

翠菊品种库蕾娜叶片和叶柄及茎段的再生研究

程密密, 杨霞, 杨玉灿, 王晓斌, 卞京军, 李名扬

(西南大学园艺园林学院/花卉研究所, 重庆 400715)

摘要:为加速翠菊新品种的培育和扩繁, 研究利用种子消毒接种获得的无菌苗作为外植体, 以 MS、1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA 依次进行愈伤组织诱导、愈伤组织分化、不定芽生根。结果表明: 茎段为再生体系的最佳外植体, 愈伤诱导培养基为 MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA, 诱导愈伤组织分化不定芽的最佳培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 不定芽最佳生根培养基为 1/2MS。叶片、叶柄最佳愈伤诱导培养基 MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA, 愈伤分化培养基只分化不定根。

关键词:翠菊; 离体再生; 叶片; 茎段; 叶柄; 组织培养

中图分类号:S681.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)10-0020-03

翠菊[*Callistephus chinensis* (L.) Nees]为菊科翠菊属草本植物, 亦称一年生紫菀。花色丰富鲜艳, 花型多样, 花期长达 25 d 以上, 常温下种子寿命 1 a^[1], 是国内外园艺界非常重视的观赏植物。国际上将矮生种用于盆栽、花坛观赏, 高秆品种用作切花观赏; 国内主要用于盆栽和庭院观赏。翠菊花入药, 中药治目赤肿痛、昏花不明。翠菊花、叶多糖均对羟自由基有清除作用^[2]。

翠菊原产于我国北部, 1728 年传入法国, 1731 年被英国引种。目前荷兰、以色列和日本等培育了不少翠菊新品种, 而国内对翠菊的研究相对较少。目前翠菊的繁殖方式主要是播种繁殖, 但该繁殖方式存在种子寿命短, 以及新品种和变异品种不易保存等不足; 由于翠菊花期较长, 适用于花坛、花境, 商业用途需求量大, 迫切需要简单快速的方法来实现翠菊产量提高。结合目前国内对翠菊新品种的培育力度不够的现状, 试验分别以叶片、叶柄、茎段为外植体进行不同器官的最优再生体系的研究, 填补了这一快繁领域空白, 同时为新品种的扩繁和新品种的培育奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

日本进口品种库蕾娜(Kurenai)翠菊种子其生产商为 TAKII, 产地日本, 2013 年 9 月购于内蒙古赤峰鑫卉园艺有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件

以 MS、1/2MS 为基

本培养基, 分别在外植体的愈伤组织诱导、分化、生根阶段添加不同种类和不同浓度的植物激素, 蔗糖浓度 30%, 琼脂浓度为 0.7%, pH5.8, 121℃ 下高温灭菌 20 min, 培养温度 (25±2)℃, 光照 12~14 h, 光照强度 1 500~2 000 lx。

1.2.2 消毒接种及外植体接种 将翠菊种子用 50℃ 温水浸泡 24 h, 无菌水冲洗 2 次, 75% 酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗 2 次, 2% NaClO 浸泡 25~28 min, 无菌水冲洗 5 次, 将种子接种到 1/2MS 培养基, 15 d 后继代 1 次, 待幼苗长到 4~5 cm 时, 分别取无菌苗叶片、叶柄和茎段为外植体, 叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的方块, 叶柄切成 0.3~0.5 cm, 茎段切成 0.3~0.5 cm, 分别接种到不同浓度配比的愈伤组织诱导培养基上(见表 1)。

1.2.3 继代培养 叶片培养 5~6 d 发生卷曲, 15 d 后, 叶片、茎段、叶柄切口处有膨大的淡绿色、绿色、白色的愈伤组织形成, 30 d 转入诱导愈伤组织分化培养基, 待 20 d 后继代培养一次, 再过 30 d 后分化出丛生芽或不定根。

1.2.4 生根及移栽 将 2.5 cm 左右的生长良好的不定芽接种到生根培养基, 植株生长健壮, 15 d 左右长出细长的根, 生根率 100%。常温下遮光炼苗 2~4 d, 取出生根苗, 洗净根部的培养基, 移栽到草炭:珍珠岩=1:1 的基质中, 遮光生长, 成活率达 90%。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对不同器官愈伤组织诱导的影响

试验所用诱导愈伤组织形成的培养基共 12 种。外植体接种到不同培养基后, 30 d 统计诱导的愈伤组织, 基本培养基为 MS, 接种数均为 30, 由表 1 可以看出, 不同器官在相同培养基上愈伤组织诱导率不同, 相同器官在不同培养基上愈伤

收稿日期:2014-06-10

第一作者简介:程密密(1988-), 女, 山东省济宁市人, 硕士, 助理研究员, 从事快繁体系及多倍体育种研究。E-mail: rhine999@163.com。

通讯作者:李名扬(1956-), 男, 四川省安岳县人, 博士研究生导师, 教授, 从事园林植物生物技术与遗传育种研究。

组织诱导率差距明显。其中,茎段诱导不定芽分化;叶片、叶柄只分化出不定根。叶片、叶柄随 6-BA 浓度升高,愈伤长势越好,呈翠绿,最佳诱导愈伤组织的培养基均为 MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA;而诱导茎段愈伤组织形成的最佳培养基为 MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA,此时愈伤长势最佳。

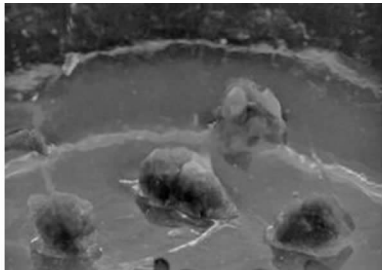


图 1 愈伤组织生长情况
Fig.1 Growth of callus

2.2 不同培养基对不同器官愈伤组织分化的影响

该试验诱导愈伤组织分化不定芽所使用的为 1~9 培养基。45 d 后统计组培瓶中的丛生芽增殖情况,由表 1 可知,只有茎段愈伤分化出了不定芽,最佳愈伤分化培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA,分生数达 5.2,不定芽长势健壮、叶片翠绿;而叶片、叶柄只分化出了不定根,无不定芽出现,不定根分生数在 6-BA 浓度一定时随 NAA 浓度的增大而增多,在 NAA 浓度一定时不定根分生数随 6-BA 浓度的增大而增大,叶片、叶柄在 MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 时,不定根分生数最大达 6.3 和 4.6。且在相同培养基诱导下,叶片不定根分生数都明显多于叶柄,叶柄在 1、2、3 培养基中几乎不分化不定根。

表 1 不同激素对比对诱导愈伤及芽分化的影响

Table 1 Effect of different hormones on callus induction and bud differentiation

序号 No.	激素浓度/mg·L ⁻¹ Hormone		叶片 Leaf		茎段 Stem segment		叶柄 Petiole	
	6-BA	NAA	愈伤	愈伤	愈伤	愈伤	愈伤	愈伤
			诱导情况 Inducing	分化情况 Differentiation	诱导情况 Inducing	分化情况 Differentiation	诱导情况 Inducing	分化情况 Differentiation
1	0.5	0.05	差	c—	差	C	差	c—
2	0.5	0.10	良—	b	良	B	良	c
3	0.5	0.20	良+	b+	优—	B—	优—	c
4	1.0	0.05	良—	c	良	A	良—	c+
5	1.0	0.10	良	b	良+	A+	优—	b—
6	1.0	0.20	良—	b+	优	B	优	b
7	2.0	0.05	差	b—	良—	C	良	b
8	2.0	0.10	优	a	良+	C+	差	b—
9	2.0	0.20	良+	a+	优+	C	良+	a
10	4.0	0.05	差		差		良优	
11	4.0	0.10	良		良—		优+	
12	4.0	0.20	优+		良			

注:ABC 指丛生芽的分化情况;abc 指不定根的分生情况;A、a 是分生数为 3.0 以上;B、b 是分生数为 1.0~3.0;C、c 是分生数为 1.0 以下。

Note:ABC mean differentiation of multiple shoot clumps;abc mean meristematic of adventitious root;Meristematic number of A and a was more that 3.0;Meristematic number of B and b was 1.0~3.0;Meristematic number of C and c was less than 1.0.

2.3 不同浓度 NAA 对不定芽生根的影响

由表 2 可知,4 种培养基做生根试验,取生长健壮,长约 2.5 cm 的不定芽分别接种到不同生根培养基上,12 d 后长出第 1 条根,15~20 d 大量丛生芽生根,观察根及植株生长情况,翠菊不定芽的最佳生根培养基为 1/2MS,此培养基中根多且细长、植株长势好、叶片翠绿光泽。NAA 诱导根部产生愈伤组织,但影响根的正常生长。

表 2 不同激素对不定芽生根的影响

Table 2 Effect of different hormone on rooting

培养基 Medium	组成/mg·L ⁻¹ Composition	根生长状况 Root growth
1	1/2MS	根细长较多,无愈伤
2	1/2MS+0.1NAA	细长根少,生根处少量水浸状愈伤
3	1/2MS+0.2NAA	根粗短,生根处部分愈伤
4	1/2MS+0.5NAA	根粗短、绒毛状,较多愈伤形成



图2 愈伤组织分化出不定芽

Fig. 2 Differentiation of adventitious buds from callus

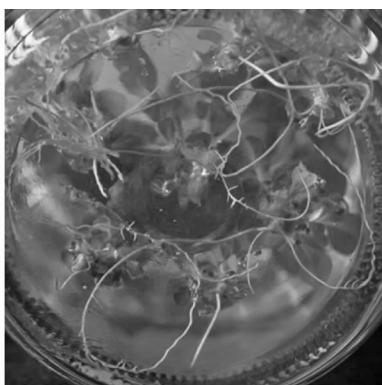


图3 不定芽生根情况

Fig. 3 Rooting of adventitious buds

3 结论与讨论

对于翠菊的研究国外主要注重新品种培育,国内的研究主要有周索对翠菊下胚轴愈伤诱导的研究^[4],何森等对 CuSO_4 处理翠菊根系的研究^[4],王永红等对氮素影响翠菊幼苗质量的研究^[5],再生体系方面滕年军等简要介绍了茎段快繁^[6],黄志明等人对翠菊快繁的研究^[7]没有具体到外植体器官的选择,王彦钧等对翠菊离体培养的研究^[8]是以快繁为基础的而不是单纯的离体再生。该研究总结了前人研究经验,分析了目前该

领域的不足和空白,对翠菊多个器官分别进行再生试验,具体到外植体器官以及单纯的离体再生,找出了其高频再生体系。

翠菊离体快繁的过程中,翠菊种子易获得且价格便宜,所以选择种子为材料来培养无菌苗,种子消毒方法为 75% 酒精 10 s + 2% NaClO 25 ~ 28 min,接种到 1/2MS 培养基上,污染率几乎为 0。翠菊不同器官诱导愈伤组织及愈伤分化不定芽的培养基差别明显。在组培阶段遇到试管苗开花现象。该试验确定了翠菊的最佳外植体为茎段,并获得茎段的高频再生体系(在取外植体时注意不要取到腋芽),愈伤诱导培养基为 $\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$,诱导愈伤组织分化不定芽的最佳培养基为 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$,不定芽最佳生根培养基为 1/2MS。叶片、叶柄的最佳愈伤诱导培养基均为 $\text{MS} + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$,但诱导愈伤分化的培养基只能分化出不定根,6-BA、NAA 的浓度范围分别在 $0.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 $0.05 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内不适合叶片、叶柄愈伤分化不定芽。试验结果可为以后叶片、叶柄及其它器官做快繁研究提供有力依据。

参考文献:

- [1] 高铁华,张永灵. 翠菊采种技术[J]. 内蒙古农业科学, 2003(5):46.
- [2] 朱月,田海晨,毕晓丹. 翠菊花叶多糖对羟自由基的清除作用[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(30):302-303.
- [3] 周索. 不同激素组合和附加物对翠菊下胚轴愈伤组织诱导的影响[J]. 河南农业科学, 2012, 41(5):113-116.
- [4] 何森,蒋鑫,颜建勋,等. 不同浓度 CuSO_4 处理对翠菊根系生长的影响[J]. 中国林副特产, 2010(1):11-13.
- [5] 王永红,侯建伟. 不同浓度氮素对翠菊幼苗质量的影响[J]. 北方园艺, 2010(1):120-121.
- [6] 滕年军,陈发棣. 翠菊的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3):227.
- [7] 黄志明,王永. 翠菊快繁及试管苗开花技术[J]. 浙江农业科学, 2011(5):1048-1050.
- [8] 王彦钧,曹婷婷. 翠菊离体培养及再生体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18):8351-8352.

Regeneration Research of Leaves, Petioles and Stem Segments of *Callistephus chinensis* Variety Kurenai

CHENG Mi-mi, YANG Xia, YANG Yu-can, WANG Xiao-bin, BIAN Jing-jun, LI Ming-yang
(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Institute of Flower, Chongqing 400715)

Abstract: In order to accelerate the cultivation and propagation of *Callistephus chinensis*, taking aseptic seedlings obtained by seed disinfection as explants, MS and 1/2MS as the basic medium, different concentrations of 6-BA, NAA were used to induce the formation and differentiation of callus, following the adventitious buds grew roots. The results showed that the stem segment was the optimal explant for regeneration system, the optimal callus induction medium was $\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$, the optimal medium was $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ to induce the proliferation of adventitious buds from callus, the best rooting medium of adventitious buds was 1/2MS. The best callus induction medium for leaves and petioles was $\text{MS} + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$, callus differentiation medium was only for forth adventitious roots.

Key words: *Callistephus chinensis*; plant regeneration *in vitro*; leaf; stem segment; petiole; tissue culture