

紫花亚菊(*Ajania purpurea*)的组织培养与快速繁殖

郑燕, 沈景, 韩倩, 赵惠恩*

北京林业大学园林学院, 北京100083

摘要: 以紫花亚菊茎段为外植体对其进行组织培养, MS为基本培养基, 设置不同激素浓度配比, 对试验结果进行观察分析, 筛选出适合的配方: 启动培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹; 继代培养基MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹, 组培苗分化率高; 不定根最适诱导培养基为: 1/2MS+IBA 0.15 mg·L⁻¹, 生根率达90%以上, 组培苗移栽成活率达95%。

关键词: 紫花亚菊; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Ajania purpurea* Shih

ZHENG Yan, SHEN Jing, HAN Qian, ZHAO Hui-En*

College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: The tissue culture technology of *Ajania purpurea* was studied in this research. Stem-segments of *Ajania purpurea* were used as explants. Bud formation on the nodal explants was induced on an optimal medium MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹. To get a high propagation ratio, the seedlings were transferred to the medium of MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹. The optimal medium for adventitious root inducing was 1/2MS+IBA 0.15 mg·L⁻¹ and the rooting rate was at least 90%. The plantlets were transplanted to pots with sands and acclimated for several weeks. The rooted and acclimated plantlets were transferred outdoors with 95% transplantation success.

Key words: *Ajania purpurea*; tissue culture; rapid propagation

紫花亚菊(*Ajania purpurea* Shih), 菊科亚菊属小半灌木, 为西藏冈底斯山特有种, 生于高山砾石堆和高山草甸及灌丛中, 海拔4 800~5 300 m的地方(林谔和石铸1979)。其叶色灰白, 花冠自中部以上紫红色, 叶、花有浓郁的香味, 植株低矮, 耐寒性、耐旱性强, 是一种良好的园林观赏植物。紫花亚菊的木质化枝条扦插不易生根, 分布区狭小, 难采集, 引种不易成活, 通过组织培养可大规模扩繁紫花亚菊, 提高其引种成功率, 为其进一步应用于园林及育种奠定基础。同时, 对于其种质资源的保存亦具有重要意义。

材料与方法

1 实验材料

本实验所用外植体为紫花亚菊当年新生嫩茎。

2 方法

2.1 外植体的准备及无菌体系的建立

在生长健壮, 无病虫害的优良紫花亚菊植株上剪取茎段, 去掉部分叶片, 用洗洁精进行清洗, 后用流水冲洗30 min左右。在超净工作台上先用

75%的酒精浸泡20~30 s, 无菌水冲洗1遍, 再用1 g·L⁻¹的升汞溶液进行消毒处理, 无菌水冲洗4遍后, 接种于启动培养基上。消毒时间设定4个水平: 5 min, 6 min, 7 min, 10 min, 每水平处理20个外植体, 重复3次, 筛选出最佳灭菌时间。

2.2 启动培养基的筛选

以MS为基本培养基, 设置6-BA浓度1.0 mg·L⁻¹, 0.5 mg·L⁻¹, 0.25 mg·L⁻¹, NAA浓度为0.01 mg·L⁻¹, 培养基中分别附加30 g·L⁻¹蔗糖和7 g·L⁻¹琼脂, pH为5.8~6.0。培养温度为(25±2) °C; 光照强度25 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间16 h·d⁻¹。观察外植体生长情况, 筛选合适的启动培养基。

2.3 继代培养基的筛选

采用L₉(3⁴)的正交试验设计, 以MS为基本培养基(琼脂7 g·L⁻¹, 蔗糖30 g·L⁻¹), 6-BA浓度1.0 mg·L⁻¹, 0.5 mg·L⁻¹, 0.3 mg·L⁻¹, NAA浓度为0.1 mg·L⁻¹, 0.05 mg·L⁻¹,

收稿 2011-08-25 修定 2011-09-19

资助 国家自然科学基金(30970207)。

* 通讯作者(E-mail: zhaohuien@bjfu.edu.cn; Tel: 010-82376017)。

0.01 mg·L⁻¹两因素三水平设计试验,以繁殖系数、生长势情况为指标,筛选合适的培养基。

按照正交试验设计的激素配比,将启动培养基上无菌外植体分别转接到不同激素浓度的MS培养基上。每处理10瓶,重复3次,观察繁殖系数和生长发育情况。繁殖系数=同一激素浓度处理生长的侧芽总数/总处理瓶数,形态指标按生长状况从好到差分为5级(芽有5~6片绿色舒展的小叶;芽有小叶3~4片,可展开;小叶2~3片,生长良好;小叶1~2片,长势较弱;叶片略发黄,长势差),相应分数为5~1。

2.4 生根培养基的筛选

以1/2MS为基本培养基(琼脂7 g·L⁻¹,蔗糖20 g·L⁻¹),设置IBA浓度0.2 mg·L⁻¹, 0.15 mg·L⁻¹, 0.1 mg·L⁻¹,以生根数、生根率、根长势为指标,记录生根情况。

将继代培养增殖的芽分别转接到不同激素配比的培养基中生根。每个浓度处理10瓶,重复3次,筛选合适的生根培养基。

实验结果

1 无菌培养体系的建立

从表1中可看到不同消毒时间对紫花亚菊茎段的影响。参照林业试验设计方法(续九如和黄智慧1995),对表1中的污染数进行方差分析: $F_{\text{污染}}=18$, $F_{\text{成活}}=54$, 而 $F_{0.05}(3,8)=4.07$; $F_{\text{污染}} > F_{0.05}$, $F_{\text{成活}} > F_{0.05}$ 。

不同消毒时间处理之间差异显著,随升汞消毒时间的增加,污染率明显下降,成活率先升高后降低,以升汞溶液消毒处理10 min的污染率最低,为5%,以升汞溶液消毒处理6 min的成活率最高,为60%。综合污染率和成活率两方面的因素,升汞溶液消毒处理6 min最为合适。

2 启动培养

从表2中可看到,高浓度的6-BA容易导致外植体玻璃化,较低浓度的6-BA较为适合作为启动培养基,且不影响芽的增殖。

3 继代培养

将启动培养基中萌发的侧芽接种到继代培养基中,3周后陆续分化出不定芽(图1-A)。试验结果如下(表3):

对正交试验的结果进行极差分析:通过对繁殖系数,生长势的K值(每一列上各个水平的平均值)分析,最佳组合为:因素1-水平3+因素2-水平2,即MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹的组合适于芽的增殖培养,繁殖系数为4.37。

4 根的诱导

将继代增殖中生长健壮的丛生芽接种到生根培养基中,3周以后开始长出大量根系(图1-B)。

方差分析结果: $F_{\text{生根数}}=116$, $F_{\text{根长}}=47$, 而 $F_{0.05}(2,6)=5.14$; $F_{\text{生根数}} > F_{0.05}$, $F_{\text{根长}} > F_{0.05}$ 。不同浓度的IBA浓度处理差异明显,IBA浓度为0.15 mg·L⁻¹时生根数目最多,根长且粗壮。

表1 不同消毒时间对紫花亚菊茎段的影响

Table 1 Effects of different sterilization time on the growth of *Ajania purpurea*

消毒时间/min	外植体数/个	污染数/个	污染率/%	成活数/个	成活率/%
10	20	1	5	1	5
7	20	3	15	1	5
6	20	6	30	12	60
5	20	14	70	4	20

表2 不同浓度6-BA处理对紫花亚菊外植体生长的影响

Table 2 Effects of different concentration of 6-BA on the germination of *Ajania purpurea* explants

培养基种类	生长情况
MS+6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹	外植体玻璃化程度较高,达到90%以上,严重影响了正常生长。
MS+6-BA 0.5 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹	侧芽基部形成绿色愈伤组织,芽体长势强壮。
MS+6-BA 0.25 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹	侧芽萌发速度较慢。



图1 紫花亚菊的组织培养与植株再生

Fig.1 Tissue culture and plant regeneration of *Ajania purpurea*

A: 继代培养; B: 生根苗; C: 炼苗移栽。

表3 不同浓度6-BA和NAA处理对紫花亚菊增殖的影响

Table 3 Effects of different concentration of 6-BA and NAA on the multiplication of *Ajania purpurea*

编号	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	繁殖系数	生长势
1	1	0.1	2.03	2.63
2	1	0.05	2.41	2.87
3	1	0.01	2.48	2.33
4	0.5	0.1	2.34	2.86
5	0.5	0.05	4.43	3.31
6	0.5	0.01	2.78	2.46
7	0.3	0.1	2.29	3.38
8	0.3	0.05	4.37	4.07
9	0.3	0.01	3.15	3.32
K1	2.31	2.22		
	3.18	3.74		
	3.27	2.80		
K2	2.61	2.96		
	2.88	3.42		
	3.49	2.60		

5 炼苗与移栽

在培养室里将生根苗的瓶盖打开, 炼苗2 d后拿到温室中, 用镊子小心将苗从培养瓶中取出, 用清水洗净黏附于组培苗根系上的培养基, 然后栽种到经过高锰酸钾灭菌的河沙中, 浇透水, 喷施绿

亨2号(广谱性杀菌剂), 防止烂根。将移栽好的苗放到阴凉处1周, 注意保湿, 待生长稳定后放到阳光下让其生长, 移栽后的成活率达90%左右(图1-C)。

讨 论

种质资源的收集和扩繁是育种的前提。目前, 国内外对紫花亚菊的研究较少, 对其组织培养和快速繁殖的研究尚未见报道。本试验以紫花亚菊茎段为材料进行组织培养, 通过表面消毒, 建立无菌体系, 以1 g·L⁻¹的升汞溶液进行6 min消毒处理最为适当, 污染率低且成活率可达60%; MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹的培养基启动培养; MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹继代培养, 组培苗繁殖率高, 增殖系数为4.37; 不定根最适诱导培养基为: 1/2MS+IBA 0.15 mg·L⁻¹, 生根率较高。

试验采用较高浓度的细胞分裂素与较低浓度的生长素结合, 继代时降低激素浓度直接诱导愈伤组织分化出芽, 通过丛生芽的方式再生植株, 筛选出较为适合的快速增殖的配方, 为亚菊属进一步遗传转化研究创造了前提, 为亚菊属其他植物再生体系的构建提供了参考。

表4 不同浓度IBA处理对紫花亚菊生根的影响

Table 4 Effects of different concentration of IBA on the rooting of *Ajania purpurea*

培养基种类	生根数/条	根长/cm	生根率/%	根生长情况
1/2MS+IBA 0.1 mg·L ⁻¹	2.00	3.64	30 (9/30)	根生长良好, 较短, 较细弱。
1/2MS+IBA 0.15 mg·L ⁻¹	5.14	4.87	90 (27/30)	根生长健壮, 根系长且粗壮。
1/2MS+IBA 0.2 mg·L ⁻¹	1.14	2.03	10 (3/30)	根生长一般, 短, 细弱。

紫花亚菊叶、花具有浓郁的香味, 是良好的野生种质资源, 可作为一种优良的芳香植物。目前, 对菊科春黄菊属(*Anthemis*) (Kivcak等2007), 菊属(*Chrysanthemum*) (Boutaghane等2008), 蒿属(*Artemisia*) (Khanina等1992; Serykh等1991; Goryaev等1981), 蓍属(*Achillea*) (Mustafaeva 1991), 滨菊属(*Leucanthemum*) (Sagareishvili 2002)精油成分研究均有报道, 亚菊属植物*Ajania fastigiata* (Sharipova等1975)的精油成分亦有所研究, 紫花亚菊香精成分的研究尚未见报道, 有待进一步研究。

亚菊属与菊属亲缘关系较近(吴国胜等2008; 赵宏波等2008), 可利用亚菊属优良的种质资源, 对栽培菊花进行改良和种质创新。紫花亚菊耐寒性、耐旱性强, 可将其高度抗旱、抗寒的性状导入菊花, 从而培育出适宜荒漠、半荒漠等干旱、半干旱地区绿化、美化等应用的菊花新品种。

参考文献

- 林谔, 石铸(1983). 中国植物志, 第七十六卷第一分册. 北京: 科学出版社, 115~116
- 吴国胜, 陈发棣, 陈素梅, 赵宏波, 房伟民(2008). 基于PCR-RFLP多态的部分菊属与亚菊属植物亲缘关系研究. 江苏农业科学, (2): 58~61
- 续九如, 黄智慧(1995). 林业试验设计. 北京: 中国林业出版社, 8~9
- 赵宏波, 陈发棣, 郭维明, 汤访评, 房伟民(2008). 菊属与春黄菊族部分属间杂交亲和性初步研究. 南京农业大学学报, 31 (2): 139~143
- Boutaghane N, Kabouche A, El-Azzouny AM, Kabouche Z (2008). Composition of the essential oil of *Chrysanthemum macrocarpum* from Algeria. Chem Nat Compd, 44 (6): 817~818
- Goryaev MI, Sharipova FS, Elchibekova LA, Averina VY (1981). Essential oil of *Artemisia scoparia*. Chem Nat Compd, 17 (5): 400~403
- Khanina MA, Serykh EA, Berezovskaya TP, Khan VA (1992). Essential oil of *Artemisia rubripes*. Chem Nat Compd, 28 (6): 759~760
- Kivcak B, Mert T, Saglam H, Ozturk T, Kurkcuoglu M, Baser KHC (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Anthemis wiedemanniana* from Turkey. Chem Nat Compd, 43 (1): 47~51
- Mustafaeva SD (1991). Essential oil of *Achillea cuneatiloba*. Chem Nat Compd, 27 (2): 251~253
- Sagareishvili TG (2002). Essential oil of *Leucanthemum vulgare*. Chem Nat Compd, 38 (3): 295~296
- Serykh EA, Khanina MA, Berezovskaya TP, Kahn VA, Kharkevich SS (1991). Essential oil of *Artemisia lagocephala*. Chem Nat Compd, 27 (3): 373~374
- Sharipova FS, Chumbalov TK, El'chibekova LA, Zhubaeva RA (1975). Study of the essential oil of *Ajania fastigiata*. Chem Nat Compd, 11 (1): 104~105