

野菊花蕾的组培与快繁技术研究

韩磊, 吕鑫, 张文静, 杨小霁

(潍坊职业学院 山东 潍坊 261041)

摘要: 利用组织培养的方法, 首次以野菊花蕾作为外植体, 借鉴前人组织培养观赏菊花的经验, 找到一种使野菊能够快速增殖的方法。以 MS 为基本培养基, 添加 BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 作为外植体的分化与继代培养基, 得到愈伤组织和大量的丛生芽; 用 MS 培养基进行增殖培养; 用 1/2MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 进行生根培养, 生根率在 98% 以上。最后通过驯化练苗得到大量的野菊再生植株。

关键词: 野菊; 花蕾; 组织培养

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0103-03

野菊为菊科植物, 又名山菊花、路边菊、野黄菊花等。易栽培, 田边地头、房前屋后皆可种植。野菊全草可供药用, 其叶和嫩茎无异味, 可食用^[1]。野菊花为野菊、北野菊或岩香菊的头状花序, 直径 2~2.5 cm, 排成聚伞状; 总苞半球形, 总苞片 4 层, 边缘膜质, 外层椭圆形^[2]; 花小, 黄色, 边缘舌状, 先端 3 浅裂, 雌性; 中央为管状花, 先端 5 裂, 两性。花期 9~11 月, 果期 10~11 月^[3]。

野菊花中含有类黄酮、挥发油、二萜类和酚酸类等多种化学成分, 主要化学成分为黄酮类化合物和挥发油。野菊花总黄酮具有较强的抗炎作用, 也是治疗高血压和冠心病的主要有效成分。其中木犀草素具有明显的抗菌作用, 蒙花苷具有抗菌活性, 保肝作用, 并对慢性气管炎有一定疗效^[2,4]。野菊花醇提浸膏的水溶液对常见的浅部真菌有明显的抑制作用。另外, 野菊花还具有抗氧化作用, 野菊花多糖具有清除活性氧自由基的作用^[5,7]。

目前, 野菊花临床多用于治疗各种急慢性感染性疾病 (如慢性呼吸道感染、泌尿生殖系统感染、急性乳腺炎、急性淋巴管炎以及急性感染性肝炎等疾病), 亦用于治疗肿瘤、高血压病和高血脂症以及对感冒、流行性脑膜炎的预防。此外, 野菊花煎液口服或外用治疗皮肤痛毒疖肿疗效显著^[2,8]。近年来, 临床研究表明野菊花粗制剂对慢性盆腔炎、盆腔结核及前列腺炎等均有较好疗效^[9,10]。野菊花还能治疗头晕目眩、结膜炎、腮腺炎、肠炎、痔血、无名肿毒、脚癣等。对人体心肺和肝功能无明显影响, 对黏膜无刺激性, 除口服偶有胃部不适、食欲减退等状况外, 临床不良反应较少。慢性给药亦无蓄积中毒现象^[2]。

野菊花的加工产品有野菊花注射液、野菊花口服液、野菊花浸膏、野菊花保健茶、野菊花保健饮料、野菊花洗发香波等^[5]。

近年来, 随着野菊花产品的开发, 通过野生野菊的自然繁殖, 已经远远不能满足人们的需要。为了在短时间内满足市场对野菊花的需求, 该试验首次尝试对野菊进行组织培养, 以确定组织培养是否适合野菊的快繁。

第一作者简介: 韩磊 (1969-), 女, 副教授, 现主要从事植物遗传与育种研究工作。E-mail: hanlihanlei@163.com。
收稿日期: 2008-12-20

Reports of The *Dicentra Pusilla* Exsomatize Reproduction

ZHOU Heng

(Tongren Vocational and Technical College, Tongren, Guizhou 554300 China)

Abstract: The plant hormone type and the different combination allocated proportion have the very tremendous influence to *Dicentra pusilla*'s exsomatize reproduction. The test result indicated that, the induction bud stage induced by the MS+BA 2 mg/L+IBA 0.2 mg/L was the best; the bud multiplication stage induced by MS+BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L grows thickly; But in the culture medium the low concentration inorganic salt was advantageous in taking root, therefore 1/2MS+IBA 1 mg/L had the best effect for taking roots. The test tube seedling transplants by the humus soil : Vermiculite =2 :1 cultivation matrix effect was good.

Key words: Plant hormone; *Dicentra pusilla*; Exsomatize reproduction

1 试验材料及仪器药品

1.1 试验材料

试验用野菊来自潍坊市寒亭区的一个农村院落。为取材方便, 移栽到潍坊职业学院园林苑中栽培。取健壮无病的野菊花蕾作为试验的外植体。花蕾幼龄, 全为绿色, 萼片全包着花蕾, 花蕾头部未开裂且相对洁净。

1.2 试验仪器药品

药品: KNO_3 、 NH_4NO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 H_3BO_3 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 KI 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、甘氨酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、肌醇、蔗糖、琼脂粉、三角瓶、量筒、烧杯、胶皮管、容量瓶、移液管、玻璃棒、钢锅、电子天平、超净工作台等。

2 野菊花蕾组培快繁的程序

外植体的采集→无菌系的建立→外植体的接种→外植体继代转接→外植体的增殖培养→外植体的生根培养→再生植株的驯化练苗。

3 试验方法

3.1 培养基

用于观赏菊花的培养基很多, 如 MS, B₅, White 培养基等。根据观赏菊花培养成功的经验, 该试验采用 MS 培养基做为基本培养基^[1]。

野菊外植体诱导分化培养基: MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, pH 6.0~6.2。野菊继代转接培养基: MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 和 MS, pH 均为 6.0。野菊增殖培养的培养基: MS, pH 6.0。野菊生根培养基: 1/2MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, pH 6.0^[1]。另外, 各培养基均加蔗糖 30 g/L 和琼脂粉 6.5 g/L, 湿热灭菌后备用。

3.2 外植体的选择及预处理

观赏菊花可再生器官较多, 如菊花的茎尖、侧芽、花瓣、叶片等。该试验以未开放的花蕾作为外植体。选取生长健壮、无病虫害的野菊植株, 花蕾相对洁净, 采取其上未开放的花蕾, 连同花蕾下的一段花梗一同采下。观赏菊花花瓣外有一层萼片包裹, 操作时剥离最外层的萼片。但野菊由于花蕾太小(如黄豆大小), 花蕾外层的萼片不易剥除, 所以该试验不剥除外层萼片。外植体的采取时间选择在 10 月 9 日下午, 取发育一致的花蕾 24 个, 流水冲洗, 然后加入稀释的洗洁精清洗, 最后清水冲洗。

3.3 外植体的灭菌

将洗好的花蕾外植体, 拿到超净工作台上, 由于野菊花蕾很嫩, 用观赏菊花的灭菌方法: 酒精灭菌 30 s, 升汞灭菌 5 min, 可能会杀死外植体, 所以先在 75% 的酒精中蘸 1 下, 然后放在 0.1% 的升汞中灭菌 3 min, 再用蒸馏水洗涤 3 次, 每次 1 min。

3.4 外植体的接种和培养

将灭菌后的花蕾外植体接入装有无菌培养基的三角

瓶中, 每瓶 2 个, 共接入 12 瓶。2 个花蕾之间应尽量离远一些, 可以避免一个污染时影响另一个。接种后的外植体放在培养室内培养, 光照 2 500~3 000 lx, 温度 25~30℃。

3.5 外植体的继代转接

将花蕾分化出的幼芽和丛生芽用无菌剪刀剪下, 接到 MS 培养基中, 愈伤组织接入到 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基中继续分化, 成活率达 95% 以上。

3.6 野菊组培苗的增殖培养

当花蕾分化出的幼苗长到距离瓶口约 1 cm, 即高约 6~7 cm 时可进行增殖培养。将幼苗嫩茎切成数段, 每段带 1 芽 1 叶, 进行短枝接种增殖培养。将其基部插入 MS 或 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基上, 当腋芽长到瓶口, 然后再转接 1 次。

3.7 野菊的生根培养

观赏菊花较易生根, 很多培养基都可使观赏菊花生根, 如 MS、1/2 MS、1/2 MS+NAA 0.1 mg/L。用 MS 培养基生根, 生根时间长, 根体粗壮, 初生根体木质化严重, 植株粗壮且高。用 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L 培养基生根, 生根时间短, 根体弱小, 初期几乎没有木质化, 根生白色, 植株不高, 适于移栽^[1]。鉴于以上 2 种培养基培养观赏菊花的不足, 野菊的生根培养基采用 1/2 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, pH 6.0^[1]。

3.8 野菊组培苗练苗

当瓶苗生出白色的根, 长度达 2~3 cm 时, 适时安排练苗, 此时根生长势好, 练苗容易成功。首先将瓶苗移出培养室, 打开瓶塞, 使之逐渐适应由无菌到有菌, 由恒温到常温的变化。利用这个时间整地做畦, 在土壤上面铺 1 层约 5 cm 的蛭石, 浇透水。将小拱棚支架搭好备用。将瓶苗轻轻取出, 洗净根部培养基, 切勿伤根。洗净后将幼苗栽于整好的畦内, 栽后立即浇透水, 用塑料薄膜将小拱棚覆盖。在练苗时要注意保湿和通风。在中午时可用遮阳网遮盖。温度超过 30℃时要打开拱棚一侧或两侧通风, 以利于幼苗的成活。待白天气温稳定在 28℃以上, 生了新根约 3 cm 时, 可去膜移栽^[2]。

4 结果及分析

由于前人对观赏菊花的组织培养技术已经非常成熟, 野菊与观赏菊是近缘的。该试验直接借鉴前人经验进行。试验从 2007 年 10 月 9 日至 2008 年 4 月。

4.1 外植体的接入和培养

外植体共接 24 瓶。接入后的 2 d 中未发现分化和污染, 说明表面灭菌较好。5 d 时未出现分化的情况, 但有 2 瓶苗污染, 说明可能花蕾内部带菌。8 d 有类似芽的分化在切口处出现, 但不是很明显, 污染扩大到 5 瓶, 说明花蕾内部带菌。12 d 后幼芽分化明显, 芽原基出现, 花梗处出现白色的愈伤组织(图 1、2), 污染未进一步扩大, 至此, 污染率达 41.7%。15 d 后分化出幼芽, 幼芽生长完全。在培养过程中, 花蕾的花瓣陆续张开(图 1、

2)。说明远离培养基的花蕾部分较难脱分化。20 d 分化出幼叶, 幼叶很小, 分化完全(图 2)。26 d 后幼叶展开, 但未出现缺刻, 幼叶进一步长大。34 d 后幼叶的数目达到 4 片, 下部的 2 片叶出现缺刻。晚分化的幼芽也陆续出现了幼叶, 但未出现缺刻。38 d 所有外植体都分化出幼叶, 且有许多的丛生芽, 多数幼叶出现缺刻。44 d 茎已长到 3~5 cm 长。这时可以根据茎的高度, 在 6 cm 以上时可陆续增殖转接。

以上所列数据是外植体第 1 次接入的情况, 总体上看外植体的成活率很高, 且分化的效果较好, 丛生芽的数量多。从污染的情况看, 培养 5 d 才发现污染, 8 d 污染率达最高 41.7%, 说明花蕾中内生菌的灭菌不彻底, 在以后的试验中可以考虑适当增加升汞的灭菌时间。

4.2 外植体的继代、转接、增殖培养

继代转接成活率达 95% 以上。增殖培养的腋芽约 1 月长成小植株(图 3), 然后再转接 1 次。直到达到所要求的定植苗数的 2 倍, 以备生根和练苗过程出问题。

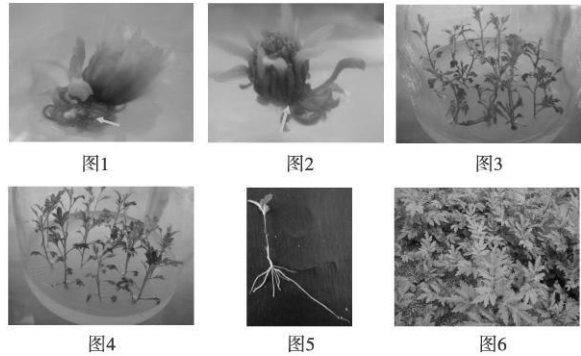


图 1 花蕾愈伤组织的诱导 图 2 由花蕾诱导的愈伤组织再分化
图 3 增殖培养的再生植株 图 4 再生植株诱导生根
图 5 练苗 1 周的再生植株 图 6 练苗 3 周的再生植株

4.3 野菊的生根培养

增殖后的幼苗诱导生根率在 98% 以上。5 d 后, 有少部分瓶苗根长至 2 mm, 部分还处于根原基状态, 只有小突起, 大部分还是未萌动的。株高有所增加但不太明显。叶色黄绿; 8 d 后, 绝大部分已生根约 2 mm, 其叶色开始转绿; 9 d 后, 有少部分瓶苗根的长度已长至 1 cm, 大部分在 0.5~0.7 cm 左右, 株高无大的变化, 但其粗度

明显增加, 叶色由黄绿色转为绿色, 长势较好(图 4)。说明所用的生根培养基适合野菊的生根诱导。

4.4 野菊组培苗驯化练苗

该试验练苗^[12]成活率达 100%, 练苗 1 周后再生植株可重新发根, 驯化练苗后野菊生长良好(图 5)。练苗 3 周, 部分植株发出侧枝, 多数已经萌发侧芽(图 6)。与种子发芽的同株高幼苗相比, 种子发芽的植株先是长高, 腋芽晚萌动; 而组织培养的幼苗腋芽早萌动并很快长成幼枝。也就是说, 组织培养的幼苗更容易发枝, 同期经济产量会更大。

5 总结

该试验选择野菊花蕾作为外植体, 借鉴前人的工作基础, 成功培养出大量野菊再生植株。因为组织培养是无性繁殖的方法, 所以不仅可以保持野菊的特性, 而且还可缩短繁育时间, 增大繁殖系数。因此组织培养可以作为大规模繁殖野菊的首选方法。

参考文献

[1] 卢元芳. 野菊叶绿素的提取[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版), 2000(2): 100.
[2] 石兰萍, 田琳, 袁劲松, 等. 野菊花的研究概况[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005(5): 434-436.
[3] 邓雪华, 朱海涛. 野菊花的鉴定及应用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 241-242.
[4] 崔兰冲, 李小琴, 韩莹. HPLC 测定野菊花中蒙花苷与木犀草素的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 33-35.
[5] 吴钉红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(2): 142-144.
[6] 罗显华, 郁建生. 野菊花总黄酮水溶液稳定性研究[J]. 食品科技, 2007(8): 152-156.
[7] 赵进, 罗建华, 刘娇, 等. 超声波提取野菊花总黄酮及鉴别[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1187-1188.
[8] 张捷, 谭建生, 姜韧, 等. 野菊花的研究进展[J]. 中国新医药, 2004, 3(1): 8-10.
[9] 王忠壮. 清热解毒野菊花[J]. 家庭医药, 2005(8): 15.
[10] 张旺辉. 自拟野菊花汤灌肠治疗慢性细菌性前列腺炎 37 例分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2002(5): 304-305.
[11] 梅家训, 丁习武. 组培快繁技术及其应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 259-260.
[12] 张文静. 菊花生产栽培实用技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 25.

Study on Flower Bud Tissue Culture and Rapid Propagating Technique of *Chrysanthemum indicum* L.

HAN Lei, LV Xin, ZHANG Wen-jing, YANG Xiao-j
(Weifang Vocational College, Weifang, Shandong 261041, China)

Abstract: Flower bud of *Chrysanthemum indicum* L. as explant was studied for rapid propagation through tissue culture for the first time in the light of ornamental *Chrysanthemum* experiences put forward in the past. Calli and multiple shoots was obtained by MS basic medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA as differentiation and subculture media. Multiplication culture was on the MS medium. Shooting culture was on 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA. The rooting ration was above 98%. At last, large number of regenerated plants were obtained after acclimatization and seedling training.

Key words: *Chrysanthemum indicum* L.; Flower bud; Tissue culture