

## 杭白菊子叶和下胚轴组织培养技术的研究

张媛,王康才\*,汤兴利

(南京农业大学园艺学院 中药材科学系,江苏 南京 210095)

**摘要:**目的 以杭白菊子叶和下胚轴为外植体进行组织培养,寻找适宜诱导菊花子叶和下胚轴愈伤组织发生和分化的激素配比。方法 采用不同的激素配比MS培养基对抗白菊子叶和下胚轴分别培养。结果 试验设计的培养基均能诱导产生愈伤组织,但不同的激素配比对芽诱导分化的影响不同。其中MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 12 mg/L 诱导菊花子叶和下胚轴得到的愈伤组织粗大且致密;MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 4 mg/L 适宜子叶不定芽的诱导,诱导率为67.5%;MS+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 适宜下胚轴不定芽的诱导,诱导率为62.5%;生根培养采用1/2 MS+NAA 0.1 mg/L,7 d后生根率为100%。结论 本实验建立了以杭白菊子叶和下胚轴为外植体的高频快繁体系,不定芽诱导频率高且生长健壮。

**关键词:**杭白菊;子叶;下胚轴;组织培养

**中图分类号:**R282.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2008)11-1721-03

### Tissue culture from cotyledon and hypocotyl explants of *Chrysanthemum morifolium*

ZHANG Yuan, WANG Kang-cai, TANG Xing-li

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** **Objective** To seek the optimization hormone combination for the callus induction and differentiation from cotyledon and hypocotyl explants of *Chrysanthemum morifolium* through tissue culture. **Methods** Cotyledon and hypocotyl explants were cultured on various medium with different hormone combinations. **Results** Callus could be induced on every media designed in this experiment, but the effects to the induction and differentiation culture of buds were different. The results showed that the medium MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 12 mg/L was suitable to the induction of callus from cotyledon and hypocotyl. The optimal hormone combination was MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 4 mg/L for the initiation of adventitious bud of cotyledon. The shoot regeneration percentage reached 67.5%. The optimal medium for the initiation of adventitious bud of hypocotyl was MS+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The shoot regeneration percentage reached 62.5%. Rooting was induced on 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L, and the root inducing ratio reached 100% in 7 d. **Conclusion** A rapid plantlet regeneration system for *C. morifolium* is established from cotyledon and hypocotyl explants. Bud induction frequency is higher and the shoots *in vitro* grow vigorously.

**Key words:** *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; cotyledon; hypocotyl; tissue culture

药用杭白菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 为菊科植物,以干燥头状花序入药,具有散风清热,平肝明目之功效,主要用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花等<sup>[1]</sup>。组织培养技术在菊花上的应用研究开展较早,1983年裘文达等<sup>[2]</sup>通过对菊花花瓣的组织培养获得了新类型。李玉芬<sup>[3]</sup>对菊花的花器官——花瓣、花萼、花托、雌雄蕊和开放前的花蕾进行诱导均实现了植株再生。薛建平<sup>[4]</sup>对安徽药菊叶片组织培养也实现了植株再生,而关于药用菊花子叶和下胚轴组织培养技术尚未见报道。一般情

况下,选用子叶和下胚轴为外植体,不仅具有愈伤组织诱导率高、不定芽分化频率高等优点,而且较其他外植体易产生变异。王仑山等<sup>[5]</sup>对枸杞下胚轴进行4次继代培养筛选出耐盐变异体。齐飞等<sup>[6]</sup>诱导辣椒子叶并成功筛选出辣椒的抗病体细胞变异体系。兰州大学通过对紫苏子叶和下胚轴组培建立了快繁体系并发现了形态变异<sup>[7]</sup>。本课题组在研究杭白菊开花结实习性的基础上,开展了子叶和下胚轴的组织培养研究,寻找适宜诱导菊花子叶和下胚轴愈伤组织的激素配比和适宜的芽诱导培养基,以期获得

收稿日期:2008-01-30

基金项目:江苏省科技厅高新技术研究项目(BC2005318)

作者简介:张媛(1982—),女,山东兖州人,在读硕士研究生,从事药用菊花栽培育种方面的研究。E-mail:yz\_zy@126.com

\*通讯作者 王康才 Tel:(025)84396125 E-mail:njwkc2002@126.com

变异植株,筛选出药用成分高和抗逆性强的品种。

1 材料与方

1.1 材料:供试品种为杭白菊品种“红心菊”,经南京农业大学王康才教授鉴定。种植于南京农业大学中药材实验基地,花败后收取种子,经消毒接种于1/2MS培养基培养,以无菌苗的子叶和下胚轴为材料进行组织培养。

1.2 愈伤组织的诱导、分化和继代培养:剪取无菌苗的子叶和下胚轴,将子叶和下胚轴分别切成2段,接种于不同激素配比的培养基上,附加蔗糖30 g/L,琼脂5 g/L,调pH值5.7~5.8。每瓶装4个外植体,重复10瓶。25℃、2 000 lx条件下培养。每20 d继代1次,观察统计愈伤组织的诱导、不定芽的诱导和分化情况,最后筛选出适宜的愈伤组织诱导培养基和不定芽诱导分化的培养基(不同激素配比培养基浓度见表1),外植体均为40个,培养30 d统计结果。

1.3 生根培养:将初代培养和继代培养的丛生苗转接到1/2MS+NAA 0.1 mg/L的生根培养基上进行生根培养。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比诱导愈伤组织的差异:培养13 d,下胚轴较子叶先开始形成愈伤组织。培养30 d,子叶和下胚轴在8种培养基中愈伤组织的生长情况见表1。从整体上看,IAA+6-BA激素组合对菊花愈伤组织的诱导较好,愈伤组织生长快,颜色浓绿,尤其是MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 12 mg/L诱导的愈伤组织块粗大致密。2,4-D虽然诱导率也高,但其诱导的愈伤组织多呈紫红色(图1),且随着2,4-D质量浓度的升高,现象越严重,后期出现褐化。下胚轴愈伤组织的平均诱导率高于子叶,说明下胚轴对激素的种类和浓度的选择性不强,易诱导产生愈伤组织,其脱分化能力比子叶强。

2.2 不同激素对比对诱导不定芽的影响:培养21 d,MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L诱导菊花子叶和下胚轴愈伤组织直接出苗,且随着KT/NAA的增大,直接出苗的效果越明显(图2)。培养40 d,各培养基不定芽诱导率见表2。结果表明,子叶较下胚轴不定芽诱导率高,说明子叶的再生频率较下胚轴高。适宜子叶不定芽诱导的激素组合是MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 4 mg/L,诱导率为67.5%。适宜下胚轴不定芽诱导的激素组合是MS+KT2 mg/L+NAA 0.2 mg/L,其不定芽的诱导率为62.5%。

2.3 生根、炼苗与移栽:将5 cm左右的丛生苗及继代培养的苗转至生根培养基1/2MS+NAA 0.1

表1 不同激素配比愈伤组织诱导率

Table 1 Inductivity of callus on cotyledon and hypocotyl explants of *C. morifolium* with different hormone combinations

培养基/(mg·L <sup>-1</sup> )	子叶		下胚轴	
	愈伤组织形成块数	愈伤组织形成率/%	愈伤组织形成块数	愈伤组织形成率/%
MS+NAA0.5+6-BA7	26	65	32	80
MS+NAA0.5+6-BA3	4	10	28	70
MS+IAA0.3+6-BA12	36	90	38	95
MS+IAA0.3+6-BA4	33	83	35	88
MS+2,4-D2	31	78	33	83
MS+2,4-D1	33	83	37	93
MS+KT2+NAA0.5	4	10	22	55
MS+KT2+NAA0.2	31	78	35	88



图1 2,4-D直接诱导生根

Fig. 1 2,4-D to direct induction of rooting



图2 MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基诱导子叶直接产生丛生芽

Fig. 2 MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L to bud induction from cotyledon

mg/L上,7 d后即形成不定根,不定根的诱导率为100%。当试管苗长至10 cm、5~6条粗根时,拧开瓶盖,用封口膜封上,在封口膜上扎少许小孔,7 d后,撤去封口膜,再培养3 d,转入蛭石中炼苗7 d。以上过程均在培养室内进行,而后即可移栽入大田。

3 讨论

药用菊花组织培养主要用于培育新品种、快速繁殖及脱毒等方面。本研究首次建立了以杭白菊子叶和下胚轴为外植体的高效快繁体系,不定芽诱导率高且生长健壮,为筛选出药用成分高和抗逆性强的品种奠定基础。适宜子叶和下胚轴愈伤组织诱导的激素组合均为MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 12

表2 不同激素配比不定芽的诱导率

Table 2 Adventitious shoot inducing rates from cotyledon and hypocotyl with different hormone combinations

培养基/(mg·L <sup>-1</sup> )	子叶		下胚轴	
	产生不定芽的外植体数	不定芽诱导率/%	产生不定芽的外植体数	不定芽诱导率/%
MS+NAA0.5+6-BA7	7	17.50	0	0.00
MS+NAA0.5+6-BA3	4	10.00	0	0.00
MS+IAA0.3+6-BA12	15	37.50	20	50.00
MS+IAA0.3+6-BA4	27	67.50	5	12.50
MS+2,4-D2	0	0.00	0	0.00
MS+2,4-D1	10	25.00	3	7.50
MS+KT2+NAA0.5	10	25.00	24	60.00
MS+KT2+NAA0.2	27	67.50	25	62.50

mg/L,诱导率分别为90%和95%,适宜子叶不定芽诱导的激素组合是MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 4 mg/L,适宜下胚轴不定芽诱导的激素组合是MS+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L。生根培养均采用1/2MS+NAA 0.1 mg/L,7 d后生根率为100%。实验中MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L可诱导菊花子叶和下胚轴愈伤组织直接出苗,成苗周期大大缩短,不定芽生长健壮。

在本实验中,随着2,4-D质量浓度的升高,愈伤组织诱导率增大,但其诱导的愈伤组织普遍呈现出紫红色,在其后期的生长过程中出现严重褐化现象,这可能是由于2,4-D易引起培养物突变的结果<sup>[8]</sup>。鉴于2,4-D的高诱导率,在不定芽诱导中,可以选择其他的激素配合2,4-D使用,以充分利用其诱导率高的优点。但在菊花愈伤组织诱导时,不宜添加2,4-D,以防止褐化发生。

## 参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 凌文达,李曙轩.利用菊花花瓣组织培养获得新类型[J].浙江农业大学学报,1983,9(3):243-246.
- [3] 李玉芬.几种菊花花器官培养及愈伤组织分化频率研究[J].生物技术,1997,7(2):24-26.
- [4] 薛建平,张爱民,常 玮.安徽菊菊叶片直接再生技术的研究[J].中国中药杂志,2004,29(2):132-134.
- [5] 王仓山,孙 彤,李惠娟.枸杞耐盐变异体的筛选及植株再生[J].遗传,1995(6):60.
- [6] 齐 飞,巩振辉,黄 玮.利用组织培养技术筛选辣椒抗病毒变异体[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(2):83-88.
- [7] Zhang T, Wan X Y, Cao Z Y. Plant regeneration *in vitro* directly from cotyledon and hypocotyls explants of *Perilla frutescens* and their morphological aspects [J]. *Biologia Plantarum*, 2005, 49(3): 423-426.
- [8] 刘忠荣,洪 波.培养因素对菊花组织培养的影响[J].广西农业科学,2004(1):19-21.

## 叶下珠愈伤组织的诱导与培养

常 莉<sup>1,2</sup>,薛建平<sup>1,2\*</sup>

(1. 淮北煤炭师范学院生命科学学院,安徽 淮北 235000; 2. 资源植物生物学安徽省重点实验室,安徽 淮北 235000)

**摘要:**目的 建立叶下珠愈伤组织培养方法。方法 采用组织培养方法,比较不同外植体、蔗糖、植物生长物质及其配比对叶下珠愈伤组织诱导的影响。结果 茎段的诱导率最高,为55.56%,叶片诱导不出愈伤组织。6-BA是叶下珠愈伤组织形成的主要影响因素,2,4-D、NAA、蔗糖次之。结论 叶下珠愈伤组织诱导及继代的适宜培养基为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 10 g/L。

**关键词:**叶下珠;组织培养;愈伤组织

**中图分类号:**R282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)11-1723-04

Callus induction and cultivation of *Phyllanthus urinaria*CHANG Li<sup>1,2</sup>, XUE Jian-ping<sup>1,2</sup>

(1. Department of Biology, Huaibei Coal Industry Teacher's College, Huaibei 235000, China; 2. Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei 235000, China)

**Abstract: Objective** To establish culture method for *Phyllanthus urinaria*. **Methods** To study the possible effective factors of culture condition by comparing with different explants, sucrose, plant growth substance, and its ratio. **Results** The inductivity of stem was the highest about 55.56%, but callus of

收稿日期:2008-01-14

基金项目:国家农业成果转化基金项目(05EFN213400124);淮北市重大专项(06085)

作者简介:常 莉(1981—),女,安徽砀山人,讲师,硕士,主要从事组织培养技术研究。

\* 通讯作者 薛建平 Tel:(0561)3802025 E-mail:xuejp2000@yahoo.com.cn