

菊花“千代姬”组培快繁条件优化

施 敏¹, 杨红玉², 张国斌², 陈 倩¹, 鄢 波¹

(1. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650051; 2. 昆明大学 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

摘 要:以菊花“千代姬”的叶片为外植体, 对其愈伤组织的诱导、丛生芽的增殖和生根的诱导等不同过程的各种培养基和培养条件进行了研究。结果表明:愈伤组织诱导最适培养基为 SH+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA, 其诱导率为 100%。丛生芽增殖培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 诱导生根的培养基为 1/2MS+0.1 mg/L NAA, 3 类培养基均加蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.0 g/L, 在 pH 5.8、光照强度 2 500 lx、温度 25℃、光照时间 12 h/d 的条件下培养最适宜。

关键词:菊花“千代姬”; 组织培养; 激素配比; 优化

中图分类号:S 682.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0105-04

菊花(*Dendranthema morifolium*)属多年生半木质化草本, 其色彩艳丽、姿态万千、不畏寒风、傲霜怒放的品性, 深受人们的喜爱。菊花原产于我国, 至今已有 1 600 年以上的栽培历史, 菊花品种达 3 000 个以上, 且名贵品种极多, 具有极高的观赏价值^[1]。切花菊在国际、国内市场上非常畅销, 是国际著名的四大鲜切花之一, 占总鲜切花量的 23%, 在花卉产业中占有很重要的地位^[2]。目前, 菊花的繁殖方式以扦插和分株为主, 但这 2 种方法均需要较多母株材料, 且受季节和外界环境的限制, 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。虽然目前关于菊花的组织培养报道较多, 建立了以叶片、茎段、花器官^[3-4]等为外植体的不同菊花品种的再生体系, 但由于菊花品种繁多, 其内部基因型差异较大, 因此不同品种组织培养技术存在着较大差异。现选择菊花“千代姬”作为研究对象, 探索以叶片为外植体诱导愈伤组织并分化不定芽, 同时诱导生根的合适条件, 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为菊花快速繁殖提供技术保证, 解决市场上菊花供应不足的问题; 另一方面, 良好的再生体系可以为菊花新品种的选育和菊花转基因操作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试切花菊品种“千代姬”的无菌苗由西南林业大

学提供。以无菌苗的幼嫩叶片为试材, 诱导愈伤组织。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导培养基的筛选 采用正交实验法, 以 MS、1/2MS、SH 为基本培养基, 含琼脂 6.0 g/L, 蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 添加不同浓度 6-BA 和 NAA, 具体培养基配方见表 1。

表 1 不同基本培养基、激素种类及浓度组合

Table 1 The combinations of different culture media, hormones and their concentrations

| 处理 Treatment | 因素 Factor | | |
|-----------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 基本培养基 Basic culture medium | 6-BA/(mg·L ⁻¹) | NAA/(mg·L ⁻¹) |
| 1 | MS(1) | 0.5(1) | 0.2(1) |
| 2 | MS(1) | 1.0(2) | 0.3(2) |
| 3 | MS(1) | 1.5(3) | 0.5(3) |
| 4 | MS(1) | 2.0(4) | 1.0(4) |
| 5 | 1/2MS(2) | 0.5(1) | 0.5(3) |
| 6 | 1/2MS(2) | 1.0(2) | 1.0(4) |
| 7 | 1/2MS(2) | 1.5(3) | 0.2(1) |
| 8 | 1/2MS(2) | 2.0(4) | 0.3(2) |
| 9 | SH(3) | 0.5(1) | 1.0(4) |
| 10 | SH(3) | 1.0(2) | 0.5(3) |
| 11 | SH(3) | 1.5(3) | 0.3(2) |
| 12 | SH(3) | 2.0(4) | 0.2(1) |
| 13 | B ₅ (4) | 0.5(1) | 0.3(2) |
| 14 | B ₅ (4) | 1.0(2) | 0.2(1) |
| 15 | B ₅ (4) | 1.5(3) | 1.0(4) |
| 16 | B ₅ (4) | 2.0(4) | 0.5(3) |

1.2.2 愈伤组织诱导 以无菌苗的幼嫩叶片为试材, 取生长健壮的幼嫩叶片, 将其切成 0.5 cm² 大小的方块接种于培养基中, 每瓶接种 3 片, 每个处理 10 瓶。愈伤组织每 20 d 继代 1 次。将接种好的菊花叶片放于培养架上进行培养。温度 25℃、光照强度 2 500 lx、光照时间 12 h/d, 自接种次日观察愈伤组织的生长情况。愈伤组织诱导率(%)=叶片产生愈伤组织块数/接种叶片总数×100%。

第一作者简介:施敏(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为园林植物。E-mail: shimin19891117@126.com.

责任作者:鄢波(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物生物技术。E-mail: yanbodr@aliyun.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060042; 31260062)。

收稿日期:2014-04-25

1.2.3 丛生芽的增殖培养 将上述培养基中诱导分化的丛生芽在超净工作台上用手术刀和镊子切成几个单芽,分别接种于继代培养基 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 中,每瓶接种 3 株苗,并观察苗的生长状况。培养条件同 1.2.2。增殖系数=出苗总株数/接种株数。

1.2.4 再生植株的生根培养 采用正交实验法,以 MS、1/2MS、1/4MS 为基本培养基,添加不同浓度的 NAA 和 6-BA,具体配方详见表 2。10 d 后统计生根情况。培养条件同 1.2.2。

表 2 不同组合的生根培养基

Table 2 Different combinations of the rooting medium

| 处理 Treatment | 因素 Factor | | |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | 基本培养基 Basic culture medium | NAA/(mg · L ⁻¹) | 6-BA/(mg · L ⁻¹) |
| 1 | MS | 0.1 | — |
| 2 | MS | — | 0.2 |
| 3 | 1/2MS | 0.1 | — |
| 4 | 1/2MS | — | 0.2 |
| 5 | 1/4MS | 0.1 | — |
| 6 | 1/4MS | — | 0.2 |

表 3 不同培养基对菊花叶片诱导愈伤组织并分化丛芽效果的影响

Table 3 Effect of different culture media on callus and proliferation induction of *Chrysanthemum*

| 处理 Treatment | 因素 Factor | | | 接种叶 片数 Number of inoculation leaf | 愈伤形 成数 Number of callus formation | 愈伤组织 诱导率 Callus induction rate/ % | 诱导丛生 芽的块数 Number of bud induction | 产生芽数 Produce buds |
|-----------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--|--|-------------------------|
| | A 基本培养基 Basic culture medium | B 6-BA /(mg · L ⁻¹) | C NAA /(mg · L ⁻¹) | | | | | |
| 1 | MS | 0.5(1) | 0.2(1) | 30 | 28 | 93.3 | 18 | 72 |
| 2 | MS | 1.0(2) | 0.3(2) | 30 | 26 | 86.7 | 15 | 63 |
| 3 | MS | 1.5(3) | 0.5(3) | 30 | 24 | 80.0 | 11 | 59 |
| 4 | MS | 2.0(4) | 1.0(4) | 30 | 25 | 83.3 | 9 | 45 |
| 5 | 1/2MS | 0.5(1) | 0.5(3) | 30 | 30 | 100.0 | 21 | 97 |
| 6 | 1/2MS | 1.0(2) | 1.0(4) | 30 | 29 | 96.7 | 17 | 125 |
| 7 | 1/2MS | 1.5(3) | 0.2(1) | 30 | 30 | 100.0 | 20 | 15 |
| 8 | 1/2MS | 2.0(4) | 0.3(2) | 30 | 30 | 100.0 | 19 | 86 |
| 9 | SH | 0.5(1) | 1.0(4) | 30 | 30 | 100.0 | 30 | 180 |
| 10 | SH | 1.0(2) | 0.5(3) | 30 | 30 | 100.0 | 23 | 147 |
| 11 | SH | 1.5(3) | 0.3(2) | 30 | 29 | 96.7 | 18 | 108 |
| 12 | SH | 2.0(4) | 0.2(1) | 30 | 30 | 100.0 | 12 | 81 |
| 13 | B ₅ | 0.5(1) | 0.3(2) | 30 | 23 | 76.7 | 9 | 21 |
| 14 | B ₅ | 1.0(2) | 0.2(1) | 30 | 17 | 56.7 | 12 | 16 |
| 15 | B ₅ | 1.5(3) | 1.0(4) | 30 | 16 | 53.3 | 11 | 27 |
| 16 | B ₅ | 2.0(4) | 0.5(3) | 30 | 20 | 66.7 | 10 | 17 |
| K1 | 53 | 78 | 62 | | | | | |
| K2 | 77 | 67 | 61 | | | | | |
| K3 | 83 | 60 | 65 | | | | | |
| K4 | 42 | 50 | 67 | | | | | |
| 极差 R | 41 | 28 | 6 | | | | | |

由表 3 可知,9 号培养基最适合菊花“千代姬”愈伤组织的诱导,其对愈伤组织的诱导率高达 100%。并且所有的愈伤组织均能分化出丛生芽,该处理中愈伤组织直接分化出丛生芽数量为 180 个,且丛生芽的长势较好(图 3)。因此,SH+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 为从叶片诱导菊花“千代姬”愈伤组织的培养基配方。

1.2.5 移栽 将长势健壮,株高为 4 cm 左右,新叶片数达到 10~15 片,并带有根系的无菌苗,开瓶练苗 2 d,将其放在 25℃左右的室温中,增加组培苗对外界环境的适应能力。移栽时清洗干净植株根部的培养基,移栽至适宜的基质中。该试验 3 次重复,每次移栽 10 株幼苗。观察无菌苗移栽后的成活率和生长状况。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及分化丛生芽分析

叶片剪碎接种到培养基中培养 7 d 时,观察各培养基叶片的变化,结果显示 9~12 号培养基中的叶片边缘出现上翘。在接种 10 d 后,所有外植体无论在什么培养基上诱导,均出现叶片卷曲,边缘膨大,说明叶片已经开始脱分化,并启动叶片边缘的细胞进行分裂。12~13 d 后叶片明显膨大,并在叶片的伤口处出现少量白色愈伤组织(图 1)。16 d 后愈伤组织开始变绿。23 d 后愈伤组织上开始长出幼芽(图 2)。不同配方培养基试验的结果表明,12 种培养基均能诱导产生愈伤组织,但不同培养基上叶片愈伤诱导率、质地及分化丛生芽的情况存在显著差异。结果统计与分析见表 3。

由极差分析结果可知,菊花叶片诱导愈伤组织并分化丛生芽的极差大小顺序为: $R_A > R_B > R_C$,从极差大小可以看出影响菊花无菌苗诱导愈伤组织并分化丛生芽的因素的主次顺序是:培养基种类对该试验的影响最大,而激素 6-BA 的浓度影响次之,NAA 浓度的影响最小。其中 A 因素的 K3 值最大,即 SH 培养基最好;B 因素

的 K1 值最大,即 6-BA 的浓度为 0.5 mg/L 最好;C 因素的 K4 值最大,即 NAA 的浓度为 1.0 mg/L 最好。由此,可以确定诱导菊花叶片产生愈伤组织并分化丛生芽的最佳培养基与激素浓度组合为 SH+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.0 g/L,pH 5.8,极差分析的结果与试验的结果一致。



图 1 叶片愈伤组织

Fig. 1 Callus induced from young leaves



图 2 叶片愈伤组织长出的幼芽

Fig. 2 Young buds induced from callus



图 3 愈伤组织诱导出的丛生芽

Fig. 3 Multiple shoots induced from callus

2.2 丛生芽的增殖培养分析

将诱导分化的丛生芽在超净工作台上切成几个单芽分别接种于继代培养基中,6 d 后可以观察到有腋芽产生,23 d 后腋芽长至 1.0~2.0 cm,30 d 后长至 2.0~3.0 cm。其增殖系数达 6.3 倍,即可获得大量无菌苗。

2.3 生根诱导分析

接入生根培养基的菊花无菌苗,在 6 d 后观察发现 1/4MS 培养基中大部分苗开始生根,其余培养基直到 8 d 后才观察到极短的白色小根,培养 20 d 后植株高可达 5~6 cm。此外,还观察发现在 1/4MS 培养基中加入 NAA 的效果比 6-BA 的生长效果好。

从表 4 可以看出,在 MS、1/2MS 或 1/4MS 培养基中附加一定的激素,菊花无菌苗均能生根,但从根的生长势分析,适宜的生根培养基为:1/2MS+0.1 mg/L NAA,其生根率达 100.0%,且生根效果最好。

表 4

不同培养基对菊花无菌苗的生根诱导效果

Table 4 Effect of different culture media on rooting induction of aseptical plantlets of *Chrysanthemum*

| 处理 Treatment | 基本培养基 Basic culture medium | 因素 Factor NAA/(mg·L ⁻¹) | 6-BA/(mg·L ⁻¹) | 生根率 Rooting rate/% | 生长情况 Growth condition |
|-----------------|-------------------------------|--|----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | MS | 0.1 | — | 100.0 | 根细长,呈辐射状,较多 |
| 2 | MS | — | 0.2 | 23.3 | 根短粗,较少 |
| 3 | 1/2MS | 0.1 | — | 100.0 | 根粗壮,较长,且多 |
| 4 | 1/2MS | — | 0.2 | 26.7 | 根短粗,较少 |
| 5 | 1/4MS | 0.1 | — | 86.7 | 根短粗,较少 |
| 6 | 1/4MS | — | 0.2 | 30.0 | 根细长,较少 |

2.4 移栽结果分析

移栽试验 3 次重复,每次 10 株幼苗,15 d 后观察移栽成活率平均达 86.6%,而且试管苗生长健壮,叶浓绿,茎粗壮,根系发达。

3 讨论与结论

在菊花的组织培养研究中,众多研究选用 NAA 和 6-BA 组合来诱导菊花叶片产生愈伤组织并分化丛生芽^[5-7],且培养基中 NAA 的浓度为 0.1~1.0 mg/L,6-BA 的浓度为 0.5~2.0 mg/L。如袁成志等^[8]以叶片为外植体诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA;

于红芳等^[9]以菊花叶片为外植体诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。

该试验结果表明,SH+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 培养基对叶片诱导愈伤组织非常适合。但是综合众多研究结果表明,不同菊花品种对 6-BA 和 NAA 的浓度需求存在较大差异,因此,每种品种的最佳浓度组合需要试验研究确定。

菊花诱导生根非常容易,大多采用 1/2MS 或 MS 添加一定浓度的生长素 6-BA 或 NAA。该试验筛选出最佳的生根培养基为 1/2MS+0.1 mg/L NAA。

西芹水提液对蚕豆根尖微核率的影响

秦永燕, 刘瑞祥, 铁军, 杨丽婷

(长治学院 生物科学与技术系, 山西 长治 046011)

摘要:以蚕豆为试材,采用根尖细胞微核试验方法,研究了不同浓度的西芹水提液与未添加和添加环磷酰胺溶液对蚕豆根尖微核率的影响。结果表明:未添加环磷酰胺溶液时,不同浓度的西芹水提液对蚕豆根尖细胞微核率的产生没有诱导作用,平均微核率无明显变化,微核指数保持在1.3左右;添加环磷酰胺溶液时,西芹水提液对环磷酰胺诱导的蚕豆根尖微核率的抑制作用较明显,抑制率为52%~72%,且与其浓度存在剂量-反应关系,相关系数 $r=0.9048$,其抑制作用随着西芹水提液浓度的增大而增强,表明西芹水提液具有一定的抗突变作用。

关键词:西芹;水提液;蚕豆;微核率;环磷酰胺

中图分类号:S 436.341 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0108-03

西芹(*Apium graveolens*)属伞形科二年生草本植物,又名西洋芹菜,是从欧美引进的新品种。其植株紧

凑粗大,叶柄宽厚、实心,质地脆嫩,有芳香气味^[1];营养丰富,富含蛋白质、碳水化合物、矿物质、多种维生素及芹菜油,具有较高的营养价值和保健价值,深受人们喜欢^[2]。

蚕豆根尖微核技术是以蚕豆为材料,运用细胞生物学手段,利用细胞微核率来表示材料受损伤程度的一种监测遗传毒物的方法。微核(micronucleus, MCN)是指

第一作者简介:秦永燕(1979-),女,山西黎城人,硕士,实验师,现主要从事遗传学等教学与科研工作。E-mail:qyy429@126.com。

基金项目:长治学院校级科研资助项目(201415);第六批高等学校特色专业建设资助项目(TS11920)。

收稿日期:2014-03-13

参考文献

- [1] 戴思兰. 中国菊花史略[J]. 湖南林业, 2007(11):31.
- [2] 陈俊愉. 中国菊花过去和今后对世界的贡献[C]//中国风景园林学会菊花研究专业委员会. 2007 中国(中山小榄)国际菊花研讨会论文集. 中国风景园林学会菊花研究专业委员会, 2007:6.
- [3] 齐向英, 郑丹, 张超, 等. 菊花组织培养研究[J]. 江苏农业科学, 2009(5):63-64.
- [4] 肖志坚, 纪艳, 刘德江, 等. 菊花的组织培养技术[J]. 园艺与种苗, 2012(3):21-23.
- [5] 周洲, 李永丽, 姜玲, 等. 菊花‘绿鹦哥’的组织培养和快速繁殖[J]. 北

方园艺, 2009(10):110-112.

- [6] 陈黎, 万志兵, 曹玲玲. 黄山贡菊组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 黄山学院学报, 2013(5):63-65.
- [7] 张月娇. 菊花“神马”组织培养快繁技术研究[J]. 林业勘察设计, 2012(1):139-142.
- [8] 袁成志, 李波, 杨蔚然, 等. 激素对菊花愈伤组织诱导和丛生芽分化的影响[J]. 北方园艺, 2010(1):162-164.
- [9] 于红芳, 许刚, 李永华, 等. 菊花品种唐宇金秋组织培养研究[J]. 河南农业科学, 2009(11):114-117.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Dendranthema morifolium* ‘Qiandaiji’

SHI Min¹, YANG Hong-yu², ZHANG Guo-bin², CHEN Qian¹, YAN Bo¹

(1. College of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650051; 2. College of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan 650214)

Abstract: Taking leaf of *Chrysanthemum morifolium* ‘Qiandaiji’ as material, tissue culture conditions and media for callus induction, cluster buds propagation and rooting were studied in this article. The results showed that the proper medium of callus induction was SH+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA and resulted in an induction efficiency of 100%. The cluster buds well grow in MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA. And the appropriate rooting medium was 1/2MS+0.1 mg/L NAA. All three types of media were contained 30 g/L sucrose and 6.0 g/L agar with pH 5.8. The culture conditions were optimized to 2 500 lx light intensity, 25°C temperature and 12 h light/12 h dark circle.

Keywords: *Chrysanthemum morifolium* ‘Qiandaiji’; tissue culture; hormone combination; optimization