

菊花花瓣的组织培养技术研究

李 平, 李庆伟, 贺爱莉, 樊亚敏, 孙新政

(河南农业职业学院 植物科学系, 河南 中牟 451450)

摘 要:以紫色线状菊花花瓣为外植体, 研究了不同培养基组成、外植体摆放方式、光照条件对其再生的影响。结果表明:菊花花瓣诱导适宜光照时间是 12~16 h/d; 花瓣花背向上比花背向下效果不定芽的诱导效果好, 而在愈伤组织诱导时花背向下比花背向上效果好; MS+NAA 1.0 mg/L 或 2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 可作为外植体的愈伤组织诱导的培养基; MS+6-BA 1.0 mg/L 能直接从花瓣上诱导产生不定芽; MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L 丛生芽诱导率高, 且产生的丛生芽质量高; 1/2MS+IBA 0.3 mg/L 为适宜的生根培养基。

关键词:菊花; 花瓣; 愈伤组织; 丛生芽; 植株再生

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)09-0068-03

菊花(*Dendranthema morifolium*)为多年生宿根花卉, 是世界四大切花之一。其多采用分株、扦插等方法进行繁殖及栽培过程中通过自然变异来选育新品种。随着市场需求的日益增大, 传统的繁殖方法和品种选育技术已经不能满足市场日益发展的需要, 通过现代生物技术手段来进行菊花的快速繁殖和新品种选育工作势在必行。自 1972 年以来, 国内外对菊花进行组织培养研究, 主要体现在以菊花茎段和腋芽作为外植体^[1-3], 对花瓣培养也有部分报道^[4,6], 但对于线状菊花尚未见报道。菊花的新品种主要是花色的变异, 利用花瓣进行组织培养, 其变异率要大于茎尖、腋芽等具有分生组织的外植体。该试验以用菊花花瓣为外植体进行组培快繁技术研究, 希望在诱导过程中获得变异植株, 进一步筛选出新的品种, 为我国菊花的新品种选育提供可靠的技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

10 月中旬在河南农业职业学院校内花卉基地园地剪取紫色细管瓣状菊花(紫色线状菊花)的初开放花瓣。

1.2 方法

花瓣用自来水冲洗 10 min, 75% C₂H₅OH 浸泡 1 min, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% 的 HgCl₂ 浸泡 20 min, 无菌水冲洗 5 次。材料消毒后于无菌纸上吸去表面水分, 剥去苞片及外围 2 层花瓣, 取单个完整花瓣,

分别以背面和正面上 2 种方式接种在培养基上, 每瓶接种 3 个花瓣。初代培养产生的苗, 切成单芽茎段, 接种在不同配方组合的培养基上(见表 3、4), 进行芽增殖诱导和生根试验。

1.3 培养基

在整个培养过程以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 培养基中添加质量浓度 3.0% 的蔗糖, 0.65% 的琼脂, 不同的培养阶段添加不同种类和浓度的植物生长物质, 培养基 pH 5.5~6.0。分装后的培养基于高压蒸汽灭菌锅中 121~123℃ 湿热灭菌 20 min。

1.4 培养条件

培养温度(25±1)℃, 除初代培养采取不同的光照时间处理外, 其他培养阶段光照时间 12~16 h/d, 光照强度 2 000~2 500 lx, RH 65%~80%。

2 结果与分析

2.1 不同激素水平对花瓣分化的影响

接种 1 个月进行调查愈伤组织和不定芽分化情况(表 1), 愈伤组织诱导率(%)=产生愈伤组织分化的花瓣数/接种花瓣数×100%, 不定芽诱导率(%)=不定芽发生的花瓣数/接种花瓣数×100%。从表 1 可以看出, 当 6-BA 浓度不变时, 随着 NAA 和 2,4-D 的浓度逐渐升高, 不论花瓣摆放方式的如何变化, 愈伤组织诱导效果呈逐渐上升趋势, 不定芽的分化呈逐渐向下趋势; 而对于同样浓度的 NAA 和 2,4-D 相比, 2,4-D 的愈伤组织诱导情况明显较 NAA 高, 不定芽的诱导情况较 NAA 低。对于外植体摆放的方式不同, 花背向上与向下对比时可以发现, 愈伤组织在相同激素浓度时, 花背向上较花背向下略低; 而在不定芽诱导上, 恰恰又呈现相反结果。综合对表 1 分析可以得出, 在菊花花瓣进行愈伤组织诱导时, 花背向下比花背向上效果好, 采用 MS+NAA 1.0

第一作者简介:李平(1971-), 女, 本科, 实验师, 现主要从事植物组织培养研究和实验室管理工作。

通讯作者:李庆伟(1979-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事植物组织培养方面研究工作。E-mail: liqingwei2003@163.com。

收稿日期:2009-04-20

mg/L 或 2 4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 培养基, 不论摆放顺序如何均能取得理想的诱导效果; 直接从花瓣上诱导不定芽(见图 1)时, 花背向上比花背向下效果好, 采用 MS+6-BA 1.0 mg/L 可取得理想效果。

表 1 不同激素水平对紫色菊花花瓣分化的影响

序号	激素/ mg · L ⁻¹			愈伤组织诱导率/ %		不定芽诱导率/ %	
	NAA	2 4-D	6-BA	花背向上	花背向下	花背向上	花背向下
1	0	0	0.1	0	0	8.2	7.8
2	0.5		0.1	12.8	14.3	0	0
3	1.0		0.1	80.5	85.6	0	0
4		0.5	0.1	30.3	35.6	0	0
5		1.0	0.1	91.6	94.3	0	0
6	0	0	0.5	0	0	82.8	78.6
7	0.5		0.5	18.9	26.8	25.2	22.5
8	1.0		0.5	86.3	90.5	0	0
9		0.5	0.5	34.5	63.2	9.8	8.7
10		1.0	0.5	95.6	100	0	0
11	0	0	1.0	0	0	100	100
12	0.5		1.0	33.8	38.5	98.3	95.7
13	1.0		1.0	93.3	100	17.8	15.9
14		0.5	1.0	66.7	98.8	23.6	23.2
15		1.0	1.0	100	100	13.2	12.2

2.2 不同光照时间对花瓣分化的影响

将消毒处理花瓣接种在 MS+6-BA 1.0 mg/L 和 MS+2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 两种不同配方的培养基上, 采用不同的光照时间处理(表 2)。

从表 2 可以明显的看到, 随着光照时间的增加, 愈伤组织的诱导速度有所减缓, 组成表现出了从松散状态到致密状态的变化, 但是在完全日照的情况下, 在愈伤组织上产生的根系均呈粉红色(见图 2), 其他时段根系成褐色。对于直接从花瓣上再生的不定芽苗来讲, 不见光或见光时间比较短时, 试管苗呈现玻璃化的典型特征(见图 3), 随着光照时间的增加, 形成试管苗表面出现了一些基本的保护组织, 在完全日照时, 形成芽苗叶片较大, 边缘下卷, 叶色浓绿, 茎粗壮, 生长健壮。综合各时段关照时间来分析, 12~16 h/d 的光照时间, 整个试管苗的愈伤组织诱导和不定芽生长良好, 根系发生正常。

表 2 不同光照时间对紫色菊花花瓣分化的影响

光照时间/h	外植体生长分化状况
0	愈伤组织分化快, 较松散; 产生的芽苗淡绿色透明
4	愈伤组织分化快 产生的芽苗淡绿色、叶片皱缩、
8	愈伤组织分化快 产生的芽苗绿色
12	愈伤组织分化较快、较致密; 芽苗绿色、叶片上现少量白色茸毛
16	愈伤组织致密; 产生的芽苗叶色深 茸毛多
20	形成致密愈伤组织; 产生的芽苗叶颜色深 茎直立较粗
24	愈伤组织及根均成红粉色; 芽苗叶大、色深 茸毛多 茎粗壮

2.3 不同激素水平对芽增殖的影响

从表 3 看出, 不同的基本培养基在相同激素组成时, 对于菊花不定芽的诱导的不同, 总体表现差异不大, 菊花的不定芽分化率较高。以 MS 为基本培养基, 直接添加 6-BA, 不定芽诱导率最高, 不定芽的分化倍数较相同浓度 6-BA 分化倍数高, 高浓度时分化产生的丛生芽

都呈现玻璃化的畸形芽, 生产价值不大; 添加 IBA 和 6-BA 2 种激素组合的培养基中, 芽的分化倍数虽较单一添加 6-BA 呈现下降趋势, 但最高诱导倍数产生的芽苗没有产生畸形苗。以 1/2MS 为基本培养基, 直接添加 6-BA 激素的培养基, 所产生分化的丛生芽数量较同等 MS 培养基低, 6-BA 最大浓度时(1.5 mg/L), 产生的丛生芽也呈现玻璃化状况; 添加 2 种激素组合时, 虽芽体质量有所改善, 但不定芽诱导数量较低。综合分析, 以 MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L 适宜进行菊花丛生芽诱导。

表 3 不同组合对菊花芽增殖的影响

基本培养基	激素/ mg · L ⁻¹		不定芽诱导率/ %	不定芽诱导倍数/ 倍	不定芽分化质量
MS	IBA	6-BA			
MS	0	0.1	86	1.3	苗健壮, 有根产生
MS	0	0.5	100	2.9	苗健壮
MS	0	1.0	100	5.8	芽健壮
MS	0	1.5	100	9.6	芽玻璃化 质量差
MS	0.2	0.1	60	0.8	苗健壮, 有根产生
MS	0.2	0.5	93	1.9	苗健壮, 有根产生
MS	0.2	1.0	100	4.7	芽健壮
MS	0.2	1.5	100	7.0	芽健壮
1/2MS	0	0.1	73	1.1	苗健壮, 有根产生
1/2MS	0	0.5	92	1.6	苗健壮, 有根产生
1/2MS	0	1.0	100	5.5	芽健壮
1/2MS	0	1.5	100	8.6	芽少量有玻璃化 质量差
1/2MS	0.2	0.1	40	0.4	苗健壮, 有根产生
1/2MS	0.2	0.5	85	0.9	苗健壮, 有根产生
1/2MS	0.2	1.0	100	3.9	芽健壮
1/2MS	0.2	1.5	100	5.8	芽健壮

表 4 不同激素水平对菊花生根的影响

基本培养基	激素/ mg · L ⁻¹		平均生根数
	IBA	6-BA	/ 条
MS	0	0	3.3
MS	0.1	0	6.5
MS	0.3	0	10.6
MS	0	0.1	1.1
MS	0.1	0.1	2.1
MS	0.3	0.1	6.8
1/2MS	0	0	5.9
1/2MS	0.1	0	10.9
1/2MS	0.3	0	12.8
1/2MS	0	0.1	1.3
1/2MS	0.1	0.1	3.4
1/2MS	0.3	0.1	9.7

2.4 不同激素水平对生根的影响

菊花是比较容易生根的植物, 在培养基中不添加任何激素时, 平均每个植株均能产生 3.3 条根。但是不同的基本培养基和激素种类对菊花的根系诱导作用也不同, IBA 能明显促进菊花根系再生, 而 6-BA 却能降低根系再生的倍数; 1/2MS 比 MS 培养基能更好的诱导产生根系。从表 4 可以得出, 1/2MS+IBA 0.3 mg/L 适宜进行菊花根系诱导。

3 讨论

薛建平等^[9]以安徽药菊花花瓣培养, 初代培养时, 探讨不同激素和外植体摆放方式对花瓣影响时指出, 在 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上, 不论接



图1 花瓣直接再生芽



图2 红色根毛

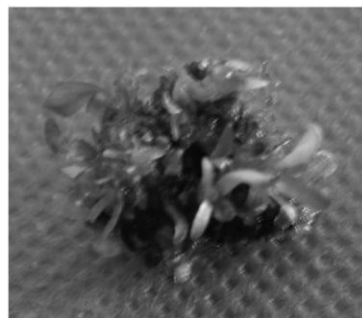


图3 玻璃化苗参考文献

种方式如何其花瓣愈伤组织诱导率 100%; 而对愈伤组织芽分化率来讲, 背面向上(反接)为 0, 正面向上(正接) 95%。在试验中探讨了不同培养基配方对两种摆放方式的影响时, 发现 MS+NAA 1.0 mg/L 或 2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 培养基 愈伤组织诱导率为 100%, 但在此培养基上, 芽的分化率最高仅为 13.2%(反接); MS+6-BA 1.0 mg/L 对于芽的诱导效果较好, 能直接从花瓣上诱导产生不定芽(100%); 同时也发现, 花背向上(反接)比花背向下(正接)效果不定芽的诱导效果好, 而在愈伤组织诱导时结果恰恰相反, 这和薛建平等研究不同, 具体原因, 经分析, 可能是基因型和材料选取时的生理差异所引起的, 但具体生理原因有待作进一步探索。

邓年方等^[6]用花瓣培养时指出, MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基有利从愈伤组织到丛生芽的诱导; 薛建平等^[5]认为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L 培养基是菊花花瓣分化形成小植株的适宜培养基, 曾凡力^[7]指出 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是从愈伤组织上芽诱导的良好培养基, 孙明等^[8]以神农香菊花蕾为外植体研究, 表明 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L 作为从愈伤组织上诱导较好; 在研究时并没有采取花瓣经过愈伤组织阶段进行分化再生植株, 而是直接从外植体上诱导产生不定芽, 然后对不定芽进行丛生芽诱导, 节省了培养环

节, 同时, 采用 MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L 对菊花不定芽诱导产生的丛生芽质量好, 能迅速在生产上利用, 较前人研究繁殖速度快。

菊花是一种比较容易生根的植物, 前人的研究都指出了基本的培养基都能诱导产生根系, 添加少量的生长素效果更好^[1-7], 这和我们试验结果是一致的。

光照时间对菊花生长发育的影响, 没有发现对其报道, 光照时间过长过短对其影响的生理原因, 可能与叶绿素的合成有关。

参考文献

- [1] 刘鹏, 刘金, 赵艳红, 等. 菊花的组织培养、脱毒与快繁技术研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2005, 20(4): 400-413.
- [2] 胡益明, 甘烦远, 彭丽萍, 等. 星花绣线菊的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(3): 235-236.
- [3] 杨鸿祚, 陈少琼, 梁木桂. 菊花组织培养的研究[J]. 热带作物研究, 1989(2): 52-54.
- [4] 蔡汉权. 金背大红花瓣的组织培养方法[J]. 韩山师范学院学报, 2005, 26(6): 72-75.
- [5] 薛建平, 常玮, 张爱民, 等. 安徽药菊花瓣组织培养技术的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 211-214.
- [6] 邓年方, 吴桂容. 菊花花瓣的组培快繁技术研究[J]. 贺州学院学报, 2007, 23(3): 144-145.
- [7] 曾凡力. 菊花花瓣的组织培养[J]. 北方园艺, 2007(9): 207-208.
- [8] 孙明, 张启翔. 神农香菊花蕾的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 348.

Studies on Petal Tissue Culture of *Chrysanthemum morifolium*

LI Ping, LI Qing-wei, HE Ai-li, FAN Yan-min, SUN Xin-zheng

(Henan Vocational College of Agriculture Zhongmu, Henan 451450, China)

Abstract: The purple petal of *Chrysanthemum morifolium* were used as explants, studied the different culture medium composition, explants and light to petal regeneration influence. The results showed that petal induction being suitable light time was 12~16 h/d; The Petal Normal place of adventitious buds induced was better. Yet .The callus induction and the results of the contrary. MS+NAA 1.0 mg/L or 2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L can be used as explants of callus induction medium; MS+6-BA 1.0 mg/L directly from the petals on the induced adventitious buds; MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L induced a high rate of Bud and Bud generated high quality; 1/2MS+IBA 0.3 mg/L for appropriate rooting medium.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*; Petal; Callus; Problems bud; Plant regeneration