

文章编号 :1673-0747(2017)01-0080-04

盆栽小菊茎尖剥离与试管苗培养试验

刘萌萌, 申雯婧, 张盛圣, 张黎

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以小菊茎尖为外植体, MS 为基本培养基, 探究不同激素种类及浓度组合对小菊茎尖组织培养的影响。结果表明:诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+6-BA3.0 ml/L+TDZ0.3 mg/L, 诱导愈伤组织分化的最佳培养基为 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L, 分化率为 76.7%;最适增殖培养基为 MS+6-BA2.0 ml/L+NAA0.05 mg/L+IBA0.1 mg/L, 增殖系数为 8.67。

关键词:小菊;茎尖;试管苗;离体培养

中图分类号:S641 文献标志码:A

DOI:10.13907/j.cnki.nykxyj.2017.01.017

选用盆栽小菊为花径小于 6 cm, 株型低矮紧凑的菊花盆栽品种。此菊具有花量大、花色丰富、株型优美, 花期长、抗逆性强等特点, 不仅可以作为盆栽欣赏, 在园林绿化造景中也占据着较大的市场^[1]。通常小菊的繁殖方式为常规扦插繁殖, 但是长期的无性繁殖容易导致病毒积累, 造成小菊品质变劣, 严重影响到小菊的观赏效果, 同时也不利于大规模商业化生产^[2]。前人大量的研究表明, 通过对小菊进行茎尖剥离和离体培养可以获得脱毒苗, 不仅可以加快增殖速度与繁殖系数, 还保持了品种的优秀性状。本试验采用正交设计筛选出适合小菊组培苗生长各阶段的激素配比, 为小菊的优质种苗生产提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选择生长良好的盆栽小菊(Chrysal Bronze)。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 取 2~3 cm 的幼嫩顶芽或侧芽, 在洗涤剂稀释液中清洗 2 min 后, 在流水下冲洗 10 min, 置于超净工作台, 用 75% 酒精表面处理 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 然后用 0.1% HgCl₂ 溶液处理 8~12 min,

无菌水冲洗 3~4 次。将无菌嫩芽置于解剖镜下, 用镊子、手术刀等工具剥取出长度为 0.5~1.5 mm 的茎尖。

1.2.2 不同激素浓度愈伤组织诱导试验 将茎尖接种于愈伤诱导培养基中, 培养基以 MS 为基本培养基, 添加不同种类与不同浓度的激素, 配比 3 因素、3 水平正交试验。共 9 个处理, 每个处理 3 次重复, 每个重复接种 10 瓶, 筛选出最适的愈伤组织诱导培养基。

1.2.3 不定芽诱导培养基筛选试验 不定芽诱导培养基由基本培养基 MS 加入不同种类与浓度的激素(6-BA、TDZ 和 NAA), 采用 3 因素 3 水平正交试验共 9 个处理, 将诱导出来的愈伤组织分割成 1 cm×1 cm 的小块转接于不定芽诱导培养基中, 每个处理重复 3 次, 每个重复接种 10 瓶, 从中筛选出最优方案。

1.2.4 继代增殖培养基筛选试验 将不定芽转接在继代增殖培养基中, 培养基由基本培养基 MS 加入不同浓度的 6-BA、IBA 和 NAA, 采用 3 因素 3 水平正交试验, 每隔 7 d 观察记录, 从而筛选出最佳增殖配方。

1.2.5 不同浓度碳源及琼脂浓度对丛芽增殖的影响 将生长到 2~3 cm 的小芽切割成单株后, 接种到含有

收稿日期:2016-04-11

基金项目:宁夏科技支撑计划项目(2014ZZN09)“宁夏设施园艺提升发展研究与示范”子课题——小盆花品种资源收集与种苗快繁技术研究与示范

作者简介:刘萌萌(1993—),女,硕士研究生,主要从事园林植物与观赏园艺研究。

通信作者:张黎(1962—),女,教授,硕士生导师,主要从事园林植物与观赏园艺研究,Email:zhang_li9988@163.com

不同浓度碳源及不同浓度琼脂的培养基上.设置MS为试验培养基,加入所筛选出的适宜浓度的激素配比,培养基碳源浓度梯度为 30、40、50 mg/L,琼脂浓度梯度为 6、7、8 mg/L,每瓶接 3 个,接种 10 瓶,重复 3 次.

1.2.6 培养条件 培养室温度为(23±2)℃,湿度为 60%~65%,光照培养条件为 1 800~2 000 lx.

1.3 数据处理及分析方法

使用 Excel 2007、SAS 8.2 统计分析软件进行数据处理分析.

2 结果与分析

2.1 外植体消毒时间筛选

由表1得出,茎尖随着灭菌时间的增加,污染率呈下降趋势,但灭菌时间过长造成褐化率的提高,当灭菌时间为 6 min 时污染率降低且褐化率低.

2.2 不同激素对愈伤组织诱导的影响

将茎尖接种于愈伤诱导培养基中,7 d 后茎尖开始膨大,14 d 以后开始逐渐分化出浅绿色半透明状

的愈伤组织,42 d 愈伤长大至 1 cm×1 cm.

由表 2 得出,NAA 的 R 值最大,TDZ 次之,6-BA 最小.根据极差分析法,R 值越大,因素对愈伤诱导的影响越显著,因此 3 种激素对诱导芽数的影响效果依次是 NAA>TDZ>6-BA. 从 K 值可以看出,最适不定芽诱导组合是 MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.25 mg/L+ZT0.3 mg/L,与 A5 号试验处理相同,A5 号处理诱导芽数为 56.6,说明此配方适用于小菊的愈伤组织诱导,在 A2 号、A7 号培养基中愈伤生长状况良好,结构松散的绿色愈伤组织有利于分化出芽,A3 号、A6 号、A8 号、A9 号可以分化出愈伤组织,但褐化情况较严重.

2.3 不同激素对丛芽诱导的影响

将结构较松散的绿色愈伤组织转接于不定芽诱导培养基中,14 d 左右分化出芽点,35 d 左右生长出不定芽,但出现了程度深浅不一的玻璃化现象.

由表 3 得出,6-BA 的 R 值最大,从 K 值可以看出,不定芽诱导最佳培养基为 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.3 mg/L+TDZ0.5 mg/L,9 个处理中没有此组合,

表 1 污染褐化率

取材部位	HgCl 灭菌时间/min	接种数/个	污染数/个	污染率/%	褐化率/%
茎尖	4	90	8	8.89	0
茎尖	6	90	6	6.67	4.33
茎尖	8	90	5	5.56	13.00
茎尖	10	90	2	2.23	21.67
茎尖	5+5	90	0	0	13.33

注:5+5 为使用 HgCl 灭菌 5 min,无菌水冲洗 3~4 次后重复此动作 1 次。

表 2 愈伤诱导结果

处理号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	TDZ/(mg·L ⁻¹)	出愈率/%	愈伤状态
A1	1(1.0)	1(0)	1(0.1)	53.3±0.058BC	黄色,结构紧密
A2	1	2(0.25)	2(0.2)	57.6±0.058B	绿色,结构松散
A3	1	3(0.5)	3(0.3)	46.7±0.058BC	褐色,结构紧密
A4	2(2.0)	1	2	54.3±0.058B	浅绿色,结构松散
A5	2	2	3	56.6±0.058B	浅绿色,结构松散
A6	2	3	1	3.3±0.058E	褐色,结构紧密
A7	3(3.0)	1	3	66.7±0.058A	绿色,结构松散
A8	3	2	1	37.6±0.058D	褐色,结构松散
A9	3	3	2	36.7±0.058D	褐色,结构紧密
K1	52.53	38.07	47		
K2	58.1	50.6	28.9		
K3	31.4	49.53	56.67		
R	14.46	29.2	25.27		

注:表中数据为平均值±标准差,同列数字旁不同大写字母表示有极显著差异(P<0.01).

表 3 不定芽诱导结果分析

处理号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	TDZ/(mg·L ⁻¹)	分化率/%	不定芽形态
B1	1(1.0)	1(0.1)	1(0)	76.7±0.58A	绿色,略玻璃化
B2	1	2(0.2)	2(0.5)	36.7±0.58B	浅绿色,玻璃化
B3	1	3(0.3)	3(1.0)	30.0±0.10B	浅绿色,玻璃化
B4	2(2.0)	1	2	16.6±0.06C	绿色,细弱
B5	2	2	3	0D	褐化死亡
B6	2	3	1	0.6±0.58D	愈伤褐化
B7	3(3.0)	1	3	0.3±0.58D	长势极弱
B8	3	2	1	0D	褐化死亡
B9	3	3	2	0D	褐化死亡
K1	47.8	5.7	0.1		
K2	31.2	12.2	10.2		
K3	25.8	17.8	10.1		
R	47.7	21.0	15.7		

注:表中数据为平均值±标准差,同列数字旁不同大写字母表示有极显著差异($P<0.01$).

需进行进一步的验证.根据诱导芽数据显示,最佳不定芽诱导配方为 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+ZT0 mg/L,不定芽诱导率为 76.7%.B1 与 B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9 有显著性差异,且 B1 处理有轻微玻璃化,说明在不定芽诱导过程中,激素浓度过大芽增殖会受抑制且玻璃化严重.

2.4 不同激素对不定芽增殖的影响

在不定芽增殖的过程中遇到了程度不同的玻璃化状况,由表 4 可得,在 C4 处理培养基的组培苗增殖系数最大且玻璃化现象较轻,可通过调整培养基配方、试验操作来改善这一状况.

由表 4 得出,IBA 的 R 值最大,从 K 值可以看

出,不定芽增殖最佳培养基为 MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.2 mg/L+TDZ0 mg/L,根据芽增殖系数显示,这与 C4 最佳不定芽增殖配方不相吻合,C4 与 C1、C2、C3、C5、C6、C7、C8、C9 均有显著性差异.C4 不定芽增殖系数为 8.67%,且为绿色健壮苗.

2.5 碳源浓度及琼脂浓度对不定芽增殖的影响

由表 5 得出,碳源质量浓度为 50 mg/L 时,玻璃化率最低且叶片绿色,正常生长;当琼脂质量浓度为 8 mg/L 时,玻璃化率最低但褐化率比较严重,琼脂质量浓度为 7 mg/L 时,玻璃化率较低,同时叶片绿色正常生长.

表 4 继代增殖结果

处理号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	IBA/(mg·L ⁻¹)	增殖系数	形态表现
C1	1(1.0)	1(0.05)	1(0.)	1.67±0.06D	浅绿色,玻璃化
C2	1	2(0.10)	2(0.1)	2.17±0.03D	浅绿色,玻璃化
C3	1	3(0.20)	3(0.2)	3.34±0.06C	绿色,较健壮
C4	2(2.0)	1	2	8.67±0.06A	绿色,较健壮
C5	2	2	3	1.67±0.06D	浅绿色,略玻璃化
C6	2	3	1	1.67±0.06D	浅绿色,略玻璃化
C7	3(3.0)	1	3	3.67±0.06C	绿色,细弱
C8	3	2	1	5.33±0.06B	枯黄
C9	3	3	2	3.67±0.06C	枯黄
K1	2.4	4.0	4.2		
K2	4.7	3.2	2.9		
K3	2.9	4.8	2.8		
R	1.8	1.8	2.0		

注:表中数据为平均值±标准差,同列数字旁不同大写字母表示有极显著差异($P<0.01$).

表 5 碳源质量浓度及琼脂质量浓度对不定芽增殖的影响

碳源质量浓度/(mg·L ⁻¹)	琼脂质量浓度/(mg·L ⁻¹)	玻璃化率/%	长势
30		61.11	叶片浅绿色、狭长、水渍化
40		36.67	叶片浅绿色、狭长、节间不明显
50		16.67	叶片绿色、正常
	6	53.33	叶片浅绿色、狭长、水渍化
	7	33.33	叶片绿色、正常
	8	27.79	叶片绿色、褐化率严重

3 结论与讨论

3.1 结论

(1)愈伤诱导最佳培养基为:MS+6-BA3.0 ml/L+TDZO.3 mg/L.

(2)不定芽诱导最佳培养基为:MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L,不定芽分化率最高达 76.7%.

(3)MS+6-BA2.0 ml/L+NAA0.05 mg/L+IBA0.1 mg/L 为最佳增殖培养基配方,丛芽增殖系数最高且生长状况良好.

(4)7 g/L 的琼脂质量浓度、50 g/L 的蔗糖质量浓度有利于遏制改善继代增殖中的玻璃化状况.

3.2 讨论

通过试验表明,不同种类激素及其质量浓度对小菊组织培养存在较大的影响,但 6-BA 质量浓度的控制范围较广泛,其质量浓度在 0.1~0.2 mg/L 时均能促进小菊茎尖的离体培养,这与汪晓沙等对菊花品种‘breeze Ivory’培养时得出的结论一致^[1].同时试验发现,当茎尖长度小于 1 mm 时成活率显著低于 1 mm 以上长度的茎尖,刘青林等在对菊花茎尖进行培养时也得出这一结论^[2].在诱导愈伤组织和不定芽试验中,出现了严重的褐化和玻璃化现象,在不改变激素浓度和培养条件的情况下,

增加培养基中琼脂和蔗糖的质量浓度、接种前倒掉培养瓶内的水,均能显著改善玻璃化症状^[3].试验将玻璃化试管苗接入了激素水平降到 50% 的培养基中后,玻璃化现象得到了明显的控制,这一试验结果与前人对玻璃化现象研究结果一致,即降低激素质量浓度可以缓解玻璃化现象^[4].前人对组织培养影响因素的研究多集中于培养基的组成,包括无机盐、有机物、激素等培养基成分的种类和配比质量浓度,未深入到培养条件层次,如培养温度、光照强度、光质、容器内空气因素等^[5].上述因素对小菊试管苗的增殖速度、生长状况还存在着较大的研究空间,值得进一步试验探究.

参考文献:

- [1] 郝洪波.缤纷灿烂话小菊[J].中国花卉盆景,2007(9):32.
- [2] 吴光金.植物脱毒苗组织培养技术的研究[D].长沙:中南林学院,2004.
- [3] 程金水.园林植物遗传育种学[M].北京:中国林业出版社,2000:243-244.
- [4] 张燕,王志勇.菊花组织培养技术研究进展[J].廊坊师范学院学报(自然科学版),2015,15(4):80-85.
- [5] 李玉梅,马强.组织培养中培养条件对培养物的影响[J].北方园艺,2001(6):35-36.

The experiment of stem tip stripping and tube seedlings cultivation of Chrysanthemum with small inflorescences

Liu Mengmeng, Shen Wenjing, Zhang Shengsheng, Zhang Li
(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The experiment use the shoot tip of Chrysanthemum with Small Inflorescences as explants, using MS as the basic medium, it explore the combination of different hormone types and concentration on tissue culture of Chrysanthemum with Small Inflorescences. The results show that the best medium for inducing callus induction is MS+6-BA3.0 ml/L+TDZO.3 mg/L, the adventitious bud induction is MS+6-BA1.0 mg/L +NAA0.1 mg/L, the differentiation rate was 76.7%. The medium for propagation of adventitious bud is MS+6-BA2.0 ml/L+NAA0.05 mg/L+IBA0.1 mg/L, and the propagation factor is 8.67.

Key words: small flowered pot chrysanthemum; shoot tip; tissue culture; virus-free seedling

(责任编辑、校对 郑国琴)