

四种露地菊再生体系的建立

李金童¹, 吴雅妮¹, 丁兵¹, 齐学军², 张旻¹, 解莉楠¹

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 辽宁省中药研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’4种露地菊叶片外植体为试验材料,在MS基本培养基上添加不同浓度的6-BA、NAA进行高效稳定的再生体系的建立。结果表明:‘东林瑞雪’叶片最适分化培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA;‘夺目玛瑙’叶片最适分化培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA;‘黄金盏’叶片最适分化培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA;‘金不换’叶片最适分化培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA;4种露地菊的最适生根培养基均为1/2MS培养基。

关键词:露地菊;再生体系;6-苄氨基嘌呤(6-BA);萘乙酸(NAA)

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)19-0119-06

菊花(*Dendranthema morifolium*)属菊科菊属多年生草本植物,关于菊花的文字记载最早见于《礼记》中,距今已有两千余年的历史。研究人员已经成功利用菊花花药、叶片、叶柄、茎段等外植体分化出芽。1968年, HILL^[1]以芽尖为外植体,通过愈伤组织诱导建立了菊花的再生体系。以后,研究人员用花瓣^[2]、花粉^[3]、茎尖^[4]、茎段^[5-8]、腋芽、叶片^[9-15]等材料作为外植体,通过调整激素配比得到了不定芽,相继建立了再生体系。与花粉、茎段、花瓣等植物材料相比,由于叶片取材方便、数量多、分化率高,在菊花分化研究中已成为主要材料。在菊花再生体系的建立中还存在着很多问题,菊花各个品种之间存在着较大差异,现有的菊花再分化体系不能适用于其它菊花品种。同一品种的不同品系之间也存在着较大差异,以露地菊为例,不同露地菊品系之间存在的差异十分明显,研究人员已经得到了几种品系露地菊的最适分化培养基,如‘繁星粉’最适分化体系为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ NAA,‘神韵’的最适分化体系为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA,‘都市丽人’最适分化体系为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA,‘粉玫瑰’最适分化体系为MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA^[16]。

该研究选取的4种露地菊,‘东林瑞雪’开花时间早,株形好,开花密集,花色从白到紫花色好,但是株高过高易倒伏,花期和其它3种相比较短,抗寒能力差;‘夺目玛瑙’色泽鲜艳,植株矮不易倒伏,开花时间在9月中旬但花期相对略短;‘黄金盏’花期长,有很强的抗寒性,在东北地区11月份还可开花,花色鲜艳,但是其株高过高,花朵直径小,花型散开花不密集;‘金不换’花期长,开花早,花径大并且花瓣层数多,但其花型易散不密集,株高过高易倒伏。要在保留其优点的同时改良其它性状,使其性状得到优化,进而应用于园林绿化中进行大面积的种植。利用基因工程来改良菊花性状的方法是在菊花育种中的常用方法。菊花高效再生体系的建立是利用基因工程的方法改变菊花形状的基础。该研究利用4个品种露地菊无菌植株叶片作为外植体,以6-BA、NAA作为植物生长调节剂,调整6-BA、NAA在基础培养基中的终浓度,进行叶片外植体最适分化培养基的筛选,从而建立起4种露地菊的再生体系,为后续利用基因工程方法改良性状的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以露地菊品系‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’为供试材料。4种露地菊均由东北林业大学生命科学学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 分化培养过程中,以MS培养基为基础培养基,添加蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂9 g·L⁻¹。在基础培养基中,添加植物生长调节剂6-BA、NAA,设置不同6-BA、NAA浓度梯度,根据分化情况筛选得到最适分化

第一作者简介:李金童(1993-),女,硕士研究生,研究方向为植物转基因。E-mail:1552066612@qq.com.

责任作者:解莉楠(1978-),女,博士,副教授,研究方向为植物抗性生物学。E-mail:linanxie@126.com.

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2013AA102706)。

收稿日期:2016-07-20

培养基;生根培养过程中,以 1/2MS 培养基作为基础培养基,添加蔗糖 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $9\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,不添加植物生长调节剂。

1.2.2 无菌苗的获得 挖取田间幼嫩露地菊‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’的脚芽,做好标记,用流水冲洗采集的新鲜外植体 30 min,然后用 75%酒精浸泡消毒冲洗过的外植体 10~15 s,之后再用灭菌水冲洗 1 次,用 2%(有效氯)的次氯酸钠溶液消毒 10 min,灭菌水冲洗 4 次,滤纸吸干多余水分,将消毒后的脚芽用镊子将外表皮剥离剥下芽尖,接种于 1/2MS 基本培养基中。

1.2.3 不定芽的诱导 分别取‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’4 种露地菊生长健壮、整齐的无菌幼苗长势良好的叶片,将叶片裁剪成 $0.8\text{ cm} \times 0.8\text{ cm}$ 的方形叶盘,叶盘背面接触培养基放置于含有不同 6-BA、NAA 浓度的 MS 培养基上,共设置 9 种处理(表 1),每个培养皿接种 5 个外植体,每个组合重复 3 盘,每个组合的小样品数到达 15 个,置于日光灯下进行诱导分化。在得到第 1 次分化试验结果后,重新设计生长调节剂的梯度(表 2),2 次重复。每 10 d 拍照记录、统计不同分化培养基中露地菊‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’叶片的分化率及其不定芽再生情况,确定叶片的最适分化培养基。

表 1 不同激素配比处理 4 种露地菊(第 1 次)

Table 1 Different hormones combination dealing with *Chrysanthemum* (First)

处理 Treatment	6-BA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	0.5	1.0
2	0.5	1.5
3	0.5	2.0
4	1.0	1.0
5	1.0	1.5
6	1.0	2.0
7	2.0	1.0
8	2.0	1.5
9	2.0	2.0

表 3 不同品系露地菊在不同处理下的分化情况(第 1 次)

Table 3 Different *Chrysanthemum* differentiation under different treatments (First)

培养基 Medium	‘东林瑞雪’‘Donglinruixue’		‘夺目玛瑙’‘Duomumanao’		‘黄金盏’‘Huangjinzhan’		‘金不换’‘Jinbuhuan’	
	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient
1	53.33	1.75	6.67	1.00	60.00	1.44	0.00	0.00
2	66.67	1.50	0.00	0.00	33.33	1.20	0.00	0.00
3	53.33	1.25	0.00	0.00	6.67	1.00	0.00	0.00
4	13.33	2.00	20.00	1.33	13.33	1.00	30.00	1.67
5	46.67	3.14	13.33	3.50	20.00	1.00	40.00	1.83
6	46.67	2.00	46.67	2.00	20.00	1.00	30.00	1.33
7	13.33	1.50	33.33	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	13.33	1.00	0.00	0.00	13.33	1.00	0.00	0.00
9	33.33	1.00	13.33	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 2 不同激素配比处理 4 种露地菊(第 2 次)

Table 2 Different hormones combination dealing with *Chrysanthemum* (Second)

品种 Variety	处理 Treatment	6-BA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
‘东林瑞雪’‘Donglinruixue’	10	0.5	1.0
	11	0.5	1.5
‘金不换’‘Jinbuhuan’	12	1.0	1.0
	13	1.0	1.5
	14	0.5	1.0
	15	0.5	1.5
‘夺目玛瑙’‘Duomumanao’	16	0.5	2.0
	17	1.0	1.0
	18	1.0	1.5
	19	1.0	2.0
‘黄金盏’‘Huangjinzhan’	20	0.75	1.5

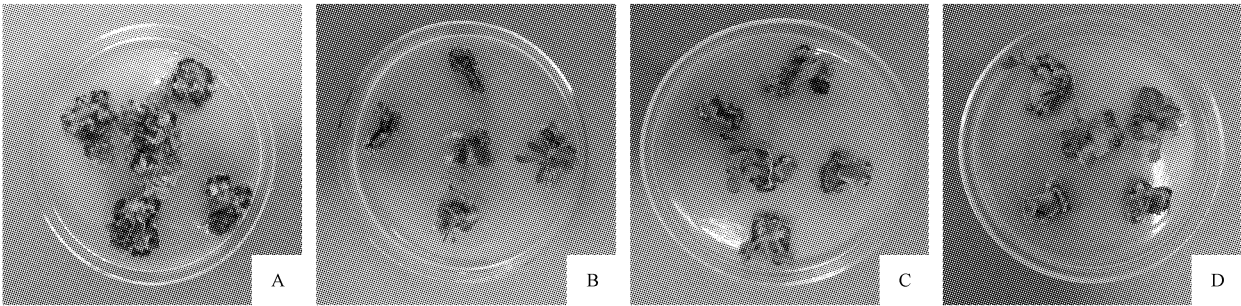
2 结果与分析

2.1 无菌苗的获得

利用脚芽进行灭菌处理后得到 4 种露地菊无菌苗,利用茎段进行扩繁,最后得到‘东林瑞雪’无菌苗 68 棵,‘夺目玛瑙’无菌苗 45 棵,‘黄金盏’无菌苗 36 棵,‘金不换’无菌苗 42 棵。

2.2 4 种露地菊的分化培养

将 4 种露地菊叶片外植体分别置于 9 种含有不同 NAA、6-BA 配比的 MS 培养基上,进行分化培养各处理结果见表 3。接种 7 d 后可见叶片边缘有少量愈伤组织的产生,并且叶片轻度卷曲;接种 14 d 后,叶片及周围愈伤组织颜色发生变化,由浅绿色变为深绿色,并且部分叶片四周已有肉眼可见的芽点产生;接种 20 d 后,露地菊‘金不换’在处理 5 中,即 $\text{MS} + 1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 培养基中分化出肉眼可见的不定芽;接种 30 d 后,露地菊‘黄金盏’在处理 1,即 $\text{MS} + 0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 培养基中分化出一棵不定芽;接种 45 d 后,除‘夺目玛瑙’外,其它 3 种露地菊都有不定芽分化产生;接种 50 d 后,‘夺目玛瑙’叶片外植体分化出不定芽,4 种露地菊在不同培养基中分化情况不同。



注:A为露地菊‘东林瑞雪’处理2;B为露地菊‘夺目玛瑙’处理6;C为露地菊‘黄金盏’处理1;D为露地菊‘金不换’处理5。

Note;A was treatment 2 for ‘Donglinruixue’;B was treatment 6 for ‘Duomumanao’;C was treatment 1 for ‘Huangjinzhan’;D was treatment 5 for ‘Jinbuhuan’.

图1 不同激素处理下的露地菊叶片分化情况(第1次)

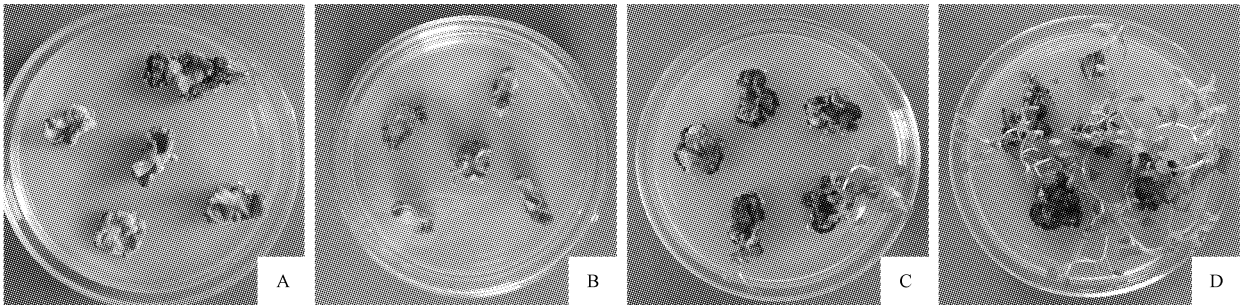
Fig.1 Leaf differentiation status of *Chrysanthemum* under different hormone combination (First)

由于露地菊叶片外植体分化情况有着不稳定性,根据第1次的试验结果,对激素浓度设置进行了一定的调整,进行了第2次试验,各处理结果见表4。第2次试验中,露地菊‘金不换’叶片外植体在接种30 d时,处理13首先产生不定芽,并且处理13中大部分叶片外植体都有不定芽产生;露地菊‘黄金盏’在接种40 d时也产生了不定芽,但是没有第1次试验时产生的芽状态好;露地菊‘东林瑞雪’和‘夺目玛瑙’依旧在接种60 d之后才有少量不定芽产生。

表4 不同品系露地菊在不同处理下的分化情况(第2次)

Table 4 Different *Chrysanthemum* differentiation under different treatments (Second)

培养基 Medium	‘东林瑞雪’‘Donglinruixue’		‘夺目玛瑙’‘Duomumanao’		‘黄金盏’‘Huangjinzhan’		‘金不换’‘Jinbuhuan’	
	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient	分化率 Differentiation rate /%	再生系数 Regeneration coefficient
10	13.33	1.50	—	—	—	—	0.00	0.00
11	33.33	1.40	—	—	—	—	13.33	2.00
12	13.33	1.50	—	—	—	—	66.67	2.00
13	6.67	1.00	—	—	—	—	100.00	3.27
14	—	—	13.33	1.50	—	—	—	—
15	—	—	20.00	1.00	—	—	—	—
16	—	—	33.33	1.60	—	—	—	—
17	—	—	0.00	0.00	—	—	—	—
18	—	—	0.00	0.00	—	—	—	—
19	—	—	13.33	2.00	—	—	—	—
20	—	—	—	—	43.33	1.85	—	—



注:A为露地菊‘东林瑞雪’处理11;B为露地菊‘夺目玛瑙’处理15;C为露地菊‘黄金盏’处理20;D为露地菊‘金不换’处理13。

Note;A was treatment 11 for ‘Donglinruixue’;B was treatment 15 for ‘Duomumanao’;C was treatment 20 for ‘Huangjinzhan’;D was treatment 13 for ‘Jinbuhuan’.

图2 不同激素处理下的露地菊叶片分化情况(第2次)

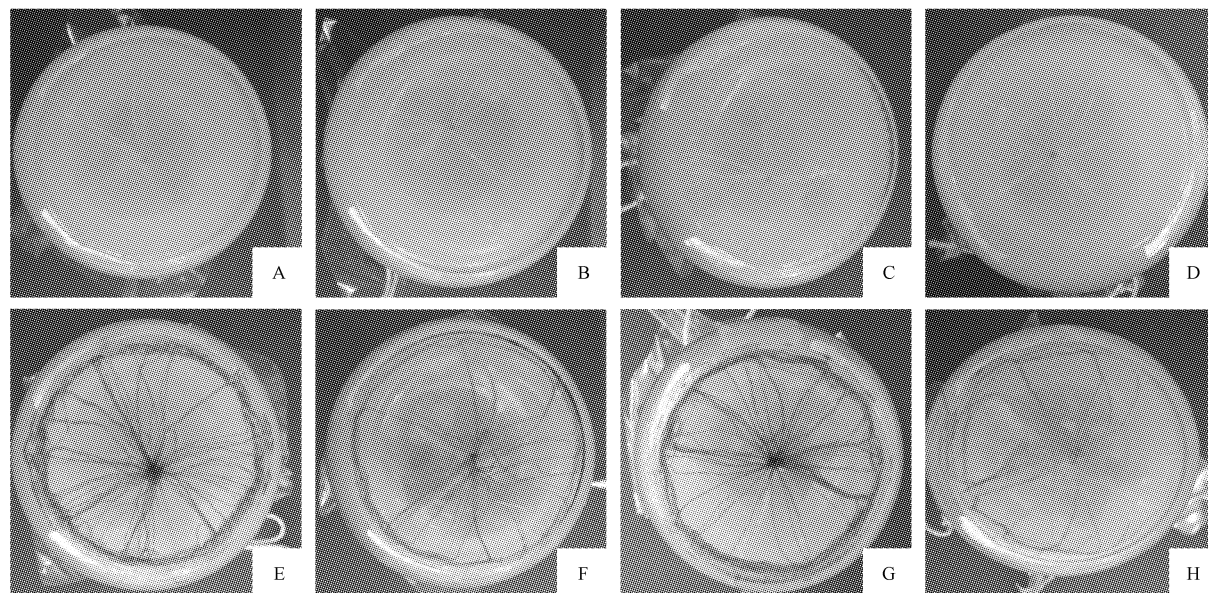
Fig.2 Leaf differentiation status of *Chrysanthemum* under different hormone combination (Second)

2次试验中叶片分化率、分化系数及不定芽生长状态的结果表明,‘东林瑞雪’叶片最适分化培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA;‘夺目玛瑙’叶片最适分化培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA;‘黄金盏’叶片最适分化培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA;‘金不换’叶片最适分化培养基

基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA。

2.3 无菌苗的生根及移栽

试验结果表明,分化得到的4种露地菊不定芽移栽到不含有激素的1/2/MS培养基上,3 d后开始有白色的根长出(图3),生长四周后移栽到花土中,移栽成活率可达100%(图4)。

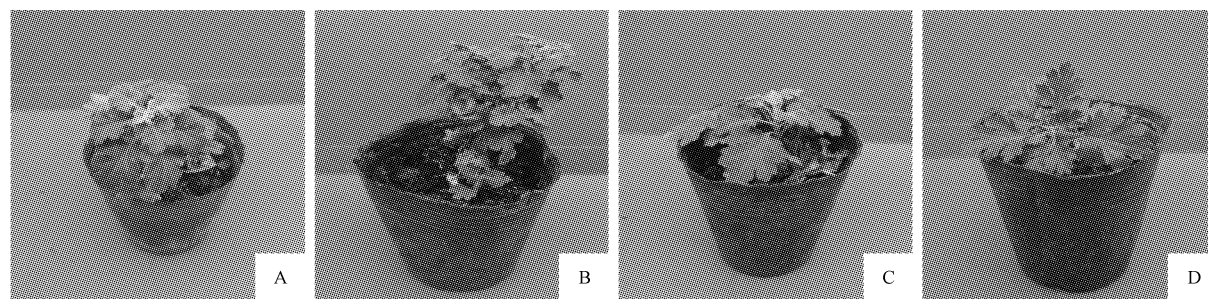


注:A为露地菊‘东林瑞雪’不定芽移栽7 d后;B为露地菊‘夺目玛瑙’不定芽移栽7 d后;C为露地菊‘黄金盏’不定芽移栽7 d后;D为露地菊‘金不换’不定芽移栽7 d后;E为露地菊‘东林瑞雪’不定芽移栽28 d后;F为露地菊‘夺目玛瑙’不定芽移栽28 d后;G为露地菊‘黄金盏’不定芽移栽28 d后;H为露地菊‘金不换’不定芽移栽28 d后。

Note:A was ‘Donglinruixue’ adventitious bud after transplanting 7 days;B was ‘Duomumanao’ adventitious bud after transplanting 7 days;C was ‘Huangjinzhan’ adventitious bud after transplanting 7 days;D was ‘Jinbuhuan’ adventitious bud after transplanting 7 days;E was ‘Donglinruixue’ adventitious bud after transplanting 28 days;F was ‘Duomumanao’ adventitious bud after transplanting 28 days;G was ‘Huangjinzhan’ adventitious bud after transplanting 28 days;H was ‘Jinbuhuan’ adventitious bud after transplanting 28 days.

图3 4种露地菊不定芽生根情况

Fig.3 Rooting status of four *Chrysanthemum* adventitious buds



注:A为露地菊‘东林瑞雪’;B为露地菊‘夺目玛瑙’;C为露地菊‘黄金盏’;D为露地菊‘金不换’。

Note:A was ‘Donglinruixue’;B was ‘Duomumanao’;C was ‘Huangjinzhan’;D was ‘Jinbuhuan’.

图4 4种露地菊不定芽移栽后生长状况

Fig.4 Adventitious buds growth status after transplanting of four *Chrysanthemum*

3 讨论

转基因成功的基础就是获得再生率较高的再分化

体系,利用露地菊叶片作为外植体进行分化培养建立再分化体系的方法比较容易,并且得到了相对较好的分化

结果。激素配比对于露地菊的分化有着很大的影响^[13]。该试验结果表明,同一品系的露地菊在不同的激素浓度处理下分化情况有着较大的差异。6-BA 和 NAA 是植物组织培养中常用的 2 种激素,6-BA、NAA 的浓度比及终浓度都会对露地菊分化情况产生一定的影响^[16]。对比分析‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’4 种露地菊品系分化情况发现,NAA 和 6-BA 的浓度及比例不同,对叶片分化的影响各不相同,难以总结出普遍规律,不过总的看来,高浓度的 6-BA 会抑制分化,而 NAA 浓度的高低对叶片分化的影响不是确定的。6-BA、NAA 的比值高时,叶片分化情况较好,并且分化出的不定芽生长状态良好,几乎没有玻璃化的现象产生。

根据试验结果可以看出,在同一处理下 4 种露地菊的分化情况也有所不同。‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’‘黄金盏’‘金不换’4 种露地菊品系叶片最适分化培养基各不相同,在相同的分化培养基上,叶片分化情况,不定芽生长状况有较大的差别,并且叶片分化能力也有较大差别。在接种 40 d 左右时,‘东林瑞雪’‘夺目玛瑙’才有第 1 棵不定芽产生,并且产生的不定芽数目不多,而且有畸形的现象。同样,‘金不换’的不定芽产生时间也比较晚,而‘黄金盏’叶片外植体在接种 25 d 时就分化出了第 1 棵不定芽,然后陆续有不定芽分化出来,且不定芽长势良好未出现玻璃化。综合 2 次重复结果,从出芽时间及不同处理中出芽情况来看,‘东林瑞雪’叶片外植体在不同激素浓度的 MS 培养基中均有不定芽分化出来,而‘夺目玛瑙’叶片外植体只有在其中 3 种处理下有不定芽产生,‘黄金盏’叶片外植体在 7 种处理下均有不定芽分化,‘金不换’叶片外植体只有在处理 4、5、6 中有不定芽分化。从分化率和再生系数的角度来说,‘金不换’在 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA 达到了 100% 的分化率和 3.27 的再生系数,而且分化出的不定芽没有出现任何的玻璃化现象,叶片外植体没有出现褐化现象。

目前建立植物再分化体系的方法主要是调整生长素和细胞分裂素的配比,筛选出最适激素组合,从而建立起植物的再分化体系。根据实际试验情况可以看出,同种植物不同品系间由于基因型的不同造成其分化情况存在很大差异。以拟南芥为例,拟南芥 KY 和 Col-0 2 种生态型的每块愈伤组织再生芽数目具有较大的差异,且 2 种生态型的愈伤组织形成无明显差异,造成这种差异的原因可能是 KY 生态型的愈伤组织中 *PIN1* 及 *LBD16* 基因表达水平明显低于 Col-0 生态型^[17]。对比 4 种露地菊分化时间和再生芽数量可以发现,露地菊‘金不换’芽再生能力、生根情况明显好于其它 3 种露地菊,在露地菊中可能会存在相关基因,来调节芽再生能力。目前,对于植物内有关于调节芽再生能力的基因调

控网络研究较少,在接下来的研究中可以筛选相关基因,为建立植物的再生体系提供更加便利的条件。

根据 4 种露地菊分化、生根情况可以认为,已经初步建立起 4 种露地菊高效、稳定的再生体系,并满足下一步遗传转化试验的研究。对比 4 种露地菊的分化、生根和移栽情况可以看出,‘金不换’与其它 3 种露地菊相比有一定的优势,可以作为一种良好的试验材料用于后续研究。

参考文献

- [1] HILL G P. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* ‘Bronze Pride’[J]. *Physiologia Plantarum*, 1968, 21(2): 386-389.
- [2] JU Y S, MATTSON N S, JEONG B R. Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2011, 107(2): 295-304.
- [3] 丁世民, 王泽宇, 宋健云, 等. 不同品种菊花组织培养比较研究[J]. 北方园艺, 2011(23): 101-103.
- [4] 龚明霞, 陈小凤, 方锋学, 等. 菊花离体快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2010(1): 172-173.
- [5] KAUL V, MILLER R M, HUTCHINSON J F, et al. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora*, Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium*, Ramat.)[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 21(1): 21-30.
- [6] 蒋旺旺, 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.
- [7] 晨卉, 王艳芳, 陈素梅, 等. 五种菊花近缘植物组织培养研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 30-35.
- [8] ANNADANA S, RADEMAKER W, RAMANNA M, et al. Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for *Chrysanthemum*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2000, 62(1): 47-55.
- [9] JONG J D, RADEMAKER W, WORDRAGEN M F V. Restoring adventitious shoot formation on *Chrysanthemum* leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, 32(3): 263-270.
- [10] 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.
- [11] 姜宁宁, 付建新, 戴思兰. 中国传统菊花品种‘小林静’再生及转化体系的建立[J]. 生物技术通报, 2012(4): 87-92.
- [12] 肖政, 范崇辉, 金万梅. 生长调节物质对菊花‘小金黄’叶片再生不定芽的影响[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(6): 50-53.
- [13] 冯君伟, 佟友丽, 赵飞, 等. 菊花新品系叶片外植体不定芽再生体系的研究[J]. 北方园艺, 2009(2): 56-59.
- [14] 薛建平, 张爱民, 常玮. 安徽药菊叶片直接再生植株技术的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 132-135.
- [15] 王一娟, 于鑫, 裴雁曦. 菊花品种黄金虎再生体系的建立[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2012, 35(1): 136-140.
- [16] 许志茹, 马静, 侯杰, 等. 4 种地被菊再生及遗传转化条件的比较[J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 130-137.
- [17] 王萌. 不同生态型拟南芥芽再生数目的 QTL 定位[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.

DOI:10.11937/bfyy.201619031

杜鹃兰原球茎增殖培养条件

吴彦秋, 吕 享, 李小兰, 高晓峰, 刘剑东, 张明生

(贵州大学 生命科学学院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘 要:以杜鹃兰种子萌发的原球茎为试材, 研究不同培养基、不同植物生长调节物质(6-BA、NAA 和 IBA)、活性炭、温度及光照强度对杜鹃兰原球茎增殖的影响。结果表明:1/2MS 培养基为适于原球茎增殖的基本培养基;添加一定浓度的 6-BA、NAA 和 IBA 均有利于原球茎的增殖, IBA 的浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 原球茎增殖率较高, 40 d 可达 170.07%;适量添加活性炭对原球茎增殖有促进作用;温度及光照强度的控制对原球茎增殖是必需的。杜鹃兰原球茎增殖的适宜培养条件为 1/2 MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭, 温度为 15°C , 光照强度为 2000 lx 。

关键词:杜鹃兰;原球茎;增殖培养

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)19-0124-05

杜鹃兰(*Cremastra appendiculata* (D. Don.) Maki-no)属兰科(Orchidaceae)杜鹃兰属(*Cremastra*)多年生珍稀药用植物,内用具有抗肝癌、乳腺癌、子宫癌等功效,外用可治疮毒、蛇虫咬伤、皮肤烫伤或烧伤等^[1]。由于

第一作者简介:吴彦秋(1992-),女,硕士,研究方向为植物生物技术与次生物质代谢。E-mail:737080538@qq.com。

责任作者:张明生(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事植物生理生化与生物技术等研究工作。E-mail:mszhang@guz.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360613);贵州省高层次人才创新创业人才培养计划资助项目(黔科合人才[2015]4031号);贵州大学研究生创新基金资助项目(研农 2016004)。

收稿日期:2016-07-21

人们长期过度采挖,导致野生资源严重枯竭^[2]。杜鹃兰种子在自然条件下几乎不能萌发,假鳞茎是其主要的繁殖器官,但因其繁殖系数低而无法实现规模化生产。利用组培快繁技术,有望解决杜鹃兰繁殖系数极低的问题,而原球茎增殖是该技术成功的关键环节。目前,虽有少数学者在杜鹃兰组织培养方面做了一些工作^[3-8],但仍未解决原球茎增殖周期长、增殖速率低等问题。现以人工授粉获得的杜鹃兰种子萌发的原球茎为试材,系统研究原球茎增殖的适宜培养基及培养条件,以期对杜鹃兰人工种植所需种苗的规模化繁育奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的杜鹃兰采自贵州省黔东南州境内,盆栽后

Establishment of Plant Regeneration System for Four *Chrysanthemum morifolium*

LI Jintong¹, WU Yan¹, DING Bing¹, QI Xuejun², ZHANG Yang¹, XIE Linan¹

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: This experiment was conducted to construct a high efficient and stable regeneration system by adding different concentration of 6-BA and NAA to the basic MS medium with the leaf explant of four kinds of *Chrysanthemum morifolium*, including 'Donglinruixue', 'Duomumanao', 'Huangjinzhan' and 'Jinbuhuan'. The results showed that the optimum concentration combination of NAA and 6-BA for 'Donlinruixue' was MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA; for 'Duomumanao' was MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; 'Huangjinzhan' was MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; 'Jinbuhuan' was MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; and the rooting medium of all the four kinds of *Chrysanthemum morifolium* was 1/2 MS medium.

Keywords: *Chrysanthemum morifolium*; regeneration system; 6-BA; NAA