

# 非洲菊花序的离体培养及其舌状花 花色素苷积累的调控

孟祥春, 张玉进, 王小菁

(华南师范大学 生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631)

**摘要:** 为建立非洲菊花序离体培养系统, 以便进一步深入探讨外界环境因素对花生长和着色的调控, 对影响非洲菊花序离体培养的关键因素进行了研究. 结果表明: P2 花序离体后, 以体积分数为 1% 的 NaClO 消毒 10 min, 在 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂的培养基中培养, 先暗培养 3 d 再转至光培养, 花序可生长并着色. 光培养过程中, 舌状花(ray floret) 花色素苷积累水平不断增加, 在第 9 d 达到最高水平, 而黑暗下, 离体花序不能生长、着色. 证明光和代谢性的葡萄糖、果糖、蔗糖是离体花序生长和花色素苷积累的必需条件.

**关键词:** 非洲菊花序; 离体培养; 花色素苷; 光; 糖

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0056-04

## *In vitro* culture of *Gerbera hybrida* inflorescence and regulation of anthocyanin accumulation in ray florets

MENG Xiang-chun, ZHANG Yu-jin, WANG Xiao-jing

(College of Life Science, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** In order to establish the *in vitro* culture system of *Gerbera hybrida* inflorescence and study its growth and pigmentation regulated by environmental stimuli, main factors affecting the *in vitro* culture of *Gerbera hybrida* inflorescence were studied. Results showed that inflorescences were detached at the developmental stage 2, sterilized with  $\varphi=1\%$  NaClO for 10 min, then incubated on the sucrose medium (8 g/L agar + 30 g/L sucrose). Cultured inflorescences, which were firstly incubated in darkness for 3 d, then transferred to light, could grow and accumulate pigments. Anthocyanin accumulation in ray florets(rf) increased with culture time under light and reached the highest level at the day of 9. However, inflorescences incubated in darkness all the time showed very low levels of growth and anthocyanin accumulation. Results demonstrated that light and metabolic glucose, fructose and sucrose are required for *Gerbera hybrida* inflorescences during their growth and anthocyanin accumulation *in vitro*.

**Key words:** *Gerbera hybrida* inflorescence; *in vitro* culture; anthocyanin; light; sugar

近百年来, 在高等植物花发育的研究中, 以拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、金鱼草 *Antirrhinum majus*、矮牵牛 *Petunia hybrida* 等为模式植物, 在花发育的各个阶段, 尤其是在分离鉴定成花转变、花器官原基形成相关基因及其功能和产物的结构分析上, 都取得了瞩目的进展<sup>[1~4]</sup>. 值得注意的是, 当植物完成由营养生长向生殖生长的转变后, 花器官和花序排列已经完成, 但花的品质形成还有赖于花发育后期各个花器官的生长和花瓣的着色过程. 而花的生长和着色受多种外界环境因素的调控, 其中, 光、糖和 GA 是主要因

目进展<sup>[1~4]</sup>. 值得注意的是, 当植物完成由营养生长向生殖生长的转变后, 花器官和花序排列已经完成, 但花的品质形成还有赖于花发育后期各个花器官的生长和花瓣的着色过程. 而花的生长和着色受多种外界环境因素的调控, 其中, 光、糖和 GA 是主要因

收稿日期: 2004-03-31

作者简介: 孟祥春(1976-), 女, 博士, 现在广东省农科院果树研究所工作. 通讯作者: 王小菁(1955-), 女, 教授, 博士; E-mail: wangxj@sncu.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(003062)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

素<sup>5,9</sup>。因此, 研究花生长和着色如何受这 3 种因子的调控, 对提高花的品质有重要理论和实际意义。非洲菊 *Gerbera hybrida* 在南方可四季开花, 是世界流行的五大切花之一, 其头状花序由 3 种花组成, 各种花在形状、对称性、性别分化等方面均不同, 是研究复杂花序发育及调控的理想材料之一。笔者前期的大田实验证明, 光是非洲菊花生长和着色的关键调控因子, 其中 P1、P2 是受光调节的关键时期, 此时将花序遮光强烈抑制花的生长和着色<sup>[7]</sup>。要进一步从生理和分子水平上深入探讨光、糖和 GA 调控非洲菊花生长和着色的机理, 确立高效、稳定的非洲菊花序离体培养系统是关键。这有利于各种可变因素的控制, 可使研究在实验室中进行, 是进行非洲菊花生长和着色调控研究的关键基础工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

非洲菊栽培苗(品种: S5)由广东珠海市园艺研究所提供, 在华南师范大学生物园大棚内进行常规栽培和管理, 日温 22 ~ 26 °C, 夜温 12 ~ 18 °C, 湿度 65% ~ 80%。将非洲菊花序发育的后期阶段分为 6 个时期(P1 ~ P6)<sup>[7]</sup>, P1 花序绿色, 总苞直立张开, 花序最外轮舌状花(ray floret, rf)与中央的盘花等高, 到 P2 期, rf 与苞片等高, 仍为绿色。本试验材料采用 P1 和 P2 期的离体花序。

### 1.2 花色素苷含量的测定

花色素苷含量的测定参见 Meng 等<sup>[7]</sup>的方法, 以每克鲜质量材料的光密度值  $\Delta D (D_{530\text{nm}} - 1/4D_{657\text{nm}})$  表示 rf 中花色素苷的相对含量, 单位为  $\text{g}^{-1}$ 。

### 1.3 花序的离体培养

培养基有以下几种: MS 基本、不同糖 + 8 g/L 琼脂、不同质量浓度蔗糖 + 8 g/L 琼脂、8 g/L 琼脂。在植株上选取生长近一致的 P1 或 P2 幼小花序, 采摘后流水冲洗 10 min, NaClO 表面消毒, 无菌水冲洗 4 遍后, 吸干表面水分, 接种到上述各种培养基中。培养室条件为: 温度 23 ~ 25 °C, 光照周期 14 h 光/10 h 暗, 光强 2 500 ~ 3 000 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基和消毒时间对花序成活率和 rf 花色素苷积累的影响

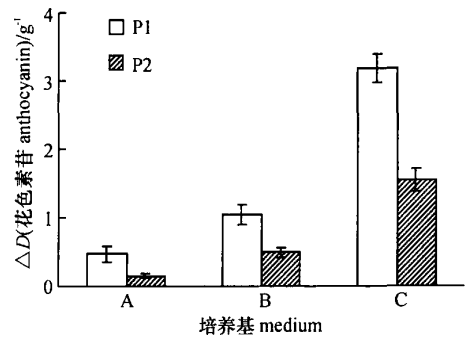
表 1 显示离体 P2 花序以体积分数为 1% 的 NaClO 消毒 10 或 20 min 后, 培养在含 30 g/L 蔗糖的固体琼脂培养基上, 成活率可达 90% 以上, 此时花序生长最好, rf 花色素苷含量也最高, 而消毒时间过长,

使用 MS 培养基或培养基中不添加蔗糖都显著降低了花序的成活率, 抑制花序生长和 rf 着色。离体 P1 花序在 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂的培养基上虽然也能积累较高水平的花色素苷, 但花序成活率极低, 仅有 3.8%, 不能作为试验系统进行后续试验(图 1, 2)。

表 1 消毒后在不同培养基上正常生长的花序比率  
Tab. 1 The ratio of inflorescences grown well on different medium after sterilization %

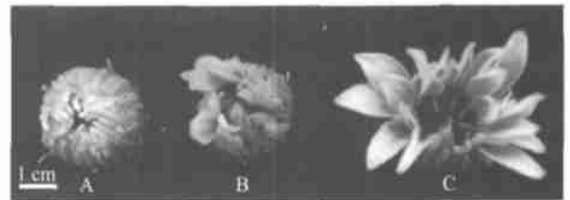
培养基 <sup>1)</sup> medium	消毒时间 sterilized time/min					
	10		20		30	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2
A	0	43.0	0	35.0	2.8	18.5
B	8.6	12.3	9.5	7.8	0	0
C	3.8	95.0	0	92.0	0	23.0

A: 8 g/L 琼脂; B: MS + 8 g/L 琼脂; C: 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂



A: 8 g/L 琼脂; B: MS + 8 g/L 琼脂; C: 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂  
A: 8 g/L agar; B: MS + 8 g/L agar; C: 30 g/L sucrose + 8 g/L agar

图 1 不同培养基对离体花序 rf 中花色素苷积累的影响  
Fig. 1 The effect of different media on anthocyanin accumulation in rf of inflorescences cultured in vitro



A: 8 g/L 琼脂; B: MS + 8 g/L 琼脂; C: 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂  
A: 8 g/L agar; B: MS + 8 g/L agar; C: 30 g/L sucrose + 8 g/L agar

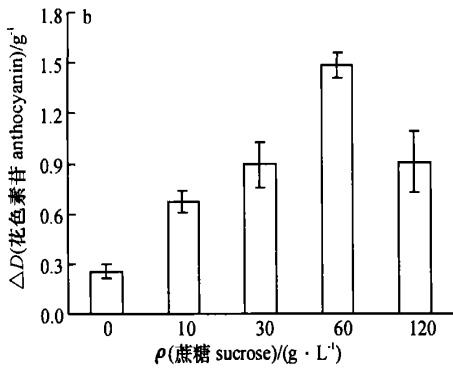
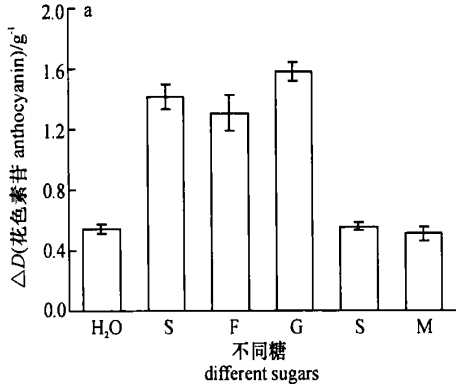
图 2 在不同培养基上培养 12 d 的花序

Fig. 2 Inflorescences cultured on different media for 12 days

### 2.2 糖对 rf 花色素苷积累的影响

2.1 的结果说明蔗糖可作为花序离体培养时的有效底物, 使用其他糖类物质或不同质量浓度蔗糖时, rf 花色素苷积累的变化如图 3 所示。在所试验的 5 种糖中, 蔗糖、葡萄糖和果糖是促进花色素苷积累的最有效物质, 甘露醇和山梨醇的作用同培养基中

不加糖类物质在同一水平(图3a). 因此后续试验中, 笔者选用蔗糖作为花序离体培养的营养来源. 在一定范围内, 花色素苷的积累水平与蔗糖的含量成正比, 当培养基中蔗糖从30 g/L提高至60 g/L时, rf 花色素苷含量提高约67%, 但过高质量浓度的蔗糖不利于花色素苷积累(图3b). 在非洲菊中, 30 g/L蔗糖比较适宜花序的离体培养, 因使用60 g/L蔗糖时, 培养污染率较高.



S: 蔗糖; F: 果糖; G: 葡萄糖; S: 山梨醇; M: 甘露醇

S: sucrose; F: fructose; G: glucose; S: sorbitol; M: mannitol

图3 糖的种类(a)及蔗糖质量浓度(b)对离体培养花序rf花色素苷积累的影响

Fig. 3 Effects of different sugar(a) and mass concentrations of sucrose (b) on anthocyanin accumulation in rf of inflorescences cultured *in vitro*

### 2.3 前期暗培养对rf花色素苷积累的影响

离体P2花序接种至培养基后, 先暗培养不同时间, 再转至光下培养至12 d, 取材rf进行花色素苷含量测定. 结果表明花序离体后, 先暗培养3 d有利于后期光培养过程中花色素苷的积累, 前期暗培养时间超过3 d时, 光培养下花色素苷的积累逐渐降低, 至暗培养9 d时, 后期光培养过程中rf的花色素苷合成能力几乎丧失(图4).

### 2.4 花序培养过程中rf花色素苷积累的变化

P2花序离体后, 体积分数为1% NaClO消毒10 min, 培养在含30 g/L蔗糖的培养基中, 先暗培养3 d, 然后进行光培养. 在光培养的前5 d, rf花色素苷含

量没有显著增长, 此后, 花色素苷积累水平迅速提高, 在光培养的第9 d达到最高水平, 12 d时略有下降, 而将花序一直在黑暗下培养, rf花色素苷含量没有显著变化, 说明黑暗下非洲菊rf合成花色素苷的能力极弱(图5).

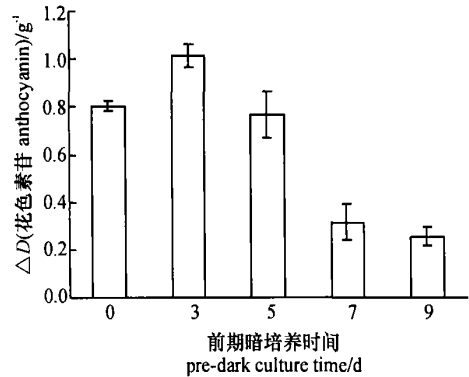


图4 前期暗培养对离体培养花序rf花色素苷积累的影响

Fig. 4 Effects of pre-dark culture time on anthocyanin accumulation in rf of inflorescences cultured *in vitro*

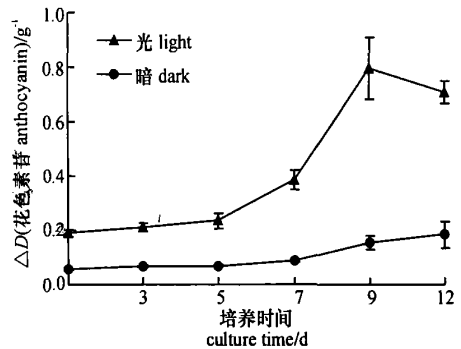


图5 花序离体培养过程中rf花色素苷积累的变化

Fig. 5 Changes of anthocyanin accumulation in rf of inflorescences cultured *in vitro*

## 3 讨论

本试验结果表明P2花序离体后, 培养在30 g/L + 8 g/L琼脂的培养基上, 先暗培养3 d, 然后转至光下培养, 花序可开放、着色, 其中光和糖是必需条件. 仅代谢性的葡萄糖、果糖、蔗糖对rf花色素苷的积累有效, 非代谢性的甘露醇和山梨醇没有明显作用, 一定范围内, 花色素苷的积累水平与蔗糖的质量浓度成正比. 暗示糖在非洲菊花生长期和着色中主要是一种代谢性功能, 为花色素苷的合成提供能源和物质基础. 这与矮牵牛花冠离体培养时, 糖在花色素苷合成中的作用一致<sup>[8,9]</sup>, 不支持糖在花生长期及花色素苷合成中作为渗透调节物质或信号分子的理论<sup>[10,11]</sup>.

多数高等植物花中花色素苷的合成必需光的诱导, 光通过调控花色素苷合成途径中相关基因的表

达而促进花色素苷积累<sup>[12,13]</sup>。非洲菊离体花色素苷的合成同样需要光,这是否也是光诱导花色素苷合成相关基因表达的结果,需要进一步试验来证明。另外,即使有光和糖存在时,离体P1花序也不能生长,暗示在花发育早期,花序的生长和着色还必须依赖其他的发育因子,到一定生长年龄后,其生长和着色可脱离植株,但必需有光和糖的提供。

在已研究的矮牵牛、金鱼草和拟南芥中,花色素苷的积累和积累器官的发育状况同步,彼此之间有相互依赖性。*Elusia plamasa*种子和玉米根中花色素苷的合成也具有年龄依赖性<sup>[14,15]</sup>。本试验也说明光对非洲菊花色素苷合成的诱导能力也依赖于花序本身的发育状况。因为离体花序暗培养3d时,对光的诱导最为敏感,花色素苷合成的潜势最大,延长前期暗培养时间,花色素苷积累水平逐渐下降至几乎不再有合成花色素苷的能力。

#### 参考文献:

- [1] 李宪利,袁志友,高东升. 高等植物成花分子机理研究现状及展望[J]. 西北植物学报, 2002, 22(1): 173—183.
- [2] NG M, YANOFSKY M F. Three ways to learn the ABCs[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 47—52.
- [3] YANG Y, XIANG H, JACK T. *Pistillata-5*, an *Arabidopsis* B class mutant with strong defects in petal but not in stamen development[J]. *Plant J*, 2003, 33: 177—188.
- [4] ZHANG S, SANDALS S, POLOWICK P L, et al. Proliferating Floral Organs (*Pfö*), a *Lotus japonicus* gene required for specifying floral meristem determinacy and organ identity, encodes an F-box protein[J]. *Plant J*, 2003, 33: 607—620.
- [5] WEISS D. Regulation of flower pigmentation and growth; Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals[J]. *Physiol Plant*, 2000, 110: 152—157.
- [6] 王小菁,孟祥春,彭建宗. 花色形成与花生长的调控[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1105—1110.
- [7] MENG X C, WANG X J. Regulation of flower development and anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*[J]. *J Horticult Sci & Biotech*, 2004, 79: 131—137.
- [8] WEISS D, BLOKLAND R, KOOTER M J, et al. Gibberellin acid regulates chalcone synthase gene transcription in the corolla of *Petunia hybrida*[J]. *Plant Physiol*, 1992, 98: 191—197.
- [9] MOALEM D, TAMARI G, LEITNER Y, et al. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in petunia corollas[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 419—424.
- [10] BIELESKI R L. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower[J]. *Plant Physiol*, 1993, 103: 213—219.
- [11] NETA I, SHOSEYOV O, WEISS D. Sugars enhance the expression of gibberellin-induced genes in developing petunia flowers[J]. *Physiol Plant*, 2000, 109: 196—202.
- [12] DONG Y H, BEUNING L, DAVIES K, et al. Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers[J]. *Austr J Plant Physiol*, 1998, 25: 245—252.
- [13] KATZ A, WEISS D. Photocontrol of *chs* gene expression in petunia flowers[J]. *Physiol Plant*, 1998, 102: 210—216.
- [14] 安田 齐. 花色的生理生物化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989. 68—100.
- [15] 孟祥春,张玉进,王小菁. 玉米根中花色素苷积累的某些影响因子研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2002, 4(4): 25—28.

【责任编辑 柴 焰】