

千头菊组织离体培养及快繁技术的研究

张晓军^{1,2}, 郭长虹¹

(1. 哈尔滨师范大学生命科学与环境学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 牡丹江师范学院生物系, 黑龙江牡丹江 157012)

摘要:以 MS 作为基本培养基, 离体培养千头菊带腋芽茎段。结果表明: 6-BA 和 NAA 分别为 1.0mg/L 和 0.1mg/L 的组合时丛生芽的诱导效率最高, 诱导频率可达 100%, 6-BA 诱导丛生芽的效果明显优于 KT 和 ZT。组培苗在大量元素减半并附加 0.4mg/L NAA 和 0.2% 活性炭的 1/2MS 培养基上诱导生根最为适宜, 生根率达 100%。

关键词:千头菊; 离体培养; 快速繁殖

Studies on Tissue Culture in Vitro and Rapid Propagation of *Chrysanthemum morifolium*

Zhang Xiao jun^{1,2}, Guo Changhong¹

(1. College of Life Sciences and Environment, Harbin Normal University, Harbin 150030;

2. Department of Biology, Mudanjiang Normal College, Mudanjiang Heilongjiang 157012)

检验。结果见表 4、表 5。由表 4、表 5 可见, 回流提取 4h 与 5h 之间无显著差异, 但回流提取 4h、5h 优于提取 3h; 85% 和 90% 乙醇之间无显著差异, 但 85% 和 90% 乙醇极显著优于 70% 的乙醇。因此, 花锚提取有效成分总黄酮的最佳工艺条件为 A₂B₂C₁。

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	397.20	2	198.60	116.14	**
B	79.53	2	39.76	23.25	*
C	10.57	2	5.28	3.09	
e(误差)	3.42	2	1.71		
总和	490.72	8			

$$F_{0.01}(2, 2) = 99.0; \quad F_{0.05}(2, 2) = 19.0$$

T 检验: 查得 $q_{0.05}(3, 2) = 8.33$ $q_{0.01}(3, 2) = 19.02$ 所以 $T_{0.05} = 11.05$ $T_{0.01} = 25.23$ 用 T 值与各水平因素差值的平均数进行比较, 结果如下:

表 4 A 因素 T 检验表

	K ₂	K ₃	K ₁
K ₂			
K ₃	3.05		
K ₁	15.37*	12.32*	

表 5 B 因素 T 检验表

	K ₂	K ₃	K ₁
K ₂			
K ₃	2.48		
K ₁	7.17	4.68	

3 结论

3.1 从表 2、3、4、5 可见, 花锚提取有效成分总黄酮的最佳工艺条件为 A₂B₂C₁。即用 85% 乙醇, 每次回流提取 4h, 共提 3 次, 乙醇用量为药材重量的 10 倍。

3.2 提取工艺中各因素对花锚中总黄酮含量的影响由 A、B、C 顺序递减, 即按乙醇浓度、回流时间、溶剂用量顺序递减。其中, 因素 A 对提取工艺影响非常显著 ($P < 0.01$); 因素 B 对提取工艺影响显著 ($P < 0.05$)。

3.3 花锚是作为优良的藏医药材, 具有疗效好、副作用小、绿色无污染等特点。本实验在工艺技术上为它的开发和生产提供了理论依据。

参考文献

- 1 罗达尚. 藏药资源及其研究开发. 中国藏药学, 1997(4).
- 2 纪兰菊, 廖志新, 孙洪发. 青海龙胆科植物部分藏药植物化学成分研究进展. 高原生物学集刊, 2002: 243~249.
- 3 白玉霞. 比色法测定花锚中部黄酮的含量. 中国民族医药杂志, 1997, 12(3).
- 4 徐任生. 天然产物化学. 北京: 科学出版社, 1997.
- 5 杨志学, 万顺, 张亮军. 正交试验优选金银花中总黄酮的最佳提取工艺. 中国民族医药杂志, 2004(1): 17~18.
- 6 肖建波, 邹登峰. 正交设计提取梨皮总黄酮. 中国林副特产, 2004(6): 9~10.
- 7 青海药品检验所, 青海省藏医药研究所. 中国藏学. 第一卷. 上海: 科学技术出版社, 1996. 157~161.
- 8 中国科学院上海药物研究所主编. 中草药有效成分的分

Abstract: Stem segments of *Chrysanthemum morifolium* with axillary bud were cultured in vitro on base MS medium. The results showed that the efficiency of bud induction is the highest and may reach 100% on the medium with the combination of 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The effect of inducing rosette buds on the medium with 6-BA is obviously better than with KT and ZT. The medium with half amount of major elements and $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and 0.2% activated carbon is the most appropriate for inducing test-tube plantlet to produce roots and its efficiency may reach 100%.

Key word: *chrysanthemum morifolium*; culture in vitro; rapid propagation

千头菊 (*Chrysanthemum morifolium*) 为菊科菊属, 多年生宿根植物, 是菊花众多品种中的一种。叶系单叶互生, 颜色为墨绿色, 叶卵形至长圆形, 边缘有缺刻, 茎非常多, 花生于枝顶, 花期为 2 个月 (从 8 月中旬至 10 月中旬)。由于每根茎上都会开一朵花, 而且还会从开过花的老茎上长出新茎, 新茎又开花, 因此一盆千头菊可以开很多花, 故称之为千头菊。因其具有花姿优美、花色种类繁多等优良的品质特性, 所以具有较高的观赏价值和商业价值; 同时它又具有重要的药用价值, 《本草纲目》中有“菊花久服利血气, 轻身, 耐老延年”的论述^[1]。千头菊常规多采用扦插的方法进行营养繁殖, 但此方法繁殖指数低, 周期较长, 难以满足大批量的生产要求^[2]。为解决这一问题, 本研究的目的就是利用组织培养技术, 研究不同种类以及不同质量浓度配比的细胞分裂素和生长素在诱导离体培养的千头菊腋芽发生不定芽过程中的作用效果, 为建立千头菊试管无性系, 扩大繁殖, 在较短的时间内获得大量的优良组培苗, 提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为牡丹江师范学院基因工程研究所提供的千头菊带叶柄幼嫩茎段。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌外植体材料的获得: 选取千头菊生长健壮的新生嫩茎, 剪去叶片留下一段 0.5cm 长的叶柄, 用流水冲洗 30min。在超净工作台上, 用 70% 酒精浸泡 30s 后, 放入 0.2% 的升汞溶液中, 加入几滴吐温, 振荡灭菌 7min, 然后用无菌水冲洗 5 次, 再用无菌滤纸将材料表面水分吸干, 并将材料切成 0.8cm 左右的带有叶柄的单节茎段作为供试外植体材料进行丛生芽的诱导。

1.2.2 丛生芽的诱导: 将无菌的外植体材料接种于诱导培养基上进行丛生芽的诱导, 每个处理组合接种 21 个茎节, 每瓶接种 3~4 个外植体。丛生芽诱导培养基以 MS 为基本培养基, 附加有不同质量浓度和不同配比的细胞分裂素 6-BA、KT、ZT 和生长素 NAA、IBA 以及蔗糖 30g/L, 琼脂糖 6g/L, LH500mg/L, pH5.8。接种后先在 25℃ 的培养箱中暗培养 3d, 然后置于光下培养。培养温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照时间为 10h/d, 光照

强度为 2000 lx 左右^[2,3,4]。

1.2.3 试管苗的生根诱导: 取生长健壮、高 2.5~3 cm 的试管无根苗进行生根诱导。生根培养基为大量元素减半的 MS(1/2MS 培养基), 并在 1/2MS 培养基中加入 0.2% 活性炭及不同浓度的 NAA, 其培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比诱导丛生芽的效果

在利用腋生分生组织诱导丛生芽的过程, 就是打破顶端优势从而激发腋生分生组织进入器官发生途径的过程, 这一过程与外源 CK 的类别与浓度密切相关^[4]。将腋芽茎段置于含有不同细胞分裂素和生长素水平的器官发生诱导培养基上, 经过 8d 的诱导培养外殖体明显膨大两端切口边缘均形成浅绿色愈伤组织, 但均未见分化, 而在外殖体的叶腋处则出现有数量不等的浅绿色小突起, 腋芽开始萌动、分化, 培养 27d 后, 对诱导效果进行调查, 结果见表 1。

表 1 不同组合及不同浓度配比的激素诱导丛生芽的效果比较

培养基 序号	激素 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种 的外 殖体 数 (个)	发生丛 生芽的 外殖体 数 (个)	丛生 芽的 诱导 频率 (%)	每个 芽丛 的芽 数 (个)	试管苗 生长状况
1	6-BA 2.0+NAA0.1	21	18	85.7	3~5	玻璃化
2	6-BA 1.0+NAA0.1	21	21	100	6~8	健壮, 整齐
3	6-BA 1.0+IBA0.1	21	17	80.9	4~5	健壮, 不整齐
4	ZT 1.0+NAA0.1	21	15	71.4	3~4	粗短, 较整齐
5	KT 1.0+NAA0.1	21	16	76.1	3~4	粗短, 不整齐

从表 1 可以看出, 1 号、2 号和 3 号培养基中各项指标均优于 4 号和 5 号培养基, 表明在诱导丛生芽的过程中 6-BA 与 NAA 的组合优于 ZT 与 NAA 的组合以及 KT 与 NAA 的组合。证明与 ZT、KT 相比, 6-BA 是一种更适合于诱导千头菊腋芽器官形成丛生芽的细胞分裂素, 其诱导频率高于 KT 和 ZT, 其中 2 号培养基尤为明显 (参见图 B)。此外, 2 号培养基中丛生芽的诱导频率、每个芽丛芽数和试管苗生长状况等指标均优于 3 号培养基, 表明 6-BA 与 NAA 的搭配优于 6-BA 与 IBA 的组合 (参见图 C)。由表 1 还可以看出, 1 号培养基中的组培苗发生玻璃化现象 (参见图 A), 这主要与 6-BA 浓度过高有关, 这表明对于千头菊这种草本植物在诱导丛生芽的过程中 6-BA 的浓度不宜过高, 否则

极易玻璃化导致失败。

在各种处理中附加 6-BA 1.0mg/L、NAA 0.1mg/L 的 2 号培养基为最佳,其丛生芽诱导频率可达 100%,每个腋芽平均产生 6~8 个不定芽,并且不定芽发育健壮、整齐一致,不发生玻璃化现象。根据外观特征推测,不定芽主要是由腋生分生组织直接分化而形成的。

以 2 号培养基作为继代培养基可以得到大量的不定芽和无根苗。当丛生芽长成不定苗后,再将其切成带一个腋芽的单节后,分别转接到新鲜的 2 号培养基上进行增殖培养,每次继代时间为 25 天左右,芽丛的发生力至少保持 1 年的时间。

2.2 NAA 诱导千头菊组培苗生根的效应

选取健壮、生长旺盛且高为 2.5~3.0cm 的无根苗进行生根诱导,经过 20d 的培养即可形成完整的植株。生根培养基中附加不同浓度的 NAA,在所试的绝大多数生根培养基中,千头菊试管苗都形成了完整的植株。实验结果见表 2。从表 2 可以看出,供试组培苗的生根只需要较低水平的外源 NAA 浓度即可,其诱导效果以 0.4mg/L 的浓度最为适宜。在此浓度水平不仅可以获得 100% 的生根率,而且根的数量较多,粗细均匀、健壮,发根时间也较短,平均为 7 天,幼苗生长状况良好(参见图 D)。

表 2 NAA 诱导千头菊试管苗生根的效果

激素 NAA (mg. L ⁻¹)	供试 苗数 (株)	生根 苗数 (株)	生根 率 (%)	每株 根数 (条)	根的生 长状况
0.2	15	10	66.6	2~3	纤细、较健壮
0.4	15	15	100	4~5	粗细均匀、健壮
0.6	15	15	100	4~5	粗细均匀、健壮

注:接种 20d 后调查的结果。

2.3 炼苗与移栽

当生根苗高 4~5cm、5~6 片叶、根健壮时,打开培养瓶口炼苗 3d。然后取出小植株,用清水洗净根部,尽可能避免伤害幼根,然后移栽到装有富含腐殖质、疏松肥沃、保水透气的沙壤土中。移栽之前介质要先行灭菌,如果没有高压锅,可以用烧开的沸水充分浇透土壤,晾干后即可移栽。移栽后的小苗要注意保温保湿,可以覆盖塑料薄膜,放在温室中阳光较充足的地方,经过 10d 左右的仔细照料小苗便可度过移植期,开始长出新根和新枝叶,随后便可以进入正常的管理,成活率可达 90% 以上。

3 结论

要使组织培养方法成功地应用于生产实践,需要满足以下几点:(1)具有较高的增殖指数。(2)芽和根的形成时间短,生长周期短。(3)苗健壮,移栽时具有较高的成活率。(4)尽可能降低激素和贵重药品的用

量。这样与常规的方法相比方能有效地降低生产成本,缩短生产周期,

在本项研究的实验条件下,对于千头菊带腋芽茎段来说,诱导丛生芽的培养基为 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L,生根培养基为 NAA 0.4mg/L 时,效果为佳。在此条件下,已符合上述的几点要求。因此,在此项研究中所建立的培养条件为今后千头菊试管苗的工业化生产奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 明·李时珍. 本草纲目(上册). 北京:人民卫生出版社, 1996. 第十五卷. 930.
- 2 陈俊愉,程绪珂. 中国花经. 上海:上海文化出版社,1990. 121~127.
- 3 裘文达. 菊花花瓣的组织培养. 植物生理学通讯,1983 (6):1~2.
- 4 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控. 北京:科学出版社,1995. 64~99.



A. 6BA 2.0+NAA 0.1 组合中试管苗发生玻璃化



B. 6BA 1.0+NAA 0.1 组合中形成正常试管苗



C. 6BA 1.0+IBA 0.1 组合中形成正常试管苗



D. NAA 0.4 中试管苗生根