

## 杭白菊同源四倍体的诱导和鉴定

赵慧娜,高山林\*,陈兰兰

(中国药科大学,江苏南京 210038)

**摘要** 采用正交试验设计方法,进行了杭白菊试管苗快速繁殖技术的优化,同时进行了组织培养条件下杭白菊同源四倍体诱导与鉴定技术的研究。结果表明,诱导愈伤组织的最优外植体为叶片,最适培养基为 MS+KT(激动素)2.0 mg/L+NAA(萘乙酸)0.2 mg/L;确定了杭白菊最佳繁殖培养基为 MS+BA(6-苄基嘌呤)0.2 mg/L+IAA(吲哚乙酸)0.05 mg/L+NAA0.2 mg/L;最佳生根培养基为 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+ABT(生根粉)0.3 mg/L。在诱导四倍体的试验中,秋水仙碱浓度对存活率有显著影响,诱导杭白菊同源四倍体的最佳条件是在 2%二甲基亚砷和浓度为 0.2%的秋水仙碱中浸泡 36 h,诱导率高达 13.33%。通过根尖细胞染色体鉴定,共获得 11 个同源四倍体株系。

**关键词** 杭白菊;组织培养;同源四倍体;染色体鉴定

**中图分类号**:S567 **文献标识码**:A **文章编号**:1005-8915(2007)02-0099-05

菊花为菊科植物菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)的干燥头状花序。始载于《神农本草经》,列为上品。本品性寒,味甘、苦,具有疏风、清热、明目、解毒的功效<sup>[1]</sup>。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,传统的扦插、分株等繁殖方法以及靠自然变异选育新品种的途径已远远不能满足生产上的需要。利用生物技术开展药菊提纯复壮和快优良品种选育的工作势在必行。

国内外对其的研究主要集中在药理活性与化学成分上,而运用现代生物技术进行杭白菊优良品种选育方面的研究基本上处于空白<sup>[4]</sup>。在组织培养条件下,可以在短时间内培育出高产优质的优良品种,有效的推进中药材的 GAP 建设。鉴于此,本文在前人研究的基础上,采用正交设计进行了杭白菊快速繁殖技术的优化,并进行了杭白菊同源四倍体的诱导与鉴定,为杭白菊优良品种的选育工作奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

杭白菊脱病毒试管苗,其原材料取自浙江桐乡

杭白菊地道产区。经中国药科大学生物技术教研室鉴定为杭白菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)(当地又称大洋菊、大白菊)

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 杭白菊试管苗快速繁殖的建立和优化

1.2.1.1 诱导愈伤组织培养基筛选实验 将杭白菊试管苗的幼嫩叶片和茎在无菌条件下分别切成 1 cm<sup>2</sup>的正方形和长约 1 cm 的切断,分别接种于添加了不同浓度的 6-BA、NAA、KT 3 种不同激素和生长素配比的 MS 培养基上,培养 30 d 后,统计材料愈伤组织的诱导率及生长率。

1.2.1.2 丛生芽快速繁殖培养基优化实验 将带有 2~4 片叶的丛生芽接种于添加了不同浓度激素和生长素的 MS 培养基上,每处理 5 瓶,每瓶 8 株,20 d 后,统计其出芽数和平均生长率。以总芽数,芽的长势及平均生长率等作为指标,来筛选出最优的繁殖培养基。实验采用均匀设计,考察在培养基中添加不同浓度 BA、IAA、NAA 3 种激素对杭白菊试管苗长势的影响,对其进行 3 因素 3 水平的正交试验。

1.2.1.3 诱导生根培养基筛选实验 采用 3 因素 3 水平的正交试验,将苗接种于添加了不同浓度 IAA、NAA、ABT 3 种生长素的 1/2 MS 培养基上,培养 20 d,记录生根率及单株平均生根数及根的长势。

收稿日期:2006-09-04 修回日期:2006-11-30

作者简介:赵慧娜,女,1980年生,河南周口人,硕士研究生,主要从事中药生物技术研究。

\* 通讯作者:高山林,博导,电话(传真):025-85391288

1.2.2 根尖染色体鉴定方法 分别于上午9:00~10:00切取试管苗根,蒸馏水洗3次,分别以不同浓度秋水仙素在常温下预处理不同时间,水洗3次,在卡诺固定液无水乙醇:冰醋酸(3:1)中冰箱固定2~24 h,依次用95%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各洗3次,60℃下0.2 mol/L盐酸处理不同时间,蒸馏水洗净并于其中等渗40 min,切取根尖,置载玻片中央,加改良苯酚品红染液染色30 min后,压片,镜检。

### 1.2.3 四倍体的诱导与鉴定

1.2.3.1 四倍体的诱导 取生长20 d后的丛生芽作为无菌材料,切成0.5~1 cm的小芽,将其浸入含2%二甲基亚砷的0.1%、0.2%的无菌秋水仙碱溶液中分别浸泡24,36,48,72 h。培养30 d后统计各处理芽的存活率,将存活苗转接到MS+BA0.2 mg/L+IAA0.05 mg/L+NAA0.2 mg/L培养基中,使其

分化成苗,继代培养,建立株系并编号。

1.2.3.2 四倍体的鉴定 将存活苗切成1 cm左右的小段转接到MS+KT0.2 mg/L+NAA0.2 mg/L培养基中,使其分化成愈伤组织,再由愈伤组织分化出芽,将分化出的芽在生根培养基上生根,待根长为0.2~0.5 cm时切取根尖,进行染色体鉴定,经3次以上观察确认为四倍体的株系,予以保留繁殖。

## 2 结果

### 2.1 杭白菊试管苗快速繁殖体系的建立和优化

2.1.1 诱导愈伤组织培养基筛选试验结果 在诱导愈伤组织培养基筛选试验中,分别以叶片和茎作为外植体,设计了6种培养基,诱导率和生长量见表1。

Tab 1 The results of the inducement from the callus of *Chrysanthemum morifolium*

No. of medium	Concentration of phytohormone (mg/L)			Rate of inducement (%)		Quantity of growth (g)	
	KT	6-BA	NAA	Stems	Leaves	Stems	Leaves
1	2	2	0.1	69	68	0.31	0.42
2	2	2	0.2	72	85	0.36	0.49
3	2	0	0.2	82	98	0.47	1.51
4	2	0	0.1	80	93	0.43	1.08
5	0	2	0.1	69	76	0.39	0.69
6	0	2	0.2	73	78	0.38	0.53

由表1可见,用叶作为外植体,诱导率较高,其平均诱导率是茎的1.12倍,愈伤组织平均生长量是茎的3.87倍,因此用叶作为外植体诱导愈伤效果优于茎。KT诱导愈伤组织的效果优于6-BA,且在KT适量的情况下,加6-BA对愈伤组织的诱导率和生长率有负增长作用,而在含有KT的培养基中加适量的NAA可提高愈伤组织的诱导率和生长量。以愈伤组织的诱导率和生长量作为综合评价指标,3号为最适培养基,即为:MS+KT2.0 mg/L+NAA0.2 mg/L。

2.1.2 丛生芽快速繁殖培养基筛选试验结果 取单芽分别接种于上述不同处理的培养基上,20 d后,试验结果见表2,3,对“生长率”进行方差分析。由结果分析可以看出,3个因素对生长率的影响次序为A(BA)>B(IAA)>C(NAA);BA和IAA对

生长率影响较大,而NAA对生长率影响较小。BA浓度为0.2 mg/L时苗长势壮,且丛生芽多,当浓度较低时,芽少且长势弱,浓度较高芽易玻璃化。在BA浓度一定的情况下,IAA浓度在0.05 mg/L时诱导效果最好,生长率和芽数都较高。综合生长率和芽数两项指标,结合芽的长势,可以确定丛生芽生长最佳条件为MS+BA0.2 mg/L+IAA0.05 mg/L+NAA0.2 mg/L。

2.1.3 诱导生根培养基筛选试验结果 正交中A、B、C3种激素,影响了杭白菊试管苗生根情况,对结果中“平均生根数”指标进行方差分析,结果见表4,5。从分析结果可以看出,3个因素对平均生根数的影响次序为A(IAA)>B(NAA)>C(ABT),IAA浓度对生根率有极显著影响,NAA有显著影响,而ABT影响则不显著。从试管苗及根的生长来看,当IAA浓度在0.2 mg/L时试管苗

根长势好,且根数较多,在不加 IAA 的情况下,试管苗的根细长,且生根数少,当 IAA 浓度达到 0.4 mg/L 时,生根数较 0.2 mg/L 减少,且根粗短,试管苗长势弱。当在培养基中添加适量的 ABT,

能使根长得粗壮。因此就平均生根数这一指标而言,综合正交试验结果与根的生长势,确定杭白菊生根最佳的培养基为 1/2MS + IAA 0.2 mg/L + ABT 0.3 mg/L。

Tab 2 The results of propagation medium designed by  $L_9(3^4)$  orthogonal test

No.	Factors				Number of the crowd buds	Rate of growth (%)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	4.00	37.97
2	1	2	2	2	5.75	40.80
3	1	3	3	3	5.13	33.54
4	2	1	2	3	5.88	36.39
5	2	2	3	1	9.56	45.82
6	2	3	1	2	8.00	33.73
7	3	1	3	2	2.13	33.62
8	3	2	1	3	3.71	30.66
9	3	3	2	1	3.06	20.56
Rate of growth	K1	112.31	107.98	102.36	104.35	$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 313.09$ CT = 10 891.7
	K2	115.94	117.28	97.75	108.15	
	K3	84.84	87.83	112.98	100.59	
	R	10.37	9.82	5.08		

Tab 3 Variance analysis of the rate of growth

Source of variance	Sum of variances	Freedom degree	Variance	F value	P value
A	192.776	2	96.388	7.682	$0.01 < P < 0.05$
B	151.091	2	75.545	6.021	$0.05 < P < 0.10$
C	40.665	2	20.333	1.620	
D	9.526	2	4.763	0.380	
Se = $S_c + S_D$	50.191	4	12.548		

$F_{1-0.01}(2,4) = 18.0, F_{1-0.05}(2,4) = 6.94, F_{1-0.10}(2,4) = 4.32$

Tab 4 The results of rooting culture medium designed by  $L_9(3^4)$  orthogonal test

No.	Factors				Number of the roots	
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	3.31	
2	1	2	2	2	2.47	
3	1	3	3	3	2.69	
4	2	1	2	3	6.45	
5	2	2	3	1	4.00	
6	2	3	1	2	6.31	
7	3	1	3	2	5.13	
8	3	2	1	3	4.45	
9	3	3	2	1	5.33	
Number of the roots	K1	8.47	14.89	14.07	12.64	$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 40.14$ CT = $G2/9 = 179.0244$
	K2	16.76	10.92	14.25	13.91	
	K3	14.91	14.33	11.82	13.59	
	R	2.76	1.32	0.81		

Tab 5 Variance analysis of the Number of the roots

Source of variance	Sum of variances	Freedom degree	Variance	F value	P value
A	12.642	2	6.312	43.403	$P < 0.01$
B	3.078	2	1.539	10.582	$0.01 < P < 0.05$
C	1.222	2	0.611	4.202	
D	0.291	2	0.145	1.000	
Se= S <sub>c</sub> + S <sub>b</sub>	1.513	4	0.756		

$F_{1-0.01}(2,4)=18.0, F_{1-0.05}(2,4)=6.94, F_{1-0.10}(2,4)=4.32$

## 2.2 根尖染色体鉴定方法

杭白菊试管苗根的不同取材时间、不同预处理和离析条件对染色体的观察有着显著的影响,用0.2%的秋水仙碱溶液浸泡5h,0.2 mol/L 盐酸溶液60℃下处理12 min时,大部分细胞分散开,染色体着色较好,同时染色体分散也较好。故实验得到的杭白菊组织培养材料较好的制片方法如下:早上9点左右切取幼根,先用0.2%的秋水仙碱浸泡5h,用卡诺固定液在0℃条件下固定4h,水洗3次,60℃0.2 mol/L 盐酸离析12 min,蒸馏水洗净并于其中低

渗30 min,切取根尖组织,置载玻片中央,加改良苯酚品红染液染色30 min,压片镜检,观察。

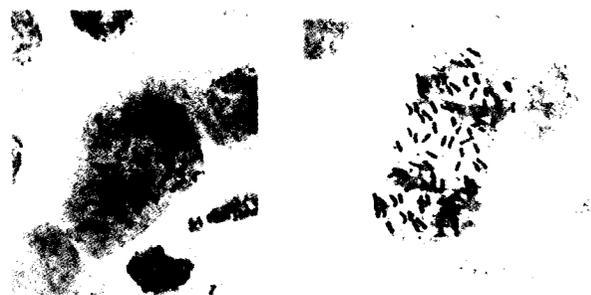
## 2.3 四倍体诱导与鉴定

2.3.1 四倍体的诱导 从表6可以看出,秋水仙碱对抗白菊试管苗的毒害程度与浸泡时间、秋水仙碱浓度密切相关,随着处理时间延长、秋水仙碱浓度的增加,试管苗存活率降低,但诱导率随之提高。当用0.2%秋水仙碱浸泡时间超过48h,诱导率开始下降。其中以含2%二甲基亚砜的0.2%秋水仙碱浸泡36h为较理想条件,诱导率达到13.33%。

Tab 6 The results of inducing autotetraploid lines by different Colchicine concentration and inducing time from the buds of *Chrysanthemum morifolium*

No.	Colchicine concentration (%)	Time of inducement (h)	Number of inoculated buds	Number of survived buds	Rate of survived buds (%)	Number of polyploid	Rate of inducement (%)
1	0.1	36	30	28	93.3	1	3.33
2	0.1	48	30	19	63.3	1	3.33
3	0.1	72	30	8	26.7	2	6.67
4	0.2	24	30	21	70.0	0	0.00
5	0.2	36	30	16	53.3	4	13.33
6	0.2	48	30	9	30.0	2	6.67
7	0.2	72	30	3	10.0	1	3.33

2.3.2 四倍体的鉴定 将存活苗切成1 cm左右的小段转接到MS+KT0.2 mg/L+NAA0.2 mg/L培养基中,使其分化成愈伤组织,由愈伤组织再分化出芽,将分化出的芽生根,待根长为0.2~0.5 cm时切取根尖,进行染色体鉴定,结果表明,杭白菊二倍体植株根尖细胞染色体数目为 $2n=2x=40$ ,四倍体植株根尖细胞染色体数目为 $2n=4x=80$ ,染色体数目增加了1倍(图1),左图为二倍体,右图为四倍体。经3次以上观察确认为四倍体的株系予以保留繁殖。通过根尖鉴定,试验共获得11个四倍体株系。



Diploid ( $2n = 2x = 40$ )

Tetraploid ( $2n = 4x = 80$ )

Fig 1 The Identification of the Polyploid of *Chrysanthemum morifolium* Ramat

### 3 结 论

田间生长的杭白菊生长繁殖很快,说明其含有较高的内源激素,本文研究结果也表明,在较低浓度的 6-BA 和 IAA 配比的繁殖培养基上就能有较好的培养效果。在适宜的培养基中,试管苗叶片舒展,繁殖系数大,无愈伤形成及玻璃化现象。6-BA 浓度的变化对丛生芽的生长情况影响显著,当 6-BA 浓度偏低时,试管苗丛生芽少,且苗矮小。当 6-BA 浓度偏高时,试管苗就会出现玻璃化现象。较高的激素配比使基部与培养基接触的叶片卷曲增厚并部分褐化,随着激素浓度的降低此现象可得以改善。

在生根培养基筛选过程中发现,菊花试管苗在不加激素的 1/2MS 培养基上就能自发生根,只是需要的启动天数长,根数少且细长易断,这可能与菊花的体内有较高的内源激素有关。但若在培养基中添加低浓度的生长素能使菊花根数增多,且缩短启动天数,而添加适量的生根粉则能使根长得粗壮,这样有利于提高菊花试管苗的移栽成活率。

由于菊花的染色体较多,进行四倍体育种难度较大,前人主要进行菊花的辐射诱变育种<sup>[5]</sup>,而菊花多倍体育种方面的研究很少。本实验采用将杭菊花丛生芽在不同浓度秋水仙碱溶液中浸泡不同时间,进行了杭白菊同源四倍体的诱导试验,结果表明用秋水仙碱诱导杭白菊四倍体诱导率相对较高,并获得了杭白菊同源四倍体株系,为杭白菊新品种的培育提供了一种新方法。

#### 参考文献

- [1] 胡春,丁霄霖,唐莉莉,等. 菊花提取物对实验动物抗疲劳和降血脂作用[J]. 食品科学, 1996, (10):58.
- [2] 郑占虎,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社,1998.
- [3] 张治国. 药用植物组织培养技术应用前景[J]. 中草药,1986, 17(11):35.
- [4] 高山林. 药用植物育种的现状和展望[J]. 世界科学技术—中药现代化,2001. 6:58.
- [5] De A M. Influence of nitrogen sources on in vitro morphogenesis of axillary shoots in stem explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *Revista-Brasileira-de-Botanica*, 1998, 21(2):141.

## The Inducement and Identification of the Polyploid of *Chrysanthemum Morifolium* Ramat.

ZHAO Hui-na, GAO Shan-lin, CHEN Lan-lan

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

**Abstract** The rapid-propagation system of *Chrysanthemum morifolium* has been established. The results showed that the leaves are the best explant to induce callus and the MS +KT2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L is the best medium. The results indicated that the strong and green clump-buds could be induced on the MS media containing BA0.2 mg/L, IAA0.05 mg/L and NAA0.2 mg/L. The strong root was induced on the 1/2MS, IAA0.2 mg/L and ABT0.3 mg/L; The technology of inducing autotetraploid of *Chrysanthemum morifolium* was studied in vitro. The results indicated that autotetraploid can be induced by immersing the buds in 0.2% colchicines solution supplemented with 2% DMSO. This method is proved to be the best way to induce autotetraploid with inducing ratio as high as 13.33%. 11 lines of autotetraploid lines were identified by optimized chromosome determination method. It has laid the basis for further selecting the varieties of *Chrysanthemum morifolium* with good quality and high yield.

**Key words** *Chrysanthemum morifolium*, Tissue culture, Autotetraploids, Chromosome determination