切花菊组织培养快速繁殖技术初探

祝洪海 张伟*

(河南省商丘市蔬菜生产办公室,河南商丘 476000)

摘要 用MS基本培养基附加不同种类和浓度的激素,以切花菊良种小菊带腋芽的茎段、幼花蕾位外植体,进行切花菊组织培养快速繁殖试验。结果表明:初代培养试验的2种激素6种不同浓度处理,均能诱导外植体分化形成愈伤组织。带腋芽的芽段腋芽分化率最高的组合为MS+6-BA 2.0mg/L+NAA0.2mg/L,分化率为83.3%;而花蕾诱导分化率最高的组合为MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.1mg/L。培养42d后,愈伤组织块的直径超过1.0cm,丛生芽数达到12~15个。

关键词 切花菊;小菊;组织培养;快速繁殖

中图分类号 S682.1⁺104⁺.3 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)14-0015-02

菊花原产我国,属于菊科多年生宿根草本植物,是国内十大传统名花之一,也是当今世界“四大鲜切花”之一。小菊是当今花卉市场流行的优良切花菊品种之一。其特点是小分枝多、色彩鲜艳、各色品种俱全、产量高、耐贮运、花期长、适应性广,远观近观效果均佳,深受人们的喜爱。生产上大多数采用脚芽扦插繁殖法,不仅繁殖系数低、周期长,而且细菌感染严重、品质退化。而利用组织培养技术,可在短时间内繁殖大量优质花苗。菊花组织培养快速繁殖技术,国外Ben-Joacov等最早(1972)进行了研究。Earle等又研究了细胞分裂素、生长素不同水平对其生长的影响。国内袁文达(1982)、唐巍(1993)又开展了这方面的工作,为批量生产开辟了一条新途径。本文旨在为采用生物技术快速繁殖优良品种,并进行大批量生产提供依据。

1 材料与方

1.1 材料

供试材料来自新乡县合河乡温室大棚栽培的植株。取生长健壮的一年生中上部带腋芽的茎段、幼花蕾。

1.2 方法

1.2.1 外植体准备。将采集的带腋芽的茎段、幼花蕾作为外植体,去掉部分叶片及花蕾上的鳞片,用小毛刷仔细地洗刷,再用洗衣粉浸泡10min,在流水中冲洗30min,冲去粘附在上面的污物,再用无菌水冲洗2~3次,装入烧杯内,在接种室内放入75%的酒精浸泡30s,而后置于滴入2~3滴吐温-80的0.1%HgCl₂溶液中浸泡8min,最后再用无菌水冲洗4~5次,放在无菌滤纸上吸干表面上水分,以备接种用。

1.2.2 具体操作。整个接种操作过程是在接种室的无菌环境条件下进行的。在超净工作台(接种前超净工作台应提前20min,打开并用紫外灯灭菌)的表面,用75%的酒精喷洒灭菌。稍等片刻,点燃酒精灯,然后再开始接种。用预先灭过菌的镊子、解剖刀或剪子将其带腋芽的茎段在培养皿上切成1.0~1.5cm,花蕾剥去鳞片后纵切成两半。把镊子在75%的酒精溶液中蘸一下,并在酒精上灼烧,注意时间要适当,不能过长,以免在夹取外植体材料时将其灼伤。接种时,培养皿

的瓶口应倾斜对准酒精灯火焰的方向,距离要适当。外植体要垂直于培养基,接种材料与培养基接触的深度要掌握好,切忌过深。接种时动作要迅速,封口要扎紧。接种用的镊子每用1次灭1次菌。操作者的手接种前必须用肥皂彻底清洗,再用75%的酒精药棉擦拭干净。

1.2.3 愈伤组织的诱导与分化。将外植体材料置于不同处理培养基配方中,具体培养基及接种材料情况见表1。

表1 切花小菊与激素处理及外植体接种情况

处理	培养基组成//mg/L	接种外植体数//个	
		茎段	花蕾
W1	MS+6-BA1.0+NAA0.1	6	6
W2	MS+6-BA2.0+NAA0.1	6	6
W3	MS+6-BA3.0+NAA0.1	6	6
W4	MS+6-BA1.0+NAA0.2	6	6
W5	MS+6-BA2.0+NAA0.2	6	6
W6	MS+6-BA3.0+NAA0.2	6	6
CK	MS	6	6

共设置7个处理,CK为空白对照。每个处理6瓶,其中带腋芽的茎段与花蕾各3瓶,每瓶2块材料,重复3次。

培养皿为100mL三角瓶,上述各培养基蔗糖3%、琼脂0.8%,pH值为5.8。接种后将培养基在培养室内培养,温度为25±2℃,光照时间为8~10h/d,光照强度为1800Lx。外植体培养7d后,茎段上的腋芽开始萌动,21d后萌发许多绿色小芽,同时在其茎段切口处(生物学下端)可以看到长出了浅绿色致密的愈伤组织。继续培养42d后愈伤组织的直径>1cm以上,同时萌发出许多莲座状的丛生芽。

2 结果与分析

2.1 不同处理培养基对带叶芽的茎段诱导分化的影响

初代培养时不同处理培养基对茎段腋芽发生的数量、愈伤组织及丛生芽的生长势等影响是不同的(见表2)。茎段腋芽在接种7d后就萌发生长而且速度较快,伴其生长继续培养21d后,发现茎段切口处已形成愈伤组织,同时腋芽的幼芽叶腋间开始发生绿色小芽,之后渐渐形成丛生芽。由表2可以看出,W5对茎段腋芽分化率发生的效果最好,分化率达83.3%。6-BA的质量浓度过低或过高均不利其腋芽分化,而NAA的质量浓度从0.1mg/L提高到0.2mg/L时,腋芽分化率有上升趋势;在生长势上,表现有所加快,但长势弱。在不加任何激素的情况下只利于生长而不利于或形成少量的愈伤组织。

作者简介 祝洪海(1954-),男,大学文化,高级农艺师,现从事蔬菜生产与科技推广工作。

* 通讯作者

收稿日期 2008-05-19

表2 不同处理培养基对带茎段腋芽诱导分化的影响

处理	接种时的腋芽		生长1个月后的腋芽				生长势
	芽高//cm	个数//个	芽高//cm	愈伤组织大小//cm	分化丛生芽数//个	腋芽分化率//%	
W1	0.4	12	2.3	0.2	5	41.7	小芽生长较慢、丛生、苗细弱
W2	0.5	12	2.0	0.3	9	75.0	小芽生长较慢、丛生、苗稍弱
W3	0.4	12	1.8	0.4	6	50.0	小芽生长较慢、丛生、苗弱
W4	0.5	12	2.2	0.2	7	58.3	小芽生长快、丛生、苗细弱
W5	0.5	12	2.4	0.4	10	83.3	小芽生长适度、节间短、丛生
W6	0.5	12	2.2	0.3	8	66.7	小芽生长快丛生、苗细弱
CK	0.5	12	2.5	0.1	2	16.7	小芽生长慢、苗细弱

2.2 不同处理培养基对花蕾诱导分化的影响

初代培养中花蕾形成的愈伤组织时间都较晚,接种后21d才能用肉眼看到浅绿色的愈伤组织出现,继续培养35d后愈伤组织逐渐膨大,同时上面形成突起状的绿色小芽体,到42d后愈伤组织已膨大达1.2cm左右,并萌发出许多丛生芽,在不同处理培养基的激素、浓度种类不同时,愈伤组织发生的大小、丛生芽丛、生长势是不一样的(见表3)。

表3 不同处理培养基配方对花蕾诱导分化的影响

处理	愈伤组织大小//cm	丛生芽数量//个	丛生芽生长势
W1	0.7	5~8	小芽生长较慢、丛生、较小苗弱
W2	0.9	8~9	小芽生长慢、丛生、较小苗弱
W3	1.2	12~15	小芽生长稍慢、丛生、节间短苗壮
W4	0.6	6~7	小芽生长快、丛生、节间长苗弱
W5	0.8	7~9	小芽生长快、丛生、节间长苗稍弱
W6	1.0	9~11	小芽生长快、丛生、节间长苗稍弱
CK	-	-	-

由表3可以看出,在NAA质量浓度相同时而6-BA质量浓度不同的处理中,随着6-BA质量浓度的提高,愈伤组织块由小到大,而且萌发丛生芽数量由少到多。在6-BA质量浓度相同时而NAA质量浓度不同的处理中,随着NAA质量浓度的提高,愈伤组织相对较小,小芽生长速度加快,但从生发生的数目相对少。其中,以W3的发生效果最好。因此,该培养基为以后的继代增殖培养提供了参考依据。空白对照(CK)从开始观察到最后尚未形成愈伤组织,这说明花蕾在不加任何激素的初代培养中,MS培养基不适合花蕾组织培养而分化产生愈伤组织。

3 小结与讨论

(1)试验结果表明:在切花菊小菊的组织培养中,不同种类激素和浓度的培养基对带腋芽的茎段及幼花蕾诱导分化有影响。在MS+6-BA 0.1~3.0mg/L+NAA 0.1~0.2mg/L的范围内,诱导率为100%。茎段腋芽诱导分化最适宜的培养基为MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.2mg/L,花蕾诱导分化最适宜的培养基为MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.1mg/L;诱导出来的丛生芽小苗整齐一致、长势较好。

(2)初代培养时,对外植体材料的处理、正确的接种方法、适宜的培养条件和有效地控制杂菌侵染,是切花菊小菊组织培养快速繁殖成功的关键因素。

4 参考文献

- [1] 罗士韦.植物组织培养在花卉上的应用[J].植物生理学通讯,1979(3):1-9.
- [2] 裘文达,李曙轩,姚毓璩.菊花名贵品种组织培养快繁技术的研究[J].浙江农业大学学报,1983(2):3-12.
- [3] 周维燕,孙自然.切花菊试管繁殖和经济效益初探[J].大众花卉,1987(1):28-29.
- [4] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991.
- [5] 黄丹枫.切花菊新品种的组培快繁试验[J].上海农学院学报,1992(2):38-39.
- [6] 陈龙清.日本早小菊的组织培养与玻璃花苗的防治[J].华中农业大学学报,1995(3):272-273.
- [7] 李玉芬.几种菊花茎尖培养和栽培技术的研究[J].北方园艺,1996(3):42-43.
- [8] 徐丽娟,曲善珊,王采兰,等.切花菊快速繁殖的研究[J].莱阳农学院学报,1997,14(2):47-49.
- [9] 程广有,韦立文.切花菊组织培养快速繁殖技术[J].延边大学学报,2000,22(3):202-206.
- [5] HAO Y J, YOU C X, DENG X X. Efforts of cryopreservation on developmental competence, cytological and molecular stability of citrus callus[J]. Cryoletters, 2002, 23(1): 27-35.
- [6] 张俊娥,郭文武,邓秀新.柑橘愈伤组织及其与体细胞胚胎发生能力的关系[J].遗传学报,2006,33(7):647-654.
- [7] 朱长甫,镰田博,原田宏,等.与胡萝卜胚胎发生相关的胚性细胞蛋白63cDNA分离及其基因表达研究[J].植物学报,2001,213(1):1-10.
- [8] KITA M, ENDO -INAGAKI T, MORIGUCHI T, et al. cDNA catalogs expressed in albedo of Citrus fruit, a comparative analysis of cDNA libraries from pulp and albedo of Satsuma mandarin (Citrus unshiu Marc.). Acta Hort, 2000(521): 179-183.
- [9] RUMYANA K, SJEF B, EUGENIA R, et al. The arabidopsis somatic embryogenesis receptor-like kinase protein complex includes brassin osteroid-insensitive1[J]. The Plant Cell, 2006(18): 626-638.
- [10] SHIMADA T, HIRABAYASHI T, ENDO T, et al. Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (CitSERK1) from Citrus unshiu Marc[J]. Scientia Horticulturae, 2005(103): 233-238.

(上接第14页)

要的作用。

4 参考文献

- [1] ALBE RTINI E, MARCONI G, REALE L, et al. SERK and APOSTART, candidate genes for apomixis in poa pratensis [J]. Plant Physiol, 2005(138): 2185-2199.
- [2] DEVITT L C, SAWBRIDGE T, HOLTON T A, et al. Discovery of genes associated with fruit ripening in Carica papaya using expressed sequence tags[J]. Plant Sci, 2006(170): 356-363.
- [3] ZENG F C, ZHANG X L, ZHU L F, et al. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray [J]. Plant Molecular Biology, 2006(60): 167-183.
- [4] HU H, XIONG L, YANG Y. Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection[J]. Planta, 2005(140): 44-53.