

单头亚菊的组织培养与快速繁殖

红歌, 吴潇波, 谢菲, 赵惠恩*

北京林业大学园林学院, 北京100083

摘要: 以单头亚菊茎段为外植体对其进行组织培养, MS为基本培养基, 设置不同激素浓度配比。对实验结果进行观察分析, 筛选出合适的配方。启动培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA。继代培养基为MS+0.75 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA, 可获得较高的增殖率。不定根最适诱导培养基为1/2MS+0.15 mg·L⁻¹ IBA, 生根率达87%以上, 组培苗移栽成活率达98%。

关键词: 单头亚菊; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Ajania scharnhorstii* (Rgl. et Schmalh.) Tzvel.

HONG Ge, WU Xiao-Bo, XIE Fei, ZHAO Hui-En*

College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: The tissue culture technology of *Ajania scharnhorstii* was studied in this research. Bud formation on the nodal explants was induced on an optimal medium MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA. To get a high propagation ratio, the seedlings were transferred to the medium of MS+0.75 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA. The optimal medium for adventitious root inducing was 1/2MS+0.15 mg·L⁻¹ IBA and the rooting rate was at least 87%. The rooted and acclimated plantlets were transferred outdoors with 98% transplantation success.

Key words: *Ajania scharnhorstii*; tissue culture; rapid propagation

单头亚菊, 菊科亚菊属小半灌木, 高4~10 cm。根木质, 直径可达2 cm (林榕和石铸1983)。单头亚菊分布于3 900~5 100 m高海拔山坡石隙等处, 是良好的野生种质资源, 其耐寒和耐旱性极强, 通过杂交可将其高度抗旱、抗寒的优良性状引入现代菊花育种中, 从而培育出适宜青海、西藏等高寒地区绿化、美化等应用的菊花新品种。单头亚菊的木质化枝条扦插不易生根, 分布区狭小, 难采集, 引种不易成活。目前, 国内外对单头亚菊的研究较少, 对其组织培养和快速繁殖的研究尚未见报道。通过组织培养可大规模扩繁单头亚菊, 提高其引种成功率, 为将其极强的抗性基因进一步应用于菊花园林育种奠定基础。由于亚菊属与菊属亲缘关系较近(吴国胜等2008; 赵宏波等2008), 可利用亚菊属优良的种质资源, 对栽培菊花进行改良和种质创新。

材料与amp;方法

1 实验材料

本实验所用外植体为国家花卉工程技术研究

中心沙河基地2011年引自西藏自治区定日县海拔5 000 m处的单头亚菊[*Ajania scharnhorstii* (Rgl. et Schmalh.)]的当年新生嫩茎。

2 方法

2.1 外植体的准备及无菌体系的建立

选取生长健壮、无病虫害的优良单头亚菊植株。将其茎段截成长1.0~1.5 cm的带节小段, 去掉部分叶片, 用洗洁精进行清洗, 后用流水冲洗30 min左右。在超净工作台上先用75%的酒精浸泡20~30 s, 无菌水冲洗2遍, 再用1 g·L⁻¹的升汞溶液进行消毒处理, 无菌水冲洗4遍后, 接种于启动培养基上。消毒时间设定为5、6、7和8 min, 每种处理20个外植体, 重复3次, 筛选出最佳灭菌时间。

2.2 启动培养基的筛选

以MS为基本培养基, 设置3个6-BA浓度

收稿 2013-07-15 修定 2013-10-13

资助 国家自然科学基金(30970207)。

* 通讯作者(E-mail: zhaohuien@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62338817)。

0.25、0.5和1.0 mg·L⁻¹, NAA浓度为0.01 mg·L⁻¹, 培养基中分别附加30 g·L⁻¹蔗糖和7 g·L⁻¹琼脂, pH为5.8~6.1。培养温度为(25±2) °C; 光照强度25 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间16 h·d⁻¹。观察不同处理对丛生芽形成与生长的影响, 筛选合适的启动培养基。

2.3 继代培养基的筛选

采用L₉ (3⁴)的正交试验设计, 以MS为基本培养基(琼脂7 g·L⁻¹, 蔗糖30 g·L⁻¹), 6-BA浓度分别为0.5、0.75和1.0 mg·L⁻¹, NAA浓度分别为0.01、0.05和0.1 mg·L⁻¹的两因素三水平设计试验, 以繁殖系数和生长势为指标, 筛选合适的培养基。

按照正交试验设计的激素配比, 将启动培养基上无菌植株或丛生芽剪成带有4~5片叶、长约1.5 cm的小段分别转接到不同激素配比的增殖培养基中。每处理10瓶, 重复3次, 培养条件同初代培养。观察不同培养基对试管苗长势的影响。繁殖系数=同一激素浓度处理生长的侧芽总数/总处理瓶数。生长势按生长状况从差到好分为5级(叶片发黄, 植株低矮长势差; 小叶1~5片, 长势较弱; 小叶5~10片, 生长良好; 芽有小叶10~15片, 可展开; 芽有15~20片绿色舒展的小叶, 植株健壮), 相应分数为1~5分(郑燕等2011)。

2.4 生根培养基的筛选

选择生长健壮、长势一致的组培植株, 分别转接到不同激素及其不同配比的培养基中生根, 以1/2MS为基本培养基(琼脂7 g·L⁻¹, 蔗糖30 g·L⁻¹), 分别添加浓度为0.1、0.15和0.2 mg·L⁻¹的IBA和NAA (张孟仁2008)。统计生根数、生根率以及愈伤组织的形成状况。2种激素每个浓度处理10瓶, 重复3次, 筛选合适的生根培养基。

结果与讨论

1 无菌培养体系的建立

从表1中可看到, 随着消毒时间的增加, 外植

体的污染率明显下降, 而成活率先升高后降低, 说明灭菌时间需控制在一定范围内。升汞溶液消毒处理8 min的污染率最低, 为10%, 但消毒6 min的成活率最高, 为60%。综合污染率和成活率两方面的因素, 升汞溶液消毒处理6 min最为合适。

2 单头亚菊的启动培养

外植体接种3 d后, 生长点开始膨大; 7 d左右绿色芽点冒出, 继而分化出不定芽或愈伤组织(图1-A)。6-BA浓度过高或者过低都不利于单头亚菊分化丛生芽。培养基MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+ 0.01 mg·L⁻¹ NAA中的植株仅生成少量丛生芽且大都质地脆弱枯黄, 并有大量愈伤组织形成, 植株畸形, 玻璃化严重。培养基MS+0.25 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA中的植株瘦弱、丛生芽分化缓慢、量少, 且节间变大叶片瘦小。而培养基MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA中的无菌苗能够分化出大量丛生芽, 且芽苗壮实, 无愈伤组织, 为单头亚菊丛生芽分化的最佳培养基。

3 单头亚菊的继代培养

增殖培养采用茎段剪切的方式进行繁殖, 将启动培养基中萌发的长势及叶片数量基本一致的茎段接种到继代培养基中, 3周后陆续分化出不定芽。

由表2可知, 接种到培养基MS+0.75 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA的茎段繁殖系数最高, 为4.01, 即1个茎段经过3周后分化出4~5个新的茎段, 且植株健壮, 芽有15~20片绿色舒展的小叶(图1-B)。

4 单头亚菊的生根诱导

将继代增殖中生长健壮、植株大小基本一致的丛生芽接种到生根培养基中(图1-C), 2周以后组培苗均开始长出大量根系(图1-D)。

由表3可知, NAA与IBA对单头亚菊生根均具有诱导作用。如添加0.15 mg·L⁻¹ NAA的单头亚菊

表1 不同消毒时间对单头亚菊污染率和成活率的影响

Table 1 Effects of different sterilization time on the contaminated rate and survival rate of *A. scharnhorstii*

消毒时间/min	外植体个数/个	平均污染数/个	污染率/%	平均成活数/个	成活率/%
5	20	13	65	3	15
6	20	8	40	12	60
7	20	5	25	4	20
8	20	2	10	2	10



图1 单头亚菊的组织培养与植株再生

Fig.1 Tissue culture and plant regeneration of *A. scharnhorstii*

A: 不定芽分化; B: 茎段增殖; C: 生根诱导前的丛生芽; D和E: 生根苗; F: 炼苗移栽。

表2 不同浓度6-BA和NAA对单头亚菊增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on the multiplication of *A. scharnhorstii*

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	繁殖系数	生长势	生长状况
0.50	0.01	3.46	3.11	长势一般, 茎段细弱
0.50	0.05	2.96	2.78	长势一般, 叶片变小卷曲
0.50	0.10	3.21	2.98	长势一般, 植株瘦弱
0.75	0.01	4.01	4.25	长势良好, 植株健壮
0.75	0.05	2.87	3.01	长势一般, 叶片变黄
0.75	0.10	3.23	3.13	长势一般, 部分植株出现叶片玻璃化现象
1.00	0.01	3.01	2.98	长势一般, 植株部分畸形, 玻璃化
1.00	0.05	2.32	2.69	长势不良, 植株畸形, 玻璃化, 叶片枯黄的现象
1.00	0.10	2.01	2.43	长势不良, 植株畸形, 玻璃化严重, 叶片枯黄

表3 不同浓度NAA和IBA对单头亚菊生根的影响

Table 3 Effects of different concentrations of NAA and IBA on the rooting of *A. scharnhorstii*

培养基	平均生根数/条	平均根长/cm	生根率/%	愈伤组织	根系状况
1/2MS+0.10 mg·L ⁻¹ NAA	2.11	1.81	63	有, 极少	肉质根系基部有少量愈伤组织
1/2MS+0.15 mg·L ⁻¹ NAA	5.22	2.55	90	有, 较多且大	根系最发达且均根最长, 但有畸形现象, 根系基部有大量愈伤组织, 不适于移栽
1/2MS+0.20 mg·L ⁻¹ NAA	1.59	1.38	67	有, 量多且大	基部愈伤组织量多且大, 在全部培养基中愈伤组织体积最大, 有玻璃化现象, 不适于移栽
1/2MS+0.10 mg·L ⁻¹ IBA	2.04	1.55	73	无	根系细弱, 植株黄化
1/2MS+0.15 mg·L ⁻¹ IBA	3.89	2.45	87	无	根系较为发达, 且无愈伤组织, 植株长势健壮, 适于移栽
1/2MS+0.20 mg·L ⁻¹ IBA	1.13	1.18	60	无	根量较少, 植株瘦弱

与其他两个浓度的根系相比, 根系最发达且平均根最长, 低于这一浓度其根系量明显减少, 而高于

这一浓度又产生了大量的愈伤组织。添加0.15 mg·L⁻¹ IBA的情况类似, 其生根情况最佳, 根系较为

发达,且无愈伤组织,植株长势健壮,适于移栽;而添加 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的根系细弱,植株黄化;添加 $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的根量较少,植株瘦弱。

NAA对愈伤组织的形成和生根数有促进作用,但添加NAA的根系较为肥大、短粗;添加IBA的根系较为细长。虽然相同浓度的NAA的平均生根率普遍要高于IBA的,但是其根部有少量愈伤组织形成,不利于单头亚菊的移栽。

而添加 $0.15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的植株叶色深绿,根系分布均匀且生长较快、白色,每株高矮、叶宽均较一致(图1-E),幼苗生长状况较好。因此从生根率、平均根数和根长、愈伤组织的多少以及幼苗素质综合考虑,单头亚菊生根较适宜的培养基为 $1/2\text{MS}+0.15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA。

在培养后期对单头亚菊扩繁配方的优化中可以尝试结合NAA和IBA一起使用,使得诱导的植株不仅生根率高、基本无愈伤组织而且成活率高(戴云新等2009;尚宏芹2010)。

5 单头亚菊的炼苗与移栽

当植株的根长到 $2\sim 3\text{ cm}$,在培养室里将生根苗的瓶盖打开,炼苗2 d后拿到温室中,用镊子小心将苗从培养瓶中取出,用清水洗净黏附于苗根系

上的培养基,然后将其移栽到砂子:蛭石:草炭=2:2:1的基质中。

然后栽种到经过高锰酸钾灭菌的河沙中,浇透水,喷施“绿亨2号”(广谱性杀菌剂),防止烂根。将移栽好的苗放到阴凉处1周,注意保湿,待生长稳定后放到阳光下让其生长,移栽后的成活率达98%左右(图1-F)。

参考文献

- 戴云新,张健,李敏,李玉娟(2009). NAA和IBA对非洲菊组培苗生根的影响. 安徽农业科学, 37 (19): 8845~8847
- 林谔,石铸(1983). 中国植物志,第七十六卷第一分册. 北京: 科学出版社, 115~116
- 尚宏芹(2010). 甜叶菊组培苗生根培养的研究. 北方园艺, (6): 170~172
- 吴国胜,陈发棣,陈素梅,赵宏波,房伟民(2008). 基于PCR-RFLP多态的部分菊属与亚菊属植物亲缘关系研究. 江苏农业科学, (2): 58~61
- 张孟仁(2008). IBA和NAA处理菊花扦插生根试验. 北方园艺, (9): 130~131
- 赵宏波,陈发棣,郭维明,汤访评,房伟民(2008). 菊属与春黄菊族部分属间杂交亲和性初步研究. 南京农业大学学报, 31 (2): 139~143
- 郑燕,沈景,韩倩,赵慧恩(2011). 紫花亚菊的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 47 (10): 983~986