

- scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Geogi [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1472: 643-650.
- [8] Li X, Huang L Q, Shao A J, et al. Study on *Scutellaria baicalensis* Geogi source [J]. *World Sci Technol: Mod Tradit Chin Mater Med* (世界科学技术—中药现代化), 2003, 5 (6): 54-58.
- [9] Chen S Y, Chen K S, Liu W H, et al. Regulation and expression of the PAL in plant and its outlook [J]. *J Fruit Sci*, 2003, 20(5): 351-357.
- [10] Xiao C Q, Gao H, Chi R A. Progress in application of elicitors to promote the production of plant secondary metabolites [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16(5): 473-476.
- [11] Yuan Y J, Ge Z Q. *Plant Cell Culture Engineering* (植物细胞培养工程) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.

杭白菊花瓣组织培养的初探

牛颜冰¹, 姚 敏¹, 孟庆章¹, 王玉庆¹, 郭吉刚², 陈占峰³

(1. 山西农业大学, 山西 太谷 030801; 2. 山西生物应用职业技术学院, 山西 太原 030031;

3. 山西丰源药业有限公司, 山西 芮城 040801)

杭白菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 属于菊科中的菊花, 是一种常用的中药, 也是一种提神饮品^[1]。花中含有挥发油 0.13%、菊苷、腺嘌呤、黄酮、胆碱、水苏碱及微量维生素 A 样物质、维生素 B₁、氨基酸及刺槐素等, 对中枢神经具镇静作用, 而且有解热、增强毛细血管抵抗力、扩张冠状动脉作用^[2], 另有抗菌、抗病毒、抗炎、抗衰老、抗肿瘤的作用^[3]。可用于目赤疼痛、头痛眩晕、眼花缭乱、风热感冒、胃痛食少、水肿尿少等症^[2]。是浙江省八大名药材“浙八味”之一。随着国内外医药、食品和饮料加工业的迅猛发展, 作为药食两用的菊花用量急剧增加^[2]。长期以来杭白菊采用分株、扦插等无性繁殖方法, 以及茎尖组织培养方法进行繁殖。前两种方法易受环境影响, 繁殖周期长, 而且极易导致病毒感染。后一种方法虽然取材方便, 脱毒率高, 脱毒速度快, 能在较短的时间内得到较多的原种繁殖材料, 但这种方法存在的缺点是外植体不易消毒, 存活率低^[4], 要求操作熟练且快, 因为茎尖长时间暴露在空气中易失水而死亡, 还会存在弱苗试管苗生长缓慢、不生根等问题。因此脱毒技术相对简单, 势在必行。在植物体内病毒分布不均匀, 在分生组织和无维管束的组织器官中一般无病毒或量少^[5~7]。花瓣不仅病毒量少, 而且其组织培养具有取材容易、繁殖系数高的特点。因此采取花瓣组织培养可获得优良杭白菊种苗以供生产应用。本试验以杭白菊为试验材料, 利用其花瓣离体培养, 通过优化培养技术以便筛选出最佳的培养基组合, 从而提高繁殖系数, 获得优良的

试管苗, 为以后向生产上示范推广提供优良的种源。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料: 试验于 2005 年 10 月—2006 年 1 月进行。试验材料源于山西农业大学园艺学院实验苗圃的杭白菊植株, 2005 年采自浙江省桐乡市。

1.2 试验方法

1.2.1 试验条件: 以 MS 培养基为基本培养基, 通过改变激素种类、浓度及添加不同的附加物形成不同培养基组合。每天的光照时间为 12 h, 光照强度为 2 500 lx, 培养温度为 (25±2) °C。

1.2.2 试验材料的获取及消毒: 从健康无病虫害的杭白菊上取饱满且苞片未开裂的花蕾^[8], 于自来水中荡洗 1 次, 再用洗衣粉上清液荡洗 1 次, 自来水荡洗 3 次, 再用蒸馏水荡洗 2~3 次, 拿入无菌室; 在超净工作台上, 按表 1 的灭菌时间进行灭菌, 每次灭菌剂处理后都用无菌水荡洗 4~5 次。

表 1 不同消毒方法对抗白菊花瓣

消毒效果的比较(接种后 4 d)

Table 1 Comparison of different sterilization methods on petals of *C. morifolium* (after 4 d)

序号	70%酒精/s	0.1%HgCl ₂ /min	10%NaClO/min	接种数	污染率/%
a	—	5	8	100	0
b	—	5	10	220	2
c	45	10	—	80	0

1.2.3 愈伤组织或胚状体的诱导: 在无菌条件下, 将无菌材料放在无菌的滤纸上, 将其无菌水吸干, 再放入

收稿日期: 2006-03-17

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20051071); 山西农业大学科技创新基金项目(2004085)

作者简介: 牛颜冰(1968—), 女, 副教授, 博士。 Tel: (0354)6185019 E-mail: niuniugood@yahoo.com.cn

培养皿中用解剖刀将花蕾纵切成两块,随后切去花瓣的顶部和基部,将分散的未开放的约 5 mm 的花瓣逐个接入培养基(表 2),其中琼脂量为 0.8%,蔗糖量为 3%,pH 为 5.8~6.0,进行诱导培养。

表 2 不同培养基对愈伤组织或胚状体的诱导效果(接种后 20 d)

Table 2 Effects of different media on induction of callus and embryoid (after 20 d)

培养基序号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	接种数	诱导率/%
1/2H	0	0	200	0
H	2	0.2	200	100

1/2H 为 1/2MS 培养基 H 为 MS 培养基

1/2H is based on 1/2 MS whereas H is based on MS

表 3 不同培养基组合对丛生芽诱导和伸长的影响

Table 3 Effect of media in different combinations on induction and elongation of crowd buds

培养基编号	培养基	接种瓶数	污染瓶数	不定芽数	苗高/cm	平均苗高/cm	生根时苗高/cm	生根时平均苗高/cm
1	MS+0.2 NAA+2 6-BA+0.8% 琼脂+3%蔗糖	8	4	37/12	0.1~1	0.5	3~12*	7*
2	MS+0.2 IAA+2 6-BA+0.8% 琼脂+3%蔗糖	10	0	20/27	0.2~2	0.8	1~3	1.5
3	MS+0.1 NAA+2 6-BA+0.8% 琼脂+3%蔗糖	10	3	145/10	1~3	1.5	1~3.5	2.7
4	MS+0.1 NAA+2 6-BA+0.6% 琼脂+3.5%蔗糖+0.1%LH	10	5	110/5	1~6	2.5	1.5~4	3.5
5	MS+0.1 NAA+2 6-BA+0.6% 琼脂+3.5%蔗糖	10	7	37/5	0.5~2	1.6	2~4	3

表中 x/y 表示 y 个愈伤组织形成了 x 个不定芽;带 * 的两个数据是接种 40 d 后测的,而其余的数据是在接种 15~20 d 后测的;LH-水解乳白蛋白

In Table x/y means that y callus or embryoid could form x adventitious shoots; two data with "*" are surveyed after 40 d since inoculation, whereas others are surveyed after 15~20 d; LH-hydrolyzable lactalbumin

表 4 不同激素组合和质量浓度对抗白菊试管苗生根的影响

Table 4 Effects of phytohormones in different combinations and concentrations on root inducing of *C. morifolium*

编号	NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	接种瓶数	根数	平均根数	生根率/%	根粗细程度
H1	1	0.1	4	70/14	5	100	较细
H2	1	0.1	10	218/35	6.2	100	较粗
H3	0.5	—	8	172/30	5.7	90	较粗

H1-MS 基本培养基,H2,H3-1/2MS 培养基

H1-as basal medium, while H2 and H3 as 1/2MS basal media

2 结果与分析

2.1 消毒剂及消毒方法的比较:获得无菌材料是植物组织培养快速繁殖的前提,关系到试验成败与否。为此选用 3 种消毒方法进行比较,以便选出灭菌效果较好且后继试验成功率较高的消毒方法。虽然在 3 种消毒方法中唯有方法 b 有污染,但在诱导愈伤组织或胚状体的最佳培养基上经方法 b 处理的花瓣全部生成愈伤组织或胚状体,而且 99% 的都是胚状体。而方法 a 和 c 只生成愈伤组织,并且方法 c 所得愈伤为淡黄色,分化率低。其可能原因是 HgCl₂ 消毒时间过长,以致对植物材料造成毒害作用,影响花瓣的生命活力。方法 b 污染率高,可能是由试验误差和试验基数大造成的。所以杭白菊的花瓣的最佳消毒

1.2.4 丛生芽的诱导及伸长培养基的筛选:将 1.2.3 试验中的愈伤组织和胚状体接种于添加了 IAA、6-BA、NAA 3 种不同质量浓度激素的培养基(表 3,激素质量浓度 mg/L)上,并对培养基的组分稍作调整,从而筛选出利于愈伤组织分化和丛生芽伸长的培养基。

1.2.5 生根培养基的筛选:在生根培养基的试验中,共有 3 种培养基组合(表 4)。将高约 1.5 cm 的健壮丛生芽或茎段接种于生根培养基(其中含 0.8% 的琼脂,3% 的蔗糖,0.05% 的活性炭,pH 为 5.8~6.0)。各组合生根情况见表 4。

方案为:10%NaClO 溶液中荡洗 10 min,无菌水荡洗后,再用 0.1%HgCl₂ 溶液荡洗 5 min,无菌水荡洗后,再制作外植体。

2.2 诱导愈伤组织或胚状体培养基的筛选:接种后 4 d 内,1/2 H 培养基上的花瓣较 H 生长得快;接种 5~10 d 内,1/2 H 培养基上的花瓣生长得就不如 H 快,而且在接种 10 d 左右的时候,H 培养基上的花瓣两端已经膨大变绿出现胚状体(图 1),而 1/2 H 培养基上的花瓣依旧是最初的伸长长大,没有任何生成愈伤组织的迹象。到接种 20 d 后,H 培养基上的胚状体的丛生芽最长可达 2~3 cm,多数都在 1 cm 左右,不适于生根培养;而 1/2 H 没有愈伤组织或胚状体的形成。虽然杭白菊含有较高的内源激素,

可花瓣不含内源激素或量极微以使花瓣脱分化,所以在不含任何激素的 1/2 H 的培养基上,花瓣不能形成愈伤或胚状体。

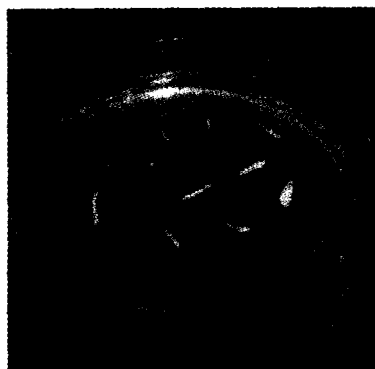


图1 10 d 左右 H 培养基上的花瓣

Fig. 1 Petals in H media about 10 d

2.3 诱导丛生芽及其伸长培养基的筛选:虽然在培养基 (MS+0.2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.8%琼脂+3%蔗糖) 上可以诱导产生丛生芽,可其丛生芽具有的节较短且少(图2),为此设计了改组试验。接种后 20 d 左右记录试验结果,并做比较。



图2 不宜生根的丛生芽

Fig. 2 Crowd buds difficult to root

从表3可以看出:最佳的芽分化和伸长的培养基是3、4、5号培养基。3、4号培养基利于芽的分化,4、5号培养基相对于3号培养基更利于芽的伸长。3号培养基形成的不定芽较4号的少一点,极少数芽较小而透明且在后续不生根(表5),但其污染率相对较小。4、5号培养基丛生芽的叶片浓绿。4号培养基上不定芽不但多而且极利于愈伤组织的生长膨大及丛生芽的形成,只是易被霉菌污染。5号的不定芽比较均一,对愈伤组织没有明显的促进长大作用。杭白菊愈伤组织或胚状体分化芽的最适培养基组合为3号培养基 (MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.8%琼脂+3%蔗糖),对不定芽伸长有明显促进作用的是4号培养基 (MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+

0.6%琼脂+3.5%蔗糖+0.1%LH)。

2.4 生根培养基的筛选:将不定芽接种到生根培养基上,5 d 后即可生根。接种 15 d 后进行统计,其结果如表5(同时对生芽和生根培养基做了比较)。

表5 各个生根培养基实验结果

Table 5 Experiment results of various rooting media

生根培养基	生芽培养基			
	2	3	4	5
H1	30/8	—	15/3	25/3
H2	—	143/22	58/10	17/3
H3	—	127/24	45/6	—

x/y 表示 y 个不定芽形成了 x 条根

x/y means that y adventitious shoots can produce x roots

由表4、5可以看出:最佳的生根培养基组合 H2 (1/2 MS+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+0.8%琼脂+3%蔗糖+0.05%活性炭)。H2 培养基上的试管苗苗高比较均一,且相对 H₃ 的稍高,叶片大而直(图3)。根多有分叉,生根率也相对较高。其原因可能是因为细胞分裂素 6-BA 的促进细胞伸长分裂作用,但也不排除接种时个体的差异。



图3 杭白菊的试管苗

Fig. 3 In vitro plantlets of *C. morifolium*

3 讨论及结论

3.1 以往对抗白菊的组织培养研究主要采用茎尖组织培养。本实验以始花期的花瓣为外植体,在培养基组分和激素质量浓度上做了初步的探讨,以便找到一种简便的快速繁殖技术,从而获得杭白菊优良的种苗。据有关资料,由花瓣培养产生的植株往往有变异产生,表现在植株、叶形、花色、花形等多方面变异,如小苗叶片的叶形、厚薄、缺刻深浅变化,光周期从短日性变为中日性,株型、花色、花型、瓣型等变化。其原因可能是因为培养中需经过愈伤组织或胚状体途径,有去分化和再分化的过程,加大植株变异的可能。但通过此组织培养技术,植株染色体是否变异、药效是否变化有待进一步研究。

3.2 水解乳蛋白(LH)是多种小分子肽,可以显著促进细胞代谢、繁殖和生长,对胚状体不定芽分化有

促进作用,是多种培养基的基础。在本试验中,水解乳蛋白不但表现出对芽分化有促进作用,而且对芽的伸长也有一定的促进作用。但在试验中,较高的污染率是因为操作问题,还是由于 LH 自身的原因,有待进一步探索。

3.3 崔德才等^[9]认为琼脂的百分浓度会影响器官的发生,当琼脂的百分浓度超过 0.7% 时很难生成芽;稍高的蔗糖质量浓度可以解除生长素 NAA 对芽诱导的部分抑制作用。而此试验中培养基中蔗糖、琼脂的质量浓度对抗白菊器官分化是否有影响,在实验结果中表现得不是很明显。如果蔗糖、琼脂的质量浓度对抗白菊器官分化的影响作用大于水解乳蛋白,就可以通过改变蔗糖、琼脂的质量浓度促进器官的分化,从而降低生产成本,获得大量的优良的杭白菊种苗。

3.4 通过这次试验可以得到杭白菊花瓣快繁的最适培养基组合:诱导愈伤组织或胚状体的最佳培养基组合是 MS+0.2 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.8% 琼脂+3% 蔗糖;愈伤组织或胚状体芽分化的最适培养基组合为 MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.8% 琼脂+3% 蔗糖;对芽伸长有明显促进作用的是 MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+

0.6% 琼脂+3.5% 蔗糖+0.1% LH;生根的最佳培养基是 1/2 MS+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+0.8% 琼脂+3% 蔗糖+0.05% 活性炭。

References:

- [1] Andrew. *Encyclopedia of Medicinal Plants* (药用植物百科全书) [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2003.
- [2] Ping P Y, Ge S J, Xu M L, et al. Effects of induction of roots and shoots of Hangzhou white *Chrysanthemum* in MS media with different amount hormones [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2003, 19(4): 52-53.
- [3] Liu D J. *Chrysanthemum* (菊花) [M]. Beijing: China Chinese Traditional Medicine Press, 2001.
- [4] Sun Q, Zhang C Q. Study on plant tissue virus-free and examine [J]. *J Shandong Agric Univ* (山东农业大学学报), 2003, 34(2): 307-310.
- [5] Li Z Y. *Cell Engineering* (细胞工程) [M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [6] Zhi H, Gao S L. Study on Hangzhou white *Chrysanthemum* shoot tip tissue cultural and propagation technology of plantlets in vitro [J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2004, 13(1): 24-27.
- [7] Li J M. *Plant Tissue Culture* (植物组织培养教程) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2002.
- [8] Wang K C, Zhang X Q, Mao Y Y. Hangzhou *Chrysanthemum* petal tissue culture [J]. *Chin Tradit Herb Med* (中草药), 2000, 31(8): 628-630.
- [9] Cui D C, Xu P W. *Plant Tissue Culture and Factory Raising of Seeding* (植物组织培养与工厂化育苗) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.

美国瓦里安与广西药用植物园达成 500 万美金的合作协议



世界知名仪器制造商美国瓦里安公司与被誉为“亚洲第一药园”的广西药用植物园达成的全方位分析解决方案协议,总金额近 500 万美金。瓦里安公司将为广西药植园提供先进的分析仪器和强大的技术支持。签约仪式于 2006 年 11 月 6 日在北京中国大饭店举行。

美国瓦里安(VARIAN)公司是当今世界上最具影响力的科学仪器制造商之一,产品涉及分析仪器、真空设备和电子产品等高科技领域,广泛应用于食品安全、生命科学、环境保护

等各种领域。

广西药用植物园占地 3 000 亩,保存药用植物 4 000 余种,是目前亚太地区面积最大、品种最多的专业性药用植物园。广西将利用国家大力发展中药产业的契机,进一步把广西药用植物园建设成为世界级的药用植物园,成为广西中药现代化研究的重要阵地,为广西中药高新技术企业提供研发成果和产品。

据介绍,此次美国瓦里安公司与广西药用植物园达成合作协议,为广西药用植物园提供包括 NMR、GC/MS/MS、Prep HPLC、ICP-MS、FT-IR 成像系统等在内的多台技术领先的分析仪器,用于药用植物成分和中草药的开发研究工作,预计这次合作将会对广西药用植物园建设成为世界最大的药用植物园起到强有力的推进作用。