

## 白花除虫菊组织培养研究

刘 蓁, 高山林\*

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

**摘要** 通过除虫菊组织培养技术的正交试验及优化筛选, 建立了除虫菊最适繁殖培养基: MS+BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 通过在培养基中添加不同浓度生长素, 得到适合除虫菊的生根培养基: 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+ABT 0.1 mg/L。建立了除虫菊根尖染色体鉴定的最佳条件。染色体鉴定结果表明: 白花除虫菊的染色体为  $2n=18$ 。为除虫菊的种质保存和优良品种的选育工作奠定了基础。

**关键词** 白花除虫菊; 组织培养; 染色体鉴定

**中图分类号**: S603.6

**文献标识码**: A

**文章编号**: 1005-8915(2005)06-0370-05

白花除虫菊 (*Pyrethrum cinerarii folium* Trev.) 为菊科小黄花属多年生宿根草本植物, 以花或全草入药<sup>[1]</sup>。其花中提取的总除虫菊酯含除虫菊酯 I、II, 瓜菊酯 I、II, 茛菊酯 I、II 共 6 种有效杀虫成分。这是迄今发现的不污染环境, 对哺乳动物及植物无毒无害, 对昆虫和蚊蝇等迅速击倒, 不易产生抗药性的高效天然杀虫剂<sup>[2]</sup>。由于拟菊酯类农药在生产合成中造成污染, 以及使用后有残毒, 易产生抗药性等缺点, 天然的除虫菊就越来越受到重视。20 世纪 90 年代, 国际除虫菊市场仍呈现上升趋势。近几年, 我国政府和社会大力倡导发展“绿色农业”, 除虫菊已经在我国云南省迅速发展。作为绿色农药, 除虫菊杀虫产品已在我国问世, 这必然会对我国绿色农业的发展起积极的作用。

采用组织培养技术, 可以有效地保存除虫菊的优良品种, 并在此基础上进行优良品种的快速繁殖, 以满足生产上的需要。本文在已有关于除虫菊组织培养文献的基础上, 首次用正交试验对除虫菊的快繁培养基进行了筛选, 并在筛选的基础上做了进一步的优化试验, 为除虫菊的种质保存和快速繁殖提供了科学的依据。对根尖染色体鉴定技术进行了优化, 得到了清晰的染色体照片, 为今后进行的多倍体优良品种选育打下了良好的基础。

## 1 材料与方 法

## 1.1 实验材料

实验于 2004.2~2004.7 月进行。供试材料白花除虫菊种子购自山西香山农业科技示范园。栽培于中国药科大学实验苗圃。原植物经中国药科大学中药生物技术教研室鉴定为白花除虫菊 (*Pyrethrum cinerarii folium* Trev.)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 无菌材料的获得 选取饱满的白花除虫菊种子, 肥皂水清洗 15 min, 用流水冲洗 0.5 h 左右。在超净工作台上将材料置于 75% 酒精中浸泡 30 s, 再放入 0.1% 升汞溶液中 (加 3~5 滴吐温-20) 消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次, 接种于 26 号培养基中无菌萌发。还可将种子在滤纸上自然萌发, 取萌发的幼芽, 用流水冲洗 15 min, 在超净工作台上, 先用 2% 次氯酸钠溶液 (加 3~5 滴吐温-20) 消毒 8 min, 再用 0.1% 升汞溶液 (加 3~5 滴吐温-20) 消毒 5 min, 无菌水冲洗 5 次。

## 1.2.2 扩大繁殖培养基筛选实验

(1) 以 6-卞基腺嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA)、病毒唑 (RTCA) 3 种激素作为 3 个因素, 分别设计 3 个水平做正交试验, 以丛生芽平均生长率 (丛生芽平均生长率 = [(n 天后材料重-接种时材料重)/接种时材料重] × 100%) 为衡量指标, 综

收稿日期: 2005-03-30 修回日期: 2005-04-15

作者简介: 刘蓁, 女, 1981 年生, 四川成都人, 博士研究生, 主要从事中药生物技术研究

\* 通讯作者: 高山林, 教授, 博导, 83260113

合考虑各培养基中丛生芽的生长情况,筛选出适合除虫菊生长的培养基。试验因素水平表 1。

Tab 1 The factor and level of orthogonal test of filtration of propagation medium of Py rethrum.

Level	Factor		
	A 6-BA(mg/L)	B NAA(mg/L)	C RTCA(mg/L)
1	0.5	0.1	0
2	1.0	0.2	5
3	2.0	0.3	10

(b) 以正交试验的结果为基础,对激素水平进行小范围的调整,对筛选出的培养基进一步优化。

1.2.3 丛生芽生根试验 分别 1/2MS 培养基中添加吲哚乙酸(IAA)(浓度为 0~0.2 mg/L)和生根粉(ABT)(浓度为 0~0.2 mg/L)。记录生根率,根长等指标。

1.2.4 试管苗移栽试验 分别在不同的月份和天气进行除虫菊试管苗的移栽试验。试管苗出瓶后练苗 3 d,移栽苗床培养,每天早晚覆膜,每隔 2 h 喷雾 10 min,培育 3~4 w 后再移栽至大田,早晚各浇水 1 次,1 w 后计算成活率。

1.2.5 除虫菊根尖染色体鉴定 于早晨 8:00~9:00 切取长为 3~5 mm 的根,将材料在蒸馏水中冲洗 3 次,用不同浓度的秋水仙碱溶液(0.1%, 0.2%, 0.3%)浸泡不同的时间(3 h, 4 h, 5 h)。取出后用蒸馏水冲洗 3 次,于卡诺氏液中固定 2~24 h。取出,蒸馏水洗 3 次。于 60℃, 0.2 mol/L HCl 中分别水解 5 min, 10 min, 15 min。蒸馏水洗 3 次,并置蒸馏水中后低渗 30 min。切取根尖于载玻片上,改良苯酚品红试液染色 30 min,压片。用“Olympus BX40”显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

正交试验结果与分析见表 2、3。

### 2.1 正交试验结果与分析

从正交分析结果可以看出:NAA 的浓度与芽的生长速率有显著相关性,而 RTCA 对除虫菊丛生芽的生长速率影响不大。NAA 的浓度在 0.3 mg/L 时最有利于芽的生长。6-BA 的浓度在 1.0~2.0 mg/L 间丛生芽的数量最多,但是部分丛生芽出现玻璃化现象,芽的生长不正常,叶片卷曲变形,非常细弱。而 6-BA 在低浓度(0.5 mg/L)时丛生芽的生长正常,试管苗健壮,叶片翠绿。

Tab 2 The results of filtration of propagation medium of Pyrethrum. designed by L9(34) orthogonai test

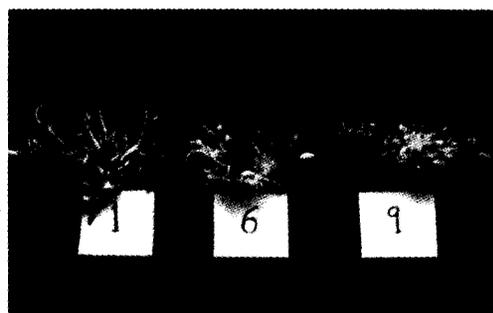
No.	Factor			Shoots growing rate(Xi, %)	Xi <sup>2</sup>
	A	B	C		
1	1	1	1	963.00	927 369
2	1	2	2	1 305.00	1 703 025
3	1	3	3	1 412.00	1 993 744
4	2	1	2	1 295.00	1 677 025
5	2	2	3	1 387.00	1 923 769
6	2	3	1	1 575.00	2 480 625
7	3	1	3	1 125.00	1 265 625
8	3	2	1	1 369.00	1 874 161
9	3	3	2	1 532.00	2 347 024
K <sub>1</sub>	K <sub>1</sub> <sup>A</sup> =3 680.00	K <sub>1</sub> <sup>B</sup> =3 383.00	K <sub>1</sub> <sup>C</sup> =3 907.00		
K <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> <sup>A</sup> =4 257.00	K <sub>2</sub> <sup>B</sup> =4 061.00	K <sub>2</sub> <sup>C</sup> =4 132.00	K=11 963.00	W=16 192 367
K <sub>3</sub>	K <sub>3</sub> <sup>A</sup> =4 026.00	K <sub>3</sub> <sup>B</sup> =4 519.00	K <sub>3</sub> <sup>C</sup> =3 924.00		
U	U <sub>A</sub> =15 957 708	U <sub>B</sub> =16 119 257	U <sub>C</sub> =155 911 950		
Q	Q <sub>A</sub> =56 222.89	Q <sub>B</sub> =217 771.60	Q <sub>C</sub> =10 464.22	P=15 901 485	
R	R <sub>A</sub> =28 111.44	R <sub>B</sub> =108 885.80	R <sub>C</sub> =5 232.11		

Tab 3 Variance analysis of filtration of propagation medium of Pyrethrum

Source of variance	Sum of variance squares	Degree of freedom	Variance	F value	P value
A(BA)	Q <sub>A</sub> =56 222. 89	2	28 111. 44	4. 38	P>0. 1
B(NAA)	Q <sub>B</sub> =217 771. 60	2	108 885. 80	16. 95	0. 05<P<0. 1
C(RTCA)	Q <sub>C</sub> =10 464. 22	2	5 232. 11	0. 81	P>0. 1
e(error)	Q <sub>E</sub> =6 422. 89	2	3 211. 44		
Sum	Q <sub>T</sub> =29 0881. 60	8			

Note: F<sub>1-0.01</sub>(2,2)=99.0 F<sub>1-0.05</sub>(2,2)=19.0 F<sub>1-0.1</sub>(2,2)=9.0

图1中1号培养基中6-BA浓度为0.5 mg/L, 试管苗生长正常;6号培养基中6-BA浓度为1.0 mg/L, 丛生芽中部分小芽生长十分细弱, 叶片呈黄绿色, 部分小芽明显玻璃化;9号培养基中6-BA浓度为2.0 mg/L, 丛生芽基本全部玻璃化, 虽然丛生芽数量为3种培养基中最多的, 但是试管苗细弱, 玻璃化严重。综合正交实验结果以及丛生芽生长数量和质量的全面考虑, 6-BA的浓度不应高于0.5 mg/L, NAA浓度在0.3 mg/L最有利于芽的生长。



1. 6-BA 0.5 mg/L; 6. 6-BA 1.0 mg/L; 9. 6-BA 2.0 mg/L.

Fig 1 The shoots of Pyrethrum in different cultural mediums

2.2 优化试验结果和分析

Tab 4 The results of the test of optimizing multiplication medium Of Pyrethrum

No.	Concentration of phytohormone (me. /L.)	Fresh weight (g)	Fresh weight of 30 days later (g)	Growing rate (times)
1	MS+BA0.1+NAA0.3	6.04	49.1	7.13
2	MS+BA0.2+NAA0.3	5.32	60.67	10.40
3	MS+BA0.3+NAA0.3	5.56	73.36	12.19
4	MS+BA0.4+NAA0.3	5.71	70.24	11.30

从表4优化试验结果可以看出, 开始丛生芽

生长率随着6-BA浓度的增加而逐步增高, 在6-BA的浓度为0.3 mg/L时达到最高, 6-BA的浓度继续升高, 则生长率有所下降。在4种培养基中丛生芽增殖系数差异不大, 因此采用3号培养基作为除虫菊快速繁殖培养基即可使繁殖材料的繁殖系数尽可能大, 又能保证获得生长健壮的试管苗。

2.3 丛生芽生根试验结果和分析

除虫菊试管苗在未添加生长激素的MS, 1/2MS, B<sub>5</sub> 3种不同的培养基中均能生根, 但以1/2MS培养基生根效果为最佳。为了考察IAA和ABT 2种激素对除虫菊试管苗生根的效果, 设计6种培养基进行生根试验(表5, 6)。试验结果表明, 在1/2MS培养基中适当添加低浓度的IAA能促

Tab 5 The phytohormones' proportion of rooting culture medium of Pyrethrum

Concentration of phytohormone (mg/ml)	NO.					
	1	2	3	4	5	6
IAA	0.2	0.2	0	0.1	0.1	0
ABT	0	0.1	0.1	0.2	0	0.2

Tab 6 The results of the test of rooting culture medium of Pyrethrum

No.	No. of culturing	Rooting No. of 30 day culturing	Rooting rate(%)	Average rooting No. ( $\bar{x} \pm SD$ )	Average root length ( $\bar{x} \pm SD$ )
1	30	375	100	12.5±1.44	5.7±0.67
2	25	392	100	15.68±5.07	5.43±0.61
3	30	287	100	9.57±7.28	5.82±1
4	30	423	100	14.1±6.96	5.79±1.04
5	30	359	100	11.97±2.24	5.5±0.85
6	25	259	100	10.36±2.16	6.35±0.53

进试管苗生根,并且有利于初生根的生长;在1/2MS培养基中单独添加ABT,效果不佳;2种生长激素配合使用,生根效果优于2种激素单独使用。IAA(0.2 mg/L)和ABT(0.1 mg/L)配合使用时,培养10 d的试管苗生根率在98%以上,初生根健壮,生长1 w左右根长可达3~5 cm。

#### 2.4 试管苗移栽试验结果和分析

分别在3,4,5,7月进行试管苗移栽苗床试验,3,4,5月的移栽成活率均在85%以上,7月移栽成活率极低。移栽最佳时间是4月份左右,选择天气温暖的阴天移栽成活率最高(可达98%以上)。而在苗床培育1个月的试管苗生长旺盛,对移栽大田的条件要求不高,移栽大田极易成活,移栽成活率可达100%。

#### 2.5 除虫菊根尖染色体鉴定结果和分析

用0.2%秋水仙碱浓缩3 h,4 h,5 h和用0.3%秋水仙碱浓缩3 h,4 h后的观察效果都很好,其中以0.2%秋水仙碱浸泡4 h的效果最好,观察得到的染色体缩短长度适宜,易于记数。用0.2 mol/L HCl水解处理10 min,大部分细胞分散开,染色体分散较好。试验得到除虫菊根尖染色体鉴定的最佳条件是:根尖用0.2%秋水仙碱溶液浸泡4 h,固定液固定2~24 h后,依次用100%,75%的乙醇和蒸馏水冲洗根尖,然后用0.2 mol/L HCl水解处理10 min,蒸馏水后低渗30 min,改良苯酚品红染色,压片。可清晰的观察到除虫菊染色体数为: $2n=18$ (图2)。



Fig 2 *Pyrethrum cinerariaefolium* Trev. rootlet chromosome( $2n=18$ )

### 3 讨论

菊科植物大都生长旺盛,分蘖数较多,这说明菊科植物普遍含有较高的内源激素<sup>[3]</sup>。本研究结果也反映出较低浓度的6-BA和NAA配比具有较好的培养繁殖效果。虽然高6-BA浓度可获得更多的丛生芽,但是芽的生长不正常,易出现玻璃化或褐化现象。本研究通过正交试验筛选出适合除虫菊快速繁殖的培养基,并在此基础上做进一步的优化试验,综合考虑丛生芽的生长情况和增殖系数,得到除虫菊最佳快速繁殖培养基的激素配比是:MS+6-BA0.3 mg/L+NAA0.2 mg/L。这一研究为除虫菊生产中遇到的种质保存和病毒感染等问题提供了一条解决途径,同时也为除虫菊优良品种的选育工作打下了一定的基础。

除虫菊是白花授粉有孢子不亲合(不育)规律<sup>[4]</sup>,属异花授粉植物,如果没有特殊的隔离条件,1个品种优良性状很难长期保持,因而种质的退化是不可避免的<sup>[5]</sup>。通过丛生芽生根试验,我们获得了除虫菊完整植株的试管苗,并通过移栽试验证明了用组织培养的方法保存除虫菊优良品种的可行性。与传统保留母株的方法比较,不仅省时,省工,而且还可以节约大量的田间管理费用。此外,还确定了除虫菊根尖染色体鉴定的最佳条件,为除虫菊同源四倍体的诱导及显微鉴定奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 杜冰群,刘启宏,朱翠英.除虫菊的染色体数目及其核型[J].武汉植物学研究,1988,6(1):95.
- [2] 王用平.除虫菊—优良的杀虫植物[J].中草药,1986,17(12):24.
- [3] 鄧慧,高山林.杭白菊茎尖组织培养及试管苗繁殖技术研究[J].植物资源与环境学报,2004,13(1):24.
- [4] Parlevliet J E, Brewer J G. The botany, agronomy and breeding of *Pyrethrum*, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis [M]. Nairobi:Ministry of Agriculture Press. 1971,8. [5] 陈宗莲,侯岁稳,俞宏渊.除虫菊的组织培养[J].云南植物研究,1998,20(3):351.

## Studies on Tissue Culture and Chromosome Identification Technology of *Pyrethrum Cinerariae folium* Trev.

LIU Zhen, GAO Shan-lin\*

(China Pharmaceutical University, Jiangsu Province, Nanjing 210038, China)

**Abstract** The fittest media of *Pyrethrum cinerarii folium* for rapid-propagation was established and optimized by orthogonal test in tissue culture process. The obtained results indicated that the fittest rapid-propagation media of *Pyrethrum cinerarii folium* is MS+BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L and its rooting media is 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+ABT 0.1 mg/L. The best condition of chromosome determination was established. The chromosomal number of pyrethrum was  $2n=18$ . The above research laid the basis for preserving the plant resource and breeding excellent lines of *Pyrethrum cinerarii folium*.

**Key words** *Pyrethrum cinerarii folium*, Tissue culture, Identification of chromosome

### 《中国药学会百年史》各专业委员会及各地药学会征稿体例

一、各会的成立时间:(特别是那些在建国前成立的各省市药学会)

二、首任及历任的会长(理事长、主任委员)(包括各地药学会的副理事长、秘书长,各专业委员会的副主任委员,亦包括名誉主任委员以及秘书等)(注:不详的可缺项,但应注明)

三、历年开展学术活动的情况,组织工作情况。按照年代发展顺序,逐年或逐届叙述。各地药学会要以本会的学术活动为主,省以下各专业委员会的活动从简。

四、对本专业或各省市药学会的发展起过重要历史作用的人物情况。具体人选可由各地药学会或各专业委员会经过集体研究后自行确定。

五、对药学会今后发展的建议。

一律形成书面资料,字数不限,但切忌空泛冗长,注意与各地药学事业的发展有所区别。

### 中国药学会百年庆典史料征集函

2007年是中国药学会成立100周年,为庆祝学会百年。经学会常务理事会研究决定,届时我会将编纂出版《中国药学会百年史》及出版VCD及纪念画册等,目的在于回顾学会历史,展望未来,以促进我国的药学事业取得更大的成就。在此,特向全国药学相关人士公开征集有关本会及各专业委员会、各地分会开展的学术活动及组织活动的历史资料,包括建国前几十年的相关资料,文字报道、摄影图片及实物等。同时也收集近百年来与药学相关的教育、科研、生产、企业、临床药学及质量管理和检验等专业和单位纪念性的综合历史资料,愿望得到各位与本会有过直接或间接往来的各位同行前辈、专家或其家属、亲属,给予大力地协助与支持,亦烦请知情者代转告之。

联系地址:北京市北礼士路甲38号中国药学会组织工作部,邮编:100810 联系人:张苙、黄石麟 电子信箱:cpa@cpa.org.cn

二〇〇五年十一月二十一日