

菊花离体叶片快繁体系的建立^①林青萍^② 陈雄庭(热带作物生物技术国家重点实验室 海口市 571101)
中国热带农业科学院热带生物技术研究所

摘要 以菊花叶片为外植体,诱导植株再生,建立高效植株再生体系。结果在MS+2 mg/L BA+0.2 mg/L NAA的培养基上诱导出愈伤组织,在MS+3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA的培养基上诱导出芽,并在1/2MS+0.6 mg/L NAA的培养基上诱导出根,从而获得再生完整植株,生根的小苗在温室生长良好。

关键词 菊花; 外植体; 再生体系

分类号 S682.11; Q813.1

Establishment of Efficient Plant Regeneration System from Leaves of Chrysanthemum

LIN Qingping CHEN Xiongting

(State Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops / Institute of Tropical Bioscience
and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101, Hainan)

Abstract A plant regeneration system from leaves of chrysanthemum was developed in this study. The optimum media were obtained for callus induction, shoot regeneration and rooting. Calli were induced from leaf explants cultured on the medium MS + BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L. Bud shoots were induced from the calli cultured on the medium MS + BA 3 mg/L + NAA 0.1 mg/L, and rooted on the half-strength MS medium at the presence of BA 0.6 mg/L. The rooted plantlets survived in greenhouse.

Keywords chrysanthemum; explants; plant regeneration system

菊花 [*Dendranthema morifolium* (Ramatuelle) Tzvelev = *Chrysanthemum morifolium* Ramatuelle] 是多年生宿根植物,是世界上栽培面积较大的花卉;其品种多达25 000种,我国也有7 000种以上,是人们非常喜欢的常见花卉。菊花再生体系的建立已有报道。K. Tanaka和Y. Kanno曾观测到菊花放射状小花外植体的体细胞胚状体发生,并从胚状体上分化出芽体^[1]。S. Roest和GS. Bokelmann在1975年报道了从菊花叶片和茎段上分化出不定芽^[2]。S. R. Bush用菊花的花瓣为外植体,建立再生体系,并通过体细胞变异获得新的变种^[3]。司怀军等以菊花幼嫩花瓣为外植体,MS为培养基,获得菊花的再生植株^[4]。

现代基因工程技术为培养更新奇的菊花品种提

供了可能。在基因工程育种过程中,不论是用基因枪,还是通过农杆菌介导的转基因,都需要细胞的脱分化、再分化等过程。本试验以菊花叶片为外植体,诱导愈伤组织和芽。并探索了不同基因型和植物生长调节剂对愈伤组织、芽和根诱导的影响,建立了高效的再生体系,为菊花的基因工程育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用的菊花材料由中国热带农业科学院海口分院苗圃提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选择和处理

① 收稿日期: 2006-02-13

责任编辑/孙继华

<http://rdnk.chinajournal.net.cn/> E-mail: rdnk@chinajournal.net.cn

② 林青萍(1978~),女,硕士研究生。E-mail: mimicar1234@163.com。单位地址:海口市龙华区学院路4号。

选用“日本黄”菊花品种为试验材料。取完全展开、绿色、无病害的叶片为外植体。自来水冲洗,用刷子轻轻刷材料表面;70%(体积分数)酒精消毒约30 s,2 g/L的升汞(HgCl₂)溶液并加数滴吐温浸泡8 min;无菌蒸馏水冲洗3~4次。叶片消毒后用无菌滤纸吸干水份,取近叶柄处部位,切成大小为0.5 cm×0.5 cm碎片,然后正面向上接种在培养基上。

1.2.2 培养基配制

以MS为基本培养基,蔗糖30 g/L,琼脂5.5 g/L,根据外植体不同培养阶段对植物生长调节剂的不同要求,设计了多种不同激素的组合和配比,pH值为5.8,121℃高压灭菌21 min。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

为研究不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响,设计了6种不同的培养基。每种培养基接种12瓶,每瓶接种5块。叶子在6号培养基上培养约5 d后,外植体切口部分渐膨大形成各种愈伤组织,见图1;14 d后,接种的叶片可观察到有绿色的愈伤组织产生,见图2。

不同浓度激素对愈伤诱导率的影响见表1。由表1可知:1~2号培养基中由于未加任何生长调节剂,愈伤的诱导率很低;3~6号培养基中由于添加了NAA、6-BA,愈伤组织长势良好;在6种培



图1 5 d后叶片诱导愈伤

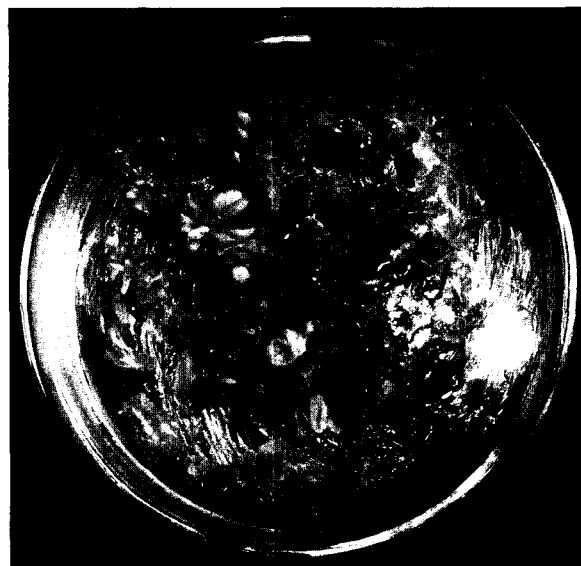


图2 14 d后叶片诱导愈伤

表1 不同浓度激素对愈伤诱导率的影响

培养基编号	培养基成分		外植体数量/块		愈伤诱导率/%	
	基本成分	激素/(mg·L ⁻¹)		接种数		愈伤数
		6-BA	NAA			
1	MS	1.0	0	60	18	30.0
2	MS	2.0	0	60	20	33.3
3	MS	1.0	0.1	60	45	75.0
4	MS	2.0	0.1	60	55	91.7
5	MS	1.0	0.2	60	54	90.0
6	MS	2.0	0.2	60	58	96.7

培养基中,有NAA存在的情况下,添加6-BA可明显提高愈伤组织诱导和鲜重;6号培养基愈伤的诱导率最高,达96.7%。

2.2 芽的诱导

配制了6种诱导芽再生的培养基,详见表2。叶片在诱导愈伤培养基上培养14 d后,在叶片的边缘伤口已形成愈伤组织块。选择愈伤组织生长良好的外植体,在超净工作台上用手术刀切成小块,

表2 不同浓度激素对芽诱导率的影响

培养基编号	培养基成分		接种数量/块		出芽率/%	
	基本成分	激素/(mg·L ⁻¹)		接种数		出芽数
		6-BA	NAA			
1	MS	2.0	0	40	17	42.5
2	MS	2.0	0.5	40	31	77.5
3	MS	2.0	1.0	40	33	82.5
4	MS	3.0	0	40	19	47.5
5	MS	3.0	0.5	40	35	87.5
6	MS	3.0	1.0	40	37	92.5

林青萍等 菊花离体叶片快繁体系的建立

每种培养基接种 10 瓶，每瓶接种 4 块，然后把愈伤组织块接种到诱导芽的培养基上，观察诱导芽的情况，培养条件与愈伤组织诱导条件相同。带有愈伤组织的外植体接种到芽诱导培养基上进行培养，接种的愈伤组织继续膨胀，19 d 后，愈伤组织的边缘处可看到芽点，而且芽点比较集中，在愈伤组织中部的芽点很少，见图 3。30 d 后，芽开始从边缘芽点上长出来，随后，中部芽点也开始分化出芽。40 d 后观察诱导芽的情况，见图 4。并统计长度在 5 mm 以上芽的数目，计算芽诱导率。



图 3 19 d 愈伤诱导芽



图 4 40 d 愈伤诱导芽

从表 2 可知：6 号培养基的出芽率达 92.5%，而且芽的数量、质量均较高；2、3、5 号培养基可形成丛芽，但是芽过密集且成簇生状堆积于培养基中，长势欠佳；1、4 号培养基诱导芽的效果很差，而且与培养基接触的愈伤部分变黑。综上，诱导芽的最佳培养基为 MS+3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA。

2.3 根的诱导

设计了 5 种以 1/2 MS 为基本成分的培养基，用于诱导菊花茎段生根，见表 3。在相同条件下培养 20 d 后，观察根的长度和数量。当芽长度超过 1 cm 时，从芽丛上把茎段切下来，接种到生根培养基上，在光下培养诱导生根。20 d 后统计长度超过 5 cm 根的数量，并选择适合生根的培养基。从表 3 的结果分析得出，NAA 诱导根的效果明显好于 IBA，且 3 号 (1/2 MS+0.6 mg/L NAA) 是诱导生根的最佳培养基，见图 5；在 2 号培养基上根出现最早，但后期生长比较缓慢；1 号培养基中没有生长调节剂，也有根的发生，但根较细，长度较短，侧根较少；在 4、5 号培养基中没有 IBA 存在，诱导的根很少。

表 3 诱导生根培养基

培养基编号	培养基成分		接种数/块	长度>5 mm 根数量/条	
	基本成分	激素/(mg·L ⁻¹)			
		NAA	IBA		
1	1/2MS	0	0	16	51
2	1/2MS	0.3	0	16	90
3	1/2MS	0.6	0	16	112
4	1/2MS	0	0.3	16	62
5	1/2MS	0	0.6	16	68

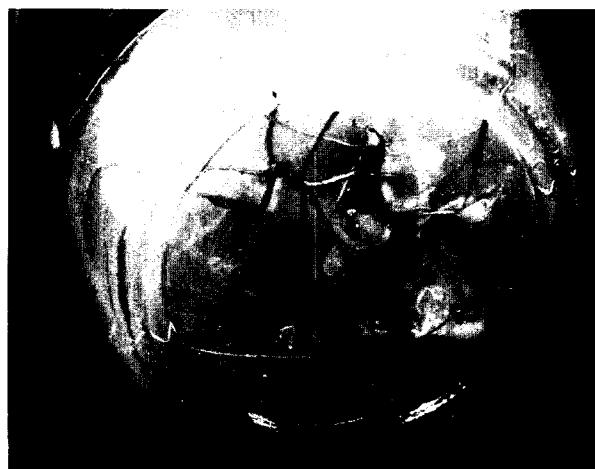


图 5 3 号培养的生根情况

2.4 植物移栽

芽苗生根后培养 15 d 左右，将瓶装苗从组培室转移到有阳光的地方练苗，练苗 1 周后，将小苗取出，小心用流水冲洗去根表面的培养基残留物，移栽到沙子中，遮荫，1 周后即可成活，成活率达 95% 以上。菊花移栽 50 d 后的生长情况见图 6。

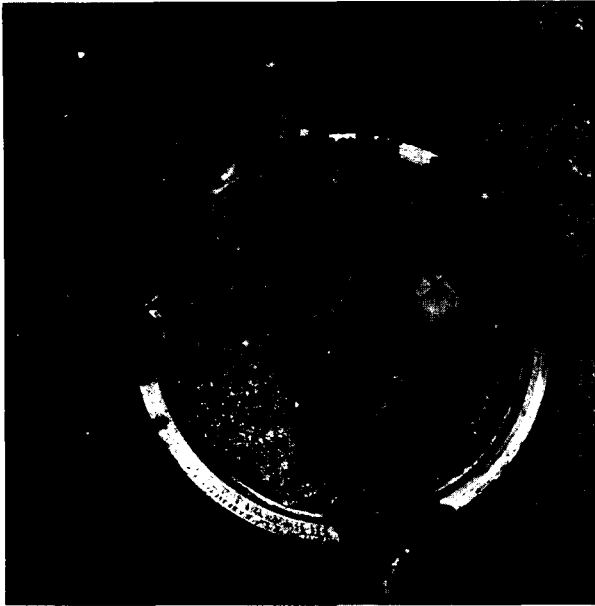


图6 菊花移栽50 d后

3 结论与讨论

3.1 外植体的选择

从理论上讲,植物的任何部位均能在合适的条件下成功地进行培养,但不同的植物部位,其分化和形态发生能力各不相同。菊花能作为外植体的部位很多,除了本试验用的叶片外,还有茎尖、茎段、侧芽、花序梗、根等。本试验以叶片为外植体,消毒时间不能过长,否则易产生褐变。对于一些优良的菊花品种,由于比较名贵,材料不多,取其叶片为外植体对植株伤害相对小。

3.2 激素水平和芽、根的分化

培养基中的生长素和细胞分裂素的比率正确与否是决定生芽和生根的关键。提高细胞分裂素的浓度,有利于芽的形成;提高生长素浓度,有利于根的形成;二者处于一定平衡质量浓度时则有利于愈伤组织的形成。本试验在培养初期,采用细胞分裂素较低的培养基,即MS+2 mg/L BA+0.2 mg/L NAA。此培养基的使用时间应视愈伤组织的产生情况而定,一般14~20 d为宜。在愈伤的诱导中,

可得出6-BA单独存在的情况下,诱导愈伤组织的发生率很低。然后把愈伤组织转移到细胞分裂水平较高的培养基(MS+3 mg/L BA+0.1 mg/L NAA)上,让其进行芽的分化。诱导不定芽的再生,当6-BA为3.0 mg/L时,适当增加NAA浓度(从0增加到1.0 mg/L),出芽率明显提高。

在根的诱导中, IAB、NAA对诱导芽生根有影响, NAA对根诱导的效果明显好于IBA,且最适浓度为0.6 mg/L。如用NAA,每株可生根8~10条,而无生长剂的培养基上也有根的发生,但生长比较细且短,侧根比较少。

3.3 初期管理与移栽成活率

由于室内组培苗一直在比较优越的环境下生长,幼苗抗病和抗干旱等能力较弱,因此移栽初期的管理相当重要。刚移栽的幼苗,由于根系供水缓慢,要避免强光照射和增加表面湿度。但这一时期维持时间不宜过长,长时间的高湿度有利于猝倒病菌的繁殖,幼嫩的菊花苗最易受到病菌侵害,所以,在移栽2 d后要适当增加光照和减少湿度。

参考文献

- 1 Tanaka K, Kanno Y, Kudo S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Cell Reports*, 2000, 19(10): 946~953
- 2 Roest S, Bokelmann GS. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 1975, 3(4): 317~330
- 3 Bush Susan R, Earle Elizabeth D, Langhans R W. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *American Journal of Botany*, 1976, 63(6): 729~737
- 4 司怀军, 戴朝曦, 于品华, 等. 菊花幼嫩花瓣愈伤组织的诱导和植株再生. *甘肃农业大学学报*, 1998, 33(2): 175~177, 174