

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.08.009

菱叶菊组培繁殖研究^①

李卓姣¹, 李 丽²

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 重庆市南山植物园, 重庆 400065

摘要: 以菱叶菊(*Chrysanthemum rhombifolium*)幼嫩茎尖为材料, 采用不同方法进行表面消毒后, 以茎段和叶片为外植体, 通过不定芽的诱导、继代和生根建立离体繁殖体系。结果表明, 幼嫩茎尖的表面消毒以洗涤剂浸泡 10 min, 自来水冲洗 20 min, 75%乙醇消毒 10 s, 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min 的效果最好, 成活率为 75.15%。最适不定芽诱导培养基为 MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L), 茎段的不定芽诱导率为 82.2%, 叶片的不定芽诱导率为 66.6%; 最适不定芽继代培养基为 MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L), 增殖系数为 4.63; 最适不定芽生根培养基为 1/2 MS+IBA(0.5 mg/L), 生根率达 98%。120 株试管苗移栽到蚯蚓土和腐殖土(V(蚯蚓土):V(腐殖土)=1:1)营养钵中, 30 d 成活 109 株, 移栽成活率达 90.83%。

关键词: 菱叶菊; 组织培养; 快繁技术

中图分类号: S682.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)08-0046-05

菱叶菊(*Chrysanthemum rhombifolium* (Y. Ling et C. Shih) H. Ohashi et Yonekura)为菊科(Asteraceae)菊属(*Chrysanthemum* L.)多年生草本^[1], 重庆特产, 分布于巫山县及奉节县, 野生个体数量稀少。菱叶菊不仅具有较高的观赏价值, 也是研究菊属植物系统演化的重要材料^[2-3]。目前, 人们对菱叶菊的研究还非常缺乏, 虽然菊花植物组织培养已成为常规的实验技术^[4-11], 但采用组织培养技术对菱叶菊进行离体繁殖的研究尚未见报道。本试验以野生菱叶菊的茎段和叶片为外植体, 拟通过不定芽诱导、继代和生根建立离体繁殖体系, 为其大量无性繁殖和野外回归奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为菱叶菊(*C. rhombifolium*)野生植株, 采自重庆市巫山县神女峰山脚, 栽植于西南大学果树学重庆市重点实验室实验地。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基与培养条件

除特别说明外, 基本培养基为 MS, 所含蔗糖质量浓度为 30 g/L, 琼脂质量浓度为 7 g/L, pH 值为 5.8。1/2 MS 培养基里的大量元素减半, 其他不变。培养温度为(25±2)℃, 光照强度为 1 500~2 000 Lx(12 h/d)。

1.2.2 材料的清洗与表面消毒

取枝条先端(长约 10 cm)带叶茎段, 清水洗净, 洗衣粉溶液(3 g/L)清洗 5~6 min, 然后流水冲洗 20 min 左右, 沥干备用。

在无菌条件下(超净工作台上), 将洗净沥干的带叶茎段装入灭菌广口杯中, 先用 75%乙醇消毒 10 s, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 5~6 min, 无菌水冲洗 5~6 次。沥干, 无菌吸水纸吸去表面水分。转入无菌培养皿中, 分离、切割茎段和叶片外植体, 用于不定芽诱导。

① 收稿日期: 2017-04-09

作者简介: 李卓姣(1995-), 女, 四川德阳人, 大学本科生, 主要从事园林植物资源与应用研究。

1.2.3 不定芽诱导

无菌条件下, 将茎段(长约 1 cm)、叶片(1×1 cm²)外植体分别接入含 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基中(表 1), 诱导不定芽分化. 每个培养基接种外植体 35 个(重复 2 次), 置于光照培养箱中培养, 每天观察记录. 培养 30 d 后统计不定芽诱导率和繁殖系数.

不定芽诱导率(%) = 产生不定芽的外植体数/接种外植体数 × 100%

繁殖系数(个) = 外植体再生不定芽总数/再生不定芽的外植体数

1.2.4 不定芽继代

以诱导不定芽效果最好的 2 个培养基为不定芽继代培养基(表 3). 将不定芽诱导培养中获得的丛生芽分离、切割成单芽, 接种到继代培养基上, 每个培养基接种 35 个不定芽(重复 2 次). 培养 30 d 后统计高于 1.5 cm 的不定芽数, 计算其增殖系数.

繁殖系数(倍) = 形成不定芽总数/接种不定芽数.

1.2.5 不定芽生根与试管苗移栽

由于生根培养一般只需要生长素, 将生长健壮的菱叶菊苗转移到生根培养基上, 诱导生根. 生根培养基质量浓度一般在 0.2~0.5 mg/L 之间, 同时大量元素也要减半, 所以试验用 1/2MS, 1/2MS+IBA(0.5 mg/L) 和 1/2MS+NAA(0.5 mg/L) 3 种培养基作为生根培养基, 各生根培养基接种 30 个再生植株, 重复 2 次.

炼苗: 将盛有再生试管苗(高 ≥ 5 cm)的培养瓶移出培养箱, 于室内放置 3~4 d, 旋开瓶盖炼苗 2 d 后再往瓶苗里加自来水炼苗 1~2 d.

移栽: 用温水浸泡培养基几分钟, 待其软化后小心将试管苗拔出, 并用水洗净根部的固体培养基(防止发霉和烂根), 然后将其移栽到盛不同基质(表 5)的营养钵中. 移栽后立即用水浇透基质, 之后注意保温保湿, 30 d 后统计移栽成活率(%).

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导

2.1.1 茎段不定芽的诱导

茎段外植体在 16 个待选的不定芽诱导培养基中, 不定芽诱导率整体上随 6-BA 和 NAA 质量浓度的增加而提高(表 1). 其中, A14 培养基的不定芽诱导率最高(82.2%), 且不定芽实际生长状态较好, A16 培养基次之. 所以, 对菱叶菊茎段外植体而言, 最佳不定芽诱导培养基为 MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L), 其次为 MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(3 mg/L).

表 1 植物生长调节剂对菱叶菊茎段外植体不定芽分化的影响

培养基编号	植物生长调节剂	不定芽诱导率/%	繁殖系数/个
A1	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	12.66	4.50
A2	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	12.87	3.21
A3	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	15.73	5.17
A4	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	13.33	4.50
A5	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	24.11	4.00
A6	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	36.89	4.61
A7	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	26.13	2.67
A8	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	28.57	4.16
A9	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	36.67	5.00
A10	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	39.53	4.76
A11	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	45.43	2.33
A12	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	42.32	2.51
A13	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	52.67	3.53
A14	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	82.23	3.66
A15	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	50.34	3.55
A16	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	63.12	4.63

注: 基本培养基为 MS.

茎段外植体接种后, 7 d 左右, 开始产生愈伤组织(图 1(a)), 愈伤组织产生于茎段的切口; 在 40 d 左右, 从愈伤组织表面分化出不定芽(图 1(b)).

2.1.2 叶片不定芽的诱导

在 16 个培养基中, 叶片外植体的不定芽诱导率和繁殖系数都存在明显差异(表 2). 不定芽诱导率整体上也随 6-BA 和 NAA 浓度的增加而提高. 其中, A14 培养基的不定芽诱导率(66.6%)最高, 繁殖系数(8.3)最大, 且不定芽生长状态良好. 因此, 用叶片诱导不定芽的最佳培养基也为 A14 培养基, 即 MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L).

叶片接种后, 45 d 左右, 部分外植体从叶片切口及表面逐渐产生绿色不定芽.

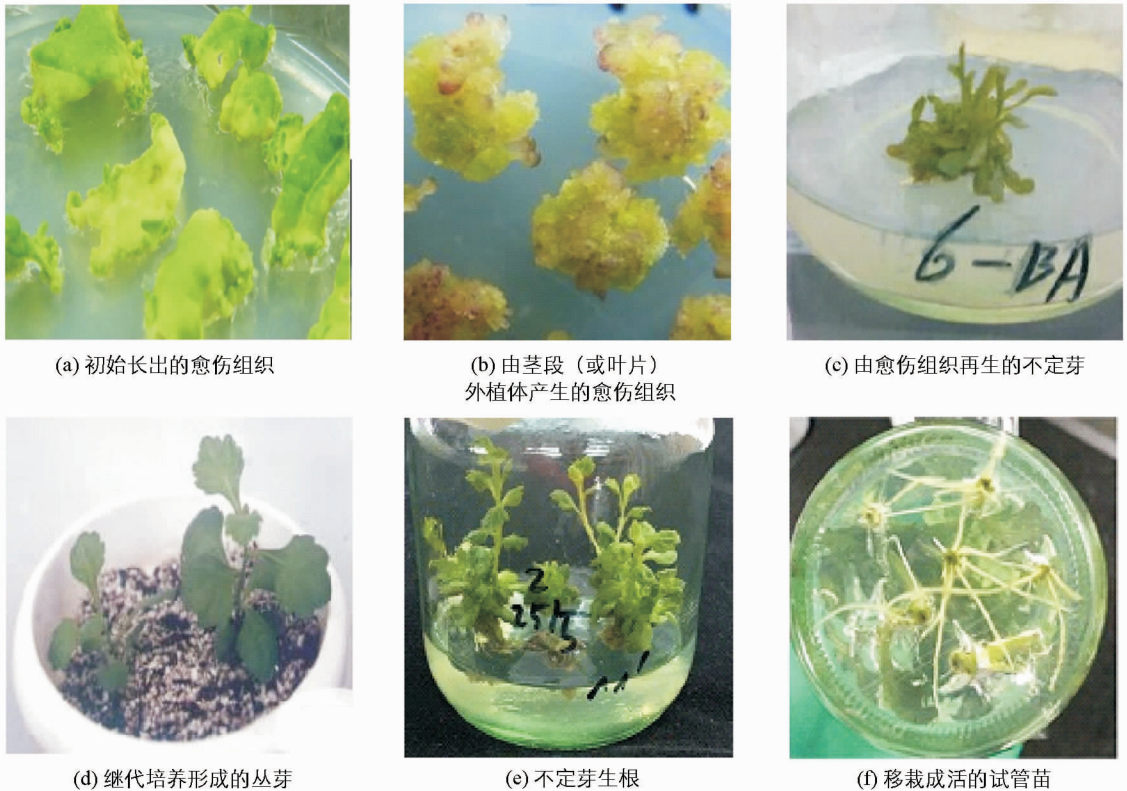


图 1 菱叶菊的离体繁殖

表 2 植物生长调节剂对菱叶菊叶片外植体不定芽分化的影响

培养基编号	植物生长调节剂	不定芽诱导率/%	繁殖系数/个
A1	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	6.32	2.50
A2	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	5.91	2.67
A3	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	4.63	2.50
A4	6-BA(0.5 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	13.12	1.91
A5	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	13.33	3.00
A6	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	10.00	2.13
A7	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	22.00	3.00
A8	6-BA(1.0 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	22.50	3.36
A9	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	18.71	1.92
A10	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	34.23	4.50
A11	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	31.00	4.67
A12	6-BA(2.0 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	41.20	5.17
A13	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	46.74	6.00
A14	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)	66.66	8.33
A15	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(2.0 mg/L)	53.76	7.13
A16	6-BA(3.0 mg/L)+NAA(3.0 mg/L)	54.71	7.33

注: 基本培养基为 MS.

2.2 不定芽的继代增殖

用菱叶菊茎段和叶片出芽效果最好的 2 个培养基 A16 和 A14 对不定芽继代培养 30 d, 结果见表 3.

表 3 不同继代培养基对不定芽生长的影响

培养基编号	培养基配方	增殖系数	有效苗数
A14	MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L)	4.63	6.51
A16	MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(3 mg/L)	2.76	3.88

由表 3 可知, 不定芽经 30 d 继代培养, 在 A14 培养基中的增殖系数达 4.63, 明显高于 A16 培养基 (2.76), 且有效苗较多, 实际褐化率较低. 因此, 菱叶菊不定芽继代培养的适宜培养基为 A14 培养基, 即 MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L).

试验中发现, 不定芽连续继代 3 次仍能大量增殖, 而且不定芽(无根苗)生长健壮(图 1(c)). 但 3 代以后的不定芽变得细长瘦弱, 叶片小而发白, 常有卷曲, 不适合生根.

2.3 不定芽的生根

不定芽在不同生根培养基中培养 30 d, 生根率都在 90 以上(表 4). R1 培养基为 1/2 MS 基本培养基, 其中生根数较少, 当添加 0.5 mg/L 的 IBA 或 NAA 后(R2、R3 培养基)生根数增加. 其中, 添加 0.5 mg/L 的 IBA 时(R2)诱导出的不定根壮而长, 根系较发达; 而添加 0.5 mg/L 的 NAA 时(R3)诱导的不定根壮而短, 根系欠较发达. 结果表明, 生长素类调节剂 IBA 和 NAA 可以促进菱叶菊的不定芽生根, 其适宜培养基为 R2 培养基, 即 1/2 MS+IBA(0.5 mg/L).

表 4 不同培养基对生根影响

培养基编号	培养基配方	生根率/%	平均生根数/条	生根状态
R1	1/2 MS	96.67	3.2	少、细、长
R2	1/2 MS+IBA(0.5 mg/L)	97.50	5.4	多、壮、长
R3	1/2 MS+NAA(0.5 mg/L)	94.16	10.3	多、壮、短

2.4 试管苗的移栽

炼苗结束后, 试管苗在不同移栽基质中 30 d 的成活率存在明显差异(表 5). T1 基质中试管苗的移栽成活率(90.83%)明显高于 T2 基质(46.67%). 因此, 在本试验中, 菱叶菊试管苗的适宜移栽基质为 T1, 即等体积的蚯蚓土和珍珠岩的混合物.

表 5 在不同移栽基质中试管苗的成活率

移栽基质编号	基质组分体积比	移栽数/株	成活数/株	成活率/%
T1	V(蚯蚓土):V(腐殖质)=1:1	120	109	90.83
T2	V(细土):V(腐殖质)=1:1	120	56	46.67

3 讨 论

3.1 外植体的消毒与取材

菊花多种组织均可进行组织培养, 如茎尖、茎段、叶片和花瓣等. 外植体消毒灭菌是取得试验成功的关键, 正确选择外植体的消毒浓度和消毒时间, 既可减少消毒液对外植体的伤害又能获得好的无菌苗, 减少工作量.

在本试验中, 带叶茎尖作为表面消毒材料, 本身比较脆弱, 消毒时间不宜过长. 所以在用 75%乙醇消毒时只设了 2 个时间, 而 0.1% HgCl₂ 设立了多个时间. 在消毒过程中发现, 用 0.1% HgCl₂ 消毒超过 5 min 时, 外植体的污染率虽有下降, 但外植体的死亡率却较高.

3.2 外源植物生长调节剂对不定芽分化和生根的影响

组织培养中, 外植体材料的选取非常广泛, 主要是植物的各个组织、器官和部位. 不同的外植体对不定芽分化有明显差异. 研究较多的是以叶片和茎段作为外植体, 取材容易, 试验成功率较高. 激素和植物生长调节剂的种类及质量浓度组合对外植体分化不定芽起决定性作用. 在试验中发现, 菱叶菊茎段的再生频率随 6-BA 质量浓度的增加而升高, 但叶片表现不明显.

在植物组织培养中, 生根多采用 1/2 MS 基本培养基添加其他生长调节剂, 如 NAA, IBA 等^[12-13]. 本试验采用添加 0.5 mg/L NAA 和 IBA, 以 1/2 MS 为对照. 发现不定根产生于不定芽的基部, 随后产生白色绒毛, 最后形成根系. 添加 0.5 mg/L IBA 的培养基中, 生根质量好, 数量多, 移栽成活率较高.

3.3 外环境对组培苗移栽的影响

试验中发现, 菱叶菊幼苗长期在温室环境中生长, 幼苗根系的吸收功能变弱, 容易出现烂根现象. 根无法吸收足够的水分不能满足叶片的蒸腾作用, 从而使得幼苗的叶片逐渐萎焉.

温度对组培苗的影响也较大. 任何植物都有其生长的适宜温度范围, 在最适温度范围, 菱叶菊的生长最快, 移栽成活率也最高. 当温度达到 30 °C 时, 就会加剧叶片的蒸腾失水. 因此, 对于夏季移栽出的组培苗应选择温度在 20 °C 左右的温室培养, 植株才能正常生长.

菱叶菊试管苗长期在弱光环境下生长, 叶保护组织不发达, 移至室外后, 过强的光线会破坏叶绿素并灼烧叶片. 所以幼苗移栽后, 应该先移至光强较弱(约 2000 Lx)的环境下生长.

4 结 论

本试验以茎段和叶片为外植体, 经表面消毒后, 通过不定芽的诱导、继代和生根, 建立了菱叶菊的离体繁殖体系, 为其大规模无性繁殖奠定了基础.

参考文献:

- [1] 石 铸, 傅国勋. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 31.
- [2] 陈发棣, 赵宏波, 李 畅, 等. 菊属植物细胞学与分子细胞遗传学研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(1): 118-126.
- [3] 吴国盛, 陈发棣, 陈素梅, 等. 部分菊属与亚菊属植物的形态学聚类及亲缘关系分析 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 155-159.
- [4] 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.
- [5] 梁 芳, 王默霏, 王洁琼, 等. 菊花高效再生体系的建立及抗生素对叶片分化的影响 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 40-43.
- [6] 刘 鹏, 刘 金, 赵艳红, 等. 菊花的组织培养、脱毒与快繁技术研究 [J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2005, 20(4): 410-413.
- [7] 李名扬, 陈 薇. 菊花花瓣愈伤组织原生质体培养再生植株 [J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(3): 243-248.
- [8] 高亦珂, 赵 勃, 丁国勋, 等. 菊花茎叶外植体再生体系的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(1): 30-31.
- [9] 蒋细旺, 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.
- [10] 毛洪玉, 李晓辉, 刘志刚, 等. 地被菊幼嫩花瓣组织培养研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 68-71.
- [11] 吕晋慧, 吴月亮, 孙 磊, 等. 菊花叶片不定芽再生体系的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(4): 97-100.
- [12] 丰 锋, 徐玉梅, 李林锋. 鸦胆子的组织培养与快速繁殖 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2016, 41(7): 86-90.
- [13] 宋常美, 文晓鹏. 4 种贵州樱桃的高效离体再生 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(9): 19-24.

Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Chrysanthemum rhombifolium*

LI Zhuo-jiao¹, LI Li²

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Nanshan Botanical Garden, Chongqing 400065, China

Abstract: Using the stem tips and young roots of *Chrysanthemum rhombifolium* as explants, in vitro propagation system was established by adventitious bud induction, subculture and rooting. The results showed that the surface disinfection of the young shoots was 10 min, the rinse with tap water for 20 min, 75% ethanol disinfection for 10 s, and 0.1% HgCl₂ for 5 min. The survival rate was 75.15%. The optimum medium for adventitious bud induction was MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L), the adventitious bud induction rate of stem tips was 82.2%, and the adventitious bud induction rate of leaves was 66.6%. The optimum medium for subculture of adventitious bud was MS+6-BA(3 mg/L)+NAA(1 mg/L), and the proliferation rate was 4.63. The optimum medium for bud rooting was 1/2 MS+IBA(0.5 mg/L), and the rooting rate was 98%. 120 strains of test tube seedlings were transplanted into earthworm soil and humus soil (V(earthworm soil):V(humus soil)=1:1) nutrition bowl, 30 days survived 109, transplant survival rate of 90.83%.

Key words: *Chrysanthemum rhombifolium*; tissue culture; rapid propagation technique

责任编辑 潘春燕