

# 万寿菊组织培养体系的建立

郑 杰, 李 素 琴, 黄 红 梅

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:**以万寿菊为试材,采用叶片和茎段作为外植体,研究其组织培养不同阶段的最佳培养基,以建立万寿菊组织培养技术体系。结果表明:叶片是诱导愈伤组织的良好材料,适合叶片诱导愈伤组织的培养基是 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;适合愈伤组织分化不定芽的培养基是 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;适合生根的培养基是 1/2MS+IAA 0.8 mg/L+IBA 1.0 mg/L。

**关键词:**万寿菊;组织培养;外植体

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)06-0111-04

万寿菊(*Tagetes erecta* L.)为菊科 1 a 生草本花卉,是提取纯天然黄色素的理想原料,该类天然色素能够延缓老年人因黄斑退化而引起的视力退化和失明症,以及因机体衰老引发的心血管硬化、冠心病和肿瘤等疾病,广泛应用于食品、化妆品、烟草、医药及禽类饲料中,国际上含 10% 的叶黄素油售价达 12 万元/t,素有“软黄金”的美誉,发展前景非常广阔<sup>[1]</sup>。万寿菊原产墨西哥,抗性强,对土壤要求不严,耐移植,生长迅速,栽培容易,病虫害较少。万寿菊花大色艳,花期长,栽培品种极多,为园林绿化、节庆摆花的主要品种。依用途可分为观赏型万寿菊和色素万寿菊(生产型万寿菊)<sup>[2]</sup>。

万寿菊育种目前仍然以常规育种为主,但因其优良性状发生分离,降低了观赏价值。利用扦插繁殖的繁殖系数低,并且要求遮光喷雾条件。利用组织培养技术繁殖良种万寿菊可以相对降低栽培成本,提高繁殖系数,且不改变原有的优良特性。并能定向调节开花期,提高其观赏价值。尤其是无菌苗在培养瓶中开花,增加了其观赏和经济价值。林淦等<sup>[3]</sup>用万寿菊植株生长状态的叶片组织作为外植体,培养 7 d 后叶片细胞增殖生成芽苗;转接培养 5 d 后,芽苗伸长为较大的幼苗;将幼苗转接入生根培养基,6 d 后获得完整的万寿菊组织培养植株。万茜等<sup>[4]</sup>曾对万寿菊水培营养液的铵态氮和硝态氮比例作了初探,认为万寿菊适宜水培,铵态氮和硝态

氮比例约为 1:4 时最利于万寿菊的生长,这为万寿菊大规模培养提供了又一途径。李甫等<sup>[5]</sup>研究了生长调节剂对万寿菊花药培养的影响,得出 KT/NAA=20/3 的花药愈伤组织诱导率最高;KT/NAA=25/3、KT/NAA=20/3 和 6-BA/NAA=25/3 最有利器官分化;2,4-D 与 6-BA、KT 组合对器官分化无作用,为单倍体育种提供了技术支撑。

建立高效的组织培养体系是进行万寿菊相关研究的重要基础。该试验以细叶万寿菊为研究对象,通过添加不同种类和不同浓度的植物生长调节物质,对万寿菊组织培养的适宜培养基进行探索,以期建立简单有效的再生体系,为后续研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

待天气晴好时,从湖南农业大学校园修业广场花坛内采集新鲜细叶万寿菊叶片和茎段,保存于 4℃ 冰箱备用。以 MS、1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的激素 NAA、6-BA、IAA、IBA,各种培养基的琼脂浓度均为 0.7%,蔗糖浓度均为 3%(表 1)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 光照强度 1 500~2 000 lx,光照 12 h/d,温度保持在 25℃ 左右。相对湿度保持在 70% 左右。

1.2.2 植物材料的灭菌 选出健壮无病、幼嫩的万寿菊茎叶材料稍洗净表面泥土,放入加盖小烧杯中,以 0.1% 升汞为灭菌剂,浸泡 10 min 灭菌,其间稍加摇动以充分灭菌,用无菌水将材料清洗 5 次,备用。

1.2.3 植物材料的接种 用无菌镊子夹出叶片、茎段、愈伤组织和不定芽置于纸上吸水。用手术刀将茎段切成 1 cm 左右,愈伤组织和嫩叶切成 1 cm<sup>2</sup>,不定芽分株切割,

**第一作者简介:**郑杰(1978-),男,本科,实验师,现主要从事植物细胞工程与遗传研究工作。E-mail:zheng1680@yahoo.com.cn。

**责任作者:**黄红梅(1978-),女,博士,讲师,现主要从事植物细胞工程与遗传研究工作。E-mail:hbm7418@163.com。

**基金项目:**湖南农业大学大学生创新性实验计划资助项目(20070728)。

**收稿日期:**2011-12-08

然后用镊子将材料放入各培养基,完毕后放入指定培养架上培养。

表 1 培养基成分与用途

培养基 编号	MS	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	IAA /mg·L <sup>-1</sup>	IBA /mg·L <sup>-1</sup>	用途
MS <sub>1</sub>	MS	0.2	1.0	—	—	诱导愈伤组织
MS <sub>2</sub>	MS	0.2	1.5	—	—	诱导愈伤组织
MS <sub>3</sub>	MS	0.2	2.0	—	—	诱导愈伤组织
MS <sub>4</sub>	MS	0.2	2.5	—	—	诱导愈伤组织
MS <sub>5</sub>	MS	0.1	1.0	—	—	愈伤组织分化不定芽
MS <sub>6</sub>	MS	0.2	1.0	—	—	愈伤组织分化不定芽
MS <sub>7</sub>	MS	0.3	1.0	—	—	愈伤组织分化不定芽
MS <sub>8</sub>	MS	0.4	1.0	—	—	愈伤组织分化不定芽
MS <sub>9</sub>	MS	0.5	1.0	—	—	愈伤组织分化不定芽
MS <sub>10</sub>	1/2MS	—	—	0.2	1.0	不定芽诱导生根
MS <sub>11</sub>	1/2MS	—	—	0.4	1.0	不定芽诱导生根
MS <sub>12</sub>	1/2MS	—	—	0.6	1.0	不定芽诱导生根
MS <sub>13</sub>	1/2MS	—	—	0.8	1.0	不定芽诱导生根
MS <sub>14</sub>	1/2MS	—	—	1.0	1.0	不定芽诱导生根
MS <sub>15</sub>	1/2MS	—	—	1.0	0.2	不定芽诱导生根
MS <sub>16</sub>	1/2MS	—	—	1.0	0.4	不定芽诱导生根
MS <sub>17</sub>	1/2MS	—	—	1.0	0.6	不定芽诱导生根
MS <sub>18</sub>	1/2MS	—	—	1.0	0.8	不定芽诱导生根
MS <sub>19</sub>	1/2MS	—	—	1.0	1.0	不定芽诱导生根

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

由表 2 可知,6-BA 的浓度变化对万寿菊叶片的出愈率影响较大。在 NAA 的浓度保持 0.2 mg/L 不变的情况下,当 6-BA 浓度到达 2.0 mg/L 时,出愈率最高,当 6-BA 浓度大于 2.0 mg/L 时,出愈率开始下降。所以 6-BA 诱导万寿菊叶片愈伤组织的最适浓度为 2.0 mg/L,最适于叶片愈伤组织诱导的培养基是 MS<sub>3</sub> 培养基,其成分为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。从图 1 可看出,愈伤组织生长得很健壮。

表 2 叶片在不同浓度的 6-BA 培养基中的出愈率

培养基编号	接种数/块	愈伤组织数/块	出愈率/%
MS <sub>1</sub>	36	13	36
MS <sub>2</sub>	35	20	57
MS <sub>3</sub>	37	32	86
MS <sub>4</sub>	36	16	45



图 1 叶片愈伤组织诱导

由表 3 可知,6-BA 的浓度变化对万寿菊茎段的出愈率有较大影响。在 NAA 的浓度保持 0.2 mg/L 不变的情况下,当 6-BA 浓度到达 2.0 mg/L 时,出愈率最高,当 6-BA 浓度大于 2.0 mg/L 时,出愈率开始下降。所以,6-BA 诱导万寿菊茎段愈伤组织的最适浓度为 2.0 mg/L,

最适于茎段愈伤组织诱导的培养基也是 MS<sub>3</sub> 培养基。图 2 是万寿菊茎段诱导愈伤组织前后对照图,右图是来自茎段的新鲜愈伤组织的照片。

由表 2、3 可知,在 MS<sub>3</sub> 培养基中叶片诱导愈伤组织的出愈率比茎段诱导愈伤组织的出愈率要高。所以,选用叶片作为外植体较好。

表 3 茎段在不同浓度的 6-BA 培养基中的出愈率

培养基编号	接种数/块	愈伤组织数/块	出愈率/%
MS <sub>1</sub>	33	9	28
MS <sub>2</sub>	35	17	49
MS <sub>3</sub>	36	22	62
MS <sub>4</sub>	34	17	51



图 2 茎段愈伤组织诱导

### 2.2 愈伤组织诱导不定芽

由表 4 可知,当 6-BA 的浓度为 1.0 mg/L 保持不变时,NAA 的浓度对万寿菊愈伤组织诱导出芽率有明显影响。NAA 浓度为 0.1 mg/L 时出芽率最高,随后出芽率随着 NAA 浓度的升高而下降。因此,以 NAA 作为万寿菊愈伤组织诱导不定芽的激素时,其最适浓度为 0.1 mg/L,最适合愈伤组织分化不定芽的培养基是 MS<sub>5</sub> 培养基,其成分为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。从图 3 可看出,万寿菊愈伤组织的丛生芽生长很茂盛。

表 4 愈伤组织在不同浓度的 NAA 培养基中的出芽率

培养基编号	接种数/块	不定芽数/块	出芽率/%
MS <sub>5</sub>	38	13	35
MS <sub>6</sub>	39	9	23
MS <sub>7</sub>	38	6	15
MS <sub>8</sub>	36	5	13
MS <sub>9</sub>	40	4	10

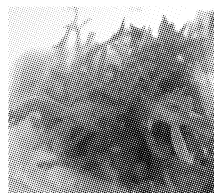


图 3 愈伤组织诱导不定芽

### 2.3 不定芽诱导生根

由表 5 可知,激素 IAA 浓度的变化对万寿菊不定芽的生根率影响较大。当 IBA 浓度为 1.0 mg/L,用不同浓度的 IAA 诱导生根时,生根率随着 IAA 浓度的升高呈先升高后降低的趋势,当 IAA 浓度为 0.8 mg/L 时,生根率最高,为 58%。当 IAA 浓度大于 0.8 mg/L 时,生

根率有所降低。所以 IAA 作为不定芽诱导生根的激素最适浓度为 0.8 mg/L, 最适合诱导不定芽生根的培养基是 MS<sub>13</sub> 培养基, 其成分为 1/2MS+IAA 0.8 mg/L+IBA 1.0 mg/L。从图 4 可看出, 万寿菊不定芽生根状况良好, 根数较多, 根也比较粗壮, 且能发育成完整植株。

表 5 不定芽在不同浓度 IAA 培养基中的生根率

培养基编号	接种数/块	生根数/块	生根率/%	生根数目/根
MS <sub>10</sub>	37	10	26	94
MS <sub>11</sub>	39	11	29	108
MS <sub>12</sub>	40	17	43	182
MS <sub>13</sub>	36	20	58	234
MS <sub>14</sub>	38	16	43	169



图 4 不定芽在 MS<sub>13</sub> 培养基中的生根

由表 6 可知, 当 IAA 浓度为 1.0 mg/L, 用不同浓度的 IBA 诱导生根时, 生根率随着 IBA 浓度的升高呈先升高后降低的趋势, 当 IBA 浓度为 0.4 mg/L 时, 生根率最高, 为 88%。当 IBA 浓度大于 0.4 mg/L 时, 生根率随着 IBA 浓度的升高而降低。所以 IBA 作为不定芽诱导生根的激素时, 最适浓度为 0.4 mg/L, 最适合诱导不定芽生根的培养基是 MS<sub>16</sub>, 其组成成分为 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L, 生根情况见图 5。

由表 5、6 可知, 用 IAA 作为变量的培养基中根诱导率虽然稍低, 但是根的质量较好, 根数较多, 且较粗壮(图 4)。用 IBA 作为变量的培养基中根诱导率虽然较前者略高, 根数也很多, 但比较弱小(图 5)。因此, 以激素 IAA 诱导不定芽的根系质量比 IBA 好, 生根植株更适合用于移植。所以, 应选择 MS<sub>13</sub>, 即 1/2MS+IAA 0.8 mg/L+IBA 1.0 mg/L 作为不定芽诱导生根的培养基。

表 6 不定芽在不同浓度 IBA 培养基中的生根率

培养基编号	接种数/个	生根数/块	生根率/%	生根数目/根
MS <sub>15</sub>	36	13	36	103
MS <sub>16</sub>	39	34	88	304
MS <sub>17</sub>	40	18	44	162
MS <sub>18</sub>	37	13	36	105
MS <sub>19</sub>	38	10	25	91



图 5 不定芽在 MS<sub>16</sub> 培养基中的生根

### 3 讨论与结论

在植物组织中, 外植体的类型直接影响初代培养中的愈伤组织诱导效率。试验中发现同一种培养基中万寿菊叶片和茎段均能成功诱导愈伤组织, 但是叶片的愈伤组织诱导率和诱导速度高于茎段, 且叶片的愈伤组织多为胚性愈伤组织, 更容易分化成功, 这与余义和等<sup>[6]</sup>的研究一致。因此, 叶片是较为适于愈伤组织诱导的外植体。

激素也是影响愈伤组织诱导率的重要因素, 在菊花组织培养研究中, 多选用 6-BA、NAA 的组合诱导愈伤组织, 且培养基中 6-BA 的浓度为 1.0~5.0 mg/L, NAA 的浓度为 0.1~1.0 mg/L, 如刘军等<sup>[7]</sup>以菊花叶片为外植体, 诱导愈伤组织最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 施波等<sup>[8]</sup>以青蒿茎段为外植体, 愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L。张妙彬等<sup>[9]</sup>对非洲菊愈伤组织诱导不定芽的研究, BA、NAA、IAA 3 种激素配合使用能大大提高“深圳 5 号”非洲菊花托的愈伤组织诱导率和分化绿率。该试验选用了 6-BA 与 NAA 的组合, 4 个诱导培养基都能从叶片和茎段上诱导出愈伤组织, 其中培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 中叶片形成的愈伤组织生长更健壮。6-BA 与 NAA 激素组合在其它品种菊花诱导愈伤组织的研究中可以进一步应用推广, 但是不同菊花品种对 6-BA 与 NAA 的浓度需求存在着较大差异, 最佳组合浓度需要试验研究确定。

付洪伟等<sup>[10]</sup>对杂种大花万寿菊进行试管苗繁殖试验的结果表明, 诱导侧芽发生不定根时, 在 1/2 MS+0.5 mg/L IAA(质量浓度)条件下效果较好。而刘军等<sup>[7]</sup>在对菊花叶盘作为外植体进行再生体系的建立时发现, 生根培养用 IBA 为宜, IBA 的最适浓度为 0.5 mg/L, 诱导的根短而粗壮, 每株生根多于 10 条, 效果最好。该试验采用 IBA 与 IAA 组合配方培养基诱导愈伤组织分化不定芽, 用 IAA 作为变量的培养基诱导率虽然不是很高, 但是根的质量较好, 根数较多且较粗壮。用 IBA 作为变量的培养基诱导率虽然较前者略高, 但根数相对而言较少, 且根较弱小。考虑组培苗移植中根系较粗壮的植株更易成活, IAA 是万寿菊不定芽的生根培养较适宜的生长素。

### 参考文献

- [1] 张春华, 黄前晶, 孟桂兰, 等. 色素万寿菊及其深加工产品内外研究生产现状[J]. 内蒙古农业科技, 2006(2): 65-67.
- [2] 王平, 吴志刚, 赵景云, 等. 色素万寿菊研究现状及发展前景[J]. 北方园艺, 2010(10): 228-231.
- [3] 林淦, 周建平. 快速离体培养万寿菊植株叶片组织[J]. 江西农业学报, 2006, 18(3): 92-93.
- [4] 万茜, 胡志辉. 万寿菊水培营养液的调试[J]. 种子, 2002(1): 37, 87.



# 香石竹快速繁殖技术研究

宛淑艳, 包秀凤

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

**摘要:**以中花散枝香石竹“红芭芭拉”的茎段为外植体,探讨不同培养基对香石竹的诱芽萌动、继代增殖和生根培养的影响。结果表明:外植体切取部位的诱导芽萌动率从高至低排序为:顶芽>带腋芽的茎段>不带腋芽的茎段;当培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L 时,对香石竹带腋芽的茎段芽萌动最好;在培养基为 1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 时,继代增殖长芽的效果最好;在培养基为 1/2 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 时,诱导不定根效果最好。

**关键词:**香石竹;顶芽;带腋芽的茎段;不带腋芽的茎段

**中图分类号:**S 681.503.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)06-0114-04

香石竹(*Dianthus caryophyllus*)石竹科石竹属多年生草本植物,又名康乃馨。其花朵绮丽、高雅,花色丰富,单朵花期长,在插花、花束、花篮、花环等中都被广泛应用,观赏价值高,与剑兰、郁金香、非洲菊一齐被誉为世界四大切花<sup>[1]</sup>。我国现已广泛栽培,近年来,随着国外优良品种的引进和栽培技术的逐步掌握,香石竹在中国种植面积成倍增加<sup>[2]</sup>。目前,为避免病毒积累及在短期

内大量生产以满足市场要求,国内外主要采用组织培养进行香石竹的快速繁殖。近年来,多花散枝香石竹正引起人们越来越浓的兴趣,受到消费者的青睐<sup>[3-5]</sup>。现以中花散枝香石竹“红芭芭拉”的茎段为外植体,通过不同种类或不同激素浓度的配比,探讨香石竹的外植体诱芽、继代增殖及生根培养的最适培养基,为短期大量工厂化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试香石竹为中花散枝型品种“红芭芭拉”,购自湛江赤坎区百合鲜花店。供试器材有电子天平、无菌操作台、高压蒸汽灭菌锅等。试剂为 75%酒精、0.1%升汞、

**第一作者简介:**宛淑艳(1968-),女,黑龙江肇东人,博士,副教授,现主要从事植物功能基因及植物组织培养工作。E-mail: yuanwen-2005@163.com。

**基金项目:**湛江师范学院校内博士专项资助项目(ZL 0604)。

**收稿日期:**2011-12-05

[5] 李甯,唐道城,梁顺祥.生长调节剂对万寿菊花药培养的影响[J].青海大学学报,2007(2):51-53.

[6] 余义和,李桂荣,王新娟.菊花离体培养体系的优化[J].陕西农业科学,2006(4):36-38.

[7] 刘军,赵兰勇,丰震,等.菊花叶片离体高效再生体系的建立[J].山东农业大学学报,2004,35(2):177-182.

[8] 施波,孙小琴,任甜甜,等.青蒿茎段愈伤组织的诱导及植株再生[J].湖北民族学院学报,2008(6):217-219.

[9] 张妙彬,李安,王小菁.非洲菊愈伤组织诱导和不定芽分化研究[J].广东农业科学,2008(6):53-59.

[10] 付洪伟,马德宝,程广有,等.杂种大花万寿菊试管苗繁殖[J].吉林农业学报,1999,15(1):34-35.

## Study on the Tissue Culture System of *Tagetes erecta* L.

ZHENG Jie, LI Su-qin, HUANG Hong-mei

(College of Oriental Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

**Abstract:** Using leaves and stems as explants of *Tagetes erecta* L., the optimal medium at different stages of the tissue culture was studied to establish the tissue culture system of *Tagetes erecta* L.. The results showed that the leaves were fit for inducing callus. In MS medium with 6-BA 2.0 mg/L and NAA 0.2 mg/L, the callus induction rate was the highest. The optimum medium of the adventitious bud regeneration was MS medium with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L. In 1/2MS medium with IBA 1.0 mg/L and IAA 0.8 mg/L, the root could be induced easily.

**Key words:** *Tagetes erecta* L.; tissue culture; explant