孔雀草杂交 F_1 代的植株再生*

刘娟旭 王 静 余义勋
（华南农业大学园艺学院 广州 510642）

摘要 以孔雀草（*Tagetes patula*）子叶、下胚轴和叶片为外植体，通过器官直接发生途径诱导形成不定芽，探讨植物生长调节剂组合、$AgNO_3$ 浓度、蔗糖浓度和外植体类型等因素对植株再生的影响，建立了再生体系。结果表明：MS + 6-BA 1.0 mg · L^{-1} + NAA 0.5 mg · L^{-1} + $AgNO_3$ 1.0 mg · L^{-1} + 蔗糖 40 g · L^{-1} 培养基最适合不定芽的分化和增殖，子叶不定芽分化率达90%以上，平均每外植体分化不定芽数达5.3个。不定芽较适生根培养基为 1/2MS + IAA 0.2 mg · L^{-1} + NAA 0.1 mg · L^{-1}，生根率达到90%。

关键词 孔雀草 子叶 植物生长调节剂 不定芽再生
中图分类号：S723.1+32 **文献标识码**：A **文章编号**：1006-4427(2009)03-0012-04

Plant Regeneration of *Tagetes patula* Hybrid Progeny F_1

Liu Juanxu Wang Jing Yu Yixun
(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642)

Abstract The regenerated plantlets in *Tagetes patula* L. hybrid progeny F_1 were obtained with the adventitious buds induced directly from the different explants, the cotyledons, leaves and hypocotyls. In this paper, several factors affecting in vitro regeneration of *T. patula*, such as different hormones combination, concentrations of sucrose and $AgNO_3$, and the different explants were examined. The optimum medium for shoot regeneration was MS medium containing 1.0 mg · L^{-1} 6-BA, 0.5 mg · L^{-1} NAA, 1.0 mg · L^{-1} $AgNO_3$ and 40 g · L^{-1} sucrose. 90% of adventitious shoot regeneration frequency with 5.3 shoots per cotyledon explants was obtained. The buds rooted when they were transferred to 1/2MS medium containing 0.2 mg · L^{-1} IAA and 0.1 mg · L^{-1} NAA after about 30 days and developed into healthy plantlets, which resulted in a rooting rate of 90%. The results of this study will facilitate the application of rapid propagation and genetic transformation methods in *T. patula* hybrid progeny F_1.

Key words *Tagetes patula*, cotyledons, plant growth regulator, shoot regeneration

孔雀草（*Tagetes patula* L.）是菊科万寿菊属植物。孔雀草品种“鸿运”杂交 F_1 代，花大瓣多，开花期长，比较适合华南地区的气候特点，是广州地区理想的园林花卉品种，市场需求量大。但是其种子价格较贵，植株开花后基本不结实，采用组织培养方法可以在短期内提供大量优质种苗以满足绿化美化需求。近年来，国内外对万寿菊（*T. erecta* L.）组织培养开展了较多研究[1-4]。齐迎春等[5]对孔雀草几个自交系扩繁及再生的研究进行了报道。但国内尚未见孔雀草杂交 F_1 代组织培养和植株再生的报道。

* 基金/项目：霍英东教育基金项目（104031）；广东省自然科学基金项目（05300848）。
通讯作者：余义勋（1973-），男，博士，副教授，E-mail：yuyixun@scau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

孔雀草 F_1 代种子购自美国泛美种子公司。

1.2 方法

1.2.1 *材料的消毒* 孔雀草 F_1 代种子在超净工作台上用75%酒精浸泡 30 s，再用 1 g·L^{-1}升汞溶液灭菌 8 min，无菌水冲洗 3～5 次，播种于 1/2MS 培养基上。

1.2.2 *培养基配方* 萌芽后，分别取幼苗的子叶、带顶芽的下胚轴、下胚轴（不带顶芽）和叶片接种到诱导培养基上培养。基本培养基为 MS，附加不同浓度及配比的 6-BA、NAA、IAA 等生长调节剂及不同浓度的 $AgNO_3$ 和蔗糖，培养基琼脂浓度均为 7 g·L^{-1}，pH 5.8～6.0。

1.2.3 *培养条件* 接种后，将材料置于 24～26℃，光照强度 2 000 lx，光照时间 12～14 h·d^{-1}条件下培养。每培养瓶接种 5 个外植体，每处理 10 瓶。25 d 后统计每个处理再生不定芽数和每个外植体再生芽数，计算不定芽分化率、每个外植体平均再生芽数，以确定最适的再生培养基。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂配比对子叶不定芽分化的影响

在基本培养基中分别附加不同浓度的 6-BA 和 NAA，见表 1。叶片、子叶和下胚轴等外植体在接种 7～15 d 后产生浅黄至黄绿色的愈伤组织，质地较为致密。不需更换培养基，子叶、带顶芽的下胚轴以及叶片 25 d 后开始产生芽点，可分化出不定芽，逐渐长成小芽丛（图 A～E）。其中在 6-BA 和 NAA 浓度分别为 1.0 mg·L^{-1}和 0.5 mg·L^{-1}的培养基中，不定芽诱导率最高，达到 88%。下胚轴外植体在各培养基中均不能分化不定芽（图 F）。

表 1 不同植物生长调节剂配比的子叶不定芽分化率 单位：%

NAA(mg·L^{-1})	各 6-BA 浓度下的子叶分化率				
	0mg·L^{-1}	0.5mg·L^{-1}	1.0mg·L^{-1}	2.0mg·L^{-1}	3.0mg·L^{-1}
0	0	0	0	0	0
0.1	0	53	62	68	42.0
0.5	0	59	88	69	62.5
1.0	0	43	73	53	70.0
2.0	0	21	51	41	60.0

2.2 $AgNO_3$ 浓度对孔雀草子叶不定芽分化的影响

从表 2 可以看出，适宜浓度的 $AgNO_3$ 对孔雀草子叶不定芽分化有明显促进作用。不加 $AgNO_3$ 时，子叶不定芽分化率和平均芽数分别只有 76.0% 和 3.64。当 $AgNO_3$ 浓度为 1.0 mg·L^{-1}时，子叶不定芽分化率和平均芽数均达到最大值，分别为 94.0% 和 5.27，但随着 $AgNO_3$ 浓度的继续增加，不定芽再生率和平均芽数都降低。因此，子叶不定芽分化的最适 $AgNO_3$ 浓度为 1.0 mg·L^{-1}。

表 2 不同 $AgNO_3$ 浓度的子叶不定芽分化

$AgNO_3$(mg·L^{-1})	外植体数(个)	不定芽分化率(%)	平均不定芽数(个)
0	50	76.0	3.64 c
0.5	50	82.0	3.83 bc
1.0	50	94.0	5.27 a
1.5	50	84.0	3.90 b
2.0	50	80.0	3.88 b

2.3 蔗糖浓度对孔雀草子叶不定芽形成的影响

蔗糖浓度对孔雀草子叶不定芽形成有明显的影响(表3)。当蔗糖浓度达到40 g·L^{-1}时,不定芽再生率和平均芽数达到最大,不定芽再生率和平均芽数分别为94.0%和4.78个,且芽生长健壮,无玻璃化现象;当蔗糖浓度为30 g·L^{-1}时,不定芽再生率和平均芽数也比较高,但分化的不定芽玻璃化较为严重;20 g·L^{-1}以下蔗糖处理产生的芽生长缓慢,这可能与后期生长过程中碳源不足有关,而含50 g·L^{-1}的蔗糖培养基渗透压过高,也不利于不定芽的形成。因此不定芽分化的蔗糖最佳浓度为40 g·L^{-1}。

表3 不同蔗糖浓度的子叶不定芽分化

蔗糖浓度(g·L^{-1})	接入子叶数目(个)	不定芽再生率(%)	平均芽数(个)
20	50	54	3.01
30	50	76	3.20
40	50	94	4.78
50	50	56	2.48

2.4 不同外植体再生植株的差异

以孔雀草幼苗的叶片、子叶和下胚轴作为外植体,在MS+6-BA 1.0 mg·L^{-1}+NAA 0.5 mg·L^{-1}+$AgNO_3$ 1.0 mg·L^{-1}+蔗糖20 g·L^{-1}中培养分化。由表4可以看出不定芽诱导率以子叶最高,带顶芽的下胚轴次之,叶片分化率较低,不带顶芽的下胚轴外植体不能分化不定芽。诱导成芽所需的时间也是子叶和带顶芽的下胚轴最短,叶片最长。另外,子叶和带顶芽的下胚轴诱导形成的芽成苗后玻璃化程度明显低于叶片,每个外植体形成芽的平均数也比较高。

表4 不同外植体类型的不定芽分化

外植体类型	不定芽分化率(%)	平均不定芽数(个)
子叶	94.0	5.3
带顶芽的下胚轴	82.0	4.2
下胚轴(不带顶芽)	0	0
叶片	53.0	2.2

2.5 不定芽增殖

将获得的小丛芽转入不同增殖培养基中进行丛生苗诱导。由表5可看出,接种的不定芽在设计的几种培养基上均能增殖。继代培养基中6-BA的浓度在0.5~1.5 mg·L^{-1}为宜。其中培养基MS+6-BA 1.5 mg·L^{-1}+NAA 0.3 mg·L^{-1}中增殖倍数最高,达到4.2。从第3次增殖培养开始,丛生苗的增殖倍数逐渐减少。

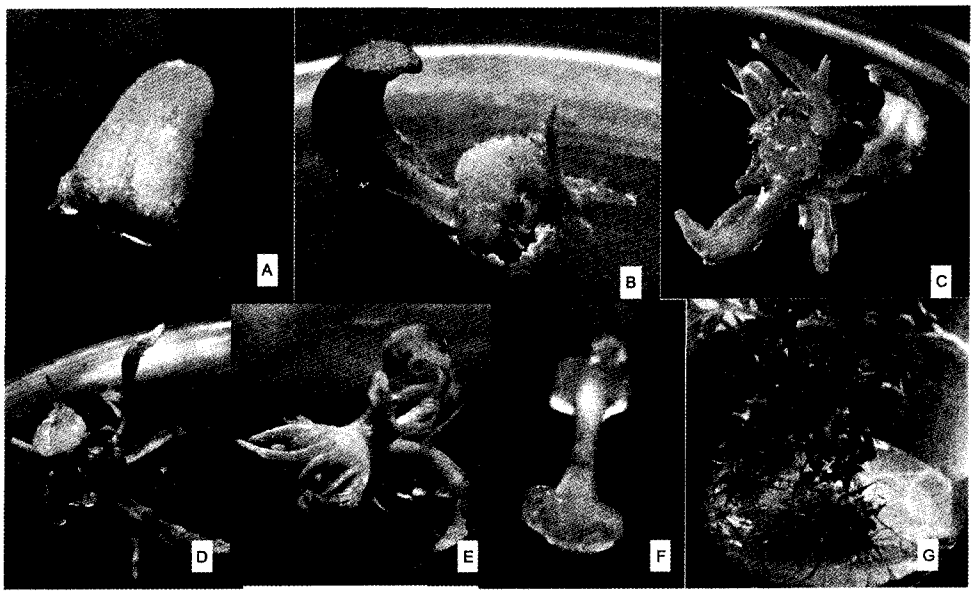
表5 6-BA对再生苗继代增殖的影响

6-BA(mg·L^{-1})	NAA(mg·L^{-1})	增殖系数
0.1	0.3	2.7
0.5	0.3	3.2
1.0	0.3	3.4
1.5	0.3	4.2
2.0	0.3	2.0

2.6 生根及移栽

将再生不定芽接到1/2MS+IAA 0.2 mg·L^{-1}+NAA 0.1 mg·L^{-1}培养基中,10~15 d后在芽的基部开始有不定根突起,25~30 d后每株苗长出3~4条粗细均匀的根。50个芽中46个生根,生根率达90%以上

(图 G)。待根长至 3 cm 左右时,炼苗 2 ~3 d,可将苗从培养基中取出,流水洗去根上的培养基,移栽到经过消毒处理的园土和泥炭土等体积混合的基质中,每周浇 3 次水,10 d 后长出新叶表明移栽成活,成活率可达 90% 以上。



注:A. 子叶切口开始出现芽点;B 、C. 子叶切口处分化出芽丛; D 、E. 带顶芽的下胚轴切口开始分化不定芽;带顶芽的下胚轴伤口分化芽丛;F. 下胚轴(不带顶芽)不能分化不定芽;G. 不定芽生根。

3 讨论

3.1 本研究利用孔雀草 F_1 代子叶、带顶芽的下胚轴和子叶建立高效再生体系,子叶的不定芽诱导率最高,达到 94%,叶片分化率为 53%。齐迎春等[5]利用孔雀草自交系的研究结果表明,叶片的不定芽诱导率最高,达到 85%。子叶分化率只有 13%,这可能是由于所使用材料不同所致。本研究还首次利用带顶芽的下胚轴为外植体,不定芽分化率为 82%。下胚轴(不带顶芽)外植体不能分化不定芽,这与齐迎春等[5]报道一致。

3.2 本研究认为添加 $AgNO_3$ 能显著提高孔雀草不定芽分化率。在培养基中添加乙烯抑制剂促进外植体再生早就引起了人们的注意[6]。$AgNO_3$ 可以促进愈伤组织的器官发生与体细胞胚胎发生,促进一些再生困难芽的产生,增加外植体产生不定芽的数目及提高植株再生频率[7]。

3.3 本研究建立了孔雀草 F_1 代的再生体系,为孔雀草优良 F_1 代迅速扩繁以及遗传转化具有重要意义。

参考文献

[1] 苏福才,钱国珍,李巧玲,等. 万寿菊茎段组织培养[J]. 内蒙古农牧学院学报,1999,20(3): 108-111.

[2] 田广红. 万寿菊杂交 F1 代的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2001,37(6): 529-530.

[3] KUMAR A, SINGH S K, SHARMA S K, et al. Comparison of seed-derived with micropropagated male-sterile plants of *Tagetes erecta* L. for F_1 hybrid seed production [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2004, 79 (2): 260-266.

[4] VANEGAS P E, CRUZ - HERN NDEZ A, VALVERDE Ma E, et al. Plant regeneration via organogenesis in marigold [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 69: 279-283.

[5] 齐迎春,叶要妹,刘国锋,等. 不同基因型孔雀草高效植株再生体系的建立[J]. 中国农业科学,2005,38(7): 1414-1417.

[6] CHI G L, BARFIELD D G, SIM G E. Effect of $AgNO_3$ and amino ethoxyvinylgycine on in vitro shoot and root organogenesis from seeding explants of recalcitrant Brassica geno-type [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 195-198.

[7] 张鹏,傅爱根,王爱国. $AgNO_3$ 在植物离体培养中的作用及可能机制[J]. 植物生理学通讯,1997,33(5): 376-379.