

文章编号:1008-9403(2006)01-0042-04

# 菊花组织培养植株再生及其后代的变异

向太和

(杭州师范学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310036)

**摘 要:**通过对微波处理后的菊花花蕾、叶片和茎进行组织培养,获得如下结果:1. 菊花花蕾、叶片和茎3种外植体均能通过诱导形成愈伤组织,愈伤组织多以丛生苗的形式再生。其中,花蕾的愈伤组织诱导频率和苗的再生频率最高,花蕾可以作为菊花组织培养的良好起始材料;2. 比较不同的培养基激素成分显示,在MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L的培养基上菊花花蕾再生频率最高;3. 从诱变育种的角度考虑,微波处理20 s对菊花花蕾的离体培养是较理想的剂量;4. 在获得的再生植株中出现了明显可见的形态变异,形态变异主要有4种类型:1) 花序由头状花序转变为唇形花,花、茎、叶等形态特征与唇形科的植物(如:紫苏)非常相似;2) 节间比亲本长约0.5 cm左右,叶片变大,枝条分蘖能力降低;3) 在同一植株上开出的花朵出现了3种不同深浅的红色,即粉红、玫瑰红、深红色;4) 株形出现丛生状。本研究结果为进一步利用组织培养实现菊花育种和利用获得的突变体研究栽培菊花的起源和菊花花发育提供了极好的前提材料。

**关键词:**菊花;组织培养;再生;变异

**中图分类号:**S682.1

**文献标识码:**A

菊花(*Dendranthema morifolium* L.)原产中国,是菊科菊属的多年生草本植物。菊花的品种非常多,叶、花型、瓣型变化很大,不仅是色、香、姿、韵俱佳的中国传统名花,而且为世界四大切花之一,深受世界各国人民的喜爱。菊花主要靠扦插繁殖,也可进行嫁接繁殖;但扦插和嫁接繁殖均需较多的母株材料,且受季节和外界环境条件的限制,繁殖速度较慢,对于一些名贵菊花品种和母株来源不足的品种,不能及时满足生产和市场的需要。植物组织培养技术,既可以进行优良品种的快速繁殖,还可以进行品种的脱毒、复壮、种质保存等研究,在推动菊花的栽培与育种工作中起到了重要作用<sup>[1~4]</sup>。

该研究分别以菊花幼小的花蕾、叶和茎作为外植体,并结合微波处理,经过组织培养获得了大量的再生植株,同时再生植株的后代出现了多种形态变异。现将初步的研究结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从自然生长的菊花植株上剪取直径在0.5 cm左右的幼小花蕾,长、宽各0.5 cm左右的叶片和约1 cm长的茎作为外植体。

### 1.2 外植体的灭菌

外植体首先用肥皂水冲洗2次,再用70%酒精浸泡30 s,并用稀释5倍的市售安替福民灭菌20 min,

收稿日期:2005-10-06

基金项目:浙江省自然科学基金项目(编号:Y304083)。

作者简介:向太和(1965-),男,安徽青阳人,杭州师范学院生命科学学院教授,博士,主要从事植物细胞和基因工程及生物信息学的研究。

最后用无菌的蒸馏水冲洗 2 次,吸干水分后,剥除外萼的花蕾直接切成 4 块接种到培养基上,叶片和茎直接接种到培养基上。

### 1.3 花蕾外植体的微波处理

对菊花花蕾外植体进行不同时间的微波处理,即在接种培养前将花蕾放在盛有水的烧杯中,每 100 mL 烧杯中放入 50 mL 蒸馏水,每个烧杯中放入 5~6 个花蕾,用普通微波炉(海尔牌,750 W,选用最大功率档)处理 5 s、10 s、15 s、20 s 或 25 s。

### 1.4 外植体的培养和试管苗的移栽

诱导和分化培养基为 3 种:1) MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L;2) MS+6-BA 3mg/L+NAA 0.5 mg/L;3) MS+2,4-D 2 mg/L. 生根培养基为 1/2MS+NAA 0.1~0.5 mg/L. 培养温度为  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  左右,光照强度为 2000 Lux,光照时间为 12 h/d,每 30~40 d 继代 1 次. 分化出的试管苗长至 5 cm 左右,打开培养瓶盖练苗 3~5 d,再移栽到含泥炭: 砻糠灰: 珍珠岩(3:1:1)的钵钵中,移栽初期注意遮光。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基成分对菊花花蕾愈伤组织诱导和再生的影响

以菊花花蕾外植体作为研究对象,研究了 3 种不同外源植物激素的培养基对愈伤组织诱导和植株再生的影响(表 1). 在愈伤组织诱导中,2,4-D 2 mg/L 的效果最好,诱导率可达 100%;其次是 6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L,为 70%;而 6-BA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L 只有 40%. 而对于分化苗,6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L 效果最好,愈伤组织再生频率为 100%。

表 1 不同激素成分培养基对菊花花蕾培养的影响

培养基成分	接种外植体数 (个)	形成愈伤组织数 (块)	再生的丛生苗或 单生苗数(个)
MS+2,4-D 2 mg/L	50	50	5
MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L	25	10	3
MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L	50	35	35

### 2.2 微波处理对菊花花蕾培养的影响

利用微波对菊花花蕾进行培养前的处理,在不同的微波处理时间中,以 10 s 的存活率和出苗率最高,分别是 73.3%和 90.9%;而 25 s 的处理,外植体全部死亡. 一般而言,辐照剂量的大小直接影响愈伤组织的存活率,剂量越大,抑制作用越明显<sup>[5]</sup>. 至于该实验中 5 s 的处理其存活率和出苗率反而比 10 s 和 15 s 处理的低,主要是因为实验过程中有部分外植体和愈伤组织受污染导致死亡所致. 此外,由表 2 可知,外植体半致死剂量(LD50)为 20 s,并且 20 s 的处理出苗频率仍可达到 60%. 因此,从诱变育种的角度考虑,微波处理 20 s 是较理想的剂量(表 2).

表 2 不同时间的微波处理对菊花花蕾培养的影响

微波处理 (s)	接种外植体数 (个)	存活数 (个)	存活率 (%)	出苗数 (株或丛)	愈伤组织再生频率 (%)
0	50	35	70	35	100
5	50	25	50	15	60
10	75	55	73.3	50	90.9
15	75	50	66.7	40	80
20	50	25	50	15	60
25	50	0	0	0	0

### 2.3 不同外植体的愈伤组织诱导、植株再生和移栽

在 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上研究菊花花蕾、叶片和茎 3 种不同外植体的培养. 其中,花蕾在培养 10 d 左右,在花蕾基部(花萼和舌状及管状花的末端)可见绿色的小突起,并逐渐形成绿

色块状致密的愈伤组织,最终由基部绿色块状致密的愈伤组织通过丛生芽的方式再生植株,在生根培养基上大部分能长出不定根。叶片和茎外植体再生的方式与花蕾相似,主要以愈伤组织和丛生芽的方式再生植株,个别愈伤组织以单个植株的形式再生。但叶片和茎外植体出现肉眼可见愈伤组织的时间较迟(10~15 d左右),并且愈伤组织诱导率和出苗率均比花蕾低。再生的植株经炼苗后,移栽成活率可达80%以上。

表3 菊花不同外植体的培养结果

外植体器官	接种外植体数(个)	愈伤组织数(块)	诱导率(%)	出苗数(株或丛)	再生频率(%)
花蕾	50	35	70	35	100
叶片	25	10	40	5	50
茎	50	15	30	2	13.3

#### 2.4 菊花花蕾再生植株的形态变异

对于菊花花蕾经微波处理再生的植株,在移栽成活的植株中出现了明显的形态变异。观察到的变异主要有4种类型:1)花序由头状花序转变为唇形花,包括花、茎、叶等在内的形态特征都与唇形科的植物(如:紫苏)非常相似;2)节间比亲本长约0.5 cm左右,叶片变大,枝条分蘖能力大大降低;3)在同一植株上开出的花朵出现了3种不同深浅的红色,即粉红、玫瑰红、深红色;4)株形为丛生状。

### 3 讨论

研究表明,菊花幼小花蕾、叶片和茎3种外植体均能在诱导培养基上诱导形成愈伤组织,且诱导出的愈伤组织绝大多数以丛生苗的形式再生。其中,花蕾的愈伤组织诱导频率和苗的再生频率最高,因此,花蕾可作为菊花组织培养的良好起始材料。比较不同的培养基激素成分显示,在MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L的培养基上花蕾再生频率最高。此外,花蕾外植体经不同剂量(5 s、10 s、15 s、20 s或25 s)微波处理实验表明,从诱变育种的角度考虑,微波处理20 s是较理想的剂量。

特别值得一提的是,微波处理的花蕾再生植株中观察到了4种明显的形态变异,尤其是获得花为唇形花的变异体,这为研究栽培菊花的起源和菊花花序发育提供了极好的前提材料,相关的深入研究正在进行中。此外,在同一株菊花上出现了开3种不同程度红色花朵的镶嵌式菊花。有文献报道<sup>[6]</sup>,花色的深浅受花色素控制,花色素生物合成酶决定花色素的形成,从而影响花色;但是,外界环境条件,如光照、温湿度等,也能引起花色的改变。至于该研究中同一株菊花上出现了3种不同程度红色的花朵,究竟是微波处理和组织培养导致调控花色素的基因结构发生改变的结果,还是由于外界环境条件所引起,我们尚不能定论,还有待深入研究。

致谢:杭州师范学院生命科学学院本科生陈敏、吕菁和吴弯弯同学参加部分工作。

#### 参考文献:

- [1]周瑞玲,吴雨龙. 菊花的组织培养及移栽技术初探[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(2): 23-24.
- [2]卢钰,刘军,丰震,等. 菊花育种研究现状及今后的研究方向[J]. 山东农业大学学报:自然科学版, 2004, 35(1): 145-149.
- [3]刘小莉,刘飞虎. 花卉育种技术研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2002, 32(2): 63-38.
- [4]宋希强,刘华敏,李绍鹏,等. 观赏植物新品种选育的方法与途径[J]. 世界林业研究, 2004, 17(6): 6-10.
- [5]洪亚辉,朱兆海,黄璜,等. 菊花组织培养与辐射诱变的研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2003, 29(6): 457-461.
- [6]安田齐. 花色的生理生物化学[M]. 傅玉兰,译. 北京:中国林业出版社, 1989: 68-100.

## Plant regeneration and its descendant's variation from tissue culture of *Chrysanthemum (Dendranthema morifolium L.)*

XIANG Tai-he

(College of Life Science, Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310036, China)

**Abstract:** The tissue culture of chrysanthemum was studied. The results were as follows: 1. Calli could be induced from young flower bud, leaf and stem of chrysanthemum. Clusters of shoots and plantlets could be regenerated from calli. Regeneration frequency of young flower bud was the highest among all. Young flower bud was suitable for tissue culture of chrysanthemum. 2. By comparing different medium, it showed that regeneration frequency of young bud flower of chrysanthemum was the highest on MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L medium. 3. Treatment Twenty-second microwave of explant of young bud flower could be suitable to mutation breeding of chrysanthemum. 4. Four types of morphological variations of the regeneration plantlets from young flower buds treated with microwave were observed. 1) Flower architecture is change from capitulum to labiate flower. The characters of variation including flower, leaf and stem were extremely similar to that of plant of mint family. 2) The internode of variation plant was approximately 0.5cm longer than that of the parent. The leaf blade was bigger while the tiller ability was lower. 3) The flowers on the variation plant appeared 3 kinds of varying degree red, namely flesh color, the rose pink color, the scarlet red. 4) The shape of variation plant was growing thickly.

**Key words:** *Chrysanthemum (Dendranthema morifolium L.)*; tissue culture; plant regeneration; variation

(上接第 13 页)

- [6] Dekking F. M. On the structure of selfgenerating sequences[J], *Seminaire de Theorie des Nombres de Bordeaux*, 1980-81, expose'n, 3101-3106.
- [7] Weakly W. D. On the number of  $C^\infty$ -words of each Length[J]. *Jour. of Comb. Theory, Ser. A*, 1989, 51:55-62.
- [8] 沈传龙, 黄允宝. 关于  $C^\infty$ -字的幂[J]. *高校应用数学学报*, 1994, 9A(4):449-451.
- [9] Sheng Chuang-long, Huang yun-bao. Some Properties of  $C^\infty$ -words with applications[J]. *Southeast Asian Bull. of Math.*, 1996, 20(4):19-30.
- [10] 黄允宝. 关于  $C^\infty$ -字的幂是  $C^\infty$ -字的条件(I)[J]. *高校应用数学学报*, 1997, 12A(4):245-249.
- [11] Páun G. How much Thue is Kolakovski? [J]. *Bull. of the EATCS*, 1993, 49:183-185.
- [12] Carpi A. Repititions in the Kolakovski Sequence[J]. *Bull. of the EATCS*, 1993, 50:194-196.
- [13] Carpi A. On Repeated factors in  $C^\infty$ -words[J]. *Information Processing Letters*, 1994, 52(6):289-294.
- [14] Lepistö A. Repititions in the Kolakovski sequence[J]. *Development in Language Theory* 1993, 2710:130-143.

## On the computing of $C^\infty$ -square words

HUANG Yun-bao

(Department of Mathematics, Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310036, China)

**Abstract:** In this note, we give out all the  $C^\infty$ -square words, i. e. suppose that  $H = \{u^2 \mid u^2 \in C^\infty\}$ , then  $|H| = 46$ , and there are two  $C^\infty$ -square words with length 2 and 4 respectively, six  $C^\infty$ -square words with length 6, twelve  $C^\infty$ -square words with length 18, twenty four  $C^\infty$ -square words with length 54.

**Key words:**  $C^\infty$ -words;  $C^\infty$ -square words; derivative