



## 研究报告

### Research Report

# 菊花预处理, 表面灭菌, 再生, 伸长和驯化的流程标准化

Arvind Kumar Verma<sup>✉</sup>, K. V. Prasad<sup>✉</sup>, T. Janakiram<sup>✉</sup>, S. Kumar<sup>✉</sup>

Division of Floriculture and Landscaping, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi – 110 012, India

✉ 通讯作者: [arvindhort@gmail.com](mailto:arvindhort@gmail.com); ✉ 作者

植物药与药理学杂志, 2012年, 第1卷, 第8篇 doi: [10.5376/jpmpp.cn.2012.01.0008](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2012.01.0008)

收稿日期: 2012年12月26日

接受日期: 2012年12月26日

发表日期: 2012年12月27日

本文首次发表在《International Journal of Horticulture》(2012, Vol.2, No.3)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

Arvind K.V.等, 2012, 菊花预处理, 表面灭菌, 再生, 伸长和驯化的流程标准化, 植物药与药理学杂志(online) Vol.1 No.8 pp.1-5 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2012.01.0008](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2012.01.0008))

引用格式(英文):

Arvind et al., 2012, Standardization of Protocol for Pre-treatment, Surface Sterilization, Regeneration, Elongation and Acclimatization of *Chrysanthemum morifolium* Ramat, Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi (online) Vol.1 No.8 pp.1-5 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2012.01.0008](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2012.01.0008))

**摘要** 目前的研究中, 我们开发了一套体外再生专业流程, 从泰国陈皇后菊花的舌状花以获得新的突变体。菊花舌状花使用代森锰锌-45 (0.1%)+多菌灵(0.1%)+ 8-HQC (200 mg/L)培养 3 小时, 培养物的成活率最大(89.44%)。使用 HgCl<sub>2</sub>(0.1%)对舌状花进行表面杀菌 4 分钟, 效果最好, 成活率达 91.04%。向 MS 培养基中添加 4 mg/L BAP 和 0.1 mg/L NAA, 再生率最高(93.33%), 每个外植体的微芽数最多(5.67)和芽再生所需天数最少(30.67 天)。再生植株被转移到添加 GA<sub>3</sub> 0.50 mg/L 对于再生芽伸长最好, 达 30 天。聚丙烯盖子的玻璃罐中 1:1 装上泥炭+组培土, 将伸长的植物体转移其中, 驯化成功。驯化 25 天后, 完成植株体淬火, 然后将植物转移到温室开花。

**关键词** 菊花, *Chrysanthemum morifolium*, 生长调控, 体外培养, 芽再生, 驯化

## Standardization of Protocol for Pre-treatment, Surface Sterilization, Regeneration, Elongation and Acclimatization of *Chrysanthemum morifolium* Ramat

Arvind Kumar Verma<sup>✉</sup>, K. V. Prasad<sup>✉</sup>, T. Janakiram<sup>✉</sup>, S. Kumar<sup>✉</sup>

Division of Floriculture and Landscaping, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi – 110 012, India

✉ Corresponding author, [arvindhort@gmail.com](mailto:arvindhort@gmail.com); ✉ Authors

**Abstract** In the present study we have developed proficient in vitro regeneration protocol from the ray florets of chrysanthemum cv. Thai Chen Queen to isolate the novel mutants. The maximum survival percentage (89.44%) of cultures was found when the ray florets were pre-treated with mancozeb-45 (0.1%) + carbendazim (0.1%) + 8-HQC (200 mg/L) for 3 hours. Culture establishment was found best (91.04%) when the ray florets surface sterilized with HgCl<sub>2</sub> (0.1%) for duration of four minutes. Murashige and Skoog (MS) media supplemented with 4 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA was found to be the best for regeneration percentage (93.33%), number of microshoots per explants (5.67) and minimum days required for shoot regeneration (30.67). The regenerated plantlets were transferred on the MS media supplemented with GA<sub>3</sub> 0.50 mg/L was found to be the best for shoot elongation after 30 days of elongation. The successful acclimatization of elongated plantlets was achieved by transferring them into glass jar with polypropylene cap filled with peat + soilrite (1:1). The hardening of plantlets was completed after 25 days of acclimatization and then plants were transferred to greenhouse for flowering.

**Keywords** Chrysanthemum; *Chrysanthemum morifolium*; Growth regulators; In vitro culture; Shoot regeneration; Acclimatization

菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)作为切花和盆栽植物, 是国际花卉市场上一种重要的观赏植物。切花中, 它排名仅次于玫瑰, 是第二名, 在观赏植物的世界贸易市场上占据主导地位(Kumar et al., 2006)。传统育种和最近结合遗传与分子技术育种, 一直专注于通过改善植物的花色、花型(大小和形状)、营养体高度、生长形式以及对光线质量/数量的敏感性来增强植物的观赏价值(Rout and Das, 1997)。菊花品种的改善已经通过一些育种方法做了一些。菊花被认为是一种良好的诱发突变的材料。诱发突变的目的是, 提高开发的植物新品种在短时间内的突变率。在花卉栽培的现代化和工业化中, 人们总是需要新的变异, 按照消费者的需求来培育, 以使其满意(Misra et al., 2003)。

植物无性繁殖的主要瓶颈发生在使用物理/化学诱变剂处理后突变体出现部分嵌合的时候。虽然如果发生完全突变, 可以隔离分支的一部分或整个分支, 但很难隔离这些范围上有限的、可能只表达为一朵小花上有颜色条带的突变体/嵌合体(Mandal and Datta, 2005)。伴有再生体外实验的突变育种将会是有用的途径来建立纯的



表 1 不同预处理对污染物和外植体生存的影响

Table 1 Effect of different pre-treatments on contamination and explants survival

Treatment	Microbial contamination (%)	Explants survival (%)
Control (distilled water shake)	94.44 (76.55) *	5.56 (13.49)
Mancozeb solution (0.1%)	77.78 (62.19)	22.22 (27.85)
Mancozeb (0.1%) + Carbendazim (0.1%)+8-HQC (200 ppm) -3 hrs	15.56 (22.92)	89.44 (67.12)
Mancozeb (0.2%) + Carbendazim (0.2%) +8-HQC (200 ppm) -3 hrs	8.89 (17.29)	75.56 (60.61)
SEm±	2.50	2.50
CD at 5 %	8.23	8.29

\* Arc sin $\sqrt{\%}$  transformed data

表 2 表面灭菌对污染物和外植体生存的影响

Table 2 Effect of surface sterilization on contamination and explants survival

Treatment	Microbial contamination (%)	Explants survival (%)
Control (distilled water shake) – 2 min	90.00 (71.76) *	10.00 (18.28)
HgCl <sub>2</sub> (0.1%) – 2 min	24.44 (29.43)	75.56 (60.61)
HgCl <sub>2</sub> (0.1%) – 4 min	15.56 (23.04)	91.04 (67.00)
HgCl <sub>2</sub> (0.1%) – 6 min	7.78 (15.64)	51.77 (45.97)
SEm±	2.73	2.73
CD at 5 %	9.04	9.04

\* Arc sin $\sqrt{\%}$  transformed data

表 3 表面灭菌对污染物和外植体生存的影响

Table 3 Effect of surface sterilization on contamination and explants survival

Plant growth regulators (mg/L)		Shoot regeneration (%)	Days required for shoot regeneration	Number of micro-shoots
BAP	NAA			
0.0	0.0	0.00 (0)*	50.33	1.00
3	0.1	26.67 (31.11)	47.33	1.33
3	0.5	51.11 (45.63)	41.00	2.33
3	1.0	66.67 (66.97)	37.33	2.33
4	0.1	93.33 (75.00)	30.67	5.67
4	0.5	71.11 (57.48)	37.33	5.00
4	1.0	48.89 (48.97)	38.67	4.67
5	0.1	35.56 (36.57)	40.00	3.33
5	0.5	24.44 (29.63)	42.33	1.67
5	1.0	8.89 (17.36)	47.33	0.67
SEm±		5.31	0.72	0.51
CD at 5 %		15.76	2.15	1.50

\* Arc sin $\sqrt{\%}$  transformed data

新突变、促进菊花大范围新颜色培养物的生产(Verma et al., 2005)。报道指出, 间接再生干细胞来自于茎、花瓣、再生芽尖的愈伤组织。但来自最初的愈伤组织阶段的芽进行不定再生可能导致体细胞无性系变异和嵌合现象(直接来自叶子或茎外植体的芽再生)可能消除这种不受欢迎的情况。尽管体细胞无性系变异的发生在营养组织, 菊花舌状小花组织也能够生成独立的固态突变体(Pillai and Zulkifli, 2000)。舌状小花的直接再生规范在嵌合突变的隔离上、在开发一系列通过射线诱导新的花色/花形突变体上得到了成功应用(Datt et al., 2005)。根据所用外植体类型的不同, 菊花单色突变体的恢复效率是不同的。菊花单色突变体中, 舌状小花再生的植株的回收率最大(Mandal et al., 2000)。因此, 前提需要建立菊花的舌状小花体外再生规范, 以便利用诱发突变和隔离纯的新突变体。

## 1 结果与分析

### 1.1 标准化预处理

对舌状小花进行不同预处理, 在组培建立上产生的影响显著。表 1 中的数据表明, 用不同浓度的杀菌剂(多菌灵、代森锰锌和杀虫剂)对外植体进行预处理, 与对照相(蒸馏水浸)比, 8-HQC 显著降低微生物负载、改



善生存比例。使用代森锰-45(0.1%)+多菌灵(0.1%)+ 8-HQC(200 mg / L), 对舌状小花的预处理 3 个小时, 是最好的处理条件。与对照和其他处理相比, 外植体杂质含量最低(15.56%)、存活率最高(89.44%)。代森锰-45(0.2%)+多菌灵(0.2%)+ 8-HQC(200 mg/L)预处理 3 小时, 微生物污染率 8.89%, 存活率 75.56%, 统计学上低于代森锰-45(0.1%)+多菌灵(0.1%)+ 8-HQC (200 mg / L) 处理 3 小时。目前的与 Bala 等(2010)在玫瑰中的一致, 多菌灵(0.2%)+代森锌 M-45 消炎痛®(0.2%)+ 8-HQC (200 mg/L)搅拌 3h 时外植体存活率最高(62.47%)、发芽率最高(56.63%)。Kadam 等(2010)发现晚香玉花瓣及未成熟花的最佳预处理是: 多菌灵 0.1% + 0.1%代森锰锌和 8-HQC(200 mg/L) 2.5h。

## 1.2 外植体的标准化表面灭菌

分析表 2 中给出的数据得到, 外植体的表面灭菌使用 0.1%  $HgCl_2$  处理 4 分钟的污染比例低(15.56), 存活率最大(91.04%), 对照存活率为 10.00%。 $HgCl_2$  (0.1%)对外植体表面灭菌 6 分钟, 使微生物污染(7.78%)显著降低、存活率(51.77%)明显减少。接种 10 天内引起外植体干燥, 这可能是由外植体长时间暴露在  $HgCl_2$  环境下产生毒性所引起。统计学上, 所有的处理彼此间显著不同。Verma 等(2011)也报道, 甜叶菊 0.1%  $HgCl_2$  表面灭菌存活率最大和微生物污染较小, 与我们的发现非常接近。在另一份报告中, 用家用洗涤剂清洗节点外植体去除杂质, 在自来水下彻底清洗, 然后用 70%酒精消毒 2 分钟, 接着 1%  $HgCl_2$  灭菌 2~3 分钟(Ilahi et al., 2007)。

## 1.3 BAP 和 NAA 对芽再生的影响

受伤的舌状小花在 MS 培养基中培养, 使用不同浓度的 BAP 和 NAA 强化再生。表 3 中给出的数据显示, 和对照(MS 中缺乏激素)相比, 添加 BAP 和 NAA 的 MS 培养基的芽再生率显著增强。添加 BAP (4 mg/L) + NAA (0.1 mg/L)的 MS 培养基, 其芽再生率(93.33%)显著高于 MS + BAP (4 mg/L) + NAA (0.5 mg/L) (71.11%), 接下来是 MS + BAP(3 mg / L)+ NAA(1.0 mg / L)(66.67%)和 MS + BAP(3 mg / L)+ NAA(0.5 mg / L)(51.11%)。BAP (4 mg/L) + NAA (0.1 mg/L)的 MS 培养基上, 微芽数最多(5.67), 天数最少(30.67), 相较于其他处理有显著的统计学意义。这些观察结果与其他人有关菊花舌状小花嵌合体的微芽再生的结论十分相似(Kumar et al., 2004; Latado et al., 2004)。通过刷叶表面给叶片外植体造成机械伤害可以增加大花蔷薇的芽再生能力(de Jong et al., 1993)。我们也培养了受伤的舌状小花, 发现舌状小花最早的再生发生于受伤的部分。添加高浓度 BAP 与低浓度 NAA, 启动不定芽和再生芽初步形成后的分化过程。众所周知, 细胞分裂素施用后, 第一步促进细胞分裂过程, 然后, 形成大量愈伤组织, 接着分化成再生芽原始细胞、器官形成和苗再生。

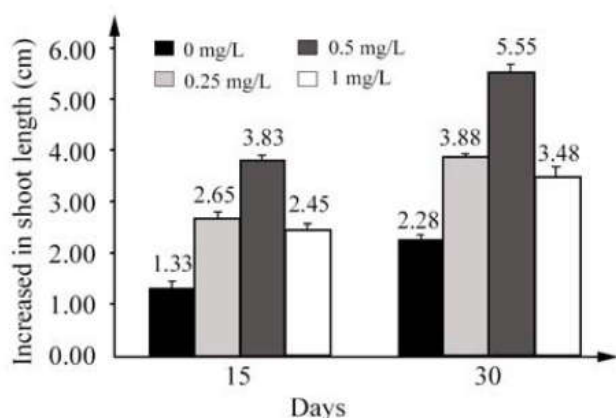


图 1 GA<sub>3</sub> 在微芽伸长中的作用

Figure 1 Effect of Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on microshoot elongation

## 1.4 GA<sub>3</sub> 对伸长的影响

无根试管苗再生分别转移到伸长介质——添加各种浓度 GA<sub>3</sub> 的 MS 培养基, 显著影响再生芽的生长, 使其成为长、厚、结实和强壮的茎, 和长势良好的、深绿色的、延伸的叶子。在这个过程中, 小的再生芽达到一个最佳高度, 以便可以转向生根。30 天后再生芽长度最长(5.55 厘米), MS 培养基上添加 0.50 mg/L GA<sub>3</sub> 再生芽长度要远大于在 MS 培养基中添加 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> (3.88 厘米)和 1.0 mg/L GA<sub>3</sub> (3.48 厘米)(图 1)。所有这些处理都具有统计学意义。无激素的 MS 培养基(对照)的无根试管苗最短(2.28 厘米)。Shruti 等(2011)研究 GA<sub>3</sub> 对甜叶菊体外生长中再生芽伸长的影响, 发现包含 0.5 mg/L GA<sub>3</sub> 的培养基伸长量最大(3.5)。伸长的无根试管苗在生根和硬化过程中降低了死亡风险。赤霉素在多种作物中有诱导茎伸长的作用。茎的伸长不是由于节点和节间的形成增



多, 而是由于细胞分裂和细胞伸长导致的节间快速伸长。赤霉素参与一些重要的生化和形态形成反应, 包括促进轴向器官伸长, 如茎和花梗, 刺激根系生长(Srivastava, 2005)。

表 4 不同处理对淬火的影响

Table 4 Effect of different strategies on hardening

Treatment	Survival (%)	Number of leaves/plant	Plant height (cm)	Days taken to glasshouse transfer
Glass jar with polypropylene cap filled with peat+ soilrite (1:1)	95.00 (79.21) *	31.50	22.45	21.00
Plastic pot with polythene cover filled with peat+ soilrite (1:1)	75.00 (60.29)	25.00	16.60	28.75
SEm±	3.61	0.98	0.97	0.84
CD at 5 %	12.72	3.45	3.42	2.32

\* Arc sin  $\sqrt{\%}$  transformed data

## 1.5 植物体的驯化

为了成功获得驯化的植株, 植物体转移到聚丙烯盖子的玻璃瓶中, 其中装有泥炭+ 组培土(1:1)和 1/2 浓度的 MS 培养基(缺乏生长调节剂、钙、有机物和蔗糖), 此条件下培养的存活率最大(95.00), 株高最高(22.45 厘米), 每个植物的叶子数(31.50)最多, 温室移栽所需生长天数最少(21.00)(表 4)。驯化 20~25 天后植物就可以准备转移到温室。这些结果与早期人们在菊花中的研究一致(Mandal and Datta, 2005; Nahid et al., 2007)。

## 2 材料与方

### 2.1 植物材料

使用  $\gamma$  射线处理泰国陈皇后的切花, 将之种植在温室中。当植物开花时, 后代会出现不同类型的花色突变体。

### 2.2 外植体的选择和制备

出现在  $M_1$  代的舌状花突变体作为体外再生的外植体。收集到的材料被带到实验室, 用流动的自来水彻底清洗 30 分钟。整个花用 0.1% 界面活性剂® 方案清洗 8~10 分钟, 再用流动的自来水冲洗 10~15 分钟。整个花朵进行预处理, 然后在 0.1% 代森锰锌 45 + 0.1% 多菌灵, 8-羟基喹啉柠檬酸(HQC)+ 200 mg / L 上接种 2 h。然后用 0.1%  $HgCl_2$  进行表面消毒 3 分钟, 紧随其后, 3~4 倍使用无菌双蒸馏水冲洗。

### 2.3 接种和培养条件

所有无菌操作在装有高效空气过滤器 (0.22 $\mu$ m) 和燃烧器的分层气流室中进行。使用前, 层流气流室的工作表面用乙醇(100%)彻底擦洗。所需的接种材料使用蒸汽消毒。每个射线处理的小花均使用无菌手术刀剪下, 然后接种在培养基上(Murashige and Skoog, 1962)。培养基中添加 3% 蔗糖、0.72%(w/v) 琼脂和不同浓度组合的 BAP、NAA、GA<sub>3</sub>。培养基条件为: pH 值 5.8 $\pm$ 0.1, 121 $^{\circ}$ C、15 psi 高压灭菌 15 min。培养物接种在培养室, 使用白色日光灯提供一个恒定的光周期(光/暗 16/8 h), 光强度 000 Lx, 温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 60%~70%。

### 2.4 媒体和体外再生的植物生长调节剂

Murashige 和 Skoog (1962) 向再生培养基中添加不同浓度与组合的 BAP (3, 4, 5 mg/L) 和 NAA (0.1, 0.5, 1 mg/L)。成倍增加的再生芽被分离出来, 个别微芽移到 MS 培养基基底+各种浓度的 GA<sub>3</sub> (0.25, 0.5, 1 mg/L) 中进行再生芽伸长。

### 2.5 植株的驯化

为了适应环境, 植株体被从体外试验条件转移到活体外试验条件下, 分别装入内装 1:1 的泥炭+ 组培土的、有聚丙烯盖子的玻璃罐, 和装有泥炭+ 组培土(1:1)聚乙烯塑料罐。20 到 25 天的硬化后, 植物转移到温室等待开花。

### 2.6 实验设计和统计分析

试验采取完全随机实验设计(CRD)。数据统计分析使用方差分析技术(ANOVA)。每个处理有 20 组, 三个重复。所有百分比数据进行 arcsin 比例转换, 之后再行方差分析。

## 作者贡献



Arvind Kumar Verma 负责写作学位论文、进行实验; K. V. Prasad 是顾问小组主席; T. Janakiram 是部门负责人、提供必要实验仪器; S. Kumar 为实验技术助理。

## 致谢

诚挚感谢 ICAR 在作者于新德里求学时提供的初级研究奖学金。

## 参考文献

- Bala M., Singh K.P., and Prasad K.V., 2010, Standardization of in vitro mass multiplication protocol for hybrid tea rose cv. Pusa Mohit, *Indian J. Hort.*, 67(2): 225-229
- Datta S.K., Misra P., and Mandal A.K.A. 2005, In vitro mutagenesis- A quick method of for establishment of solid mutant in chrysanthemum, *Curr. Sci.*, 88(1): 155-158
- de Jong J., Rademaker W., and van Wordragen M.F., 1993, Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32: 263-70, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00042287>
- Ilahi I., Jabeen M., and Sadaf S.N., 2007, Rapid clonal propagation of chrysanthemum through embryogenic callus formation, *Pak. J. Bot.*, 39: 1945-1952
- Kadam G.B., Singh K.P., Singh A.K., and Jyothi R., 2010, In vitro regeneration of tuberose through petals and immature flower buds, *Indian J. Hort.*, 67(1): 76-80
- Kumar S., Kanwar J.K., and Sharma D.R., 2004, In vitro regeneration of *Gerbera jamesonii* Bolus from leaf and petiole explants, *J. Plant Biochem. Biotech.*, 13: 73-75
- Kumar S., Prasad K.V., and Choudhary M.L., 2006, Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers, *Current Sci.*, 90(8): 1108-1113.
- Latado R.R., Adames A.H., and Neto A.T., 2004, In vitro mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 77: 103-106, doi:10.1023/B:TICU.0000016481.18358.55
- Mandal A.K.A., and Datta S.K., 2005, Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum, *Biol. Plant.*, 49: 29-33, <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-005-0033-6>
- Mandal A.K.A., Chakrabarty D., Datta S.K., 2000, Application of in vitro techniques in mutation breeding of chrysanthemum, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 60:33-38, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006442316050>
- Misra P., Datta S.K., and Chakrabarty D., 2003, Mutation in flower colour and shape of chrysanthemum induced by gamma radiation, *Biol. Plant.*, 47(1): 153-156, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1027365822769>
- Nahid J.S., Saha S., and Hottori K., 2007, High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. in vitro, *Pak. J. Biol. Sci.*, <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2007.3356.3361>
- Pillai V., and Zulkifli L., 2000, Somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium* generated through petal cultures, *J. Trop. Agric. Food Sci.*, 28: 115-20
- Rout G.R., and Das P., 1997, Recent trends in the biotechnology of chrysanthemum: A critical review, *Sci. Hort.*, 69: 239-257, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00008-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00008-3)
- Srivastava, L.M., 2005, *Plant growth and development: Hormones and environment*. Academic Press, An imprint of Elsevier, San Diego, USA, pp:172-188
- Verma A.K., Prasad K.V., Singh S.K., and Kumar S., 2012, In vitro isolation of red coloured mutant from chimeric ray florets of chrysanthemum induced by gamma-ray, *Indian J. Hort.*, 69(4): 562-567
- Verma S., Yadav K., and Singh N., 2011, Optimization of the protocols for surface sterilization, regeneration and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 11 (2): 221-227