**7.1菊花试管苗愈伤组织的诱导与分化研究**

　　菊花(Dendrantherna mori f olium)为多年生菊科宿根草本植物, 在我国有悠久的栽培历史，具有很强的观赏性及药用价值，是世界四大切花之一。

菊花喜凉爽、 较耐寒, 生长适温 18~ 21℃, 在微酸性至微碱性土壤中皆能生长, 最适pH值 6.2~ 6.7。菊花味甘、苦, 微寒。花和全草含挥发油, 成分有菊油环酮、蜡状物、单龙脑酞酸酯、菊醇利黄酮类成分、木樨草素- 7-葡萄糖苷二水合物等。具有散风清热、平肝明目之功效, 可用于风热感冒、头痛眩晕、 目赤肿痛、 眼目昏花的治疗。

菊花多采用分株、扦插等方法进行繁殖及栽培，通过自然变异来选育新品种，繁殖与选育受季节和外界环境条件的限制,速度慢, 随着市场需求的日益增大,对于一些名贵菊花品种和母株来源不足的品种更不能及时满足生产和市场的需要。通过现代生物技术手段来进行菊花的快速繁殖和新品种选育工作势在必行。组织培养技术除了可进行优良品种的快速繁殖外,还可以进行种质资源保存等。

菊花的组织培养主要体现在以菊花茎段和腋芽作为外植体[1-3] ,对花瓣培养也有部分报道[4-6]，菊花的新育品种主要是花色的变异,利用花瓣进行组织培养,其变异率要大于茎尖、 腋芽等具有分生组织的外植体。

菊花组织培养的发生途径主要有不定芽途径和愈伤组织再生途径。

**不定芽途径一般是：**

茎段、茎尖---诱导不定芽---不定芽增殖---壮苗培养---生根培养---完整植株。



**愈伤组织再生途径为：**

花器官（花瓣、花萼、花轴等）---诱导愈伤组织---分化芽---芽增殖---壮苗培养---生根培养---完整植株。



**1 培养基的配制与灭菌**

适用于菊花的培养基种类很多，如White、 B5 、N6 、Morel 、MS等等，现大多采用MS培养基。激素组合有BA3 + NAA0.01 、 BA3 + NAA0. 1 、 BA2 + NAA0.2 、 KT2 + NAA0.02等不同配比。菊花对激素的要求并不严格，适用的范围很广。培养基值为5.8左右。

**1.1 实验材料与试剂**

实验材料：采用菊花,无机盐，各种生长激素等。

实验试剂：20%新洁尔灭， 75%酒精， 0.1%氯化汞（W/V）, 2-20%次氯酸钠

**1.2植物生长调节剂的配制**

植物生长调节剂配成浓度为100mg/L母液（根据需要配制20-100ml）。由于多数植物生长调节剂难溶于水，其配制方法为：生长素和GA先用少量95%酒精溶解，再加蒸馏水定容。细胞分裂素类，先用少量1mol/L盐酸或氢氧化钠溶解，再加蒸馏水定容。

**1.2 MS培养基母液的配制**

MS培养基母液及培养基配制参考表\*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 母液成分 | 化学试剂品名 | 分子量 | 配方用量（mg/L） | 溶液配制与使用 |
|
| 大量元素 | 硝酸铵　NH4NO3 | 80.04 | 1650 | 母液扩大10倍配制，配制1L培养基加入100ml母液 |
| 硝酸钾　KNO3 | 101.21 | 1900 |
| 硫酸镁　MgSO4·7H2O | 246.47 | 370 |
| 磷酸二氢钾　KH2PO4 | 136.09 | 170 |
| 氯化钙　CaCl2·2H2O | 147.02 | 440 | 同上 |
| 微量元素 | 硫酸锰　MnSO4·4H2O | 223.01 | 22.3 | 母液扩大100倍配制，配制1L培养基加入10ml母液 |
| 硫酸锌　ZnSO4·7H2O | 287.54 | 8.6 |
| 氯化钴　CoCl2·6H2O | 237.93 | 0.025 |
| 硫酸铜　CuSO4·5H2O | 249.68 | 0.025 |
| 钼酸钠　Na2MoO4·2 H2O | 241.95 | 0.25 |
| 碘化钾　KI | 166.01 | 0.83 |
| 硼酸　H3BO3 | 61.83 | 6.2 |
| 铁盐 | 硫酸亚铁　FeSO2·7H2O | 278.03 | 27.8 | 母液扩大200倍配制，配制1L培养基加入5ml母液 |
| 乙二胺四乙酸二钠　Na2-EDTA | 372.25 | 37.3 |
| 有机成分 | 烟酸　VB5 或 VPP |  | 0.5 | 母液扩大100倍配制，配制1L培养基加入10ml母液 |
| 盐酸吡哆醇　VB6 |  | 0.5 |
| 盐酸硫胺素　VB1 |  | 0.1 |
| 肌醇 |  | 100 |
| 甘氨酸 |  | 2 |

\*各种化合物必须充分溶解后才能混合，混合时注意先后顺序，特别要将钙离子与硫酸根离子、磷酸根离子错开，以免产生硫酸钙、磷酸钙等不溶性化合物沉淀。混合时要慢慢来，边搅拌边混合。大量元素和微量元素可用蒸馏水溶解，氯化钙单独配制。烟酸则用少量稀氨水溶解。配制好母液应贴上标签、注明日期、倍数等，低温下（0～4℃）储藏。

**1.3应用培养基的配制（1000ml培养基）**

①根据配方要求用量筒或移液管从每种母液中分别取出所需的用量，放入1L搪瓷杯中，加入600ml蒸馏水，30g蔗糖，用玻璃棒搅拌使其溶解。

②根据要求加入生长素（NAA终浓度0.2mg/L）和细胞分裂素（6-BA终浓度2mg/L）。③用1N的氢氧化钠或盐酸调节pH至5.8，添加蒸馏水至1000ml。

④加入7g琼脂，加热并不断搅拌，使琼脂融化呈透明状。

⑤培养基分装：把配制好的培养基用漏斗分装到培养瓶中，100-150ml的培养瓶每瓶装入20-35ml培养基。并用棉塞塞紧瓶口，贴上标签，注明培养基的名称与配制时间等。

**1.4培养基的灭菌（高压蒸汽灭菌）**

①包扎：用牛皮纸、纱布或铝箔把玻璃器皿和金属器械包扎好。

②装水：先在高压灭菌锅内装入一定量的水（严格按照高压灭菌锅使用说明操作）。

③灭菌：把含培养基的培养瓶、包扎好的玻璃器皿（如装好滤纸的培养皿）和金属器械（镊子、手术刀、手术剪刀），以及装有蒸馏水的三角瓶，放入高压灭菌器，通常灭菌要求1.1kg/cm2，锅内达121℃，维持压力20min。（严格按照高压灭菌锅使用说明操作）

④贮藏：达到灭菌时间后，缓慢放出蒸汽，不能使压力降低太快，以免引起激烈的减压沸腾，使容器中的液体四溢，培养基玷污棉塞、瓶口等造成污染。当压力逐渐降至零后才能打开盖子，取出物品，置于10℃下避光保存。

**2 外植体的选择与灭菌**

菊花能够产生再生植株的营养器官很多，如茎尖、茎段、侧芽、叶、花序梗、花序轴、花瓣等。以快繁为目的，最好用茎尖或侧芽，其次是花序轴；如果以育种为目的，可采用花瓣；以脱毒为目的，则必须用茎尖；以形态发生学研究为目的，则可用各种器官。

2.1茎尖、茎段

从无病虫害、生长健壮的植株上或是新抽出的嫩枝上采集的茎尖或茎段。茎段去叶，初步切割后 --- 自来水冲洗15～20min --- 70%～75%酒精浸泡30～60s --- 升汞溶液灭菌8～12min（升汞中加几滴吐温）--- 无菌水冲洗8～10次 --- 吸干水分 --- 切断接种。

如为了脱毒，茎尖在解剖镜下剥离切取0.5mm大小的尖端

2.2花序轴

如以花序轴为材料，则选用具该品种典型特征的、饱满壮实的花蕾，最好是即将开放而未开放的花蕾。这时花瓣外有一层薄膜包围着，里面仍是无菌的，易表面灭菌，也便于花序轴的剥离。

花蕾---清水冲洗干净---70%～75%酒精浸泡30～60s ---10%次氯酸钠（加几滴吐温-80）

消毒3～15min --- 无菌水冲洗4～6次---剥除花序轴外层花被---得到透镜状的或半球状的花序轴---视其大小，切成2～4块接种。

从花蕾上拔下的舌状花、管状花，也可切成小块、小段用于接种。

**3 培养过程**

**3.1培养条件**

菊花培养适宜的温度较宽，一般22～28℃均可，以24～26℃最好，光照12～16h/d，光强1000～40000lx均可。

**3.2初代培养**

由于品种和外植体的不同，诱导芽的初代培养所用的培养基也不同。茎尖及茎段培养用MS + BA1.0-5.0 + NAA0.01培养基，第5～7d腋芽萌动，随后开始展叶；当小芽长到2cm左右时可转至增殖培养基。初代培养时若加入5%～10%的CM，效果较好。

**3.3继代培养**

一般4～6周后，可通过茎尖分生新芽，侧芽萌发产生丛芽或经愈伤组织生长，分化新芽等种种方式再生出嫩茎。最初分化率及分化苗数量都小，随继代次数增加，很快就增多起来。4～6周为一个周期，增殖倍率随品种而异，一般在3～8倍。增殖培养基为MS + BA0.5-2.0+ IAA0.01-0.2 。

在增殖培养中，BA起主导作用。随着BA浓度的增加，增殖率增大，但芽的伸长受到抑制。NAA在一定程度上有助于苗的生长。如果增殖后，苗细弱，应该进行壮苗培养，壮苗培养基可以用MS + BA0.5-1.0+ NAA0.1-0.2 。

增殖方式除诱导丛生芽增殖外，也可用茎段微型扦插来增殖。将嫩茎剪成1节带1叶为一段，插入MS + NAA0.1 培养基中培养。4～5周后，腋芽即生长成新的小植株，再剪切，重复培养。还可以用具分化能力的愈伤组织培养。愈伤组织增殖液体培养基为：MS + KT2+ NAA0.02 。愈伤组织分化固体培养基为：MS + KT0.5-2(或再加GA3) 。一般6～12周即可形成植株。

应引起注意的是，随着继代培养次数的增加，可能会出现玻璃化的现象。玻璃化的植株呈半透明水渍状，叶脆弱，易破碎，影响了正常的光合作用和苗的成活率。

**3.4生根培养**

菊花无根苗生根一般较容易，通常在增殖培养基上久不转瓶，即可见有根系发生。生根有两种方法：

无根嫩茎试管生根　　切取3cm左右无根嫩茎，转插到1/2 MS + NAA0.1 （或IBA）的培养基上，经2周即可生根。即使在无激素的培养基上亦可达90%生根。生根培养基糖用量应保持30g/L , 一般低盐浓度的1/2 MS培养基有利于生根。增殖培养的激素应用对生根也有一定的影响，增殖时适当的GA有利于生根。

无根嫩茎直接插到插壤中生根　　剪取2～3cm无根苗，插植到用促生根的生长素溶液浸透的珍珠岩或蛭石中，12d后生根率可达95%～100%。直接生根的插壤介质要疏松透气，珍珠岩优于蛭石。

**3.5移栽**

生根培养生长一段时间后，根系生长减缓，上部顶芽开始生长。当顶芽长到3～4片叶时即可移栽。此时根茎贯通良好，能同时生长，容易成活。一般菊花试管苗移栽成活没有大的困难。移栽前要进行通风炼苗，一般为7～10d。移栽时用镊子轻轻取出试管苗，注意不要损伤根系和茎叶，然后把试管苗根颈部的培养基洗干净，栽入备好的基质中。基质要求疏松、肥沃、透气。基质消毒能够提高移栽成活率。以蛭石为基质，试管苗生长好。移栽时要注意保温保湿、避免日晒，同时应防止有害菌类的侵染，造成烂苗。温度最好保持在25～28℃，开始几天必须保持空气的相对湿度90%以上，10d以后可逐渐增加光照和通风，人工补充喷水。刚移栽的试管苗，由于根系吸收能力弱，应每3～5d叶面喷营养液一次，7～10d基质浇营养液一次。移栽后2～3周待长出新叶、新根，即可上盆或定植。