

药菊组织培养研究进展

代丽萍 胡蕙露* 丁元春 丁香莲 陈羽

(安徽农业大学林学与园林学院, 安徽合肥 230036)

摘要:本文对药用菊花组织培养技术及其进展进行了综述, 包括在茎尖培养、叶片培养、花瓣、花蕾培养、以及培养基和培养条件、脱病毒研究、药菊染色体研究等方面, 并对其研究前景进行了展望。

关键词:药菊; 组织培养; 进展

中图分类号 S493 文献标识码 A 文章编号 1007-7731(2008)07-86-03

Progress in Tissue Cultures of *Chrysanthemum Morifolium*

Dai Liping Hu huilu* (College of Forest and Garden, Anhui Agriculture University, Hefei Prov 230036)

Abstract: Through collecting mass literatures, progress of tissue culture technology of stem tip, leaf and flower petals from *Chrysanthemum morifolium*, including research of medium and culture conditions, cutting viruses and chromosomes observation and so on. Was summarized Besides, suggestions about tissue culture of *Chrysanthemum morifolium* were also put forward in the paper.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*; tissue culture; progress

安徽有三种药菊, 贡菊(黄山贡菊)、亳菊、滁菊, 贡菊主产于皖南山区歙县一带, 亳菊产于淮北平原亳州市(原亳县), 滁菊产于江淮丘陵地区的全椒县、滁县。这三种药菊的花含挥发油、腺嘌呤和类黄酮等成分, 有疏风散热、清肝明目、解疮毒的作用, 是药用和饮料兼用的中药材, 也是出口创汇的主要产品。近年来, 随着药用菊花功效的不断验证和菊花茶、菊粉等制品的不断研制开发, 市场对其数量、品种及品质的需求日益提高。但传统的扦插、分株等繁殖方法以及靠自然变异选育新品种等途径繁殖系数较小, 已远远不能满足生产上的需要, 特别是经多代分殖以后, 常造成种性退化, 甚至病毒积累, 产量和品质大大下降。利用组织培养技术, 能够迅速去除病毒和更新品种, 加快了药菊的快速繁殖速度, 缩短了药菊的生育周期, 并且利用茎尖脱毒技术开展药菊复壮的研究工作也就应运而生^[1]。脱毒苗具有抗病性强、生长势旺、高产等特点, 迄今为止, 对脱毒处理后植株的产量、性状等方面的研究已经十分广泛^[2]。本文综述了近年来药菊组织培养、病毒检测、细胞学鉴定等方面的研究进展以及存在的问题, 为药菊组织培养的进一步研究提供参考。

1 培养体系的建立

1.1 外植体的获取 药菊组织培养常用的外植体有茎尖、叶片、花瓣、花蕾。薛建平^[1]人用茎尖对药菊进行脱毒培养。胡蕙露、王杰^[31, 12]等用药菊热处理后的茎尖作为外植体对药菊进行脱毒培养。薛建平^[20]等用药菊的花瓣、花蕾作为外植体进行愈伤组织诱导并成功培育出完整的试管苗。茎尖、花瓣等外植体的选择有时会受到季节的限制和影响, 而叶片的获取则比较方便, 薛建平^[21]等以药菊脱毒苗的叶片为外植体先诱导其形成愈伤组织, 通过调节生长素与细胞分裂素比值诱导完整植株。当生长素与

细胞分裂素比值高时, 诱导根的分化; 两者比值处于中间水平时, 愈伤组织只生长而不分化; 两者比值较低时, 则诱导芽的形成^[30]。此外薛建平^[25]等利用叶片再生植株, 不经过愈伤阶段直接获得再生植株的研究, 并且保持了亲本的遗传性状。

1.2 外植体处理 消毒方法, 茎尖培养取药菊嫩芽长 2cm 左右, 去掉叶片, 接着在洗衣粉中浸泡 10min, 然后用流水冲洗 1-2h。在超净工作台上用 70% 酒精处理 30s, 用无菌水冲洗 3 次后, 再用 0.1% 的升汞溶液处理 8-10min, 无菌水冲洗 6-8 次。将消毒好的材料放入无菌的培养皿内, 在解剖镜下小心剥掉顶芽外面的幼叶, 直至解剖镜下能看清表面光滑呈圆锥形的茎尖为止, 切去长约 0.5mm 的茎尖, 接种于诱导培养基上进行培养^[1]。严格地讲, 茎尖分生组织仅限于顶端圆锥区内长度不超过 0.1mm 的范围内, 但实际操作难以取得, 也不容易培养成功。目前绝大多数的研究报告所取茎尖均超过了该范围^[9]。花瓣和花蕾培养, 剪取即将开放的幼蕾及开放花瓣, 流水冲洗 5min, 70% 酒精表面擦拭消毒后加入 0.1% 的升汞溶液灭菌 5min; 再用无菌水冲洗 5 次, 取出材料滤纸吸干^[20]。

1.3 培养基与培养条件 药菊培养多以 MS 为基本培养基, 在培养物的不同阶段分别附加不同种类和浓度的植物生长物质, 蔗糖 3.0%, 用约 0.8% 的琼脂固化, pH 值 5.8-6.0, 分装后在 121℃ 条件下灭菌 15min。在光照培养箱中, 光照强度为 2000-3000lx, 光照时间 12h · d⁻¹, 培养温度 (25 ± 1) °C^[1]。

2 药菊培养方法

2.1 茎尖培养 药菊主要靠扦插、分株等进行繁殖, 但长期的营养繁殖, 使得病毒积累日趋严重, 造成药菊生长发

育不良和品种退化。目前侵袭菊花的病毒不下 10 种, 如菊花矮缩类病毒 (CSC), 菊花番茄不孕病毒 (TAV), 烟草花叶病毒 (TMV), 黄瓜花叶病毒 (CMV), 马铃薯 X 病毒 (PVX), 马铃薯 Y 病毒 (PVY) 等。药菊一旦感染上这些病毒, 则株矮花小, 在叶片上出现斑点甚至坏死, 严重影响药菊的经济价值。组织培养是脱除病毒的一种重要方法, 结合热处理技术效果更为显著, 国外曾有菊花脱毒试验报道^[3,4], 国内鲜有报道^[5], 为解决安徽药菊的病毒病, 保留优良品种基因, 研究人员主要采用茎尖脱毒苗技术^[1]。自 1952 年法国人 Morel 首次用生长点培养法从罹患病毒病的植株中获得无病毒植株成功以来, 茎尖培养技术广泛用于植物脱毒。关于药菊在茎尖培养方面的研究, 也已经有了很多报道^[1,6]。脱毒苗具有抗病性强、生长势旺、高产等特点, 迄今为止, 对脱毒处理后植株的产量、性状等方面的研究已经十分广泛^[2,7,8]。

2.1.1 药菊脱毒苗方法 脱毒过程中茎尖的成活率和脱毒率是茎尖脱毒培养的两个关键环节^[10,11]。胡慧露、王杰^[12]等的研究表明, 离体培养的药菊茎尖过小 (< 0.3mm) 时, 成活率只有 29%, 脱毒效果最佳 (100%); 茎尖过大 (0.7 - 1.0mm) 时, 成活率虽升高 (75%), 脱毒效果较差 (26%); 相对比较, 取 0.4 - 0.6mm 的茎尖, 可使成活率与脱毒率之间趋于平衡, 脱毒率为 60% 左右。薛建平等^[1]人研究表明, 利用药菊的茎尖作为外植体, 取茎尖 0.5mm 左右, 接种在茎尖诱导培养基 MS + 6 - BA 2.0mg · L⁻¹ + NAA 0.2mg · L⁻¹ 上, 培养 3d 后, 茎尖开始萌动, 经过 10d 菊花茎尖颜色逐渐变绿, 基部逐渐增大, 茎尖也逐渐肿胀, 4 - 6 周后形成丛芽, 40d 后, 芽诱导率达 80% 以上; 以 MS + 6 - BA 2.0mg · L⁻¹ + NAA 0.5mg · L⁻¹ 为芽增殖培养基, 25 - 30d 后, 芽增殖系数达 4 - 7 倍, 而且继代增殖时, 切取的继代苗只留 1 个腋芽与留两个腋芽对增殖速度有一定影响, 一芽苗的生长速度比二芽苗慢, 达到同样的繁殖系数时所需继代周期长 10 - 15d, 年继代次数少 3 - 4 次, 产苗量大幅度下降。生根培养基以 MS + NAA 0.5mg · L⁻¹ 为宜, 生根率 100%, 根系粗壮, 移栽易于成活^[1]。王杰、胡慧露^[13]等人对 3 种脱毒方法 (热处理、茎尖培养、热处理结合茎尖培养) 进行研究。结果表明, 采用热处理 (38℃, 光照 10h · d⁻¹, 1000Lux, 时间 4 周) 对去除球状病毒 TAV 和 CMV 有效, 其中热处理结合茎尖培养脱毒效果最佳, 而且脱毒苗在大田种植表现出较大幅度的增产效果。

2.1.2 药菊脱毒苗检测手段 采用已知的菊花番茄不孕病毒 (TAV), 黄瓜花叶病毒 (CMV), 马铃薯 X 病毒 (PVX), 马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的抗血清, 抗原分别为贡菊、毫菊、滁菊脱毒苗标样, 检测采用酶联免疫吸附测试 (ELISA - 双抗夹心法) 方法^[12,14,15,16] 为: (1) 将 TAV、CMV、PVX 和 PVY 抗体加入聚苯乙烯板反应孔, 洗脱; (2) 将脱毒苗澄清汁液 (抗原) 加入反应孔培养, 洗脱; (3) 用碱性磷酸酶 (AKP) 标记 TAV、CMV、PVX 和 PVY 抗体, 经

透析后加 1% 牛血清蛋白再加入反应孔, 洗脱; (4) 加底物 P - 硝基磷酸钠反应后加 NaOH 终止反应; (5) 用酶标测定仪检测组培苗脱毒率。

2.2 菊花和药菊的花瓣、花蕾培养 据报道, 有关菊花组织培养方面的工作多是针对观赏菊花所做。其中王卉^[17]等的试验结果表明以茎尖和腋芽作外植体扩繁速度快, 再生植株遗传稳定性强; 以花蕾为材料诱导再生植株变异频率高^[17]。李玉芬^[18]、裘文达^[19]的研究也发现菊花器官——花瓣、花蕾在培养过程中, 由愈伤组织再生的植株往往有变异发生, 并且已获得新的观赏品种, 而在菊花花瓣的组织培养过程中, 观察到大量玻璃化丛生芽的现象, 张鹏等^[26-28]研究认为是植物细胞产生乙烯并逐渐积累, 而使培养物的生长受到影响。针对药用菊花, 以花瓣、花蕾为外植体的组织培养也已获成功^[20]。

薛建平^[20]等对花瓣、花蕾为外植体的组织培养进行了较系统研究。以毫菊、贡菊和滁菊的幼蕾及开放花瓣为材料, 获得了药菊变异植株。研究结果表明: 所有培养基均能诱导愈伤组织产生, 但愈伤组织形成和再分化结果有明显差别。愈伤组织诱导花瓣正接优于反接, 培养基以 MS + KT 2mg · L⁻¹ + NAA 0.2mg · L⁻¹ 为宜; 在三种药菊愈伤组织诱导时, 高浓度 KT 和低浓度 NAA 的配合是必须的, 而且 KT 的作用优于 6 - BA; 幼蕾愈伤组织诱导率高于开放花瓣诱导率; 愈伤分化以培养基 MS + KT 2mg · L⁻¹ + NAA 0.2mg · L⁻¹ + AgNO₃ 5mg · L⁻¹ 为宜, 幼蕾花瓣诱导植株再生频率高于开放花瓣; 而且所得植株在叶形、及株形等方面发生了变异。

2.3 药菊叶片培养 选取花蕾作外植体, 常受季节限制, 茎尖或腋芽取材虽无季节限制却不易得到变异率较高的再生植株; 而选用叶片作外植体, 既具有取材方便、易于操作之优点, 同时, 通过诱导愈伤组织再分化又可望得到变异率较高的再生苗^[21]。张嘉宝等以观赏菊花各器官为外植体的离体培养结果也已证明以叶片再生植株能产生高频率变异^[22]; 而针对药用菊花, 以叶片为外植体的组织培养已获成功^[21]。薛建平^[21]等以药菊脱毒苗的叶片为外植体, 按不同接种方式接种到同种培养基上和按同种接种方式接种到不同培养基上进行培养, 诱导其成为完整植株。研究结果表明: 所用培养基均能诱导愈伤组织产生, 但愈伤组织形成后的再分化结果却有明显差别。愈伤组织诱导叶片背接优于正接, 愈伤组织生长以低浓度的 NAA 为宜, 其中 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 6 - BA 0.1 - 1.0 mg · L⁻¹ 是菊花愈伤组织诱导的适宜培养基; 背接芽的分化率也显著高于正接, 分化培养基以 MS + 6 - BA 2.0mg · L⁻¹ + NAA 0.5mg · L⁻¹ 较适宜; 所得再生植株在叶形等方面发生了变异。

近年来, 以药菊叶片为外植体脱分化诱导愈伤组织, 再分化形成再生植株^[21] 已获成功。但这一途径往往存在变异, 因为在愈伤组织中, 常可见到细胞染色体组成发生变化而表现出遗传上的不稳定性^[23,24]。因此薛建平^[25]等

利用叶片再生植株,不经过愈伤阶段直接再生植株的研究也已获成功,并且保持了亲本的遗传性状。研究结果表明:以无菌脱毒苗的叶片为外植体,以不同方式接种到附加不同植物生长物质的培养基中,诱导叶片直接再生植株,其中正接及背接方式中靠近叶柄的近基端再生能力明显高于叶顶部,造成这种现象的原因可能是维管束在叶中的分布密度不同^[29];叶片背接方式中芽的分化率远远高于正接方式,而且不同品种间再生能力存在着很大差异,贡菊和毫菊、滁菊相比,叶片直接再生植株过程多表现为生长停滞、分化慢。因此对毫菊、滁菊来说,培养基 MS + 6-BA 0.1mg · L⁻¹ + NAA 0.1mg · L⁻¹ 诱导效果最好;其中以背接方式适于植株的直接再生。

2.4 药菊染色体研究 胡惠露、王杰、李展等人对安徽药菊三个品种及其脱病毒苗进行染色体比较观察,结果表明,毫菊、滁菊、贡菊三个品种脱毒前后染色体数大多均为4倍体(2N = 4x = 36, x = 9),脱毒处理没有造成各药菊遗传种性的明显变异。此外,毫菊大田苗有少数奇数多倍体(2N = 5x = 45),其脱病毒苗除此之外还出现非整倍体变异(2N = 43);贡菊大田苗有少数非整倍体(2N = 28),其脱病毒苗出现少数奇数多倍体(2N = 3x = 27)^[32]。

3 结论与展望

综上所述,近些年来药菊的组织培养研究取得了较大的进步,包括药菊脱病毒手段、病毒检测、脱病毒苗的染色体鉴定都有了较系统研究,但对药菊的外植体选择、培养基的设计、植物生长调节物质和培养条件的控制等方面,还有待进一步研究。另一方面,药菊的组培还仅限于试验研究和小规模生产,需要探索组培条件的控制,实现药菊种苗生产工厂化、自动化,才能满足产业化需求。此外药菊的组织培养研究虽已经取得了较大的进步,但目前还未形成完整的药菊组培苗、脱病毒苗繁育体系及配套的栽培管理技术,今后应完善这方面的技术,以推动药菊快繁产业化发展。最后,还应把药菊的组织培养与基因工程、细胞工程结合起来,以创造新的药菊变异品种,改善药菊的产品品质。

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]. 中国中志,2002,27(5):20

[2] 栾运芳,王建林. 脱毒与未脱毒马铃薯叶片光合特性的比较研究[J]. 中国农业科学,2001,35(1):222

[3] 麻谷正义,井上忠男. 热处理对菊花病毒病的作用(初报). 日植病报,1968,34(5):384

[4] Hakkart AF and Quak F1 Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysan themum from virus B by means of meristem culture Neth1JI Plant path,1964,(70):154-157

[5] 蔡祝南,杨莉莉,彭超美等. 切花菊病毒脱毒及脱毒苗的检测. 植物病理学报,1992,22(1):34

[6] 王康才,茅毓英,张雪琼. 杭菊花茎尖组织培养初探. 中药材,2000,23(3):125

[7] 陈选阳,陈凤翔,袁照年等. 甘薯脱毒对一些生理指标的影响. 福建农业大学学报,2001,30(4):449

[8] 扬鹏,郑晓军,孙毅等. 枣树茎尖脱毒培养过程中的细胞显微结构和3种保护酶活性的变化. 植物生理学通讯,2002,38(4):341

[9] 张宇和. 果树繁殖[M]. 上海:上海科技出版社,1984

[10] 陈君帜等. 李属植物脱毒技术及病毒检测研究进展[J]. 北京林业大学学报,2001,23(5):71-73

[11] 邹英宁,李国怀. 李组织培养研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2005,34(4):76-80

[12] 王杰,胡惠露,张成林等. 菊花病虫害综合防治研究. 应用生态学报,2002,13(4)

[13] 王杰,胡惠露,胡易冰等. 安徽药菊高产无公害栽培技术研究. 中国中药志,2001,26(5)

[14] Li R-G(李汝刚). 1990. Three viruses causing mosaic symptoms on Dahlia pinnata Cav. In Beijing. Acta Phytopathol Sin(植物病理学报),20(2):111-115(in Chinese)

[15] Wadell HT, et al. 1980. Physiology and pathology of septonia species on chrysanthemum Mycologia,55:422-452

[16] Wang G-H(王光华), et al. 1995. On pathogen of Stevia rebaudian Bertoni leaf spot disease. Acta Phytopathol Sin(植物病理学报),25(4):336(in Chinese)

[17] 王卉. 地被菊组培快繁及栽培技术的研究. 山西农业科学,1995,23(1):49

[18] 李玉芬. 几种菊花花器培养技术及栽培技术的研究. 生物技术,1997,7(2):24

[19] 裘文达,李曙轩. 菊花名贵品种组织培养快速繁殖的研究. 浙江农业大学学报,1983,9(2):105

[20] 薛建平,常玮,张爱民等. 安徽药菊花瓣组织培养技术的研究. 中国中药杂志,2004,29(3)

[21] 薛建平,于森,张爱民. 安徽药菊叶片愈伤组织诱导及植株再生技术的研究. 中国中药杂志,2003,28(3):213

[22] 张嘉宝,蔡朝晖,付蕾等. 菊各器官的组织培养. 河南师范大学学报(自然科学版),1986,(1):108

[23] Hiroshi E, Ezuta G. Highly frequent apperance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of Melon. Plant Scie, 1992,85:209

[24] 许智宏. 植物生物技术. 上海:上海科学技术出版社,1998. 186

[25] 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. 中国中药杂志,2004,29(2)

[26] 张鹏,傅爱国,王爱国. AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能机制. 植物生理学讯,1997,33(5):376

[27] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol. 1984,35:155

[28] 李浚明. 组织培养教程. 北京:中国农业出版社,2002. 28

[29] 李小芳,汤章城,何玉科. 不定根的形态发生与调节机制. 细胞生物学杂志,2001,23(3):130

[30] 潘瑞炽,董恩得. 植物生理学. 第3版. 北京:高等教育出版社,1995. 203

[31] 胡惠露. 安徽贡菊茎尖培养和再生植株. 安徽农业大学学报,1987,NO. 3,13

[32] 胡惠露等. 安徽药菊脱病毒苗的染色体研究. 安徽中医学院学报,1991,10(3):45-47