

DOI:10.11937/bfyy.201518028

# 菊花不同外植体组培快繁及其再生体系的研究

王自布, 莫国秀, 罗会兰, 张德英

(贵州师范学院 化学与生命科学学院, 贵州 贵阳 550018)

**摘 要:**以菊花不同外植体为试材,采用离体培养快速繁殖的方法,研究菊花不同外植体在不同的培养基中诱导不定芽再生的频率。结果表明:菊花不同基因型外植体在含适宜 6-BA、NAA 等激素的培养基中形成愈伤组织的难易程度不同,愈伤组织诱导形成不定芽的能力强弱也不一样;不同基因型菊花外植体的不定芽诱导率高低排序是花蕾>花瓣>茎段>叶片;对菊花的花蕾、花瓣、茎段和叶片来说最适合的培养基配方是 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,不同培养基诱导不定芽的能力为花蕾>花瓣>茎段>叶片,其中,菊花花蕾和花瓣的再生能力较强。最合适的生根培养基是 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L。该研究成功的建立了菊花不同外植体离体培养再生途径,并获得了再生植株。

**关键词:**菊花;外植体;组织培养;再生体系

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0106-04

菊花(*Chrysanthemum indicum* L.)属菊科菊属多年生宿根草本植物。原产我国,是我国的十大名花之一,现世界各地均有栽培,品种多,花期各异,菊花作为观赏花卉来说有其独特的时间优势,在百花开败的深秋笑霜傲雪,而且花期也比较长,条件许可花开 2~3 个月而不败,是目前世界上栽培最广的花卉之一,也是切花的主要来源之一。袁成志等<sup>[1]</sup>认为,目前人们对于名贵的菊花品种的追求导致这些品种的母株生产不能及时的满足市场的需求;菊花的栽培主要依靠传统的方法进行繁殖,即靠扦插和分株进行繁殖,这种繁殖方式最明显的不足是其需要大量的母株原材料,最重要的是还受环境条件(主要是依赖季节性比较强)的影响,再加上在生产上因其繁殖速率低、花费时间长、幼苗的质量也存在着良莠不齐等诸多问题,导致繁殖效果不理想。然而组织培养的技术和方法可以解决现实中存在的这些矛盾。虽然菊花的组织培养技术前人已经有诸多的报道,菊花的侧芽<sup>[2]</sup>、茎段<sup>[3]</sup>、茎尖<sup>[4]</sup>、叶片<sup>[5]</sup>、花瓣<sup>[6]</sup>、子房<sup>[6]</sup>等都可以实现植株再生,但是较全面、较系统地利用不同外植体对菊花离体培养方面的研究报道比较少。菊花品种繁多,然而名贵的品种仍然是难以满足市场需求,能够育出名优特新的菊花品种仍是菊花育种者追求的目标。

**第一作者简介:**王自布(1984-),男,博士,副教授,现主要从事植物资源开发方面的教学与科研工作。E-mail:xjshz\_2008@sina.com.

**基金项目:**贵州省自然科学基金资助项目(黔科合 J 字[2013]2246 号);贵州师范学院博士启动基金资助项目(12BS028)。

**收稿日期:**2015-05-25

标。基于此,该试验选择不同基因型的菊花,研究菊花不同外植体在不同的培养基中从器官发生的途径进行不定芽诱导再生试验,为菊花新品种的繁育以及品种改良等方面在理论上提供了可行的技术基础,对于名贵菊花的大面积推广具有重要的价值和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的菊花品种有“蓝菊”、“黄绣球”、“墨菊”、“绿芙蓉”、“紫菊”。所有材料均为贵州师范学院化学与生命科学学院实验室栽培品种。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的选择和接种** 分别取供试品种的花蕾、花瓣、茎段以及叶片进行消毒(其中花蕾和花瓣是秋季时的试验材料,茎段以及叶片是春季时的试验材料),先用 75%酒精震荡浸泡 30 s,再用 0.1%的升汞溶液消毒 7 min,无菌水冲洗 3~4 次,分别接种于相对应的适宜培养基上进行培养。

### 1.2.2 不同品种菊花的外植体对愈伤形成能力的影响

将菊花的花蕾、花瓣、茎段和叶片接种在培养基:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。大多数外植体都在接种 7 d 后就开始膨大,切口处开始形成愈伤组织,呈黄绿色,14 d 后产生明显可见的愈伤组织。另外将外植体花蕾、花瓣、茎段以及叶片接种在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+IAA 0.1 mg/L 或 MS+2,4-D 1.0 mg/L 的培养基上,叶片和茎段的愈伤组织诱导率明显提高有所提高。

1.2.3 6-BA 浓度的差异对菊花外植体诱导不定芽的影响 选择基因型不同的“墨菊”和“绿芙蓉”为该部分的试验材料,将浓度不同的细胞分裂素(6-BA)添加在 MS 培养基中进行诱导培养,观察不同外植体花蕾、花瓣、茎段以及叶片诱导不定芽发生的效果。不同外植体的 6-BA 浓度分别为:花蕾 0.2~2.0 mg/L,花瓣 1.0~2.0 mg/L,茎段 1.0~2.0 mg/L,叶片 2.0~3.0 mg/L。

1.2.4 不同培养基对菊花叶片不定芽诱导率影响 以 MS 为基本培养基,以“蓝菊”、“黄绣球”的叶片为试验材料,研究 2 种激素共同作用(6-BA 和 NAA)对不定芽诱导发生的影响,具体配比见表 1。

1.2.5 不同基因型不同外植体对菊花叶片不定芽诱导率的影响 试验以不同基因型的菊花,“蓝菊”、“黄绣球”、“墨菊”、“绿芙蓉”、“紫菊”的不同外植体花蕾、花瓣、茎段、茎尖以及叶片为试验材料,在上一步得出的最优培养基的基础上进行诱导分化。

1.2.6 不同基因型不同外植体菊花诱导生根率的影响 当继代苗长到 2.0 cm 时,选取长势均匀一致的丛生苗,把幼苗切割成 1.0~1.5 cm 左右,转接到生根培养基 1/2MS+NAA 0.1 mg/L 上,1 周后观察,幼苗开始有生根迹象,2 周后长根很明显。

1.2.7 菊花组培的条件要求 组培室内温度要求 25~28℃,光照强度 2 000 lx 左右,日光灯光照时间是 12 h 左右,固体培养基含琼脂 5 g/L,调 pH 5.8 左右,将菊花的外植体消毒后接种在组培专用的培养瓶中,每隔 2 周继代 1 次。

### 1.3 数据分析

试验重复 3 次,每处理接种外植体数为 30 个,每 2 周统计其愈伤率,菊花不定芽诱导率的统计时间为每 8 周进行一次,采用 SPSS 19.0 软件进行相应的数据分析,柱形图的制作均采用 Origin 7.0 软件进行操作。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同品种菊花的外植体对愈伤形成能力的影响

把菊花不同外植体花蕾、花瓣、茎段以及叶片接种培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上,大多数外植体均能在一周之后,在外植体与诱导培养基接触部位出现膨大,表面有愈伤组织形成的迹象,并呈现白色或淡绿色,2 周后愈伤组织就比较明显了。比较基因型不同的外植体诱导培养变化情况,发现花蕾、花瓣、叶片、茎段等较容易形成愈伤组织,平均愈伤率达到 80% 以上(图 1)。但是叶片诱导愈伤组织的能力不如花蕾和花瓣。从基因型上来看 6 种菊花的花蕾和花瓣都容易诱导愈伤组织,愈伤组织诱导率均达到 93% 以上。另外将外植体花蕾、花瓣、茎段以及叶片接种在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+IAA 0.1 mg/L 或 MS+2,4-D 1.0 mg/L 的培养基上,结果发现添加 IAA 或 2,4-D 后,叶片和茎段的愈伤组织诱导率比较高。

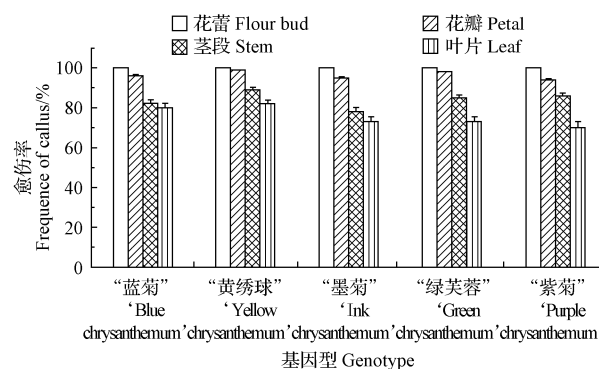


图 1 不同基因型菊花外植体愈伤形成能力

Fig. 1 Effect of different types of genotypes on callus formation

### 2.2 6-BA 浓度的差异对菊花外植体诱导不定芽的影响

在该试验设计的浓度范围内,菊花不同外植体对激素不同浓度下诱导不定芽表现有差异。由图 2、3 可知,不同基因型的不同外植体不定芽发生的适宜激素浓度范围不同,甚至这个适宜浓度范围相差还比较大。方差分析的结果显示,菊花不同外植体以及 6-BA 浓度不同对菊花不定芽的诱导存在显著差异( $P < 0.05$ ),但是基因型间诱导不定芽的能力没有显著差异( $P > 0.05$ )。从激素浓度不一样对 2 种基因型菊花不同外植体不定芽诱导的差异性来看,不同外植体适宜的不定芽诱导激素浓度是 6-BA 2.0 mg/L。

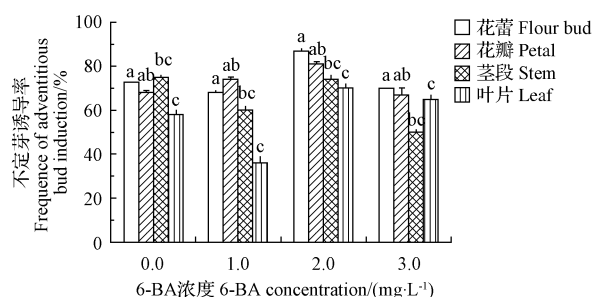


图 2 6-BA 浓度对菊花“墨菊”不同外植体不定芽的影响

Fig. 2 Effect of the concentration of 6-BA on shoot regeneration of different explants of 'Ink chrysanthemum'

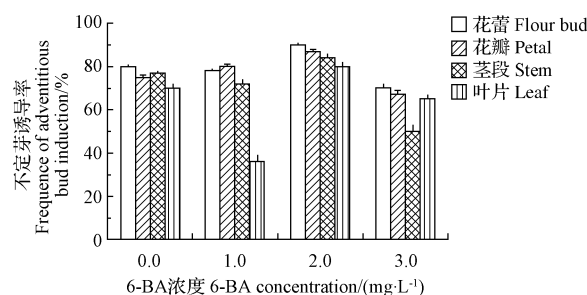


图 3 6-BA 浓度对菊花“绿芙蓉”不同外植体不定芽的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of 6-BA on shoot regeneration of different explants of 'Green chrysanthemum'

## 2.3 不同培养基对菊花叶片不定芽诱导率影响

表1表明,当激素6-BA浓度在1.0~3.0 mg/L, NAA浓度为0.2~0.4 mg/L,2个品种菊花叶片进行诱导时,不定芽诱导率超过60%。方差分析的结果显示,附加激素不同的培养基,不定芽诱导间存在着显著性差异( $P<0.05$ )。进行不定芽诱导率差异性测验结果显示,最适宜叶片不定芽诱导的培养基配方为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

表1 10种培养基对菊花不定芽诱导率影响的差异显著性

Table 1 Significance test for frequency of adventitious bud induction with 10 kinds of media

培养基 Types of media/(mg·L <sup>-1</sup> )	不定芽平均诱导率 Average of frequency of adventitious/%	显著性 Significance
MS+6-BA 2.0+NAA 0.2	75.50	a
MS+6-BA 1.0+NAA 0.2	71.40	a
MS+6-BA 3.0+NAA 0.4	67.80	a
MS+6-BA 2.0+NAA 0.4	66.50	a
MS+6-BA 1.0+NAA 0.4	65.40	a
MS+6-BA 3.0+NAA 0.2	63.60	a
MS+6-BA 3.0+NAA 0.1	46.40	ab
MS+6-BA 3.0+NAA 0.6	40.50	abc
MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	37.50	bc
MS+6-BA 1.0+NAA 0.6	30.50	bc
MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	25.90	bc
MS+6-BA 2.0+NAA 0.6	19.50	c

注:在0.05水平差异显著。下同。

Note: At the 0.05 level, the population means are significantly different. The same below.

## 2.4 不同基因型不同外植体对菊花叶片不定芽诱导率影响

表2、3表明,不同基因型不定芽诱导率为“黄绣球”>“紫菊”>“墨菊”>“蓝菊”>“绿芙蓉”,而不同外植体之间不定芽诱导率依次为花蕾>花瓣>茎段>叶片。

表2 不同外植体对不定芽诱导率的差异显著性测验

Table 2 Significance test for frequency of adventitious bud induction with different explants

外植体 Explant	不定芽平均诱导率 Average of frequency of adventitious/%	显著性 Significance
花蕾 Flour bud	79.4	a
花瓣 Petal	73.5	a
茎段 Stem	43.6	b
叶片 Leaf	35.5	bc

表3 5个基因型对不定芽诱导率的差异显著性测验

Table 3 Significance test for frequency of adventitious bud induction with three types of genotype

基因型 Genotype	不定芽平均诱导率 Average of frequency of adventitious bud induction/%	显著性 Significance
“黄绣球”“Yellow chrysanthemum”	59.4	a
“紫菊”“Purple chrysanthemum”	53.5	a
“墨菊”“Ink chrysanthemum”	45.6	a
“蓝菊”“Blue chrysanthemum”	30.5	b
“绿芙蓉”“Green chrysanthemum”	27.6	b

方差分析显示,菊花不同外植体之间不定芽诱导率存在显著性差异( $P<0.05$ )。

## 2.5 不同基因型不同外植体菊花诱导生根率的影响

在该试验中,随着时间的推移生根率明显提高,5种不同基因型的菊花在一周时有生根迹象的达到50%以上,到第2周时平均生根率达75%左右,其中“黄绣球”生根率高达100%。“绿芙蓉”和“墨菊”生根率最低,但是在培养基中添加IAA 0.1 mg/L后,在一周后有生根迹象的提高至75%左右。

## 3 讨论与结论

该试验研究得出的结论与前人研究略有不同,以花瓣为外植体为例,TANAKA等<sup>[7]</sup>用品种Aboukyo的花瓣为外植体,以MS为基本培养基,添加适宜的IAA和KT,愈伤组织诱导不定芽80%。TYMOSZUK等<sup>[8]</sup>以花瓣为外植体,在培养基MS+2,4-D 4.0 mg/L+KT 1.0 mg/L上,愈伤组织诱导率达到85%;TYMOSZUK等<sup>[9]</sup>以MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养,只有41.67%的诱导率。NAING等<sup>[10]</sup>在品种Baeksun上诱导不定芽为56.3%。该试验中,不同品种菊花的外植体(花蕾、花瓣、茎段和叶片等)在激素(IAA、6-BA、NAA等)不同的培养基中进行诱导,结果形成愈伤组织的难易程度不同,愈伤组织诱导形成不定芽的能力强弱也不一样;不同基因型之间存在显著性差异性,“黄绣球”培养时适用的培养基配方范围相对比较宽泛一些,其中MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基最适合不同基因型不同外植体进行快速繁殖。

很多学者报道了激素6-BA对植株不定芽再生的影响,认为在以不同的试验材料为外植体的试验中,正是因为培养基中加入了不同的外源激素才导致了其各种外植体发生了分化状态,因此植物器官的发生主要依赖于细胞分裂素。在菊花的组培中,BUSH等<sup>[11]</sup>及TANAKA等<sup>[7]</sup>认为叶片和茎段作为外植体进行试验明显优于其它组织或器官。XU等<sup>[12]</sup>选择叶片和茎段作为外植体,用不同的植物激素浓度(6-BA和NAA)进行组合试验,结果表明,当只使用单一的激素6-BA而没有NAA时,在叶片中没有愈伤组织被诱导出现;当6-BA为0.5 mg/L时,适当的提高NAA浓度有利于愈伤组织的诱导,甚至达到100%的诱导率。当二者激素浓度配比为6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L时,对于茎和叶片作为外植体来说是最优的。该研究结果表明,当6-BA 2.0 mg/L, NAA浓度在0.2~1.0 mg/L时,基因型不同的菊花其叶片和茎作为外植体的诱导率均表现不错。TYMOSZUK等<sup>[9]</sup>以花瓣为外植体,在培养基MS+2,4-D 4.0 mg/L+KT 1.0 mg/L上,愈伤组织诱导率达85%;TYMOSZUK等<sup>[8]</sup>以MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,只有41.67%的诱导率。该试验中以花蕾和



花瓣作为外植体时,调整了 NAA 浓度,在培养基配方为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 时,各种基因型均能产生愈伤组织,且愈伤率最高的基因型达 90% 以上。

组织培养对菊花生物工程来说是一种比较重要的工具<sup>[13]</sup>。许多因素影响着菊花离体培养植株再生过程。该研究从外植体类型、基因型、外源激素等探讨菊花离体培养再生过程中的影响因素。菊花愈伤组织的形成均比较容易,不受基因型和外植体的影响,但是进一步分化成芽的能力不同。该试验中,诱导花蕾外植体较适宜的培养基配方是 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,花瓣作为外植体进行诱导时较适宜的培养基配方是 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,对茎段进行诱导时较适宜的培养基配方是 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,对茎尖进行诱导时较为适宜的培养基配方是 MS+6-BA 1.0~2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,叶片作为外植体进行诱导时较为适宜的培养基配方是 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,生根培养基最为适宜的是 1/2MS+NAA 0.1 mg/L,不同培养基诱导不定芽的能力为花蕾>花瓣>茎段>茎尖>叶片,其中,菊花花蕾和花瓣的再生能力较强。因此以菊花组织培养再生体系为例,不同基因型、不同外植体以及适宜的培养基配方的选择是菊花离体培养成键的关键。

#### 参考文献

- [1] 袁成志,李波,杨蔚然. 菊花组织培养技术研究[J]. 北方园艺, 2010 (16):154-156.
- [2] 顾昌华,郑利锋. 世界名菊墨菊花的组织培养与快速繁殖技术[J]. 种子, 2006, 25(6):93-94.
- [3] 蒋细旺,刘国锋,包满珠. 菊花 9 个品种叶片和茎段快速高效再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(2):162-166.
- [4] 王丽娟,沈默,吴绛云,等. 名种菊花快速繁殖技术[J]. 北方园艺, 2002(3):61.
- [5] 刘军,赵兰勇,丰震,等. 菊花叶片离体高效再生体系的建立[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004, 35(2):177-182.
- [6] 李辛雷,陈发棣,王红,等. 菊花外植体再生体系的研究[J]. 上海农业学报, 2004, 20 (2):13-16.
- [7] TANAKA K, KANNO Y, KUDO S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura][J]. Plant Cell Rep, 2000, 19:946-953.
- [8] TYMOSZUK A, ZALEWSKA M. *In vitro* adventitious shoots regeneration from ligulate florets in the aspect of application in Chrysanthemum breeding[J]. Acta Sci Pol Hortorum Cultus, 2014a, 13(2):45-58.
- [9] TYMOSZUK A, ZALEWSKA M, LEMA-RUMIN, et al. Regeneration of somatic embryos from in vitro isolated ligulate florets of Chrysanthemum [J]. Acta Sci Pol Hortorum Cultus, 2014b, 13(4):13-22.
- [10] NAING A H, MIN J S, PARK K I, et al. Primary and secondary somatic embryogenesis in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cv. 'Baeksun' and assessment of ploidy stability of somatic embryogenesis process by flow cytometry[J]. Acta Physiol Plant, 2013, 35:2965-2974.
- [11] BUSH S R, EARLE E D, LANGHANS R W. Plantlet from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* "Indianapolis" [J]. Am J Bot, 1976, 63:729-737.
- [12] XU P S, ZHANG Z L, WANG B, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chrysanthemum (Yuukou) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 111:393-397.
- [13] TEIXEIRA DA SILVA J A, KULUS D. Chrysanthemum biotechnology: discoveries from the recent literature[J]. Folia Horti, 2014, 26(2):67-77.

## Research of Tissue Culture and Regenerated of the Different Explants of *Chrysanthemum indicum* L.

WANG Zibu, MO Guoxiu, LUO Huilan, ZHANG Deying

(College of Chemistry and Life Science, Guizhou Normal College, Guiyang, Guizhou 550018)

**Abstract:** *Chrysanthemum indicum* L. was used as explants to study rapid propagation through tissue culture. The effect of media components on the induction of shoot regeneration for different types of explants in five genotypes of *Chrysanthemum indicum* L. were investigated. The results showed that forming the callus for different genotypes explants cultured on media containing suitable 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (6-BA) concentrations was easy, but shoot regeneration from the callus proved difficult. The frequency of shoot regeneration from chrysanthemum's different types of explants for all the genotypes were in turn as follows: flower bud>petal>stem>leaf. The best culture medium for the chrysanthemum's explants was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The ability of inducing shoot regeneration for different explants of chrysanthemum was very different, and the regenerated frequency of flower bud and petal was the highest. Shooting culture was on 1/2 MS medium supplemented with NAA 0.2 mg/L. These results indicate that the experiment successfully established the plant regeneration system of *Chrysanthemum indicum* L., and successfully obtained the regenerated plant.

**Keywords:** *Chrysanthemum indicum* L.; explants; tissue culture; regeneration