺科学研究所提供的非洲菊品种F30、S5 无菌苗和广东省农业科学院花卉研究所提供的非洲菊品种Ⅱ、96、L2、6267、6259 无菌苗。从非洲菊无菌苗上分别切取幼嫩叶片和带部分幼叶的叶柄,叶片大小约为4 mm×4 mm,带叶叶柄约为1 cm 长且带约1 mm×1 mm 幼叶(以下均简称为叶柄)。

1.2 培养基

以MS培养基为基本培养基,附加3%蔗糖,并依试验需要添加不同浓度的6-BA、KT、TDZ、2,4-D 和NAA等生长调节剂。所有培养基皆以0.75%琼脂固化,在高压灭菌前将pH值调至5.8。

品种F30和Ⅱ的叶片和叶柄接种在以MS为基本培养基,附加仅含单一生长调节剂6-BA 1.0、5.0、10.0、12.0 mg L⁻¹ (单位下同),TDZ 0.1、0.3、0.5、1.0,KT 1.0、5.0、10.0、12.0,2,4-D 0.5、1.5、2.0的愈伤组织诱导培养基上,每天观察非洲菊叶片和叶柄的愈伤组织发生状况。另外品种F30和Ⅱ的叶柄接种在含6-BA和NAA组合的MS培养基上,其浓度为6-BA 0.5、2.0+NAA 0.2和6-BA 2.0、5.0+NAA 0.5,观察在含细胞分裂素6-BA的前提下再添加生长素NAA与单一附加6-BA诱导叶柄愈伤组织发生效果的差异。品种F30、Ⅱ、S5、96、L2、6267和6259的叶片和叶柄接种于仅含生长素2,4-D 0.5、1.5、2.0的培养基上,每天观察愈伤组织生长情况,每5 d统计愈伤组织诱导率和愈伤组织鲜重。所有处理重复3次。

1.3 培养条件

培养温度为25±1℃,光照时间为16 h d⁻¹,光照强度为2 000 lx。

1.4 统计方法

始愈期的测定 自外植体接种到培养基上起至肉眼可见愈伤组织发生时的时间(d)。

愈伤组织诱导率的测定 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%。

愈伤组织鲜重的测定 根据李浚明^[11]方法测定。

统计分析 愈伤组织诱导率和愈伤组织鲜重的每组数据以平均值±标准误差(SD)表示。数据采用SPSS软件进行变量分析(AVOVA),在确定F值下以0.05水平为最小显著性差异(DUNCAN)。

2 结果和分析

2.1 生长调节剂与愈伤组织的诱导和出芽

品种F30和Ⅱ的叶片和叶柄接种在添加不同浓度的2,4-D (0.5、1.5、2.0),6-BA (1.0、5.0、10.0、12.0),KT (1.0、5.0、10.0、12.0)和TDZ (0.1、0.3、0.5、1.0)的单一生长调节剂的MS培养基上,这2个品种的叶片和叶柄仅在含生长素2,4-D的培养基中才能被诱导出愈伤组织,而在只含有6-BA、KT、TDZ及对照(不添加生长调节剂)培养基中均不能诱导出愈伤组织并相继死亡。在含6-BA和TDZ的培养基中培养的叶片和叶柄随生长调节剂浓度升高而褐化增强,培养50 d后全部褐化死亡;在含KT的培养基中培养的叶片和叶柄无明显异常变化,但培养60 d后死亡。表明生长素在非洲菊的愈伤组织诱导过程中起决定性作用,单一的6-BA、KT和TDZ等细胞分裂素不能诱导非洲菊的叶片和叶柄产生愈伤组织。

品种F30和Ⅱ的叶柄接种到MS+6-BA 0.5+NAA 0.2, MS+6-BA 2.0+NAA 0.2, MS+6-BA 2.0+NAA 0.5和MS+6-BA 5.0+NAA 0.5的培养基上培养13 d时,在叶柄切口处产生极少的黄色愈伤组织,随后这些愈伤组织很快变为绿色颗粒状愈伤组织,但愈伤组织增殖比在仅含2,4-D的培养基上的慢,当培养28 d时,在MS+6-BA 2.0+NAA 0.5上培养的品种F30叶柄基部直接产生芽(图1),品种Ⅱ叶柄基部出现湿润的绿色愈伤组织,并且分化出丛生芽(图2);在MS+6-BA 2.0+NAA 0.2上培养的品种Ⅱ叶柄生长状况与在MS+6-BA 2.0+NAA 0.5上相同;而在其余2种培养基上培养的品种F30和Ⅱ的叶柄仅诱导出愈伤组织。

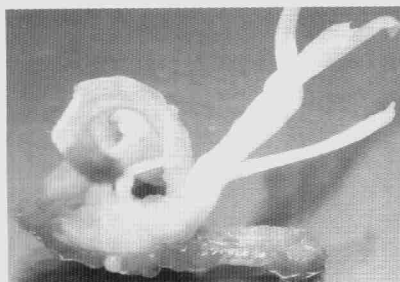


图 1 品种 F30 叶柄直接出芽

Fig. 1 Shoot directly from petiole of cv. F30 cultured on MS medium containing 2.0 mg L⁻¹ 6-BA and 0.5 mg L⁻¹ NAA



图 2 品种 II 愈伤再分化出芽

Fig. 2 Shoots redifferentiated from petiole derived callus of cv. II cultured on MS medium containing 2.0 mg L⁻¹ 6-BA and 0.5 mg L⁻¹ NAA

2.2 始愈期比较

接种在仅含 2,4-D 0.5、1.5、2.0 培养基上的 7 个品种的叶片和叶柄,在培养至第 5 天时切口处均开始膨胀,培养至第 8 天时除品种 F30 和 II 均出现淡黄色愈伤组织之外,品种 96、S5 和 6267 无愈伤组织产生。当培养基中的 2,4-D 浓度为 0.5 时,品种 L2 叶片的始愈期比叶柄的早 2 d,品种 6259 叶片的始愈期比叶柄的晚 2 d。除此之外,当 2,4-D 浓度为 2.0 时,品种 6259 叶片的始愈期比叶柄的早 2 d,同一品种的叶片和叶柄的始愈期均相同,但不同品种间有差别,品种 F30 和 II 的始愈期较早,为 8 d,其它的较晚,其中品种 96 和 6267 为 12 d,品种 S5 为 13 d。

2.3 愈伤组织诱导状况

叶片接种在仅含 2,4-D 0.5 的 MS 培养基上培养,品种 F30、II 和 L2 比其它 4 个品种能更快地产

生愈伤组织,并且这 3 个品种在培养 10 d 时的愈伤组织诱导率比其余 4 个品种在培养 15 d 时的还要高;叶片在仅含 2,4-D 0.5、1.5 和 2.0 的 3 种培养基上培养 15 d 时,品种 F30、II 和 L2 的愈伤组织诱导率已达 100%;培养 25 d 时,除品种 S5 愈伤组织诱导率只有 80% 外,其余 6 个品种都达 100% (表 1)。当以叶柄为外植体在仅含 2,4-D 2.0 的培养基上培养 10 d 时,除品种 96、S5 和 6267 外,其余 4 个品种均已产生愈伤组织,当培养 25 d 时,品种 F30 和 II 愈伤组织诱导率达到 100%,其余 5 个品种均低于 90% (表 1)。

培养相同时间,除品种 S5 外,其余 6 个品种叶片愈伤组织诱导率均高于叶柄,其中当 2,4-D 为 0.5 时,品种 L2 的叶片培养 25 d 的愈伤组织诱导率比叶柄高 25.00%。说明愈伤组织诱导率除受品种影响外,外植体也是重要的影响因素之一。

表 1 不同品种叶片和叶柄外植体的愈伤组织诱导率(%)
Table 1 Callus induction rates (%) from leaf and petiole explants of different varieties

外植体 Explants	2,4-D (mg L ⁻¹)	品种 Varieties	培养时间 Days of culture				
			5	10	15	20	25
叶片 Leaf	0.5	F30	0.00±0.00a	83.33±15.24ab	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	70.00±10.00a	96.67±5.77a	96.67±5.77a
		II	0.00±0.00a	86.67±5.77a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	46.67±5.77b	80.00±0.00b	80.00±0.00a
		L2	0.00±0.00a	73.33±5.77b	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	66.67±11.55a	93.33±11.55a	93.33±11.55a
		6259	0.00±0.00a	5.00±0.00c	49.60±20.00a	93.33±5.77a	93.33±5.77a

续表 1(Continued)

外植体 Explants	2, 4-D (mg L ⁻¹)	品种 Varieties	培养时间 Days of culture				
			5	10	15	20	25
叶片 Leaf	1.5	F30	0.00±0.00a	93.33±5.77a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00b	83.33±15.28a	96.67±5.57a	100.00±0.00a
		II	0.00±0.00a	76.67±20.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00b	26.67±5.77b	60.00±20.00b	66.67±15.24b
		L2	0.00±0.00a	80.00±20.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00b	76.67±15.28a	96.67±5.77a	100.00±0.00a
		6259	0.00±0.00a	6.67±11.55b	73.33±15.28a	96.67±5.77a	96.67±0.00a
	2	F30	0.00±0.00a	80.00±10.00a	96.67±5.77a	100.00±5.77a	100.00±0.00a
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00b	86.67±15.28a	96.67±5.77a	100.00±0.00a
		II	0.00±0.00a	86.67±15.28a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00b	10.00±0.00b	40.00±0.00b	83.33±15.28b
		L2	0.00±0.00a	65.00±15.24ac	90.00±10.00a	96.67±5.77a	100.00±0.00a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00b	50.00±17.00a	90.00±10.00a	100.00±0.00a
		6259	0.00±0.00a	23.33±10.00c	96.67±5.77a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
叶柄 Petiole	0.5	F30	0.00±0.00a	30.00±17.00b	86.67±5.77a	96.67±5.77a	100.00±0.00a
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	70.00±10.00ab	73.33±5.77b	76.67±5.77b
		II	0.00±0.00a	43.33±5.77a	80.00±10.00ab	86.67±5.77a	90.00±0.00ab
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	10.00±0.00c	43.33±5.57cd	70.00±20.00b
		L2	0.00±0.00a	0.00±0.00c	60.00±0.00b	66.67±5.77b	75.00±5.77b
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	13.33±5.77c	36.67±5.77d	83.33±5.77ab
		6259	0.00±0.00a	0.00±0.00c	20.00±0.00c	53.33±11.55c	53.33±17.00c
	1.5	F30	0.00±0.00a	53.33±5.77a	96.67±5.77a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00b	93.33±5.77a	93.33±5.77ab	96.67±5.77a
		II	0.00±0.00a	46.67±5.77a	80.00±10.00ac	90.00±10.00ab	90.00±10.00ab
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00b	6.67±5.77d	40.00±0.00c	76.67±5.77bc
		L2	0.00±0.00a	60.00±36.00a	70.00±20.00bc	70.00±20.00ab	86.67±11.55abc
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00b	46.67±5.77b	66.67±23.09b	90.00±17.00ab
		6259	0.00±0.00a	4.54±5.77b	54.55±34.28bc	72.73±25.00ab	77.27±10.00c
	2	F30	0.00±0.00a	50.00±1.55b	93.33±11.55a	96.67±5.77a	100.00±0.00a
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	90.00±10.00a	90.00±10.00a	90.00±10.00a
		II	0.00±0.00a	80.00±17.00a	96.67±5.77a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	13.33±11.55c	33.33±11.55c	86.67±23.09a
		L2	0.00±0.00a	70.00±10.00ab	86.67±15.28a	90.00±10.00a	90.00±10.00a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	16.67±5.77c	33.33±11.55c	76.67±15.24a
		6259	0.00±0.00a	21.73±19.00c	65.22±6.19b	65.22±6.19b	78.26±13.78a

*Duncan 新复极差测验, 同栏数据间具有相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$), 表 2 同。Means in each column followed by the same letter are not significantly different at $p>0.05$ according to Duncan's multiple range test. The same for Table 2.

总体来说,品种 F30、II 和 L2 愈伤组织诱导率最高,品种 96、6267 和 6259 次之,品种 S5 最低;叶片比叶柄容易诱导愈伤组织;愈伤组织诱导率受 2,4-D 浓度的影响不显著。

2.4 愈伤组织增殖状况

品种 L2 叶片在含 2,4-D 0.5、1.5 和 2.0 的 3 种培养基上培养 15 d 时的愈伤组织鲜重达 17.2 mg 个⁻¹, 高于其余 6 个品种培养 25 d 时的愈伤组织鲜重, 而品种 S5 叶片培养 25 d 的愈伤组织鲜重显著低于其余 6 个品种, 最高仅为 8.2 mg 个⁻¹ (表 2), 表明在由叶片诱导出的愈伤组织中 L2 的增殖最快, S5 的增殖最慢。对叶柄而言, 在相同的培养时间内, 同一培养基上培养的 7 个品种中, 品种 S5 的愈伤组织鲜重显著低于其余 6 个品种; 培养 25 d 时品种 S5 叶柄的愈伤组织鲜重最高仅为 4.66 mg 个⁻¹, 而品种 96 的叶柄最高为 17.46 mg 个⁻¹ (表 2)。从愈伤组织增殖状况来看: 除品种 S5 外, 其余 6 个品种由叶片诱导的愈伤组织鲜重均高于培养相同时间的叶柄, 其中品种 L2 在 3 种培养基中的叶片愈伤组织鲜重分别为叶柄的 8.12 倍、5.45 倍和 4.46 倍 (表 2)。可见, 愈伤组织增殖同时受品种和外植体种类的影响。

7 个品种在 3 种培养基上的愈伤组织增殖状况

不同, 25 d 时, 品种 L2 叶片在含 2,4-D 1.5 的培养基上诱导的愈伤组织鲜重分别比在 2,4-D 为 0.5 和 2.0 的高 1.12 倍和 1.33 倍; 品种 96 叶柄在含 2,4-D 1.5 的培养基上诱导的愈伤组织鲜重分别比在 2,4-D 为 0.5 和 2.0 的高 2.23 倍和 1.76 倍 (表 2)。可见, 2,4-D 浓度是影响愈伤组织增殖的因素之一。

2.5 愈伤组织生长状况

叶片和叶柄接种到仅含 2,4-D 0.5、1.5、2.0 的培养基上培养 10 d, 品种 F30、II 和 L2 诱导的愈伤组织为淡黄色, 其余品种的愈伤组织颜色相对较深; 品种 96 和 S5 由叶片和叶柄诱导出的愈伤组织颜色不同, 分别为黄色和棕黄色, 其余品种由叶片、叶柄诱导出的愈伤组织颜色基本一致。在这 3 种培养基上培养至 25 d 时, 只有由品种 L2 叶片和叶柄和品种 96 叶片诱导出的愈伤组织没有出现褐化现象, 其余的均发生不同程度的褐化现象, 其中以品种 6259 的褐化最为严重, 说明愈伤组织生长状况与品种及外植体种类有关。25 d 后有部分愈伤组织从黄色变为棕黄色, 这可能是愈伤组织老化的结果。

3 讨论

在非洲菊离体培养的研究中, 以用含多种激素

表 2 不同品种叶片和叶柄外植体诱导的愈伤组织鲜重(mg 个⁻¹)
Table 2 Fresh weight (mg) per callus of leaf and petiole explants from different varieties

外植体 Explants	2,4-D (mg L ⁻¹)	品种 Varieties	培养时间 Days of culture				
			5	10	15	20	25
叶片 Leaf	0.5	F30	0.00±0.00a	5.00±0.92b	8.00±0.00c	9.00±0.00bc	11.54±0.12c
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	6.06±0.24d	11.26±4.54b	15.74±2.94b
		II	0.00±0.00a	4.26±0.64b	10.00±1.00b	12.66±1.52b	16.00±0.40b
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	2.54±0.80e	6.94±0.84c	8.20±0.92d
		L2	0.00±0.00a	6.00±0.88a	20.46±0.64a	55.00±1.00a	56.00±1.00a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	2.66±0.62e	7.06±0.84c	17.46±0.50b
		6259	0.00±0.00a	0.00±0.00c	3.06±0.84e	7.46±0.46c	11.46±0.62c
	1.5	F30	0.00±0.00a	7.80±0.72b	10.00±0.00bc	11.00±0.00ab	15.74±0.24b
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	7.86±3.76cd	17.46±6.54ab	17.54±0.92b
		II	0.00±0.00a	6.14±1.63b	12.00±1.74b	13.66±0.58ab	17.06±0.12b
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	1.20±0.40e	3.86±0.84b	4.00±0.40d
		L2	0.00±0.00a	15.00±2.94a	27.60±3.28a	61.66±2.08a	62.94±2.00a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	2.94±0.84e	6.80±1.06ab	16.60±3.68b
		6259	0.00±0.00a	0.26±0.46c	4.66±1.40de	7.86±0.62b	12.26±0.42c

续表 2(Continued)

外植体 Explants	2, 4-D (mg L ⁻¹)	品种 Varieties	培养时间 Days of culture				
			5	10	15	20	25
叶柄 Petiole	2	F30	0.00±0.00a	5.74±1.42a	9.34±1.16b	10.24±1.16c	13.86±0.12c
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	6.26±0.64c	10.80±0.92bd	12.94±1.10c
		II	0.00±0.00a	4.20±0.92b	10.00±1.00b	12.00±0.00b	16.20±0.34b
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	0.40±0.00e	2.20±0.20bd	3.74±0.46d
		L2	0.00±0.00a	6.90±1.10a	17.20±2.40a	46.00±4.00a	47.50±1.50a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	3.06±1.66d	8.26±1.62a	16.14±0.12b
		6259	0.00±0.00a	1.46±2.28c	8.00±0.92bc	9.80±1.32bd	12.20±0.72c
		F30	0.00±0.00a	1.20±0.70 a	3.46±0.24ab	6.26±0.24a	8.40±0.34c
	0.5	96	0.00±0.00a	0.00±0.00b	3.14±0.50b	5.20±0.20b	7.80±1.32ab
		II	0.00±0.00a	1.74±0.24a	3.14±0.12b	3.74±0.46c	5.60±0.34cd
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00b	0.40±0.00c	1.14±0.30d	2.86±0.80e
		L2	0.00±0.00a	0.00±0.00b	3.60±0.00a	6.00±1.00ab	6.90±0.90bc
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00b	0.26±0.12c	1.86±0.24d	4.80±0.72d
		6259	0.00±0.00a	0.00±0.00b	0.46±0.12c	2.00±0.40d	2.54±0.50e
		F30	0.00±0.00a	2.14±0.24ab	6.66±2.30a	8.20±0.20b	14.14±0.24b
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00c	6.74±1.10a	15.94±8.40a	17.46±0.12a
	1.5	II	0.00±0.00a	1.86±0.24b	3.00±0.60b	4.66±1.16c	6.34±0.58d
		S5	0.00±0.00a	0.00±0.00c	0.14±0.12c	1.20±0.00c	4.66±0.42e
		L2	0.00±0.00a	3.14±1.74a	5.46±1.86a	7.80±1.58c	11.44±0.50c
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00c	1.80±0.20bc	3.40±0.34c	7.00±0.60d
		6259	0.00±0.00a	0.18±0.24c	2.18±1.34bc	4.54±1.42c	7.72±1.90d
		F30	0.00±0.00a	1.74±0.80abc	4.00±0.70a	6.14±1.32b	8.40±1.96ac
		96	0.00±0.00a	0.00±0.00d	4.60±0.64a	9.20±0.84a	9.94±0.30a
		II	0.00±0.00a	3.20±0.72a	3.86±0.24a	4.46±0.12c	5.34±0.12ab
	2	S5	0.00±0.00a	0.00±0.00d	0.26±0.24b	0.66±0.24d	3.46±0.92d
		L2	0.00±0.00a	2.80±0.40ab	5.26±2.40a	9.66±2.08a	10.66±2.08a
		6267	0.00±0.00a	0.00±0.00d	0.40±0.20b	1.20±0.70d	4.86±2.16bd
		6259	0.00±0.00a	1.22±1.04c	2.60±0.20a	3.66±0.18c	6.60±0.58bc

组合的培养基诱导叶片和叶柄产生愈伤组织为主。张素勤等将叶片在含 6-BA 和 2,4-D 两种激素的培养基上培养 15 d 成功获得了愈伤组织,并且愈伤组织诱导率达到 100%^[12]。黄衡宇等以叶柄为外植体,在附加 6-BA 和 NAA 的培养基上培养时,发现愈伤组织诱导率最高仅为 5%^[13],但尚未发现使用单一生长素成功诱导叶片和叶柄产生愈伤组织的报道。本研究结果表明,在仅含生长素 2,4-D 的培养基中,7 个品种的叶片和叶柄均能成功地诱导出愈伤组

织,并且愈伤组织诱导率最高可达 100%,最低的也有 75% (表 1),这与杨继涛^[14]以花托为外植体时的愈伤组织诱导率相似。但当培养基中仅附加细胞分裂素 6-BA、TDZ 和 KT 时,却不能诱导出愈伤组织,而在含 6-BA 的培养基中再添加 NAA 时却能诱导出愈伤组织,说明生长素在非洲菊愈伤组织的诱导中是不可或缺的。Miyoshi 等以非洲菊 17 个品种的子房为外植体,在含 6-BA 0.2、IAA 0.1+6-BA 0.2、NAA 0.1+6-BA 0.2 的培养基上培养,结果仅有

13个品种能产生愈伤组织,而愈伤组织诱导率最高为 17.5%,他认为 6-BA 是诱导愈伤组织所必需的^[9],这与本研究结果不同,其原因可能与外植体的种类不同有关。从本研究所用的 7 个品种的愈伤组织诱导及增殖状况看,叶片普遍好于叶柄,这可能与外植体本身对激素的敏感性不同有关。

在本文所试的 7 个品种中,品种 L2 明显比其它品种更容易诱导出愈伤组织,并且愈伤组织增殖也最快,而品种 S5 刚好相反(表 2);品种 F30 和 II 的叶柄出芽方式截然不同,品种 F30 的叶柄基部有直接出芽的现象(图 1),而品种 II 则需经过愈伤组织再分化才能出芽(图 2),表明非洲菊愈伤组织的诱导、增殖及叶柄出芽状况与品种有关。在不添加 NAA 而仅含 6-BA 1.0–12.0 的培养基中培养的品种 F30 和 II 叶柄 50 d 后全部死亡,而李华勇等以叶柄为外植体在附加 6-BA 2.0–5.0 的培养基上可直接分化出芽,并且出芽率最高达 53%^[15],这与本试验结果差别较大,可能与所试的非洲菊品种不同有关。Miyoshi^[9]和陈发棣等^[16]也认为非洲菊的愈伤组织诱导和出芽在品种间存在较明显的基因型效应。

本研究采用叶片和叶柄为外植体成功诱导出了愈伤组织,并且诱导出的这些愈伤组织能成功分化出芽(结果另文报道),叶片和叶柄不但具有材料丰富和取材不受植物生长期限制的优势,而且具有愈伤组织诱导率高和愈伤组织增殖快等特点,这可通过以愈伤组织为转化受体的基因转化体系的建立提供借鉴;同时,以叶片为外植体经愈伤组织再分化时及再生苗在生长阶段易发生表型变异^[17],因此,本研究也可对非洲菊的诱变育种提供参考。

参考文献

- [1] 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 Tissue Organ Cult*, 1999, 59:95–102.
- [2] 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'-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)
- [3] Elooma P, Honkanen J, Puska R, et al. *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation [J]. *Bio/Techn*, 1993, 11:508–511.
- [4] Nowak E, Makowska Z, Kucharska D, et al. The influence of initial explant on transformation effectiveness of *Gerbera hybrida* [J]. *Biotechnologia*, 1997, 4:27–38.(in Polish, with English summary)
- [5] Nagaraju V, Srinivas G S L, Lakshmi G, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida* [J]. *Curr Sci*, 1998, 74(7):630–634.
- [6] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nat Biotechn*, 1996, 14:745–750.
- [7] Liu H K(刘海坤), Wei Z M(卫志明). Recent advances in soybean genetic transformation [J]. *Plant Physiol Mol Biol (植物生理与分子生物学学报)*, 2005, 31(2):126–134.(in Chinese)
- [8] Jean-Paul R, Dominique C, Michèle N, et al. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1993, 33:203–210.
- [9] Miyoshi K, Asakura N. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16:1–5.
- [10] Lu F B(吕复兵), Zhu G F(朱根发), Liao F X(廖飞雄), et al. *Gerbera* tissue culture cell differentiation and rapid propagation [J]. *Hubei Agri Sci(湖北农业科学)*, 2004, 2:71–72.(in Chinese)
- [11] 李俊明. 植物组织培养教程 [M]. 第二版, 北京: 中国农业大学出版社, 2002. 57.
- [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 Tech 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] Huang H Y(黄衡宇), Li L(李鹏), 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)
- [14] Yang J T(杨继涛), Zou Z R(邹志荣), Zhang S Q(张素勤), et al. Effects of plant hormone on callus induction of *Gerbera* floral receptacle *in vitro* [J]. *Acta Agri Boreali-Occid Sin* (西北农业学报), 2003, 12(3):133–135.(in Chinese)
- [15] Li H Y(李华勇), Xu D G(许大光), Dong J(董静), et al. Effects of 6-BA and paclobutrazol on tip and petiole from *Gerbera in vitro* culture [J]. *Guangxi Agri Sci(广西农业科学)*, 2004, 35(4):270–271.(in Chinese)
- [16] Chen F D(陈发棣), Li Q Z(李倩中), Fang W M(房伟民), et al. Leaf culture *in vitro* of two varieties of *Gerbera jamesonii* [J]. *Jiangsu For Sci Techn* (江苏林业科技), 1998, 25:174–176.(in Chinese)
- [17] Schween G, Schwenke H G. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in greenhouse of *Primula* ssp. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2003, 72:53–61.