

# 黄山贡菊茎尖脱毒快繁技术研究

李云玲<sup>1</sup>, 孙虎<sup>1</sup>, 苗锦山<sup>1</sup>, 刘杰<sup>1</sup>, 孙明茂<sup>1</sup>, 孙海亮<sup>2</sup>

(1. 潍坊科技学院 园艺科学与技术研究所, 山东 寿光 262700; 2. 山东禾宜生物科技有限公司, 山东 寿光 262700)

**摘 要:**以黄山贡菊茎段为外植体,研究了不同消毒方法和不同培养基对黄山贡菊茎尖组织培养的影响。结果表明:0.1%升汞消毒 8 min,外植体污染率及褐化率较低;诱导茎尖分化的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.05 mg/L,芽诱导率可高达 100%,且丛生芽生长较快;最适宜生根的培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L,植株生根粗壮,根系发达,利于练苗及移栽。

**关键词:**黄山贡菊;茎尖;组织培养;快繁

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0106-03

黄山贡菊又称贡菊、徽州贡菊,与杭菊、滁菊、亳菊并称为中国四大名菊。黄山贡菊的花器官含有挥发油、腺嘌呤和类黄酮等成分,有疏风散热、清肝明目、解疮毒等作用,是价值颇高的中药材,其制品市场需求日益增加。目前传统生产的扦插、分株等无性繁殖方法繁殖系数较低,苗株成本较高。尤其贡菊多代分殖易引发病毒侵入植株并积累,引发其种性退化以及产量和品质的下降。利用茎尖组织培养技术可以有效脱除贡菊多种入侵病毒,使之恢复原有品种种性。还可加快贡菊的繁殖速度,缩短其生育周期<sup>[1-3]</sup>,从而降低生产成本和增加产量,生产应用前景广阔。

该试验针对黄山贡菊生育期间存在的实际问题,以贡菊茎尖为材料进行脱毒培养,以期获得大量脱毒组培苗,为黄山贡菊脱毒苗在生产上的大规模应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为无病虫害、生长健壮、带顶芽的黄山贡菊茎段。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒和茎尖剥离 取菊花带顶芽的茎段,长约 2 cm,先用清洁自来水冲洗并轻刷材料,除去附着尘土,然后用吸水纸吸干水分;再除去多余叶片,转入超净工作台;先用 75%乙醇灭菌 30 s,然后用无菌水冲洗 2~3 遍;再用 0.1%的升汞和 10%次氯酸钠按照设定的不同灭菌时间分别灭菌(表 1);最后用无菌水冲洗 4~5 次,中间不停搅动。将消毒好的茎段放入无菌的培养皿

内,直至观察到表面出现光滑呈圆锥形的茎尖为止。切取长约 0.3~0.5 mm 的圆锥体茎尖,接种于 MS 基本培养基。每处理接种 6 瓶,每瓶接种 4 个茎尖。5 d 后统计污染率,确定最佳消毒方法。

表 1 不同消毒剂的消毒时间

编号	消毒剂	消毒时间/min
1	0.1%升汞	5
2	0.1%升汞	8
3	0.1%升汞	10
4	10%次氯酸钠	5
5	10%次氯酸钠	8
6	10%次氯酸钠	10

1.2.2 培养基的配制 该试验诱导茎尖分化培养基是在 MS 基本培养基的基础上,分别添加不同浓度配比的 6-BA 和 NAA。J1:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L;J2:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;J3:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;J4:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;J5:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;J6:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;培养基蔗糖和琼脂含量分别为 3%和 0.7%。每种培养基分装 6 瓶,每瓶接种 4 个外植体,30 d 后进行顶芽分化情况调查。

1.2.3 培养条件 在光照强度为 1 800 lx,温度为(25±2)℃,光照时长为 14 h/d 的培养室中进行培养。

1.2.4 生根培养 丛生芽长至 2 cm 左右时进行单芽切割,转入添加 IBA 和 NAA 的 MS 培养基中进行生根试验。G1:MS+IBA 0.5 mg/L;G2:MS+IBA 1.0 mg/L;G3:MS+NAA 0.5 mg/L;G4:MS+NAA 1.0 mg/L。每天观察根系生长情况,15 d 后调查生根情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒方法的灭菌效果比较

植物组织培养中,0.1%升汞和 10%次氯酸钠是常用的消毒剂。按照不同的灭菌方法灭菌后进行接种培

**第一作者简介:**李云玲(1982-),女,硕士,讲师,现主要从事农业生物技术等研究工作。E-mail:liyuning82@126.com.

**责任作者:**苗锦山(1972-),男,博士,副教授,现主要从事作物育种等研究工作。E-mail:lnmjs@163.com.

**收稿日期:**2013-09-23

养,5 d后观察记录各瓶污染情况。由表2可知,75%乙醇消毒30 s后,0.1%升汞消毒8 min和10 min污染率最低,考虑消毒时间,8 min效果最好,外植体生长良好。10%次氯酸消毒10 min效果次之。10%次氯酸钠消毒5 min效果最差,污染率高达100%。

表2 不同消毒方法对贡菊茎段的灭菌效果

编号	接种数	污染块数	污染率/%
1	24	21	87.50
2	24	1	4.17
3	24	1	4.17
4	24	24	100.00
5	24	16	66.67
6	24	5	20.83

## 2.2 不同激素配比对黄山贡菊茎尖的诱导效果

从表3可以看出,6-BA的浓度与黄山贡菊茎尖分化率关系密切,一定范围内6-BA浓度过高或过低均不利于茎尖分化。其中,J2培养基为黄山贡菊茎尖最适宜分化培养基。该培养基30 d诱导的丛芽数为24个,茎尖分化率100%,且丛芽生长较快,利于进一步生根(图1、2)。在6-BA浓度确定的基础上增加NAA浓度,茎尖分化率呈现下降趋势,且分化出的芽生长缓慢。这与张伟<sup>[4]</sup>的切花菊花组培研究结果不一致,可能与菊花基因型差异有关。

表3 不同激素对比对贡菊茎尖的诱导效果

编号	接种芽数	30 d后分化丛生芽数	分化率/%
J1	24	17	70.83
J2	24	24	100.00
J3	24	22	91.67
J4	24	11	45.83
J5	24	16	66.67
J6	24	14	58.33

## 2.3 不同培养基对黄山贡菊分化芽生根的影响

将培养约45 d后得到的长约2~3 cm的分化丛芽进行单芽切割,然后分别接种至G1~G4培养基中进行生根培养。由表4可知,MS基本培养基添加0.5~1.0 mg/L的NAA或0.5~1.0 mg/L的IBA均可诱导贡菊生根,生根率均为100%,说明黄山贡菊组培生根所需的激素较为广泛,较易生根。但4种培养基中单株生根数和根的长势差异显著。其中,G3和G4培养基诱导生根数多,单株可生根16条和15条。且根粗壮,发育良好(图3);而G1和G2中生根较细弱,生根数少,每株仅生根6条和8条(图4)。因此,贡菊诱导生根最优培养基为MS+NAA 0.5~1.0 mg/L,诱导植株根系较发达,植株健壮,有助于提高成活率(图5、6)。



图1 接种20 d茎尖分化形成的丛生芽



图2 接种45 d形成的丛生芽

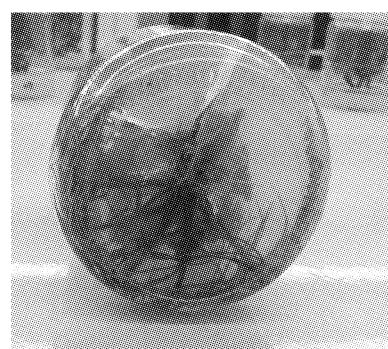


图3 G3中组培苗生根,粗壮,根系发达

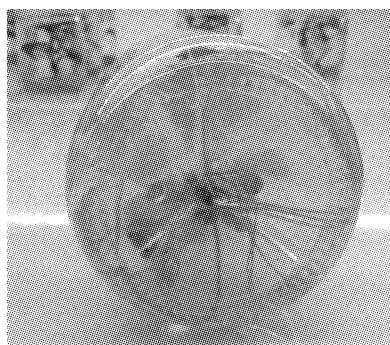


图4 G1中生成的组培苗生根,较细长,根数少

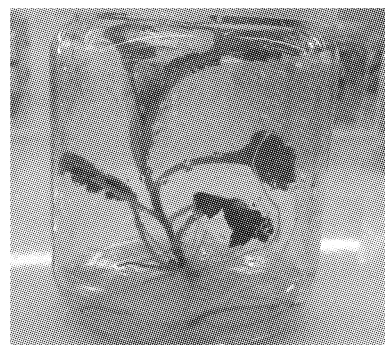


图5 组织培养获得的黄山贡菊全株





图6 组织培养获得的黄山贡菊苗

表4 不同培养基对贡菊分化芽生根的影响

编号	生根率/%	每株根数	根的生长势
G1	100	6	较细长
G2	100	8	较细长
G3	100	16	根粗壮,较长
G4	100	15	根粗壮,较长

### 3 讨论与结论

该研究在试验过程中发现叶片、茎段、根、茎尖等贡菊的组织器官均可诱导成苗,但以茎尖诱导分化最快,繁殖系数高,且茎尖分生组织中维管系统尚未发育完善,病毒仅能通过刚形成的少量的胞间连丝进行细胞间转移,因此茎尖分生区的病毒传播速度很慢,组培后获得无毒苗的几率也较大,从而达到脱毒快繁的目的<sup>[5]</sup>。该试验优化了黄山贡菊茎尖培养的灭菌方法、诱导分化和生根的激素配比,发现0.1%升汞消毒效果优于10%次氯酸钠。0.1%升汞消毒8 min时污染率较低,符合规模化生产需要。在MS培养基中添加2,4-D、6-BA、NAA等不同配比的激素,表明在添加6-BA和NAA的组合中茎尖分化率较高,并筛选到黄山贡菊最优分化培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L,此培养基诱导

分化率高,繁殖系数高,丛生芽健壮,生长快。贡菊组织培养生根所需激素较为广泛,该试验中以MS+NAA 0.5 mg/L为最佳生根培养基。

近年来,贡菊的组织培养中的外植体选择、培养基的设计、培养条件的控制、病毒检测、脱病毒苗的染色体鉴定等研究进展较快<sup>[6-9]</sup>。但实际生产中仍需进一步简化组培条件控制,降低组培成本,实现黄山贡菊种苗工厂化生产,并形成完整的贡菊脱毒快繁及配套栽培管理技术体系,以满足产业发展需求。同时,在完善优化黄山贡菊组培体系的基础上还应积极探索发展贡菊基因工程技术,加强品种基因修饰和种质创新,改善其产品品质<sup>[10]</sup>,从而更好地满足生产需求。

### 参考文献

- [1] 薛建平,张爱民,赵丰兰.安徽药菊茎尖组织培养技术的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(5):350-353.
- [2] 蔡祝南,杨莉莉,彭超美,等.切花菊病毒脱毒及脱毒苗的检测[J]. 植物病理学报,1992,22(1):34.
- [3] 宋瑞林,吴如健,黄兆才.福建省菊花病毒病的初步调查与检测[J]. 福建农业科技,1997(5):17.
- [4] 张伟.切花菊组织培养及快速繁殖的初代研究[J]. 现代园艺,2012(17):4-5.
- [5] 刘庆昌,吴国良.植物细胞组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2003:78-79.
- [6] 刘丽辉,王亦民,方顺生.黄山贡菊的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2001,37(4):314-315.
- [7] 刘丽辉.黄山贡菊的脱毒快繁与栽培技术[J]. 特产研究,2002(1):48-49.
- [8] 薛建平,张爱民,常玮.安徽药菊叶片直接再生植株技术的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(2):132-134.
- [9] 薛建平,常玮,张爱民,等.安徽药菊花瓣组织培养技术的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(3):211-214.
- [10] 代丽萍.药菊组织培养研究进展[J]. 安徽农学通报,2008,14(7):86-88.

## Tissue Culture and Rapid Propagation of *Chrysanthemum morifolium*

LI Yun-ling<sup>1</sup>, SUN Hu<sup>1</sup>, MIAO Jin-shan<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, SUN Ming-mao<sup>1</sup>, SUN Hai-liang<sup>2</sup>

(1. Institute of Horticultural Science and Technology, Weifang University of Science and Technology, Shouguang, Shandong 262700;  
2. Shandong Heyi Bio-technology Corporation, Shouguang, Shandong 262700)

**Abstract:** With the stem tips of *Chrysanthemum morifolium* as the explants, the effects of different disinfection methods and culture mediums on stem tip tissue culture were studied. The results showed that the contamination rate and browning rate of the explants were the lowest by 0.1% mercuric chloride for 8 min. The optimum culture medium for inducing adventitious shoots was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L, the bud induction rate was up to 100%, and the multiple shoots grow rapidly; the optimum rooting culture medium was MS+NAA 0.5 mg/L, it was easier for acclimatizing and transplanting with the sturdy root system.

**Key words:** *Chrysanthemum morifolium*; stem tip; tissue culture; rapid propagation