

# 菊花离体快繁技术流程概述

苏云凤<sup>1</sup> 岳中辉<sup>2,\*</sup> (1 哈尔滨师范大学教师教育学院 150025; 2 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 150025)

**摘 要** 菊花离体快繁技术是解决菊花优质种苗短缺的有效途径之一。本文概述菊花离体快繁技术流程的研究进展,为园艺植物的离体快繁研究提供基础生物学资料。

**关键词** 菊花 离体快繁 技术流程

菊花是菊科菊属的多年生宿根草本植物,是世界四大切花之一,已成为全世界普遍栽培的重要花卉。菊花除了具有很高的观赏价值外,还具有清热解毒、平肝明目等药用价值。菊花主要靠扦插或嫁接繁殖,需较多的母株材料,且受季节和外界环境的限制,繁殖速度较慢。而离体快繁是指利用离体培养技术,将植物的器官、组织或是细胞在合适的条件下用培养基进行培养,在短期内获得大量遗传性一致的个体的方法。对菊花进行离体快繁,可以提高菊花的繁殖系数和繁殖速度,满足菊花种苗的市场需求。本文综述菊花离体快繁的技术流程,为菊花及其他园艺植物的离体快繁研究提供基础资料。

## 1 菊花离体快繁技术的流程

1.1 外植体的选择 在进行菊花离体快繁时,首先要进行外植体的选择,目前人们采用的外植体有茎尖、茎段、叶片、花瓣、花蕾、花序轴以及花托等。其中最常采用的是幼嫩的带芽茎段,其次是幼嫩的茎尖和花瓣。这些外植体可以来自自然生长的健壮植株,也可以源自离体条件下由种子培养出的无菌苗。外植体选择好后,需要对外植体进行适当的修剪。

1.2 外植体的灭菌 将修剪后的外植体在超净工作台上进行灭菌,常用的灭菌剂是酒精+升汞,即先用 70%~75% 酒精处理 30 s,再用 0.1% 的升汞处理 5~20 min。当外植体是茎尖、茎段、叶片、花蕾时灭菌时间为 5~8 min,外植体是花瓣、花序轴、花托时灭菌时间为 10~20 min。也有学者用酒精+次氯酸钠来灭菌,即先用 75% 酒精对未开放花蕾进行表面灭菌 15 s,再用次氯酸钠处理 5 min(外植体是花瓣)。此外,可用次氯酸钠和戊二醛作为灭菌剂,对花蕾进行灭菌。

1.3 外植体的接种 若外植体是茎尖或茎段,可将其剪成 1~2 cm 大小,基部切成斜切面,插于培养基上完成接种;当外植体是叶片、花瓣时,可将其切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的小片,按照形态学方向平铺接种;若外植体是花蕾,需要将其纵切成大小相等的 3~6 块,平放着接种于培养基中;若外植体是花序轴或花托时,则需要将其切成 4 等块,并将表面向上进行接种。

1.4 外植体的诱导培养 菊花外植体接种后开始进行人工诱导培养,培养温度控制在 24~26℃,湿度控制在 65%~85%,光照时间 10~12 h/d,光照强度为

1 000 lx~3 000 lx。培养时多以 MS 为基本培养基,加入细胞分裂素(6-BA、KT)和生长素(NAA、IBA、2,4-D、IBA)两类植物生长调节剂,细胞分裂素的浓度一般为 1.0~2.0 mg/L,生长素的浓度一般为 0.1 mg/L。若外植体为茎尖或茎段时,可诱导外植体直接成芽,加入的植物生长调节剂一般是 6-BA 和 NAA;若外植体为叶和花时,需要先诱导形成愈伤组织,然后成芽,加入的植物生长调节剂是 6-BA 或 KT 和 NAA 或 IBA 或 2,4-D 等。

1.5 芽的增殖培养 在外植体诱导成芽后,需要进行继代培养进行芽的增殖。一般也是以 MS 培养基,加入 6-BA 和 NAA,6-BA 的浓度一般为 1.0~2.0 mg/L,NAA 的浓度一般为 0.1 mg/L。

1.6 试管苗的生根培养 增殖后的试管苗长到 2 cm 高以上时,即可转接至生根培养基上进行生根培养。大多数研究是用 1/2 MS 作为基本培养基,再向培养基中加入 NAA,NAA 的浓度一般为 0.1~0.2 mg/L,也有学者加入 IBA 进行生根培养,IBA 的浓度一般为 0.5 mg/L。

1.7 炼苗和移栽 当生根培养中的根长到 3~4 cm、平均根数 2~3 条以上时,即可进行炼苗。炼苗时首先将瓶塞打开,让其由无菌环境转至有菌且湿度较低的环境中锻炼 3 d,此时苗的成活率最高,可达 95% 以上。然后将苗取出,洗净根部附着的培养基,移栽到基质中。基质分为有机基质和无机基质,有机基质主要有壤土、泥炭土、沙土、草炭、椰糠、腐熟的猪粪等;无机基质主要有蛭石、珍珠岩、沙等。移栽时两种基质常搭配使用,最常用的是壤土+珍珠岩。

## 2 菊花离体快繁中的几个技术问题

2.1 外植体的处理 对外植体需要进行 5 个方面的处理:①外植体的清理:在取得外植体后,需要将其在烧杯中用饱和洗衣粉溶液漂洗或洗洁精水浸泡 10~15 min,再用蒸馏水冲洗 20~30 min,去掉表面泥土和杂质,防止其污染外植体;②外植体的修剪:对外植体进行灭菌前,不要把茎上的嫩叶剥得太干净,以免伤口面暴露太大,导致外植体的损伤,从而影响培养效果;③外植体的灭菌:用升汞灭菌外植体时,若处理时间过长,外植体污染率虽低,但死亡率增高,若时间过短,则污染率增高,研究发现以升汞处理 5 min 效果最好,

# 关于 DNA 方向性问题之刍议

沈兆瑞 (天津市武清区杨村第一中学 301700)

摘要 DNA 复制、转录以及限制酶识别等过程都离不开“方向”的指引,这一问题在高中生物学教学中屡被提及。本文尝试通过例题对高中阶段涉及到的 DNA 方向性问题进行探讨,为生物学教学提供参考。

关键词 高中生物学 DNA 复制 转录 限制酶识别 方向性

## 1 质疑辨惑

例题: 2011 年 11 月, 武汉大学的科学家将人的血清白蛋白基因导入水稻体内合成了人的血清白蛋白, 这种蛋白质的生理活性和人体自然产生的这类物质是完全一致的。结合图 1 回答转基因水稻培育过程的相关问题。

其中限制酶 *Mun* I 的识别序列及切割位点是一 C<sup>↓</sup>TTAAG—, 而限制酶 *Eco*R I 的识别序列及切割位点为一 G<sup>↓</sup>AATTC—。为保证重组质粒表达载体的准确构建, 应用 \_\_\_\_\_ 切割质粒, 用 \_\_\_\_\_ 切割含目的基因的 DNA 分子, 构成重组质粒。( 参考答案: *Mun* I、*Eco*R I)

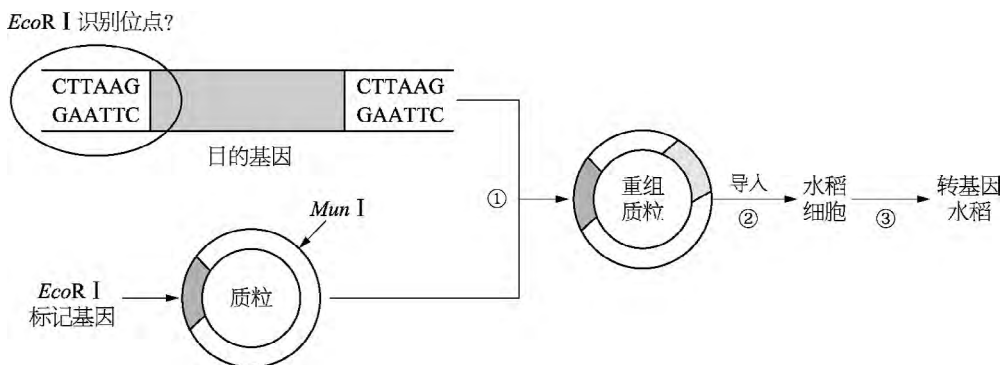


图 1 转基因水稻培育过程示意图

灭菌成活率达 77.8%。但升汞含有剧毒, 且对环境污染严重, 因此在外植体灭菌时应尽量减少升汞的使用或用其他的灭菌剂代替; ④外植体的接种: 在进行外植体的接种时, 需将外植体接触灭菌液的切口切去一小段, 可减少灭菌药物对外植体的毒害。

2.2 培养基的参数选择 涉及 2 个方面的问题: ①pH 值调节: pH 值对培养基的凝固度有较大影响, 一般培养基的 pH 在 5.6 ~ 5.8, pH 过高培养基变硬, 过低培养基不能凝固; ②植物生长调节剂配比: 植物生长调节剂主要分为生长素和细胞分裂素, 两者的配比影响植物组织脱分化的方向。当生长素与细胞分裂素比例适中, 且生长素含量高于细胞分裂素时, 主要诱导形成愈伤组织和根原基; 当细胞分裂素含量高于生长素时, 主要诱导形成芽原基。

2.3 试管苗的成活率 由于试管苗一直处于人工控制的适宜环境, 其抗病和抗干旱等能力均较弱, 一旦出瓶种植, 幼苗的成活率将受到影响, 所以移栽初期的管理是移栽成功的关键。由于根系供水缓慢, 刚移栽的

幼苗要避免强光照射和增加叶表面湿度。但长时间的高湿度利于繁殖猝倒病菌, 幼苗最易感染细菌、病毒, 引起成活率下降, 因此炼苗时间不宜过长。选择 3 d 作为炼苗时间较合适, 在移栽 2 d 后要适当增加光照和减少湿度。

2.4 试管苗的褐化及玻璃化 在诱导愈伤过程中, 由于材料基因型、生理状况和培养条件等因素影响, 外植体会发生不同程度的褐化, 严重影响愈伤分化诱导、再生芽形成。除此之外, 在菊花组织培养过程中, 还可能会产生玻璃化的丛生芽。有研究发现, AgNO<sub>3</sub> 可防止培养物的褐化与玻璃化。

## 3 展望

菊花的离体快繁技术日趋完善, 已初步建立了一套菊花组培快繁的培养程序, 但该技术成本较高, 所以如何通过简化培养基、简化工序以及改进移栽技术等方法来降低成本, 生产出大量廉价的优良植株, 是菊花离体快繁技术亟待解决的问题。

(\* 通信作者) ◆