

生长调节物质对菊花‘小金黄’叶片再生不定芽的影响

肖 政^{1,2}, 范崇辉^{1*}, 金万梅²

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘 要:MS 培养基中添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的菊花品种‘小金黄’叶片再生频率为 27.1%, 显著高于添加 TDZ 或 KT。在 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与不同浓度生长素的配比中, MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的再生频率达 96.9%, 高于 2,4-D 和 IBA。‘小金黄’最适宜的生根培养基为 MS + NAA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:菊花; 外植体; 再生; 生长调节物质; 不定芽

中图分类号: S682.110.353

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2009)06-0050-04

Effects of Plant Growth Regulators on Adventitious Shoot Regeneration of *Dendranthema morifolium* cv. Xiaojinhuang Leaf Discs

XIAO Zheng^{1,2}, FAN Chong-hui¹, JIN Wan-mei²

(1. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: Some plant growth regulators were tested in series of experiments to determine their effects on inducing adventitious shoot from leaf discs of *Dendranthema morifolium* cv. Xiaojinhuang. The results showed that $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA was more favorable to shoot formation than TDZ or KT, and regeneration rate of $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA treatment was 27.1%. Whereas the combination of 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ on regeneration frequency was much more efficient than others with a regeneration rate of 96.9%. The optimal rooting medium was MS + NAA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: *Dendranthema morifolium*; explants; regeneration; growth regulators; adventitious shoot

菊花(*Dendranthema morifolium*)是我国的传统名花,也是目前国际上销售量最大的五大鲜切花之一,约占鲜切花总量的 30%^[1]。多年来,利用常规育种方法在菊花上取得了一些成就,但是仍然不能满足生产和生活需要,由于现代遗传转化技术可定向修饰菊花的某些性状并保留原有性状,使其在花色、花期、抗病虫、抗逆性等方面发挥重要作用。建立良好的菊花再生体系是进行遗传转化工作的基础。自 Hill^[2](1968 年)用芽尖通过愈伤组织诱导成株建立菊花的再生系统以来,Roest 和 Okelmann^[3]从菊花叶片和茎段上分化出不定芽;Bush 等^[4]以菊花的花瓣为外植体,建立了再生体系,并通

过体细胞变异获得新变种;Tanaka 等^[5]观测到菊花放射状小花外植体的体细胞胚状体发生,并从胚状体上分化出芽体;司怀军等^[6]以菊花幼嫩花瓣作为材料,以 MS 为培养基,获得菊花的再生植株;高亦珂^[7]、蒋细旺^[8]、李辛雷^[9]等先后进行了 6-BA 和 NAA 不同浓度对比对菊花不同品种叶片离体再生的研究,并建立了再生体系。但是,这些研究均没有系统研究细胞分裂素和生长素类型及其对比对菊花再生的影响,而细胞分裂素和生长素类型及其对比对菊花再生影响很大,是得到较高再生频率的关键因子。通过研究多种细胞分裂素和生长素组合(如 6-BA、KT、TDZ、NAA、IBA、2,4-D)对菊花叶片离

收稿日期:2008-12-29 修回日期:2009-04-08

基金项目:北京市自然科学基金(5052010);北京市科技新星计划项目(2006B39)和转基因专项(Z07070501770701)

作者简介:肖政,男,在读硕士研究生,主要从事园林植物分子遗传育种。

* 通讯作者:范崇辉,男,教授,主要从事果树生理研究。E-mail:apple19561019@163.com。

体再生的影响,并探索不同生长素浓度对根诱导的影响,建立快速、高效、稳定的菊花再生体系,为其基因工程育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菊花品种‘小金黄’采自北京农林科学院林业果树研究所苗圃内。采集当年生带腋芽茎段,流水冲洗后用洗涤剂水浸泡 2 h,无菌水冲洗后,用 0.1% 升汞消毒 5~7 min,无菌水冲洗 3 次,每次 5 min,接种于初代培养基(MS)上,建立试管苗培养体系。

6-BA、TDZ、KT、IBA、NAA 和 2,4-D 为 Sigma 公司产品,其他试剂为国产分析纯。MS 为基本培养基。

1.2 方法

1.2.1 细胞分裂素对菊花不定芽诱导的影响 将菊花叶片接种在 MS 分别附加 0.5、1.0、2.0、4.0 mg · L⁻¹ 的 TDZ、6-BA 或 KT 培养基上。MS 培养基用 1 mol · L⁻¹ NaOH 或 1 mol · L⁻¹ HCl 调 pH 至 5.8,并经 121℃ 高压灭菌 20 min,待其温度降至 55℃ 时加入经 0.45 μm 微孔滤膜过滤灭菌的 TDZ。每瓶接种外植体 16 个,每处理 3 瓶,重复 3 次。将处理置于 16/8 h 光周期下,温度 25℃ ± 2℃ 培养,观察外植体的形态变化。

1.2.2 细胞分裂素与生长素组合对菊花不定芽诱导的影响 将菊花叶盘分别接种在 MS 附加 1.0 mg · L⁻¹ TDZ、6-BA 或 KT 和 0.2、0.4、0.6 mg · L⁻¹ 2,4-D、NAA、IBA 的培养基中。每瓶接种、灭菌、培养以及观察方法同“1.2.1”。

1.2.3 生长素对菊花带芽茎段生根的影响 将菊花带芽茎段分别接种在 MS 附加 0.1、0.2、0.4、0.8 mg · L⁻¹ NAA、IBA、2,4-D 的培养基上。每瓶接种外植体 3 个,每处理 3 瓶,重复 3 次。灭菌、培养以及观察方法同“1.2.1”。

1.2.4 数据调查 叶盘接种后 30 d,调查不定芽再生频率和每外植体平均再生芽数。2 周后,统计外植体平均生根数。

不定芽再生频率(%) = 再生不定芽的外植体数/接种的总外植体数 × 100%

平均再生芽数 = 再生芽的总数/再生芽的外植体数

平均生根数 = 生根总数/接种外植体总数

2 结果与分析

2.1 细胞分裂素对菊花不定芽再生的影响

将菊花的叶盘接种在含不同浓度 6-BA、KT 或

TDZ 的 MS 培养基上,1 周后,叶盘边缘开始向叶背卷曲,6-BA 0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹ 处理叶盘的切口有少量绿色愈伤组织产生,而其他处理未见有愈伤。3 周后,6-BA 0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹ 处理的切口愈伤膨大,6-BA 0.5、1.0 mg · L⁻¹ 处理诱导出芽,对照 MS 从叶脉的切口处有少量短根生长。TDZ 处理的叶盘膨大,TDZ 0.5 mg · L⁻¹ 处理的叶盘切口有大量淡绿色愈伤组织细胞团,TDZ 2.0、4.0 mg · L⁻¹ 处理切口只有少量愈伤,部分叶盘有枯叶现象。KT 处理切口愈伤少,KT 0.5、1.0 mg · L⁻¹ 处理有少量生根。第 4~5 周,6-BA 0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹ 处理有不定芽大量产生(图 1-a),TDZ 处理无芽分化(图 1-b),KT 0.5、1.0 mg · L⁻¹ 有少量诱导芽产生(图 1-c)。6-BA 4.0 mg · L⁻¹ 处理出现叶枯现象,TDZ 1.0、2.0、4.0 mg · L⁻¹ 处理中,随着浓度的升高,枯叶增多。研究结果(表 1)表明,TDZ 和 KT 处理不利于菊花叶盘再生,而随着 6-BA 浓度上升,菊花叶盘的再生频率先升后降,6-BA 0.5 mg · L⁻¹ 和 1.0 mg · L⁻¹ 处理的再生频率达到 22.9% 和 27.1%,显著高于其他处理,外植体平均再生芽数分别为 1.8 个和 1.2 个。

表 1 细胞分裂素对菊花叶盘再生的影响^①

Table 1 Effects of different cytokinins on adventitious shoot regeneration of leaf discs

培养基	再生频率 / %	每叶盘平均再生芽数 / 个
MS	0 c	0 d
MS + 6-BA 0.5 mg · L ⁻¹	22.9 a	1.8 a
MS + 6-BA 1.0 mg · L ⁻¹	27.1 a	1.2 b
MS + 6-BA 2.0 mg · L ⁻¹	10.4 bc	1.6 ab
MS + 6-BA 4.0 mg · L ⁻¹	0 c	0 d
MS + KT 0.5 mg · L ⁻¹	4.2 bc	1 c
MS + KT 1.0 mg · L ⁻¹	2.1 bc	1 cd
MS + KT 2.0 mg · L ⁻¹	0 c	0 d
MS + KT 4.0 mg · L ⁻¹	0 c	0 d
MS + TDZ 0.5 mg · L ⁻¹	0 c	0 d
MS + TDZ 1.0 mg · L ⁻¹	0 c	0 d
MS + TDZ 2.0 mg · L ⁻¹	0 c	0 d
MS + TDZ 4.0 mg · L ⁻¹	0 c	0 d

① 同列不同字母表示差异显著 (p < 0.5)。

2.2 生长素与细胞分裂素对菊花再生的影响

6-BA 与不同生长素组合是影响菊花叶盘再生的重要因素。将菊花叶盘接种在不同生长素与 6-BA 组合的 MS 培养基上。1 周后,NAA 处理叶盘边缘上翘,切口处尤其叶脉附近形成大量愈伤组织;2,4-D 处理叶盘边缘失绿,随浓度升高,叶盘边缘褐化加重;IBA 处理叶盘边缘卷曲,切口有少量黄绿色愈伤产生。2 周后,NAA 处理外植体的切口边缘直

接分化出绿色小芽点,其他处理未发现芽分化。4周后,NAA 处理叶盘产生大量不定芽(图 2-a);IBA

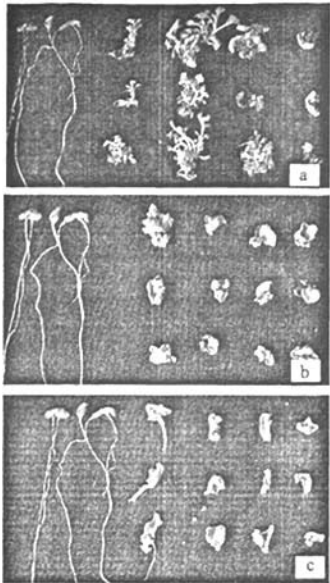
处理也有少量不定芽产生(图 2-b);2,4-D 处理叶盘均愈伤化,无芽分化(图 2-c)。表 2 表明,在不同的培养基上,菊花叶盘再生频率和每外植体平均再生芽数有显著差异。在 NAA 与 6-BA 组合的培养基上,菊花叶盘再生频率高于其他处理,分别为 51.6%、95.3%和 96.9%,同时,每外植体平均再生芽数分别为 2.9、3.8、3.6 个,其中再生频率 95.3%和 96.9%间无显著差异,综合考虑认为,NAA 0.4 mg · L⁻¹与 6-BA 组合可作为菊花再生培养基。

表 2 生长素与 6-BA 组合对不定芽再生率的影响^①

Table 2 Effects of combination of different auxins and 6-BA on adventitious of leaf discs

培养基	再生频率 / %	每叶盘平均再生芽数/个
M + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	51.6 b	2.9 b
M + NAA 0.4 mg · L ⁻¹	95.3 a	3.8 a
M + NAA 0.6 mg · L ⁻¹	96.9 a	3.6 a
M + IBA 0.2 mg · L ⁻¹	12.5 d	1.3 c
M + IBA 0.4 mg · L ⁻¹	20.3 c	1.5 c
M + IBA 0.6 mg · L ⁻¹	17.2 cd	1.4 c
M + 2,4-D 0.2 mg · L ⁻¹	0 e	0 d
M + 2,4-D 0.4 mg · L ⁻¹	0 e	0 d
M + 2,4-D 0.6 mg · L ⁻¹	0 e	0 d

①M 表示 MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹;同列不同字母表示差异显著 (p<0.5)。



a. MS + 6-BA b. MS + TDZ c. MS + KT

图 1 菊花叶片不定芽的再生情况

Fig. 1 Adventitious shoots regeneration of leaf discs of *D. morifolium*



a. MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA b. MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA c. MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + 2,4-D

图 2 菊花叶片不定芽的诱导和生长

Fig. 2 Induction and growth of adventitious buds of *D. morifolium*

2.3 生长素对菊花生根的影响

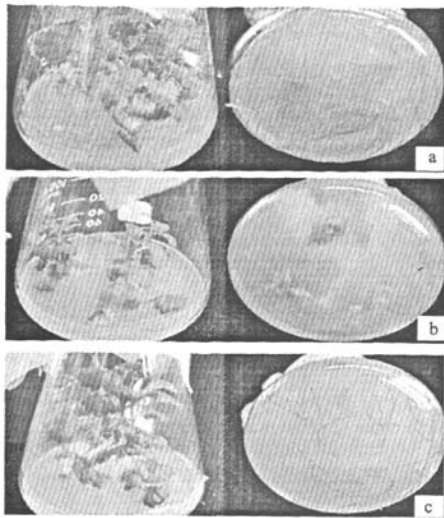
将带芽的菊花茎段接种在含不同浓度的 2,4-D、NAA 和 IBA 的 MS 培养基上,2 周后,NAA 处理均有生根,而且根粗壮、较短。由表 3 可知,NAA 0.4 mg · L⁻¹处理平均生根数为 10.9,高于其他处理;IBA 处理生根细长,2,4-D 0.1 mg · L⁻¹处理茎基有愈伤团,根扭曲畸形,粗细不均;其他处理茎基均愈伤化,无生根。因此,取 MS + NAA 0.4 mg · L⁻¹(图 3)为菊花生根适宜培养基。

表 3 不同浓度生长素对菊花生根的影响^①

Table 3 Effects of different auxins on root growth

浓度 / (mg · L ⁻¹)	平均生根数 / 个		
	MS + NAA	MS + IBA	MS + 2,4-D
0.1	8.4	7.1	6.5
0.2	9.9	6.9	0
0.4	10.9	8.2	0
0.8	7.8	7.5	0

①基本培养基为 MS。



a. MS + NAA 0.4 mg · L⁻¹ b. MS + 2, 4-D 0.4 mg · L⁻¹
c. MS + IBA 0.4 mg · L⁻¹

图3 不同浓度生长素对菊花生根的影响

Fig. 3 Effects of different auxins on root growth of *D. morifolium*

3 结论与讨论

植物生长调节物质对于植物离体再生的调节作用非常明显,作用也最显著。植物离体再生是外植体内激素与体外环境中生长调节物质共同作用的结果,生长调节物质调节着植物离体再生的方向^[10]。高亦珂^[7]、蒋细旺^[8]、吕晋慧^[11]等先后均用NAA和6-BA对菊花不同品种叶片再生进行研究,得到了较高的再生频率。本试验以叶片为外植体,得到菊花叶片最适宜再生的培养基为MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.4 mg · L⁻¹和MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.6 mg · L⁻¹,再生频率分别高达95.3%和96.9%,每外植体平均再生芽分别为3.8个和3.6个,可以满足菊花遗传转化的要求。

高亦珂^[7]认为,叶盘对激素的反应的最适范围为6-BA 1~5 mg · L⁻¹。黄丽云^[12]在对非洲菊的叶片再生研究中发现,6-BA浓度大于10 mg · L⁻¹时容易产生褐化现象,随着浓度的升高,褐化现象趋于严重。本试验中,6-BA浓度为2.0 mg · L⁻¹时,菊花叶片再生芽出现玻璃化,部分褐化;浓度为4.0 mg · L⁻¹时无芽分化,叶片褐化加重。吕晋慧^[11]在对菊花“紫研”品种的再生研究中认为,高浓度NAA有利于提高叶片外植体的再生能力和消除褐化现象。在本试验中,含2,4-D和IBA再生培养基中叶盘均有不同程度的褐化,而含NAA的再生培养基中,叶片外植体无褐化现象。研究中发现,NAA诱导的芽丛生较密集,IBA诱导的叶盘再生频率低,诱导产生的不定芽叶片较大,叶色浓绿,生长健壮。

NAA和IBA对诱导芽生根有影响。刘军^[13]在研究日本黄、千头菊、国华积福3个菊花品种生根试验中,认为IBA对根诱导效果好于NAA。本试验中,NAA诱导生根最适浓度的平均生根数达10.9个,根短而粗,健壮,与刘军的结果基本一致,但IBA诱导的根细长,平均生根数少于NAA。

TDZ是一种棉花脱叶剂,具有较强的细胞分裂活性^[14]。近年来的研究表明,TDZ在一些难再生品种上有较好的作用^[15],而在本试验中,TDZ处理没有芽的分化,TDZ 0.5 mg · L⁻¹处理有愈伤分化,随着浓度升高,叶盘褐化现象加重。由于TDZ活性远高于6-BA,因此试验中所取浓度对菊花叶片还是太高,进一步降低TDZ浓度可能促进菊花叶盘愈伤分化出芽,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙向丽,张启翔,潘会堂. 菊花采后生理与技术研究进展[J]. 西北林学院学报,2006,21(6):84-89.
- [2] HILL G P. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* 'Bronze Pride'[J]. *Physiol Plant*, 1968, 2: 386-389.
- [3] ROEST S, BOKELMANN G S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram in vitro [M]. *Sci Hortic*, 1975, 3(4): 317-330.
- [4] BUSH SUSAN R, EARLE E D, LANGHANS R W. Plants from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'[J]. *American Journal of Botany*, 1976, 63(6): 729-737.
- [5] TANAKA K, KANNO Y, KUDO S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Chrysanthemum* [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat) Kitamura][J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 946-953.
- [6] 司怀军,戴朝曦,于品华,等. 菊花幼嫩花瓣愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 甘肃农业大学学报,1998,33(2):175-177.
- [7] 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):32-33.
- [8] 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.
- [9] 李辛雷,陈发棣,王红,等. 菊花外植体再生体系的研究[J]. 上海农业学报,2004,20(2):13-16.
- [10] 曹汝义,刘国民. 植物组织培养教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996:9-12.
- [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):98-100.
- [12] 黄丽云. 非洲菊高效再生体系的建立与双抗虫基因转化的研究[D]. 儋州:海南热带农业大学,2006.
- [13] 刘军,赵兰勇,丰震,等. 菊花叶片离体高效再生体系的建立[J]. 山东农业大学学报,2004,35(2):177-182.
- [14] HUETTEMAN C A, PREECE J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 33:105-119.
- [15] 张志宏,景士西,王关林. TDZ对苹果叶片离体再生不定芽的效应[J]. 植物生理学通讯,1997,33(6):420-423.