

除虫菊高效再生体系的建立

于 娅, 屈 玲

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

摘 要:以除虫菊为试材,以带柄叶片为外植体,对除虫菊不定芽的诱导、丛生芽的增殖以及生根诱导进行了系统的研究。结果表明:升汞对除虫菊种子的毒害作用太大,次氯酸钠对种子的消毒效果比较好。叶片消毒选择次氯酸钠 8 min 为宜,成活率高达 95%;不定芽诱导的最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,诱导率最高可达 83.3%,不定芽个数为 8.15;丛生芽增殖的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,增倍数达 9.16;生根的最适培养基为不加激素的 MS,生根率为 80%。

关键词:除虫菊;不定芽;褐化

中图分类号:S 682.1⁺¹ **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0135-05

除虫菊(*Pyrethrum cinerariaefolium* Trev.)为菊科小菊属多年生宿根草本植物,原产欧洲^[1],具有较高的经济价值及观赏价值,其根、茎、叶、花都含有毒虫物质,是用来配制各种杀虫剂的较好原料,常以花或全

草入药^[2]。对除虫菊的研究和利用已有近百年历史,它是目前世界上唯一集约化种植的杀虫植物^[3]。20 世纪初除虫菊在世界各地广泛栽培,20 世纪 40 年代起曾在我国华东、新疆、贵州和云南等省区引种,从其花头中提取的总除虫菊酯含除虫菊酯 I、II,瓜菊酯 I、II,茉莉菊酯 I、II 共 6 种有效杀虫成分^[4]。是迄今为止发现的不污染环境、对人畜等哺乳动物安全无毒、对害虫迅速击倒而不易产生抗药性、在植物和土壤中无残留的高效天然杀虫

第一作者简介:于娅(1976-),女,博士,讲师,研究方向为植物遗传育种与基因工程。E-mail:yuy1025@163.com.

基金项目:湖北省教育厅指导资助项目(B20104602)。

收稿日期:2012-08-31

[4] 赵巧阳,赖钟雄. 硝酸银在离体培养和转化中的作用及其机理[J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(1): 62-66.

[5] MA G, GUO J P. Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on endogenous hormone levels during regeneration of *Brassica campestris* ssp. *Rapifera*[J]. Journal of Zhejiang University, 2010, 36(3): 237-245.

[6] 邢德峰,李新玲,王全伟,等. 影响大白菜高效离体培养再生的因素

[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 420-424.

[7] 黄俊轩,李双跃,李建科,等. 花椰菜叶片离体再生技术的研究[J]. 天津农学院学报, 2006, 13(4): 21-23.

[8] 李艳红,宋秀珍,庄木. 青花菜组织培养再生体系的研究[J]. 首都师范大学学报, 2001, 22(3): 48-53.

Regeneration Plants of Cotyledon and Hypocotyl of Xinjiang *Brassica rapa* L.

Dilraba · DILXAT, Muhraipya · ARKIN, ZHANG Fu-chun, ZHANG Xia

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: The regeneration system of tissue culture of Xinjiang *Brassica rapa* L. was discussed by using cotyledon and hypocotyl of 5 day-old seedling of Xinjiang *Brassica rapa* L. as the explant. The results showed that MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L medium was effective for callus induced, the averaging callus frequencies were 65.4%, 95.5% for cotyledon, hypocotyl; shoots were induced with 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO₃ 5.0 mg/L, the averaging regeneration shoots frequency was 20.8%, 65.0% for cotyledon, hypocotyl; shoots was transferred into medium of MS+IBA 0.5 mg/L to root; after 20 days, regeneration plants were transferred into flower-soil and its survivable rate was more than 95%.

Key words: *Brassica rapa* L.; cotyledon; hypocotyl; callus; regeneration plants

剂^[3]。在 20 世纪 50~70 年代世界除虫菊干花的主产国一度受到人工合成杀虫剂的冲击,20 世纪 80 年代以来随着人们对环境保护意识的增强,国家对高毒高残留化学农药的逐步禁止使用,给天然无公害生物农药提供了巨大的市场空间,除虫菊的应用研究又重新得到青睐,但近期世界原除虫菊干花生产国,因受多种因素干扰产量直线下降,重新寻找新的生产基地已势在必行。

除虫菊一般以种子与扦插繁殖为主。其栽培方式多为大田种植,既浪费土地资源,又需要大量的人力去种植与管理,且受自然条件限制较大,品种分化严重,含量降低,不能满足生产的需要;同时植株还会受根结线虫及病毒的侵染,成为带毒植株^[5]。近年来,随着生物科学的不断发展,各种生物技术在植物源农药研究与生产中的应用越来越广泛,植物组培这种新型技术受到越来越多的关注。植物组培具有不受生长季节限制地繁殖植物,不携带病毒,培养周期短,可用组培中的愈伤组织制取特殊的生化制品,可短时间大量繁殖用于拯救濒危植物,可诱导其分化成需要的器官如根和芽,解决有些植物产种子少或无的难题等诸多优点,因此组培是植物大量繁殖的最佳选择^[6]。

目前,国内已开展了一些除虫菊组培相关研究,如昆明植物所对栽培技术和良种选育等方面的研究^[7];董建新等^[8]对除虫菊愈伤组织的诱导和继代的研究;吴沿友等^[5]进行了除虫菊的试管繁殖研究。但都存在诱导愈伤率、长芽率与生根率不是很理想的状况。该试验以除虫菊为试验材料,进行种子与外植体的消毒、不定芽的诱导和丛生芽的增殖以及生根诱导试验,拟建立除虫菊的高效再生体系,为除虫菊的商业化开放奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

除虫菊人工种子:购于北京南无科贸有限责任公司;除虫菊幼苗:购于江苏花语园艺公司。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的消毒 选用无病虫害、饱满、成熟度高且一致的除虫菊的种子,用温水浸泡 24 h 后弃去漂浮的种子。将下沉的种子用自来水冲洗后,在超净工作台上用 75% 酒精表面处理 30 s,无菌水冲洗 3 次,分别用次氯酸钠溶液和升汞溶液处理,消毒完后用无菌水冲洗 5 次,然后接种于不含激素的 MS 固体培养基上,每种处理接种 10 瓶。随后置于培养室培养温度(25±2)℃,光照时间 10 h/d,光照强度 2 000 lx,30 d 后观察并记录除虫菊种子的发芽情况和污染率。

1.2.2 外植体的消毒 取带叶柄的叶片,流水冲洗 2 h,用 75% 的酒精处理 30 s,无菌水冲洗 4 次,用次氯酸钠、升汞溶液分别处理不同时间后再用无菌水冲洗 5 次,然

后将叶片切成含主脉且近叶柄端约 0.5 cm 大小的叶块(含叶柄),接种于不含激素的 MS 固体培养基上,每种处理接种 20 瓶,每瓶接种 1 个外植体。置于培养室,培养 10 d 后观察记录污染、褐化及成活情况,计算成活率和污染率^[9]。褐化率(%)=(褐化数/接种数)×100%;成活率(%)=(成活幼苗数/接种数)×100%;污染率(%)=(污染瓶数/接种瓶数)×100%;以褐化率成活率和污染率为指标评价消毒效果。

1.2.3 不定芽的诱导 取消毒后的外植体接种于含不同浓度的激素组合的 MS 培养基中,各种培养基中均加入蔗糖 3%,琼脂 0.7%,调 pH 至 5.8,共 9 种不同的培养基中。培养条件是:(25±2)℃,光照强度为 2 000 lx,10 h/d。置于培养室,培养 30 d 后观察记录不定芽诱导率,不定芽个数及玻璃化现象。不定芽个数是指每个外植体分化出的芽个数,以≥0.5 cm 记为有效芽。诱导率(%)=(出芽外植体数/未污染的外植体总数)×100%。9 种诱导培养基见表 2。

1.2.4 丛生芽的增殖 将诱导出的不定芽接种于含不同激素组合的 MS 增殖培养基中诱导丛生芽,各种培养基均加入蔗糖 3%,琼脂 0.7%,调 pH 至 5.8,培养条件为:温度(25±2)℃,光照强度为 2 000 lx,光照时间 10 h/d。培养 30 d 后观察记录增殖倍数及玻璃化情况。增殖倍数=增殖的芽数/接种外植体总数。7 种继代培养基见表 3。

1.2.5 生根诱导 将 3 cm 左右的芽分别转接到生根培养基 MS 与 MS+0.2 mg/L NAA 中,观察不同生根培养基对除虫菊生根的影响,筛选出最适生根培养基。培养 30 d 后观察记录生根情况。生根率(%)=(生根外植体数/接种总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 种子的消毒

除虫菊种子分别用 0.1% 的升汞消毒 4 min 与用 10% 的次氯酸钠消毒 30 min,30 d 后观察结果。由图 1 可知,升汞消毒的种子不发芽,污染率为 0%。而用次氯酸钠消毒的每瓶种子中均有发芽,且污染率为 0%。可见升汞对种子发芽的毒害作用比次氯酸钠的大。张强等^[10]报道,除虫菊种子对升汞敏感,极易被杀死,而用次氯酸钠消毒,污染率低,发芽率高,是除虫菊种子消毒的最适方法。因此,除虫菊种子消毒试剂宜选用次氯酸钠。

2.2 外植体的消毒

由表 1 可知,分别用 0.1% 的升汞和 10% 的次氯酸钠对除虫菊的带叶柄的叶片进行消毒处理,10 d 后观察结果表明,用升汞进行 2 min 消毒处理后的污染率为 20%,褐化率为 0%,成活率为 80%。用次氯酸钠进行 8 min 消毒处理后的污染率为 5%,褐化率为 0%,成活

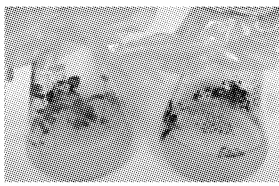


图1 不同消毒剂对除虫菊种子发芽的影响

注:左:次氯酸钠消毒;右:升汞消毒。

率为95%。由此可见,用10%的次氯酸钠对带叶柄的嫩叶进行消毒处理效果最好,消毒时间为8 min 成活率最高。此外,在一定的时间范围内,同一种消毒试剂处理外植体,随着时间的增加,外植体的污染率有降低的趋势,但其褐化率却有升高的趋势。在选择外植体的消毒试剂与时间时既要考虑褐化问题,又要考虑污染因素。

表1 不同试剂及处理时间对
除虫菊叶片消毒效果

消毒试剂	处理时间/min	污染率/%	褐化率/%	成活率/%
0.1%升汞	1	60	0	40
0.1%升汞	2	20	0	80
0.1%升汞	3	15	40	45
0.1%升汞	4	10	50	40
0.1%升汞	5	0	80	20
10%次氯酸钠	1	50	0	50
10%次氯酸钠	3	35	0	65
10%次氯酸钠	5	15	0	85
10%次氯酸钠	8	5	0	95
10%次氯酸钠	10	0	25	75
10%次氯酸钠	15	0	50	50
10%次氯酸钠	20	0	75	25

2.3 不定芽的诱导

由表2可知,4、7号培养基出芽最早,18 d就可见芽点,到30 d时,不定芽诱导发芽率分别为83.3%和85.7%,芽点多发生在叶柄处。而6、8号出芽较晚,30 d后观察发现芽点不仅小而且少。单从诱导率分析,4、7、8、9号的不定芽诱导发芽率均在80.0%~85.7%,但8、9号的不定芽数却极少,仅出现少量芽点,而7号培养基有玻璃化现象。综合考虑,4号即MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,为带叶片的叶柄诱导出不定芽的最适激素比。这与张军云等^[11]的研究结果一致。4号(0.5:0.05)、7号(1.0:0.1)、9号(2.0:0.2)中的6-BA/NAA的比值都为10:1,其不定芽诱导率均很高,9号(2.0:0.2)的不定芽数却明显比4号(0.5:0.05)、7号(1.0:0.1)低,是因为6-BA浓度过高抑制不定芽的分化。邹慧等^[12]认为当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。刘葵等^[4]认为菊科植物普遍含有较高的内源激素。其研究结果也反映出高6-BA浓度诱导出的芽的生长不正常,易出现玻璃化或褐化现象。

表2 不同激素组合对除虫菊不定芽诱导的影响

培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	诱导率 /%	不定芽 个数	出芽部位	芽的状态
1	0.5	0.5	66.5	7.13	叶片	正常
2	0.5	0.2	73.3	2.47	叶柄、叶片	正常
3	0.5	0.1	44.4	2.08	叶柄、叶片	正常
4	0.5	0.05	83.3	8.15	叶柄	正常
5	1.0	1.0	66.7	4.92	叶柄	正常
6	1.0	0.5	14.3	1.70	叶柄	正常
7	1.0	0.1	85.7	8.17	叶片、叶柄	少量玻璃化
8	2.0	1.0	83.3	5.16	叶柄、叶片	正常
9	2.0	0.2	80.0	5.74	叶片	正常

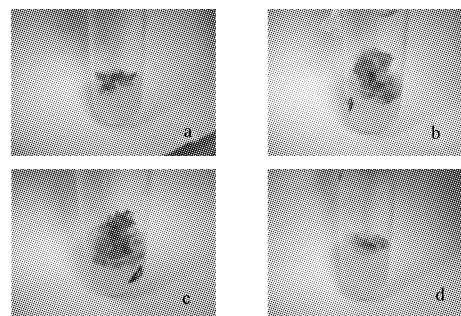


图2 不定芽诱导情况

注:a:从叶柄处出芽;b:从叶柄处和叶片伤口处出芽;c:叶柄和整个叶片都出芽;d:不定芽玻璃化。

2.4 丛生芽的诱导

由表3可知,增殖倍数最高的是2号培养基,其次是4号,而玻璃化率最低的是1、7号,其次是2、6号,4号则是玻璃化率最高的,因此2号即MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L培养基是诱导丛生芽的最适培养基。这与张军云等^[11]的研究结果一致。试验用的是试管,封口用的是不透气的薄膜,因此透气性差。除虫菊生长较快,试管空间有限,这可能使试管内部积累的乙烯和二氧化碳浓度偏高,致使玻璃化现象严重^[13]。3、4号的玻璃化现象,还可能是6-BA浓度偏高的缘故^[14]。吴林等^[15]研究发现在除虫菊丛生芽诱导过程中,随着激素浓度的加大,会出现比较严重的玻璃化现象,玻璃化的幼苗在继代培养中会成批死亡。

表3 不同激素组合对除虫菊丛生芽诱导的影响

培养基	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	增殖倍数	玻璃化
1	0.5	0.05	7.13	+
2	1.0	0.05	9.16	++
3	2.0	0.2	6.77	+++
4	2.0	0.05	8.85	++++
5	1.0	0.1	7.29	++
6	1.0	1.0	5.74	++
7	0.5	0.5	6.73	+

注:“+”:0~1/4的丛生芽玻璃化;“++”:1/4~1/2的丛生芽玻璃化;“+++”:1/2~3/4的丛生芽玻璃化;“++++”:3/4~1的丛生芽玻璃化。

2.5 生根的诱导

由图4可知,未添加激素的MS培养基诱导的根多、长、壮,均为实生根且苗的生长状态较好,且生根率

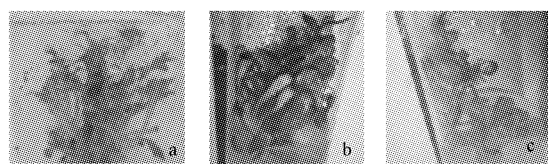


图3 丛生芽诱导情况

注:a:诱导出的正常丛生芽;b:诱导出的丛生芽但苗玻璃化;c:诱导出的丛生芽,但苗玻璃化且愈伤组织很多。

为80%。而用MS+NAA 0.2 mg/L的培养基诱导生根,明显可见愈伤量较多,根少、短、细,且多为气生根,生根率仅55%。综合表4中的生根率可知,未添加任何激素的MS培养基的生根效果比添加了NAA的培养基好。在一般的组培中NAA均有促进生根的作用,但在该试验中,NAA 0.2 mg/L不仅没有促进作用,反而对生根有抑制作用,究其原因可能是除虫菊本身可以分泌足够的内源激素,若再添加外源激素,会因激素浓度偏高而抑制生根。董倩等^[16]在驱蚊草组织培养的研究中认为NAA的影响比较复杂:适量的NAA有利于生根,但在1/2MS、1/4MS培养基中则无激素培养表现明显的早发根现象和平均根数多的现象;过量的NAA则表现为延缓生根及根数极少的现象。郅慧等^[12]在杭白菊试管苗的研究中也发现了这一点。

表4 不同培养基对驱蚊草生根的影响

培养基	外植体数/个	生根率/%	生根情况
MS	30	80	根多、长、壮,均为实生根
MS+NAA 0.2 mg/L	30	55	根少、短、愈伤量多,多为气生根

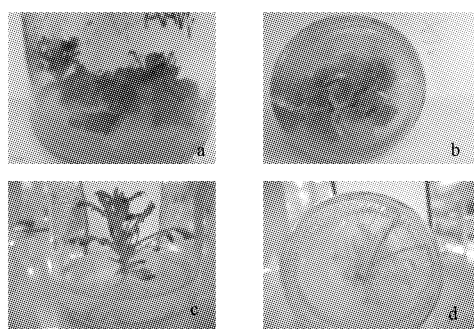


图4 不定根诱导情况

注:a:MS+NAA 0.2 mg/L培养基,正面观,再生苗愈伤量多,多为气生根;b:MS+NAA 0.2 mg/L培养基,底侧观,再生苗无实生根;c:MS培养基,正面观,再生苗根多、长、壮,均为实生根;d:MS培养基,底侧观,再生苗根为实生根,且根多、长、壮。

3 讨论

3.1 外植体不定芽分化

该试验发现无叶柄叶块、带叶柄叶块均可诱导产生不定芽。叶片产生不定芽的部位主要在叶脉切口处和叶柄端切口处,其形态发生过程基本为:外植体在切口处先脱分化形成愈伤组织,愈伤组织再分化形成不定芽,叶柄

处无愈伤组织,直接出芽,整个过程大约需要20 d。

茎段通过2种途径形成不定芽:一是叶腋生芽,即腋芽生长;二是从茎段切口处细胞脱分化形成愈伤组织,再分化形成不定芽。从以上叶块和茎段不定芽的诱导途径来看,二者有一些共同点,即都是在有维管组织部位的切口处细胞启动愈伤,而一般维管组织周围都有一层或多层的薄壁细胞,这些薄壁细胞的特化程度较低,容易脱分化进入再分化的过程^[17-18]。

另外,在不定芽的诱导中,发现叶柄比叶片容易出芽。董倩等^[16]在除虫菊的研究中也阐述了这一现象:叶块的叶柄端切口处最容易分化出不定芽,这是由于叶片或子叶对叶柄或子叶柄具有滋养保护作用。当叶柄平铺时维管组织无法从培养基中获得这些物质,所以不能启动,而当叶柄被插入培养基后,就可以充分的吸收营养,以满足启动不定芽时的物质和能量需求。这也间接的说明了叶片的滋养保护作用。

3.2 褐化现象

褐化一直是困扰植物组织培养的难题,在进行除虫菊组织培养的过程中,同样也存在褐化现象。对叶片进行消毒处理时,叶片极易褐化。在对除虫菊不定芽的诱导试验中发现,30 d后有少量叶片诱导出的愈伤褐化,影响了不定芽的生长。关于褐化现象有不同的观点,颜昌敬^[19]认为褐变是由材料伤口处分泌的酚类化合物引起的;而徐振彪等^[20]认为,褐化可能是由于细胞受胁迫或其它不利条件影响而死亡(称为程序化死亡)或自然发生的细胞死亡(称为坏死)造成的。董建新等^[8]认为,影响除虫菊愈伤组织褐化的因素是多重的,既与外部培养条件(温度、光照、光强等)有关,又与培养基成分以及外激素种类和浓度有关,同时与不同的外植体取材部位也有关系。对于褐化的抑制,前人已做过不少工作,总结出了多种有效的抑制途径^[21-23]:适当降低培养温度;选择适宜的培养材料;选择刀口较快的,没有生锈的操作工具;暗培养一段时间;加吸附剂活性炭及维生素C之类的抑制褐化的物质等。针对试验中叶片消毒时的褐化现象,可以选择用10%的次氯酸钠消毒5 min这样可以使褐化率降低。对于愈伤组织的褐化,可选择适宜的激素配比,或进行暗处理等措施来降低褐化率。

3.3 玻璃化现象

在丛生芽的增殖过程中发现玻璃化情况很严重,当6-BA:NAA为2.0:0.05时丛生芽玻璃化率大于3/4,且大部分增殖培养基中也均有不同程度的玻璃化情况。玻璃化是组织培养中一个常见问题,是试管苗的一种生理失调症状,植物试管苗玻璃化是指试管苗呈半透明状,外观形态异常的现象。虽然试管苗玻璃化后可延长恢复正常的时间,也可通过诱导形成愈伤组织后重新分化生成正常苗^[24],但通常玻璃苗恢复正常的概率很低,

继代培养中形成玻璃苗,且玻璃苗的分化能力低,难以增殖生根成苗。玻璃化苗的生理功能异常,难以移栽成活,因此玻璃苗的出现对于植物快速微繁殖是不利的。玻璃化的原因有多种^[25]:植物种类和外植体部位;培养基激素浓度;琼脂含量与培养基硬度;离子水平;培养温度;光照时间和强度;通风条件(封口膜);碳源种类、含量与培养基的渗透势。当控制玻璃苗发生时,大多研究者均采用如下措施^[26]:控制细胞分裂素的用量;提高琼脂浓度;选用适当的培养基和改变供氮形态;提高培养基中蔗糖用量;增加自然光和防止温度突变;改善培养容器的气体交换状况;在培养基中添加有机物,如青霉素和氯化胆碱等;添加植物激素合成前体,如 ACC 等;选择优良的外植体并尽量减少创伤乙烯发生。对于除虫菊的玻璃化情况,除了从以上几方面进行改进外,还可以用果酱瓶代替试管,用透气材料代替封口膜,控制激素的浓度,在培养基中添加有机物等措施来解决。

参考文献

- [1] 陈宗莲,侯岁稳,俞宏渊. 除虫菊的组织培养[J]. 云南植物研究, 1998, 20(3): 351-354.
- [2] 杜冰群,刘启宏,朱翠英. 除虫菊的染色体数目及其核型[J]. 武汉植物学研究, 1988, 6(1): 95.
- [3] 陈寿宏. 真空冻干技术在除虫菊鲜花干燥中的应用研究[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(9): 31-33.
- [4] 刘蓁,高山林. 白花除虫菊组织培养研究[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 370-374.
- [5] 吴沿友,张平夫. 除虫菊组织培养研究[J]. 贵州科学, 1995, 13(3): 28-30.
- [6] 任秋萍,张复君. 驱蚊草的栽培管理技术[J]. 农业新科技, 2002(3): 11-12.
- [7] 顾刘金,杨校华,陈琼姜,等. 天然除虫菊酯的免疫毒性[J]. 职业与健康, 2003, 19(12): 37-38.
- [8] 董建新,马志卿. 除虫菊愈伤组织的诱导和继代[J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(3): 77-79.
- [9] 任彦荣. 除虫菊组织培养的研究[J]. 甘肃联合大学学报(自然科学版), 2009, 23(4): 61-63.
- [10] 张强,李瑛,张兴. 除虫菊组织培养中种子及幼苗消毒方法研究[J]. 陕西农业科学, 2007(2): 27-28, 55.
- [11] 张军云,马文彬,瞿观,等. 除虫菊组织培养快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 989-992.
- [12] 邱慧,高山林. 杭白菊茎尖组织培养及试管苗繁殖技术研究[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 24.
- [13] 李胜,李唯. 植物试管苗玻璃化现象研究进展[J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 3(1): 4-19.
- [14] 孙满芝,尹成涛. 植物组培过程中玻璃化现象的发生与解决措施[J]. 山东林业科技, 2001(6): 19-20.
- [15] 吴林,吴飞,余家平,等. 驱蚊草组织培养及其愈伤组织诱导研究[J]. 生物学杂志, 2007, 24(4): 45-48.
- [16] 董倩,李凤玉. 驱蚊草组织培养及其再生体系的建立与优化[J]. 福建师范大学学报, 2006, 22(1): 73-76.
- [17] 张新英,韩厉玲,李白玲. 离体培养下白杜木质部的形态发生研究[J]. 植物学报, 1989, 31(7): 489-494.
- [18] 柯善强,傅俊,桂耀林,等. 裂叶悬钩子器官发生的细胞组织学观察[J]. 植物学报, 1989, 31(11): 889-891.
- [19] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1990.
- [20] 徐振彪,傅作申,原亚萍,等. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学—杂粮作物, 1997(1): 55-56.
- [21] 张俊琦,罗晓芳. 牡丹组织培养中褐化的发生原因与防治方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006(5): 720-724.
- [22] 陈政,李程斌,何家宝,等. 在正交设计在驱蚊草组织培养中的应用[J]. 安徽师范大学学报, 2008, 31: 364-367.
- [23] 李丽,何康. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 复旦学报(自然科学版), 2006, 45(6): 705-707.
- [24] 柴明良. 留兰香玻璃苗愈伤组织化再生正常植株[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27: 371-376.
- [25] 陈龙清,李春. 日本早小菊的组织培养及玻璃苗防治[J]. 华中农业大学学报, 1995, 6(3): 272-274.
- [26] 黄宇翔. 无病毒香石竹组培玻璃化控制研究[D]. 福州:福建农林大学, 2005.

Establishment of Highly Efficient *in vitro* Plant Regeneration of *Pyrethrum cinerariae folium*

YU Ya, QU Ling

(Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: Using *pyrethrum cinerariae folium* leaves as experimental materials, the factors of adventitious buds induction, shoot buds proliferation and shoots rooting were investigated systematically. The results showed that the effects of leaf sterilized with sodium hypochlorite were suitable than those with mercuric chloride. Leaf was sterilized in choice sodium hypochlorite for 8 minutes and the survival rate reached as high as 95%; The suitable medium of adventitious buds induction was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L, which made the shoot buds differentiation frequency of 83.3% and the average number of shoot buds per explants was 8.15. The shoots proliferation medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5mg/L, with the ratio of buds propagation was 9.16. The optimal rooting medium was MS without no hormones and the rooting rate of 80%.

Key words: *Pyrethrum cinerariae folium*; adventitious buds; browning