

doi:10.11937/bfyy.20182615

# 太行菊组织培养技术研究

韩 霜, 马 丽, 裴冬丽

(商丘师范学院 生物与食品学院, 植物与微生物互作重点实验室, 河南 商丘 476000)

**摘 要:**以太行菊叶片、叶柄、茎尖和茎段为试材, 采用 MS 培养基, 在其中添加不同的激素对太行菊的不同外植体进行培养, 研究了濒临灭绝的太行菊再生植株的方法。结果表明: 太行菊的叶片、叶柄作为外植体诱导出愈伤组织的诱导率分别为 44.44% 和 44.11%, 所需时间较长, 而茎尖、茎段作为外植体诱导愈伤组织诱导率分别为 48.44% 和 68.75%, 培养时间较短。茎段最适合作为诱导愈伤组织的繁殖材料。为了使茎段能更好的诱导出愈伤组织, 课题组又对诱导茎段愈伤组织的激素浓度组合进行了研究, A 组: MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, B 组: MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, C 组: MS + 6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, D 组: MS + 6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>。试验表明, C 组激素浓度组合最适合太行菊茎段的愈伤组织诱导。35 d 后愈伤组织不再增加后进行继代培养, 45 d 后将植株转移至生根培养基 1/2MS + NAA 0.12 mg · L<sup>-1</sup> 中进行生根培养。

**关键词:**太行菊; 愈伤组织; 组织培养

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)06-0083-06

太行菊 (*Opisthopappus taihangensis*) 属菊科太行菊属多年生草本植物, 又名野菊花, 是中国所独有的, 产于山西陵川、晋城、河南济源、新乡、辉县、林州市茶店镇等太行山区, 生长在山坡岩石上, 由于生存环境恶劣和附近人的随意采摘, 现在处于濒危状态, 已被列为国家第二批珍稀濒危保护植物和河南省重点保护植物<sup>[1]</sup>。经研究证明, 太行菊与其它菊花相比, 太行菊有更好的保健、药

用作用以及经济价值<sup>[2-6]</sup>。由于太行菊分布的地域比较狭窄, 生长环境比较恶劣, 而其种子不育, 扦插又极不易成活, 大量实践证明组培是最理想的繁殖方法<sup>[7]</sup>。

组织培养是利用细胞的全能性, 对植株的外植体进行离体培养<sup>[8]</sup>。近年来组织培养方法已经被广泛应用, 该方法不仅繁殖系数高、繁殖速度快, 而且可以进行品种的脱毒复壮、种质资源保存和濒危植物种群数量的扩大等<sup>[9]</sup>。太行菊是依靠自然条件繁殖的濒危植物, 受自身条件、地理环境和季节的限制, 很难达到快速、高效繁殖的目的<sup>[10]</sup>。前期对太行菊组织快繁做了一些研究, 赵元增等<sup>[11]</sup>探讨了培养基的种类和无机盐的用量对太行菊不定芽增殖与生长的影响, 认为 MS 培养基作为基本培养基效果最好, 在 1.5%~3.0% 的糖浓度范围内, 不定芽增殖与生长差异不大。桑叶子等<sup>[12]</sup>对太行菊茎段进行了细胞悬浮培养, 得出了诱导愈伤组织的最佳配方。目前还没有对

**第一作者简介:**韩霜(1982-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物光合作用等教学与科研工作。E-mail: htshd\_012@163.com.

**责任作者:**裴冬丽(1971-), 女, 博士, 教授, 现主要从事分子植物病原体互作等教学与科研工作。E-mail: peidongli@126.com.

**基金项目:**河南省科技厅科技攻关资助项目(162102110161, 162102110092); 河南省高等学校重点科研资助项目(17B210010); 国家自然科学基金资助项目(31571997)。

**收稿日期:**2018-10-29

叶片、叶柄、茎尖、茎段4种外植体进行诱导愈伤组织的对比试验的报道,课题组从太行菊母株上选取不同外植体,进行愈伤组织的诱导、分化和生根诱导,旨在建立一种方便快捷且高效的太行菊快繁技术体系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

太行菊引自南京农业大学菊花种质资源库,在商丘师范学院生物与食品学院实验田保存(大田栽培)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 无菌外植体的获得

将植株的叶片、叶柄、茎尖以及茎段放在广口容器里,并在容器的口上放一层薄薄的纱布,防止水的冲击力太大损坏外植体,然后将其放在水管下冲洗2 h。冲洗完成后,将其放在经紫外线灭菌后的超净工作台上,对外植体用75%的酒精进行30 s的消毒,再用无菌水进行3次的清洗,清洗干净之后再用0.1%的氯化汞处理210 s,最后再用无菌水冲洗3~5遍。将获得的无菌叶片放在无菌培养皿中剪成0.5 cm<sup>2</sup>小块,无菌叶柄、茎尖、茎段剪至约0.5 cm长的小段,接种到所备好的培养基上。

#### 1.2.2 愈伤组织的诱导

将获得的不同的无菌外植体接种到所配制好的培养基上并作好标记,然后记录其生长状况,统计长出愈伤组织的外植体数及所需要的时间。叶片培养基:MS+6-BA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>[13]、叶柄培养基:MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>[12,14]、茎尖培养基:MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>[15]、茎段培养基:MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>[13]。

诱导茎段愈伤组织的激素浓度组合分别是,A组:MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,B组:MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,C组:MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,D组:MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+

NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>。

每天观察,从接种完成到外植体不再有愈伤组织的增加所需要的时间为培养天数。愈伤诱导率(%)=诱导愈伤的外植体数/(接种外植体总数-污染总数)×100。

失败总数为没有污染也没有诱导愈伤的外植体数。

继代诱导率(%)=长出丛芽的继代愈伤组织小块/(接种的全部继代愈伤组织小块总数-污染愈伤组织小块总数)×100。

#### 1.2.3 继代培养

经过35 d愈伤组织诱导完成后,去掉愈伤组织发黑部分,将剩下的愈伤组织分割为2~3个小块,接种到MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg·L<sup>-1</sup>培养基中,观察其生长状况并作记录。

#### 1.2.4 生根培养基

继代培养之后,将长至3~4 cm的小苗从下部切下接种到配制好的生根培养基1/2MS+NAA 0.12 mg·L<sup>-1</sup>上[15],观察生根状况,并记录。

#### 1.2.5 练苗移栽

将长至6 cm以上的苗瓶盖打开,在培养箱中练苗7 d,每天叶面喷水1次。7 d后,取出并洗掉根上的培养基,最后将再生植株移栽于大田中。

#### 1.2.6 培养基及培养条件

培养基的蔗糖浓度是30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂浓度是7.7 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.5~6.2。培养条件:温度26℃,光暗周期12 h/12 h,光照度是2 600 lx。

## 1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 21.0软件中的单因素方差分析,同时利用Excel 2003软件对试验数据进行处理和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

#### 2.1.1 外植体筛选

从表1可以看出,叶片、叶柄、茎尖和茎段诱导愈伤组织的诱导率分别为44.44%、44.11%、48.44%和68.75%。叶片接种14 d后开始形成明显的愈伤组织,开始是发白,之后愈伤组织呈淡黄绿色生长点多,但是生长速度慢;接种叶柄愈

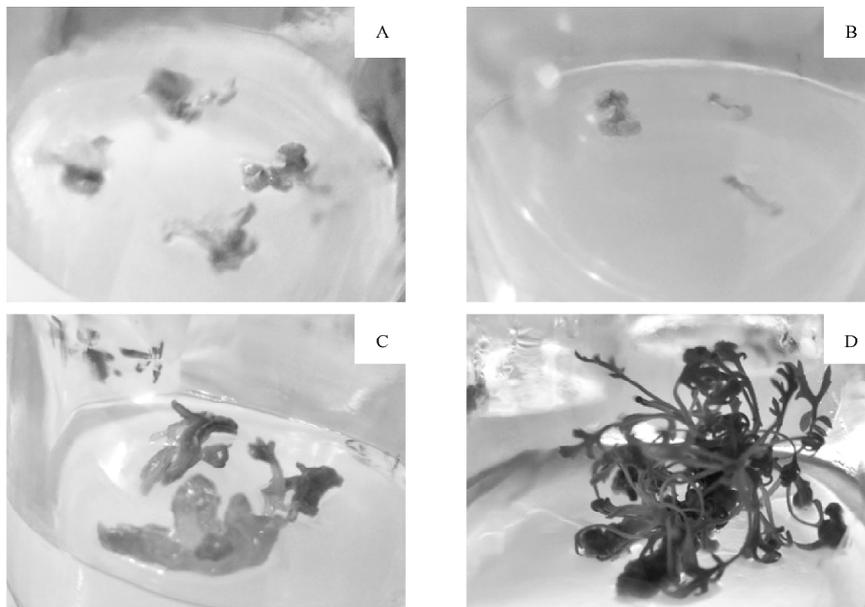
表1 太行菊愈伤组织培养情况  
Table 1 Callus culturing of *Opisthoppappus taihangensis*

外植体 Explant Explants	外植体总数 quantity	培养时间 Culture time/d	污染总数 Number of polluted explants	诱导愈伤的外植体数 Number of explants induced callus	失败总数 Number of failures	诱导率 Induction rate/%
叶片 Leaves	50	45	23	12	15	44.44
叶柄 Petioles	50	45	16	15	19	44.11
茎尖 Stem tip	50	40	23	13	14	48.44
茎段 Stem segment	50	30	18	22	10	68.75

伤组织形成所需时间最长,颜色呈黄绿色;接种茎尖8 d后开始形成愈伤组织,14 d后愈伤组织呈鲜绿色;接种茎段7 d后便出现明显的愈伤组织,颜色绿色,培养时间较短。

由图1可知,色泽方面,叶片诱导的愈伤组织呈淡黄色,叶柄诱导出的愈伤组织的颜色呈黄绿色,茎尖的愈伤组织呈鲜绿色,茎段的愈伤组织为绿色,茎尖和茎段的愈伤组织发育较好。长势方

面,叶柄和叶片的愈伤组织发育比较慢,愈伤组织的块头较小且较硬,茎尖的愈伤组织发育较快,愈伤组织块大质地较疏松,而茎段的愈伤组织长势最好,愈伤组织块头大,硬度适中,生长最快且有小苗长出。综上所述,可以得知茎段愈伤组织诱导率最高,愈伤组织色泽好、块头大、所需时间最短,而且可以直接发育成小苗,所以茎段是愈伤组织诱导的最合适外植体。



注:A. 叶片愈伤组织;B. 叶柄愈伤组织;C. 茎尖愈伤组织;D. 茎段愈伤组织。  
Note: A. leaf callus; B. petioles callus; C. stem tip callus; D. stem callus.

图1 不同外植体愈伤组织比较

Fig. 1 Callus originated from different explants

### 2.1.2 培养基筛选

由表2可以看出,A、B、C、D 4种配方诱导茎段愈伤组织的诱导率分别为34.15%、65.91%、83.33%、66.67%,因此C组的诱导率最高。

由图2可以看出,各个激素组合均能诱导出

愈伤组织,但是形态各异,数量有多有少。据观察7 d后4组均能长出肉眼可见的愈伤组织,21 d后愈伤组织的分化逐渐有了明显的差异:A组愈伤组织的分化最少,颜色呈深绿色,诱导率最低,形态似水质地松软;B组愈伤组织质地疏松,愈伤

表2 不同激素组合对茎段愈伤组织的诱导情况  
Table 2 Induction of callus from stem segments in different hormone medium

分组 Group	BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	2,4-D /(mg·L <sup>-1</sup> )	培养时间 Culture time/d	污染总数 Number of failures	诱导出愈伤的外植体数 Number of explants induced callus	诱导率 Induction rate/%
A	1.0	0.55	0.1	45	9	14	34.15
B	1.0	1.0	0.1	45	6	29	65.91
C	2.0	0.55	0.1	45	8	35	83.33
D	2.0	1.0	0.1	45	8	28	66.67

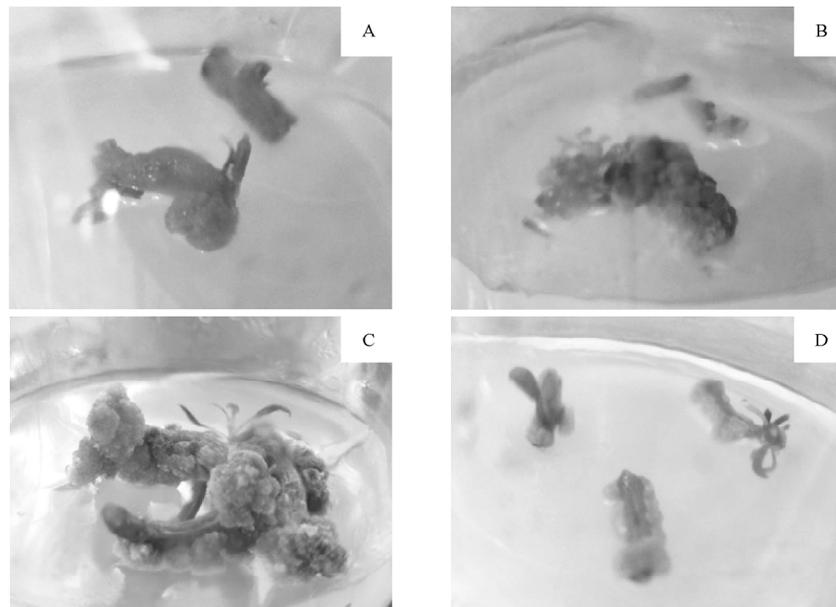


图2 不同激素组合的愈伤组织生长状况

Fig. 2 Callus with different hormone combinations

组织中夹杂褐化组织;C组生长最为旺盛,愈伤组织呈绿色有绿色小芽,部分愈伤组织有小苗长出;D组愈伤组织分化较少,呈淡绿色且质地较硬。综上所述,C组合培养基最好。

## 2.2 继代培养

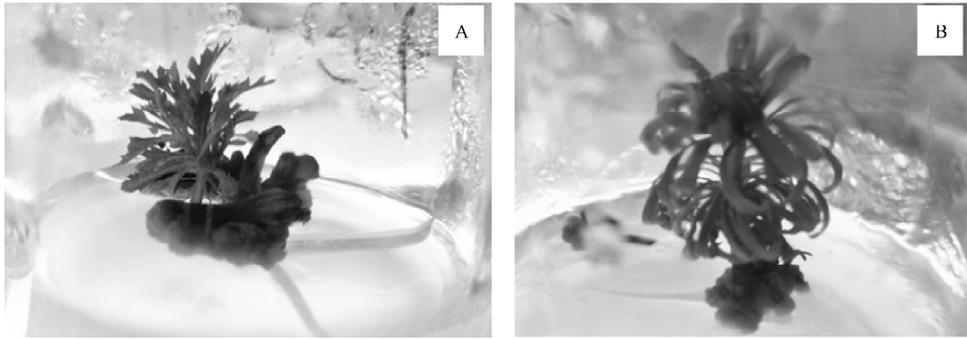
35 d后,愈伤组织上开始出现小芽,进行继代培养,45 d后统计继代诱导率为85%,继代前后生长状况如图3所示。继代之后生长速度快,叶片嫩绿成簇生长,节间不明显。

## 2.3 生根培养

试验发现,接种后的小苗在7 d后开始发育白色小根,40 d后,长度5~7 cm,粗度直径范围是1.6~2.2 mm(图4)。

## 3 讨论

愈伤组织诱导是植物组织培养的关键一步,优化不同外植体的培养基配方以提高诱导率是研究重点。赵元增等<sup>[13]</sup>的研究发现,降低培养基中大量元素用量,不定芽分化数量减少;王建博等<sup>[16]</sup>研究表明,太行菊茎尖可以成功诱导出愈伤组织,最适培养基为:MS+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>;梁芳等<sup>[1]</sup>的研究筛选出了最佳培养基 MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>,茎段外植体可一步成苗。该试验在前人研究的基础上对叶片、叶柄、茎尖、茎段进行对比研究,茎段诱导愈伤组织的诱导率最高,所需时间最短,通过不同的激素配比试验发现C组MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+



注:A. 继代前;B. 继代后。

Note:A. Before subculture;B. After subculture.

图3 继代前后的对比

Fig 3 Comparative diagrams before and after subculture



图4 根部生长状况

Fig 4 Root growth status

2,4-D  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  会出现不定芽,此结论与桑叶子等<sup>[12]</sup>研究结果一致,而该试验愈伤组织和不定芽长出的时间与桑叶子等<sup>[12]</sup>的相比提前了3 d。因此,太行菊茎段是最佳繁殖材料,MS + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 2,4-D  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的激素浓度较适合茎段愈伤组织诱导。

#### 参考文献

[1] 梁芳,蒋素华,王洁琼,等. 濒危植物太行菊组织培养及快繁技术研究[J]. 中国农学通报,2015,31(16):115-120.  
[2] 赵元增,杨靖,孙海燕. 不同激素配比对太行菊不定芽增殖与生长的影响[J]. 河南科技学院学报,2015,43(3):16-20.

[3] 刘海芳,魏东伟,刘全军,等. 太行菊不同器官中绿原酸和4种黄酮类物质含量研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(3):646-651.

[4] 刘莹,孙跃枝,田转运. 太行菊的生物学特性及保护利用[J]. 湖北农业科学,2012,51(17):3775-3776.

[5] 权玉萍,王育水,辛泽华,等. 太行山5种特有植物的生存现状及保护[J]. 吉林农业科学,2013,38(1):80-82.

[6] 张安世,赵利新,刘莹. 珍稀濒危植物太行菊遗传多样性的ISSR分析[J]. 广西植物,2014,34(4):535-540.

[7] 赵元增,单长卷,杨靖,等. MS培养基成分调整对太行菊不定芽增殖与生长的影响[J]. 河南科技学院学报(自然科学版),2016,44(5):7-11.

[8] 赵丽君,王雪芳,张金林,等. 植物组织培养及其在草类植物中的研究和应用[J]. 草业科学,2016,28(6):1140-1148.

[9] 周权男,张慧君,戴雪梅,等. 植物组织培养在农业生产中的应用研究进展[J]. 北方园艺,2014(13):196-199.

[10] 高亚卉,戴攀峰,姬志峰,等. 太行菊属植物花粉形态研究[J]. 西北植物学报,2011,31(12):2464-2472.

[11] 赵元增,王鸿升,杨靖,等. 培养基基本成分对太行菊不定芽增殖与生长的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):41-43.

[12] 桑叶子,孙明,张启祥. 太行菊细胞悬浮培养体系的建立[J]. 河南农业大学学报,2011,45(2):177-182.

[13] 赵元增,单长卷. 无机盐用量调整对太行菊不定芽增殖与生长的影响[J]. 生物技术通报,2014(10):128-133.

[14] 张薇. 适宜红掌叶柄不同组织培养阶段的培养基研究[J]. 农业与技术,2013(10):89.

[15] 王建博,徐思明,董鹏,等. 太行菊顶芽离体高效再生系的建立[J]. 首都师范大学学报(自然科学版),2008,29(5):45-50.

## Study on Tissue Culture Technology of *Opisthopappus taihangensis*

HAN Shuang, MA Li, PEI Dongli

(Department of Biological and Food, Shangqiu Normal University/Key Laboratory of Plant-Microbe interactions, Shangqiu, Henan 476000)

**Abstract:** The leaves, petioles, stem tips and stem segments of *Opisthopappus taihangensis* were used as test materials, and different explants of *Opisthopappus taihangensis* were cultured with MS medium, and different callus were cultured to grow callus. The method of regenerating plants of the endangered *Opisthopappus taihangensis* was studied. The results showed that induction rate of callus induction from leaves and petioles of *Opisthopappus taihangensis* were 44.44% and 44.11%, respectively, which took longer time. Induction rate of callus induction from stem tip and stem segments were 48.44% and 68.75%, respectively and those took less time. Thus, we proved that stem segments were the most suitable materials for callus induction for *Opisthopappus taihangensis*. In order to effectively induce callus from stem segments, the combination of hormone concentration in callus of stem segments was studied. Group A, MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, Group B, MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, Group C, MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>, Group D, MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.1 mg · L<sup>-1</sup>. The test showed that the concentration of hormone in Group C was the most suitable for callus induction in the stem segment of *Opisthopappus taihangensis*. After 35 days, the callus was no longer increased and subcultured. After 45 days, the plants were transferred to rooting medium 1/2 MS+NAA 0.12 mg · L<sup>-1</sup> for rooting culture.

**Keywords:** *Opisthopappus taihangensis*; callus; tissue culture

## 被农业部批准登记的微生物肥料,只有这 11 类

### 信息广角

微生物被拟为土壤养分循环的“转化器”、环境污染物的“净化器”、陆地生态系统稳定的“调节器”。可以说,没有土壤微生物,土壤就失去了活性,就没有了生产能力。然而,我国农业长期过度地依赖化肥,导致土壤中大量的有益微生物菌群遭到破坏,土壤活性下降,最直观的表现就是蚯蚓的缺失。因此,要改善当前土壤生态质量,提高土壤生物肥力,当务之急就是补充土壤有益微生物,施用微生物肥料是最直接的有效方法。

**微生物肥料种类:**农业部批准登记的微生物肥料产品共有 9 个菌剂类品种和 2 个菌肥类品种。9 个菌剂:根瘤菌剂、固氮菌剂、溶磷菌剂、硅酸盐菌剂、菌根菌剂、光合菌剂、有机物料腐熟剂、复合菌剂和土壤修复菌剂。微生物菌剂具有直接或间接改良土壤、恢复地力、维持根际微生物区系平衡、降解有毒有害物质等作用。2 个菌肥:复合微生物肥料是把无机营养元素、有机质、微生物菌有机结合于一体,体现无机化学肥料、有机肥料及微生物肥料的综合效果。是化解土壤板结现象、修复和调理土壤,提高化学肥料利用率,提高果实品质及产量的首推肥料。

**生物有机肥**是指特定功能微生物与主要以动植物残体为来源并经无害化处理、腐熟的有机物料复合而成的一类兼具微生物肥料和有机肥效应的肥料。

**微生物肥料的施用:**微生物肥料具有生态适应性,施用时应依据当地生态状况、作物品种、土壤类型和耕作方式等确定具体施用方式和施用量,以达到较佳的作用效果。微生物肥料可用作基肥、追肥、沟施或穴施,还可拌种、浸种、蘸根。生物有机肥一般作基肥、种肥、追肥。农用微生物菌剂除作基肥、种肥、追肥外,还可叶面喷施等。

(来源:北方农资报)