

# 杭白菊茎尖组织培养及试管苗繁殖技术研究

鄧 慧, 高山林<sup>①</sup>

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

**摘要** 采用茎尖组织培养技术,建立了杭白菊中大洋菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)的无菌试管苗体系。通过基本培养基和激素配比实验,筛选出杭白菊试管苗快速繁殖的最佳培养基组成。结果表明:最适宜的外植体为直径0.3 mm的茎尖;诱导丛生芽的最适培养基为:MS+6-BA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 0.02 mg·L<sup>-1</sup>;诱导试管苗生根的最适培养基为:1/2MS+IAA 0.7 mg·L<sup>-1</sup>。用电子显微镜进行病毒检测后,筛选出2个脱病毒株系,脱病毒试管苗可作为今后提供优质种苗的种源。

**关键词:** 杭白菊(大洋菊);茎尖;组织培养;脱病毒

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2004)01-0024-04

**Tissue culture of shoot tip and *in vitro* propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat.** ZHI Hui, GAO Shan-lin<sup>①</sup>(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(1): 24-27

**Abstract:** The shoot tip of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. were used as explants to produce plantlets *in vitro*. A series of optimization experiments for cultural medium composition and concentration of phytohormones were investigated with a view to accelerate the propagation of virus-free materials. The results indicated that the most suitable explant was the shoot tip with diameter 0.3 mm. The optimized medium for crowd bud propagation was MS + 6-BA 0.1 mg·L<sup>-1</sup> + IAA 0.02 mg·L<sup>-1</sup>. The optimized medium for rooting was 1/2MS + IAA 0.7 mg·L<sup>-1</sup>. Virus-free materials were identified repeatedly under electron microscope and 2 virus-free strains were selected, which could be used as the sources for rapid-propagation.

**Key words:** *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; shoot tip; tissue culture; virus-free

杭白菊是我国传统中药之一,具有散风清热、平肝明目的功效,主要用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花等<sup>[1]</sup>,是多种方剂配伍要药及中成药生产的主要原料。随着近年来一系列菊花产品的开发及新疗效,如抗氧化<sup>[2,3]</sup>和治疗冠心病的发现,作为药食两用的菊花用量急剧增加。

长期以来杭白菊采用无性繁殖方法,极易导致病毒的感染,病毒病十分普遍。而且品种退化严重,直接影响了花的产量和质量<sup>[4]</sup>,因此脱病毒和良种选育工作势在必行。由于病毒在植株体内分布并不均匀,顶端分生组织一般无病毒或数量极少,因此利用植物茎尖组织的脱毒培养,可以成功地获得脱病毒苗,有效地去除病毒,再通过组织培养克隆繁殖就可以获得大量脱毒优良种苗供生产上应用<sup>[5]</sup>。

本实验以杭白菊中的大宗品种大洋菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)为试材,剥取茎尖,离体培养,再通过培养技术的优化,筛选出最佳

的培养基组成,显著提高繁殖系数,大量繁殖出无病毒试管苗,为今后向生产上示范推广提供优质无病毒种源。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验于2003年4-6月进行。供试材料大洋菊(商品名为杭白菊)2001年5月采自浙江省桐乡县。栽培于中国药科大学实验苗圃。原植物经中国药科大学中药生物技术教研室鉴定为菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)。

收稿日期: 2003-07-11

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2002118)

作者简介: 鄧 慧(1979-),女,河北石家庄人,硕士,主要从事药用植物生物技术研究。

<sup>①</sup> 通讯作者

## 1.2 实验方法

1.2.1 无菌材料的获得 在田间取长势良好的杭白菊顶芽和侧芽剥去叶片,用洗衣粉洗去表面尘土,自来水冲洗0.5 h,然后进行表面灭菌。分别采用升汞、次氯酸钠及漂粉精片(上海世康特公司生产)3种灭菌剂,进行不同灭菌剂的效果实验。然后将经表面灭菌处理的实验材料,用无菌水冲洗4次,剥取直径为0.3~1.2 mm的茎尖,迅速接种于MS+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>的启动培养基表面。培养条件:每天光照16 h,光照强度1 000 lx,培养温度(25±1)℃。

1.2.2 扩大繁殖培养基筛选实验 将高约1.5 cm带有2个节的无菌苗接种于添加了6-BA、IAA、NAA和IBA 4种不同激素和生长素配比的MS培养基上,培养25 d收获,统计出芽数并记录生长情况。

1.2.3 生根培养基筛选实验 取高约1.5 cm带有2个节的无菌苗接种于添加了IAA、IBA和NAA 3种不同生长素浓度的1/2MS培养基上,培养14 d,记录生根启动天数、根长、平均根数及根粗细情况。

1.2.4 杭白菊的病毒检测 取经过脱病毒和繁殖的试管苗材料1 g(约为8个高为1.5 cm带有2个节的无菌苗),加入2倍体积的0.2 mol·L<sup>-1</sup> PBS磷酸盐缓冲液(含1%巯基乙醇,pH 7.2)捣碎,研磨,10 000 g离心30 min,取上清液。用2%磷钨酸(pH 6.8)负染色2 min,在电子显微镜(HITACH-7000型)下观察,每个样品做3个铜网,每个铜网至少取20个不同视野检测病毒,并以未脱毒样品作为对照,确认所含病毒类型的基本形态和特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒剂及灭菌方法比较

获得无菌材料是进行脱病毒和组织培养快速繁殖的前提,为此进行了5种不同消毒方法及消毒剂的比较实验,以便选择杀伤力小且效果较好的药剂和灭菌方法。不同消毒剂种类及消毒方法的灭菌效果实验结果见表1。

表1 不同灭菌剂及灭菌方法对抗白菊幼芽消毒效果的比较(接种后20 d)

Table 1 The comparison of different reagents and methods of sterilization on the sprouts of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (after 20 d)

编号 No. of treatment	灭菌剂 Reagent of sterilization	时间 Time	接种数 No. of explant inoculated	污染数 No. of contamination explant	污染率/% Rate of contamination	存活数 No. of survival	存活率/% Rate of survival
1	75% Alcohol + 0.1% HgCl <sub>2</sub>	30 s + 8 min	20	4	20	6	30
2	0.1% HgCl <sub>2</sub>	12 min	20	0	0	8	40
3	75% Alcohol + 2% NaClO <sub>3</sub> + 0.1% HgCl <sub>2</sub>	30 s + 5 min + 6 min	20	1	5	10	50
4	2% NaClO <sub>3</sub> + 0.1% HgCl <sub>2</sub>	4 min + 8 min	20	0	0	9	45
5	Saturated solution of valid chlorine	12 min	20	3	15	14	70

表1结果表明,用1% HgCl<sub>2</sub>消毒8 min和用2% NaClO<sub>3</sub>消毒4 min后再用1% HgCl<sub>2</sub>消毒8 min,这2种方法灭菌效果较好,没有污染,但对外植体的杀伤力也很强,获得的无菌材料存活率也较低;方法3污染率低,存活率也不高,而且操作过程复杂;方法5虽然污染率较高,但存活率也高。在使用乙醇进行表面消毒的情况下(如方法1和3),外植体容易发褐而导致生长缓慢,可能系酒精毒害所致。因此在选择消毒剂时既要考虑能杀死附着在外植体表面的微生物,又要尽量不伤害组织细胞。实验结果表明,外植体的最佳消毒方案为:用洗衣粉洗去外植体表面灰尘和部分细菌,流水冲洗1 h,在饱和的漂粉精片

溶液中浸泡12 min,无菌水冲洗4~5次,即可转入培养基中。

### 2.2 茎尖大小与成活率的关系

取自田间的实验材料,用最佳消毒方案灭菌后,取直径为0.3~1.2 mm的茎尖,接种到启动培养基上,12 d左右茎尖明显变绿并开始膨大生长,说明接种的已经成活。

茎尖成活率的高低与茎尖直径大小的关系见表2。结果表明:茎尖大小为0.3 mm时成活率很低,而大于0.6 mm的茎尖成活率可达45%以上。茎尖越小,所含的病毒也越少,脱毒也就越彻底。但过小的茎尖顶端含有的细胞数目少,能诱导细胞进一步分

裂分化的可能性也小,因而难以成活。当茎尖直径大小为0.3 mm时,细胞生长分化等受到限制,成活率仅为25%。但是本研究以脱病毒为主要目的,一旦获得脱毒的无菌材料,就可以通过组织培养技术进行快速繁殖,因此作者认为剥取0.3 mm的茎尖可以取得较好的效果。此外,茎尖成活率也与培养基的硬度有关,过硬的培养基不利于茎尖生长。据试验,pH 5.8、添加 $3.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂粉的培养基有利于茎尖的成活。另外剥取的茎尖应迅速接种于培养基表面,防止干燥失水死亡。成活的茎尖约经40 d左右即可直接分化形成植株。

表2 杭白菊茎尖直径与成活率的关系(接种后40 d)  
Table 2 The relationship between the diameter of shoot tip of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. and the rate of survival (after 40 d)

茎尖直径/mm Diameter of shoot tip	接种数 No. of explant inoculated	成活数 No. of survival	成活率/% Rate of survival
0.3	20	5	25.0
0.6	20	9	45.0
0.9	20	11	55.0
1.2	20	15	75.0

### 2.3 丛生芽繁殖培养基筛选

在繁殖培养基实验中,设计了8种不同激素及生长素浓度配比的MS培养基,将高约1.5 cm的无根苗转接在各培养基上,结果见表3。

由表3可知,6-BA的浓度对丛生芽的数目有较大的影响,6-BA的浓度越高,产生的丛生芽越多,但随着浓度的提高,新生芽节间距缩短且形成玻璃化苗的可能性增大。单独使用6-BA时,新生的叶片卷曲,接触培养基的叶片表面呈颗粒状,有明显愈伤化

倾向,可见在高浓度(6-BA浓度高于 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )或单独使用6-BA时,对芽的生长都有不良影响。当6-BA和IAA配合使用时具有较好的效果,其中以添加了 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA的培养基为较为理想的组合,芽数及增重情况均优于其他培养基且基部叶片无愈伤化现象,植株无玻璃化现象,新生叶片舒展宽大,叶色深绿,节间较长,苗高为4~6 cm,可以切成2~3段,客观上扩大了繁殖系数。

### 2.4 生根培养基筛选

将高约1.5 cm具2个节的健壮苗或切段接种于添加不同生长素组合的1/2MS培养基上。14 d后,试管苗的生根情况见表4。

由表4可看出,在没有添加任何激素的1/2MS培养基上,杭白菊试管苗也能生根,但出根数少,启动天数长,根细且弱。添加不同浓度的IAA、NAA和IBA均能改善生根情况,其中 $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA与 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA均能增强根的粗壮度,但在添加了 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的培养基上试管苗出根数少,因此,确定最佳的生根培养基为1/2MS + IAA  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.5 病毒检测结果

为了确认脱病毒效果,对脱病毒前后的杭白菊试管苗进行了病毒检测。在未脱病毒样品中,主要观察到了大量长约290 nm的直杆状烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus)、大量直径约为30 nm的球形黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus)及少量条状弯曲的马铃薯Y病毒(Potato virus Y)。对茎尖(直径为0.3 mm)培养成活的5个株系的样品反复进行了病毒检测,其中有2个株系的样品在所有视野中均没有观察到病毒(占所观察样品总数的40%),其余株

表3 不同激素组合和浓度对抗白菊丛生芽繁殖的影响(继代20 d)  
Table 3 The effects of different combination and concentration of phytohormones on crowd buds propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (after 20 d)

培养基编号 No. of medium	激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of phytohormone				丛生芽数 No. of crowd bud	苗高/cm Height of plantlet	试管苗生长情况 Growth of plantlet
	6-BA	IAA	IBA	NAA			
3-1	0.6	-	0.10	-	9.16	2.0~3.0	严重玻璃化 Severe vitrification
3-2	0.5	-	-	0.10	6.83	2.5~4.0	严重玻璃化 Severe vitrification
3-3	0.5	-	-	-	7.23	2.0~4.0	严重玻璃化 Severe vitrification
3-4	0.4	0.10	-	-	6.76	3.0~4.0	轻微玻璃化 Slight vitrification
3-5	0.3	-	-	0.05	7.83	3.5~4.0	轻微玻璃化 Slight vitrification
3-6	0.2	0.05	-	-	6.07	3.5~5.0	生长良好 Grow better
3-7	0.2	-	-	-	6.60	4.0~6.0	叶片轻度卷曲 Leaves slightly curled
3-8	0.1	0.02	-	-	6.30	5.0~6.0	生长最好 Grow best
3-9	-	-	-	-	2.32	6.0~8.5	苗弱节间长 Seedling slim, longer internode

表4. 不同激素组合和浓度对抗白菊试管苗生根的影响

Table 4 The effects of different combination and concentration of phytohormones on root inducing of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. plantlet

培养基编号 No. of medium	激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of phytohormone			每苗平均根数 Average number of roots per plantlet	平均根长/cm Average length of root	达到 100%生根的天数/d Days of 100% rooting	根粗细程度 thickness of roots
	IAA	NAA	IBA				
5-1	0.2	0	0	2.1	2.56	10~12	一般 Average
5-2	0.4	0	0	3.1	3.46	8~9	略粗 A little thick
5-3	0.7	0	0	4.3	4.62	7~8	粗壮 Thick
5-4	0	0.1	0	1.7	1.12	12~13	一般 Average
5-5	0	0.2	0	2.0	3.30	7~9	粗壮 Thick
5-6	0	0	0.1	3.5	0.98	13~15	略细 A little thin
5-7	0	0	0.2	3.6	2.08	11~12	一般 Average
5-8	0	0	0	1.2	0.71	15~16	细 Thin

系的样品视野中均有少量病毒,予以淘汰。对脱病毒的株系保留并繁殖,可作为今后提供无病毒优质种苗的种源。

### 3 讨 论

1) 在田间生长情况下,杭白菊生长繁殖较快,说明其含有较高的内源激素。本研究结果也反映出较低浓度的 6-BA 和 IAA 配比具有较好的培养繁殖效果。在适宜的培养基中,叶片舒展宽大,繁殖旺盛,无愈伤组织化及玻璃化现象。但当 6-BA 浓度偏高时,细胞分裂过快,造成植株叶绿素等成分的合成滞后,产生绿色略透明的玻璃化苗。较高浓度的激素配比使试管苗基部与培养基接触的叶片卷曲增厚并部分褐化,随着激素浓度的降低,此现象可加以改善。

2) 杭白菊试管苗在不含生长素的 1/2MS 培养

基中也能生根,说明试管苗的内源激素可以诱导自发生根,但根数少且细弱,需要的启动天数长。加入适量的 IAA 可以增加发根数及根的粗壮度,缩短启动天数,改善苗的性状,提高移栽成活率。

3) 脱毒试管苗较未脱毒试管苗有显著的生长优势,主要表现为植株粗壮、叶片舒展宽大、叶色浓绿、繁殖系数稍有所提高。经茎尖(直径 0.3~0.9 mm)培养的各株系间试管苗外观差异不明显。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 年版(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 254.
- [2] 张尔贤,方 黎,张 捷,等. 菊花提取物抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2000,21(7):6-9.
- [3] 刘 方,武子斌,牛淑敏,等. 中药材抗氧化及自由基清除活性的研究[J]. 中国药理学杂志,2001,36(7): 442-445.
- [4] 王 杰,胡惠露,张成林,等. 菊花病虫害综合防治研究[J]. 应用生态学报,2002,13(4): 444-448.
- [5] 高山林. 药用植物遗传育种的现状和展望[J]. 世界科学技术-中药现代化,2001,3(6):58-62.