

菊花‘绿鹦哥’的组织培养和快速繁殖

周 洲¹, 李永丽¹, 姜 玲¹, 王 沛², 尹新明

(1. 河南科技大学 林学院 河南 洛阳 471003; 2. 河南农业大学 植物保护学院 河南 郑州 450002)

摘 要:以菊花‘绿鹦哥’茎段、叶盘为外植体,选用 MS 培养基为基本培养基,附加激素 6-BA 和 NAA,研究不同激素浓度组合对外植体愈伤诱导及不定芽分化的影响。结果表明:菊花‘绿鹦哥’茎段最适芽诱导分化培养基分别为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L;小苗的最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L,生根率可达 100%。

关键词:芽再生;茎段;生根;移栽

中图分类号:S 682.1⁺1;S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)10-0110-03

菊花(*Dendranthema*×*grandiflorum* (Ramat) Kitam) 为菊科、菊属多年生宿根草本植物。绿色菊花非常珍贵。开绿色花朵的‘绿鹦哥’菊花色泽美丽,具有很高的经济价值。菊花苗需求量较大,而菊花主要以扦插和分株进行繁殖,但这 2 种方法均需要较多母株材料,且受季节和外界环境限制,存在繁殖周期长,幼苗质量差等问题。利用组织培养的方法可以解决这些问题。关于‘绿鹦哥’菊花的组织培养相关研究还未开始。现选择‘绿鹦哥’菊花作为研究对象,探索茎叶外植体愈伤诱导、不定芽分化、生根及移栽的合适条件,旨在摸索出高效、简单、稳定的菊花组织培养快速繁殖的再生体系。一方面,成熟的组织培养再生体系可以作为快速繁殖提供技术保证,解决市场上绿色菊花供应不足的问题;另一方面,良好的再生体系可以为基因工程育种提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菊花‘绿鹦哥’*Dendranthema*×*grandiflorum* (Ramat) Kitam ‘Lvyngge’。于 2007 年 10 月购买于洛阳市花卉市场。

1.2 外植体的处理

取顶端幼嫩茎段,用自来水冲洗 1 h。叶片单独剪下,茎段切成 4~5 cm 的节段,在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 升汞灭菌 7 min,然后用无菌水漂洗 5 次,用手术刀将枝条切成 2 cm 左右带腋芽的茎段,用剪刀将叶片剪成包含主脉的 1 cm² 左右的块状接

种到初代培养基上。

1.3 初代培养

取顶端幼嫩茎段,用自来水冲洗 1 h,剪掉叶片,茎段切成 4~5 cm 的节段,在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 升汞灭菌 7 min,然后用无菌水漂洗 5 次,用手术刀将枝条切成 2 cm 左右带腋芽的茎段接种到初代培养基上。

基本培养基为 MS,所有培养基中蔗糖含量 3%,琼脂粉 0.5%,pH 5.8。培养温度 (25±1)℃,光照时间 16 h/d,光照度 30 μmol·m⁻²·s⁻¹。初代培养基: (1)MS+6-BA 1 mg/L(单位下同)+NAA 0.1; (2)MS+6-BA 1+NAA 0.5; (3)MS+6-BA 1+NAA 1; (4)MS+6-BA 2+NAA 0.1; (5)MS+6-BA 2+NAA 0.5; (6)MS+6-BA 2+NAA 1; (7)MS+6-BA 4+NAA 0.1; (8)MS+6-BA 4+NAA 0.5; (9)MS+6-BA 1+NAA 1。

1.4 生根培养

生根培养基: (13)1/2 MS+NAA 0.1; (14)MS+NAA 0.1。培养基中蔗糖、琼脂粉、pH 值及培养条件同上。

1.5 继代培养

生根无菌小苗生长至 8 cm 左右高时。叶片单独剪下,茎段切成 2 cm 左右带腋芽的茎段,叶片中部剪成 1 cm² 左右的叶盘,茎段叶盘分别接种到继代培养基上。

继代培养基: (1)MS+6-BA 1+NAA 0.1; (4)MS+6-BA 2+NAA 0.5; (7)MS+6-BA 4+NAA 0.1; (10)MS+6-BA 3+NAA 0.1; (11)MS+6-BA 5+NAA 0.1; (12)MS+6-BA 6+NAA 0.1。培养基中蔗糖、琼脂粉、pH 值及培养条件同上。

1.6 移栽

长根无菌苗生长至 10 cm 左右高时,取出小苗,将根部粘连的琼脂于自来水中洗去,剪去过长的须根,保留根 3~4 cm 长,移入含水量 60% 的灭过菌的营养土(泥炭土:珍珠岩为 3:1)中,压实营养土,浇透水,盖塑

第一作者简介:周洲(1978-),男,博士,讲师,现主要从事植物生物技术教学与研究工作。E-mail:zhouzhou_caf@yahoo.com.cn。

基金项目:河南科技大学博士科研启动基金资助项目(09001265);河南科技大学科学研究基金资助项目(08QN027);河南省杰出人才创新基金资助项目(074200510018)。

收稿日期:2009-05-20

料薄膜保湿 7 d, 后逐渐掀开薄膜, 2 周后移栽大田。

2 结果与分析

2.1 初代培养

茎段腋芽接入初代培养基后 7 d 左右均能萌动生长, 其中培养基(1)上芽生长较健壮; (4)、(7)上的芽生长最快, 玻璃化较多; (3)、(5)、(6)和(9)上的芽生长缓慢; (2)、(8)上的芽玻璃化较多。30 d 后芽长至 2~3 cm 时, 切下生长健康大小较为一致的再生芽转入生根培养。

2.2 不同培养基生根结果

1/2MS 中接种 21 瓶, 第 5 天全部生根, 生根率达 100%, 并且长出须根的数量较多; MS 培养基接种 20 瓶, 第 7 天全部生根, 生根率达 100%, 但是长出的须根数量较少。1/2 MS+NAA 0.1 mg/L 作为生根培养基更好。

待不定芽生长约 2 cm 时自基部切下, 移至生根培养基(13)、(14)中。培养基(13)中第 7 天就长出根, 而

培养基(14)中长根需要 10 d。18 d 后(13)、(14)生根率均达 100%, (13)中生根须根数多而且分枝丰富, 生根整齐健康, 采用(13)作生根培养基较好。

2.3 不同激素浓度组合对茎段分化的影响

截取生根试管苗带腋芽 2 cm 大小茎段, 接种到继代培养基(1)、(4)、(7)、(10)、(11)、(12)中。30 d 后统计, 茎段分化结果和生长状况见表 1。随着 6-BA 浓度的升高, 茎段的分化率和每个茎段的出芽个数呈现先增加后下降的趋势, 其中培养基(7)的分化率最高, 培养基(2)中每个茎段外植体平均出芽数最高。从分化的芽生长状态分析, 随着 6-BA 浓度的增加, 分化芽的生长状况越来越差, 出现黄化、玻璃化和茎节不能正常伸长等不良症状。培养基(1)中外植体分化率超过了 90%, 生长健康, 芽的数量也最多, 增殖系数为 1.8。因此, (1)是较好的继代增殖培养基。

表 1 不同激素浓度组合对茎段不定芽分化影响

继代培养基	茎段外植体数量	分化茎段外植体数量	总出芽数	分化率/%	平均每茎段出芽数	叶片生长状态	茎节伸长状态
(1)	33	30	53	90.9	1.8	浓绿, 伸展正常	8 个芽伸长不健康, 其余的正常伸长
(4)	21	19	54	90.5	2.8	叶片偏黄, 14 个苗玻璃化	18 个芽伸长不健康, 其余的正常伸长
(7)	30	29	72	96.7	2.5	叶片黄化, 叶片小而皱缩	普遍伸长不充分
(10)	17	13	34	76.4	2.6	叶片黄化, 叶片小而皱缩	普遍不伸长
(11)	18	14	26	77.8	1.6	叶片黄化, 叶片小而皱缩	都不伸长
(12)	21	19	35	90.5	1.8	黄化, 玻璃化 2 个, 叶片小而皱缩	都不伸长

2.4 不同激素条件对叶片愈伤诱导的影响

6 种不同激素浓度组合的继代培养基中, 叶片外植体均只产生了愈伤, 未能诱导分化出芽。但 6 种培养基中产生的愈伤量和色泽有较大区别(见表 2)。

表 2 不同激素条件对叶盘愈伤诱导

继代培养基	叶盘外植体数量	愈伤量	愈伤色泽
(1)	14	较多	绿
(4)	18	多	少量褐化
(7)	15	多	少量褐化
(10)	15	较多	较多褐化
(11)	16	少	褐化严重
(12)	17	很少	褐化严重

6 个不同激素浓度组合的培养基中, 随着 6-BA 浓度的增加, 叶片脱分化产生的愈伤量呈现先增多后减少趋势, 愈伤的褐化状况越来越严重, 生长健康状况越来越差。培养基(1)中, 叶片产生的愈伤都分布于叶片切口四周, 愈伤产生的量较多、色泽浓绿, 且质地呈紧密团块状, 愈伤生长状态较健康, 随着培养基中 6-BA 浓度的升高, 产生的愈伤量先增加后减少的变化趋势, 褐化的色泽越来越重, 愈伤出现部位也由叶缘转向不规则分布。

2.5 移栽成活

试管苗生根 1 个月后, 挑选 30 株 10 cm 左右高度的试管苗移栽, 最初用塑料薄膜覆盖 7 d, 后逐渐掀开薄膜, 2 星期后完全掀开, 期间经常浇水保湿, 20 d 后于室内正常管理, 30 株移栽苗均成活, 成活率达 100%, 且移栽苗茎秆挺拔, 叶片浓绿, 晚秋正常开花。

3 结论与讨论

3.1 合适激素浓度组合的培养基对茎段分化影响

在菊花的组织培养研究中, 众多研究选用 6-BA 和 NAA 组合能诱导茎段成功分化出芽, 且培养基中 6-BA 的浓度分布在 1.0~5.0 mg/L 之间, NAA 的浓度分布在 0.1~1.0 mg/L 之间。如焦德志^[1]以菊花茎段为外植体, 茎段最适分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 周洲^[2]以‘小黄’菊茎段为外植体, 茎段最适分化培养基为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L。在预试验研究的基础上, 设计了低浓度 NAA 0.1 mg/L 和不同浓度 6-BA 组合的培养基, 结果表明 6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的组合对‘绿鹦哥’茎段的分化出芽非常合适。结合众多的研究结果, 6-BA 与 NAA 种激素组合在其他品种菊花茎段分化出芽的研究中可以进一步应用推广; 但是不同菊花品种对 6-BA 与 NAA 的浓度需求存在着较大差异, 最佳组合浓度需要试验研究确定。

3.2 不同激素浓度组合的培养基对叶片分化影响

6 个组合的分化培养基都未能从叶片上诱导出芽, 仅产生了不同程度的愈伤, 相比较而言培养基 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 中叶片形成的愈伤生长更健康。结合预试验的结果, 叶片的分化需要较低浓度的分裂素 6-BA 和生长素 NAA。虽然该研究未能从叶片中诱导出芽, 但以 6-BA 与 NAA 组合对从菊花叶片诱导出芽也有成功的例子, 如李秋杰^[3]以叶片为外植体,

最佳分化培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA; 徐士清^[4] 用非洲菊试管苗叶片作外植体, 合适培养基为: MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 洪波^[5] 在叶片分化培养基中添加生长素 2,4-D, 不仅能诱导叶片产生愈伤, 而且能进一步分化出芽。

不同物种或品种对细胞分裂素 TDZ、KT、6-BA 的反应强度是不同的, 许多植物材料用 6-BA 作分裂素不能诱导出芽, 但是在使用 TDZ、KT 后, 诱导出芽变得容易^[13]。因此, 未来的研究可以尝试使用 TDZ 和 KT, 配合低浓度生长素的组合来研究从‘绿鹦哥’叶片中诱导再生不定芽。

3.3 试管苗生根的分析

对菊花诱导产生的不定芽生根也有许多的研究, 大多采用的是 1/2MS 或 MS 添加生长素 NAA 或 IBA。张瑞麟^[14] 在地被菊早小菊试管苗不定芽最合适生根培养基是 1/2MS+IBA 3 mg/L; 李秋杰^[3] 发现菊花‘旦香疏影’试管苗生根的最佳培养基为 1/2MS+0.1 mg/L IBA; 洪波生^[5] 发现地被菊花 Fall Color 试管苗生根最佳培养基为 1/2MS+0.01 mg/L NAA; 侯玉杰^[6] 对一种开封观赏菊的试管苗最佳培养基为 1/2MS+0.1 mg/L NAA; ‘小黄’菊的组织培养表明试管苗最佳培养基为 1/2MS+0.1 mg/L NAA^[2]。该试验比较了 MS 和 1/2MS 培养基附加 NAA 0.1 mg/L 对‘绿鹦哥’试管苗生根的影响, 结果表明 2 种培养基生根率达 100%, 只是 1/2MS+0.1 mg/L NAA 生根更好。结合众多研究结果, 菊花试管苗生根比较容易, 1/2MS 或 MS 添加低浓度的生长素 NAA 或 IBA 可以为试管苗生根提供很好的条件。

4 展望

该研究以‘绿鹦哥’茎段作为外植体建立了组织培养和快速繁殖体系, 从不定芽的诱导到不定芽的生根, 及小苗的移栽整个过程很完善。在短时间内能生产出大量的试管苗, 研究结果用于商业化生产具有很好前景。

菊花新品种的培育具有非常现实的意义, 其中基因工程育种具有目的性强、周期短等优点倍受关注。很多研究表明菊花以叶盘^[7-8]、叶柄^[9]、茎段^[10-12] 为外植体获得了转基因植株, 遗传转化再生体系是基因工程育种的前提研究为‘绿鹦哥’菊花基因工程的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 焦德志, 李波, 魏明丽. 菊花的快速繁殖[J]. 北方园艺 2007(6): 208-210.
- [2] 周洲, 尹新明, 张德强. ‘小黄’菊遗传转化再生体系的建立[J]. 北京林业大学学报 2004 26(5): 36-39.
- [3] 李秋杰, 陈春燕, 张吉. 6-BA 和 NAA 对菊花叶片离体再生的影响[J]. 长江大学学报(自科版) 农学卷 2007 4(3): 31-34.
- [4] 洪波, 仝征, 李邱华. 地被菊花 Fall Color 体细胞胚途径再生、遗传转化及转基因植株的抗寒性检测[J]. 中国农业科学 2006 39(7): 1443-1450.
- [5] 徐士清, 杨世湖, 倪丹. 非洲菊试管苗叶片的组培快繁[J]. 园艺学报, 2002 29(5): 493-494.
- [6] 侯玉杰, 朱涛, 王晓涛. 菊花的组织培养研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2005, 18(3): 323-325.
- [7] Urban L A, Sheman J M, Moyer J W. High frequency shoot Regeneration and Agrobacterium mediated transformation of chrysanthemum[J]. Plant Sci 1994, 98(1): 69-76.
- [8] May R A, Triginano R N. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaves of *Dendranthema grandiflora*[J]. America Society Horticulture Science 1991, 116(2): 366-371.
- [9] De J, Rademaker W, Van Wordragen M F. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following co-cultivation with *Agrobacterium*[J]. Plant Cell Organ Tissue Culture 1993, 32(3): 263-270.
- [10] Kaul V, Miller R M, Hutchinson J F, et al. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora*[J]. Plant Cell Organ Tissue Culture 1990 21(1): 21-30.
- [11] Renou J P, Brochard P, Jalouzet R. Recovery of transgenic chrysanthemum after hygromycin resistance selection[J]. Plant Sci 1993, 89(2): 185-197.
- [12] 傅荣昭, 刘敏, 梁红健, 等. 通过根癌农杆菌介导法获得菊花转基因植株[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 72-76.
- [13] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报 2003 20(2): 227-237.
- [14] 张瑞麟, 范敏. 地被菊的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 531.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Dendranthema grandiflorum* (Ramat) Kitam ‘Lvyinge’

ZHOU Zhou¹, LI Yong-li¹, JIANG Ling¹, WANG Pei², YIN Xin-ming²

(1. Forestry College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: Adventitious shoots were induced from stem explants of *Dendranthema grandiflorum* ‘Lvyinge’ in this study. The optimized medium for stem explants contained Murashige and Skoog basal medium supplemented with 6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The medium for rooting of shoots was optimized as 1/2 Murashige and Skoog basal medium supplemented with NAA 0.1 mg/L, with 100% efficiency.

Key words: Explants; Shoot regeneration; Rooting; Transplant