

天人菊无性系建立的研究

邱玲玉

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要:以天人菊幼嫩叶柄为材料,进行了组织培养及无性系建立的研究,比较了不同诱导条件对天人菊愈伤组织诱导、分化以及不定芽生根的影响。结果表明:MS+BA 0.4 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹是诱导叶柄形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基;1/2MS+BA 0.8 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹是愈伤组织分化的理想培养基;1/2MS+IAA 0.2 mg·L⁻¹是天人菊分化不定芽壮苗和生根的理想培养基。

关键词:天人菊;组织培养;愈伤组织;无性系

中图分类号:S681.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)12-0001-04

天人菊(*Gaillardia pulchella*)又叫虎皮菊、老虎皮菊等,属菊科天人菊属一年生草本植物^[1],天人菊原产北美,喜阳光,耐半阴,是干旱地区良好的防风固沙植物^[2]。由于其花朵美丽、花期较长,为人们非常喜爱的花卉。在大量观赏栽培天人菊中,偶尔会出现生长旺盛、花期延长 10 d 左右的植株。采用常规种子繁殖方法进行繁殖,由于分离作用这种性状将无法保持。因此,为了满足人们对这种优良植株种苗的观赏和栽培需要,对其进行了组织培养及无性系建立的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为生长非常旺盛的盆栽天人菊。

1.2 培养条件

以 MS、1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素 BA 和生长素 IAA、IBA、NAA 和 2,4-D。以 MS 为基本培养基,加蔗糖 30 g·L⁻¹,以 1/2MS 为基本培养基,加蔗糖 15 g·L⁻¹;培养基胨力强度为 180 g·cm⁻²^[3],pH 5.8~6.0,培养温度 25℃,光照时间 12 h·d⁻¹,光照强度 2 500 lx。

1.3 培养方法

1.3.1 愈伤组织诱导和继代培养 将天人菊无菌叶柄切成 0.2~0.3 cm 的柄段后,接种到以 MS 为基本培养基,附加不同浓度 BA、NAA、IAA 和 2,4-D 的培养基上,进行天人菊愈伤组织诱导培养。每种培养基接种 60 个材料,培养 20 d 左右。3 次重复。

1.3.2 愈伤组织分化和继代培养 将继代培养得到的愈伤组织接种到以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的 BA、NAA 的分化培养基中进行天人菊愈伤组织的分化培养。每种处理接种 80 个愈伤组织颗粒。3 次重复。

1.3.3 生根培养 将所确定的诱导天人菊叶柄愈伤组织和不定芽分化的理想培养基上分化培养的丛生不定芽从基部剪下,使之成为独立的无根不定苗,接种到以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度 IAA、IBA 和 NAA 的生根培养基中进行生根培养。每种处理接种培养 40 个材料。3 次重复。

1.3.4 试管苗移栽与移植 将所确定的生根试管苗的理想培养基上培养着生根试管苗的培养瓶塞打开,放到光照强度 4 000~5 000 lx 的条件下炼苗 4 d 后,用镊子将试管苗取出后,立即在 20℃ 以上的清水中洗掉根部的培养基,然后移栽到下层为肥沃的园土、上层为约 7 cm 厚炉灰渣的温室苗床上,接着用喷壶浇透水。移栽后的前 14 d,要保持没有直射光照、湿度 90%~95%、温度 20~28℃ 的条件。从第 15 天开始,按照温室条件进行正常管理。移栽试验重复 3 次,每次移栽 400 株,移栽后 30 d 观察统计。

1.4 材料灭菌

10 月上旬,将具有生长旺盛、花期延长 10 d 左右的天人菊嫩叶采回实验室后,将叶片切去,把叶柄放入磨口广口瓶中,用自来水冲洗 4 次后,用 0.05% 安利洗涤液洗涤 30 min,洗至无泡沫时置于超净工作台上,用 75% 乙醇灭菌 10 s 后迅速用无菌水洗涤 3 次,接着用 0.1% HgCl₂ 溶液振荡灭菌 1 min,再用 0.05% HgCl₂ 溶液振荡灭菌

收稿日期:2010-09-28

作者简介:邱玲玉(1986-),女,辽宁省营口市人,硕士,从事植物技术方面的研究。E-mail:qiu_ling_yu@126.com。

12 min,最后用无菌水振荡洗涤 6 次,即获得无菌叶柄。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和继代培养

观察发现,有的培养基上培养的材料切口处形成淡黄色的愈伤组织。随后,愈伤组织迅速生长,并逐渐生长成绿色的颗粒状愈伤组织。60 d 时观察统计(见表 1),结果表明在不加激素和只加 BA(浓度为 0.1、0.4 mg·L⁻¹)的培养基上均不能诱导形成愈伤组织;而在不同浓度 BA 仅与 NAA 或 2,4-D 配合使用时,诱导的愈伤组织少、

表 1 不同浓度激素对天人菊愈伤组织诱导的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹			诱导愈伤组织数/块	诱导率/%	愈伤组织长势
BA	NAA	2,4-D			
0	0	0	0	0	—
0.1	0	0	0	0	—
0.1	0.2	0	13	21.7	+
0.1	0.4	0	19	31.7	++
0.1	0.8	0	27	45.0	+++
0.1	0	1.0	20	33.3	+
0.1	0	1.5	16	26.7	+
0.1	0	2.0	11	18.3	+
0.1	0.2	1.0	13	21.7	+
0.1	0.2	1.5	15	25.0	+
0.1	0.2	2.0	15	25.0	+
0.1	0.4	1.0	10	16.7	+
0.1	0.4	1.5	8	13.3	+
0.1	0.4	2.0	9	15.0	+
0.1	0.8	1.0	14	23.3	+
0.1	0.8	1.5	15	25.0	+
0.1	0.8	2.0	13	21.7	+
0.4	0	0	0	0	—
0.4	0.2	0	24	40.0	+++
0.4	0.4	0	25	41.6	+++
0.4	0.8	0	27	45.0	+++
0.4	0	1.0	21	35.0	+
0.4	0	1.5	19	31.7	+
0.4	0	2.0	17	28.3	+
0.4	0.2	1.0	58	96.7	+++
0.4	0.2	1.5	52	86.7	++
0.4	0.2	2.0	40	66.7	++
0.4	0.4	1.0	36	60.0	++
0.4	0.4	1.5	35	58.3	++
0.4	0.4	2.0	37	61.7	++
0.4	0.8	1.0	23	38.3	+
0.4	0.8	1.5	23	38.3	+
0.4	0.8	2.0	36	60.0	+

注:+++为好;++为较好;+为一般;—为不生长。下同。

长势较弱、多数为浅褐色;而在 BA、NAA 或 2,4-D 种激素配合使用的培养基上,均能诱导形成愈伤组织。尤其是在 BA 浓度 0.4 mg·L⁻¹、NAA 浓度 0.2 mg·L⁻¹ 和 2,4-D 浓度 1.0 mg·L⁻¹ 的培养基上,不仅愈伤组织的诱导率达到了 96.7%,而且诱导形成的愈伤组织颜色嫩绿、生长速度快、表面呈较均匀的颗粒状(见图 1)。这样的愈伤组织具有分化能力。而在 BA 浓度为 0.4 mg·L⁻¹、NAA 浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 与 2,4-D 浓度为 1.5 mg·L⁻¹ 的培养基上也有较高的愈伤诱导率,但诱导形成的愈伤组织有褐化现象。这样的愈伤组织不具有分化能力或分化能力较弱。把在 MS+BA 0.4 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + 2,4-D 1.0 mg·L⁻¹ 培养基上诱导的天人菊叶柄愈伤组织分散为颗粒状后,接种到相同的培养基上进行愈伤组织的继代培养,每次重复试验继代培养 3 次,愈伤组织形态特征保持不变,每次继代培养周期缩短为 60 d,平均每个培养颗粒的增殖系数 21.4。这说明 MS+BA 0.4 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + 2,4-D 1.0 mg·L⁻¹ 培养基为天人菊叶柄愈伤组织培养的理想培养基。

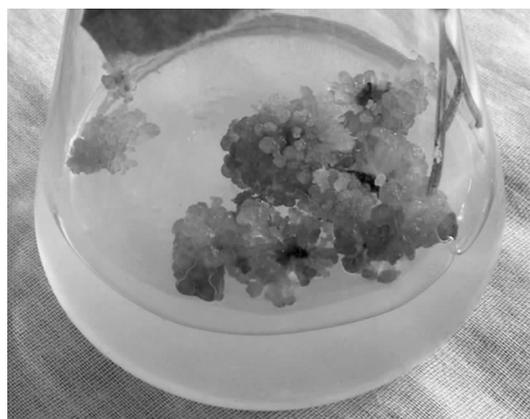


图 1 诱导的愈伤组织

2.2 愈伤组织分化和继代培养

接种 5 d 后可见颗粒状愈伤组织缓慢生长,培养 15 d 左右时,在有的愈伤组织颗粒上部出现绿色的芽点,培养 50 d 可分化出大量的绿色的丛生不定芽(见表 2)。由表 2 可见,在不加激素、单独使用 BA 或 NAA 的培养基上培养的愈伤组织不分化。而在 BA 与 NAA 配合使用的培养基中,培养的愈伤组织颗粒均可分化,分化率在 30% 以上,其中在 1/2MS+BA 0.8 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 培养基上不仅分化率达到 96.25%,并且分化的丛生不定芽叶片鲜绿、伸展、

长势好,呈丛生状。把在其上分化培养的丛生不定芽从基部剪下后,接种到相同的培养基上进行不定芽的继代培养,每次重复试验连续进行4代不定芽继代培养的结果表明:继代培养分化的不定芽不仅叶片鲜绿、伸展、长势旺盛,而且在与培养基接触部位上还能生长出3~9个白色的气生根,平均每个继代培养的培养周期缩短为45 d,每个培养周期的增殖系数为6.1。说明:1/2MS+BA 0.8 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹培养基是诱导天人菊叶柄愈伤组织和不定芽分化的理想培养基。

表2 不同浓度的激素对天人菊叶柄愈伤组织分化的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹		分化数/块	分化率/%	长势
BA	NAA			
0	0	0	0	—
0	0.1	0	0	—
0	0.3	0	0	—
0	0.6	0	0	—
0.2	0	0	0	—
0.2	0.1	30	37.5	+
0.2	0.3	32	40.0	+
0.2	0.6	27	33.75	+
0.4	0	0	0	—
0.4	0.1	53	66.3	++
0.4	0.3	30	37.5	++
0.4	0.6	52	65.0	+
0.8	0	0	0	—
0.8	0.1	77	96.25	++
0.8	0.3	63	78.75	++
0.8	0.6	51	63.75	+

2.3 生根培养

试验结果表明,培养10 d左右时,有的培养基上能形成可见根原基。培养25 d时观察统计(见表3),天人菊不定苗在不添加任何浓度激素的培养基上和附加不同浓度IBA培养基上不能生根。在附加浓度在0.2~0.8 mg·L⁻¹的NAA、IAA培养基均能够诱导生根,然而在2种激素浓度达到0.8 mg·L⁻¹时,诱导生根率都相对较低,长势一般。而在IAA浓度为0.2 mg·L⁻¹的培养基上,不定苗不仅生根率高达100%,而且生根试管苗长势较好。观察发现,在IAA浓度为0.2 mg·L⁻¹的生根培养基上,每个不定苗不仅平均生根最多,其根系为白色粗壮、长度10 cm左右(见图2),而且试管苗长势旺盛(见图3)。培养25 d时,试管苗可长成株高为5 cm以上的旺盛试管苗。将生长旺盛的试管苗从基部剪下,切成长0.3 cm左右、具有2~3个生长点的茎段,接种到相同的生根培养基上进行生根继代培养,经过25 d的培养,又可培养生长为一株长势旺盛的试

管苗。每次重复试验连续进行5代生根继代培养的结果表明,所培养的生根试管苗不仅长势旺盛,平均每代的繁殖系数为2.9,而且用这种生根继代培养所繁殖的试管苗几乎没有无效苗。说明:1/2MS+IAA 0.2 mg·L⁻¹培养基是天人菊生根试管苗的理想培养基。

表3 不同浓度激素对天人菊不定苗生根的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹			生根数/个	生根率/%	长势
IAA	NAA	IBA			
0	0	0	0	0	—
0.2	0	0	40	100	++
0.4	0	0	27	67.5	++
0.6	0	0	23	57.5	+
0.8	0	0	10	25.0	+
0	0	0.2	0	0	—
0	0	0.4	0	0	—
0	0	0.6	0	0	—
0	0	0.8	0	0	—
0	0.2	0	23	57.5	++
0	0.4	0	19	47.5	+
0	0.6	0	8	20.0	+
0	0.8	0	6	15.0	+



图2 生根试管苗根系长势



图3 生根试管苗的长势

2.4 试管苗移栽与移植

统计表明:移栽的成活率为96.5%。移栽的试管苗10 d左右可见成活,14 d开始发出新叶生长。移栽后前50 d生长缓慢、植株较小;50 d后

开始旺盛生长。

把 3 月份在温室中移栽成活并开始旺盛生长试管苗,于 5 月下旬移植到花坛上,并按照常规栽培方式进行管理。移植试验结果表明,移植成活率几近 100%。移植的试管苗生长旺盛,长势整齐。8 月份开始正常开花。

3 结论与讨论

到目前为止,虽然已有许多菊科植物组织培养和无性系的报道^[4-12],并有天人菊组织培养研究的报道^[2],但迄今未见对具有优良性状天人菊叶柄组织培养的报道。该研究利用天人菊的叶柄为外植体进行了愈伤组织诱导与分化、不定芽分化与生根、试管苗移栽和移植的研究。叶柄愈伤组织能以较高分化率分化出不定芽说明:天人菊的叶柄在离体条件下仍具有较强的生长分化力,这不仅证明栽培天人菊非分生组织细胞也具有全能性,而且还说明,通过组织培养的方法,能使大批栽培中偶尔发生的有利变异植株得到保存,为优良变异品系保存和利用提供了可能。

在对芽进行分化培养时可以看到,在 $1/2$ MS+BA $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上的愈伤组织分化率是最高的,达到了 96.3%。在不定芽继代分化培养中,每个培养周期(45 d)的增殖系数为 6.1。按照这个速度,1 a 能繁殖 6.1^8 个后代;用生根继代方法进行繁殖,每个培养周期(25 d)的增殖系数为 2.9,按照这个速度,1 a 能繁殖出 $2.9^{14.6}$ 个后代;这说明不论采用什么方法进行快速繁殖,一年内可增殖出大量的具有有利变异性状天人菊试管苗。不仅为优良植株的工

厂化育苗奠定了基础,而且也为其推广利用提供了可能。

在生根培养时,使用 IAA 效果较好,这是因为 IAA 为天然的植物生长素,在光照条件下易分解。把待生根的不定苗接种到以 IAA 为生长素的生根培养基中,7 d 左右诱导形成根原基,此时培养基中的 IAA 因光照大部分分解,使其含量降低到不至于抑制根的伸长生长的浓度。

参考文献:

- [1] 齐向英,郑丹,张超. 菊花组织培养研究[J]. 江苏农业科学, 2009(5):63-64.
- [2] 倪苏. 天人菊的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2003,39(4)61-62.
- [3] 姜长阳. 培养基琼脂用量计算的高榷[J]. 植物生理学通讯, 1990,26(2):53-54.
- [4] 顾梅仙. 花卉组织培养的前途[J]. 大众花卉,1987(4):32.
- [5] 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.
- [6] 杨鸿祚,陈少琼,梁木桂. 菊花组织培养的研究[J]. 热带作物研究,1989(2):43-45.
- [7] 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):34-35.
- [8] 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):61-62.
- [9] 柳建军,于洪欣. 菊花外植体分化诱导及植株再生的初步研究[J]. 山东农业科学,1994(5):37-38.
- [10] 刘丽君,谷迎春,邵雪. 切花菊组织培养及移栽[J]. 农业科技通讯,1998(11):17.
- [11] 叶小曲,沈效东,陈萍. 植物激素对菊花试管苗快速繁殖的影响[J]. 宁夏农林科技,1999(3):32-33.
- [12] 向萍,刘超权,陶友保. 菊花组织培养和快速繁殖[J]. 黄冈师范学院学报,1999,19(4):31-34.

Study of Establishment of Asexual Line for *Gaillardia pulchella*

QIU Ling-yu

(Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

Abstract: Young petioles were used as the explants to study the tissue culture and clone establishment of *Gaillardia pulchella*. The influence of callus induction, differentiation and rooting of adventitious bud in different inducing conditions were compared. The results showed that MS+BA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the ideal medium to induce the callus of petiole. The ideal medium of callus differentiation was $1/2$ MS+BA $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. $1/2$ MS+IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the perfect medium for adventitious bud differentiation and rooting cultivation of *Gaillardia pulchella*.

Key words: *Gaillardia pulchella*; tissue culture; callus; clone