

# 正交实验优化“神农”香菊顶芽的离体培养条件

雷霄飞<sup>1</sup>, 杨学领<sup>2</sup>

(1. 武汉生物工程学院 学报编辑部, 湖北 武汉 430415; 2. 武汉生物工程学院 科技处, 湖北 武汉 430415)

**摘要:**以湖北神农架地区采集的“神农”香菊顶芽为外植体,研究了不同消毒剂种类及方法的灭菌效果,通过芽增殖培养基和生根培养基的激素配比试验,筛选出“神农”香菊试管苗快速繁殖的最佳培养基组成。结果表明:“神农”香菊顶芽的最佳消毒方案为 75% Alcohol 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 2 min+2% NaClO<sub>3</sub> 8 min;顶芽最适增殖培养基为 MS+0.7 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+0.3 mg/L NAA,生根的最适培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA。

**关键词:**“神农”香菊;组织培养;快繁技术;正交实验

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0105-04

“神农”香菊(*Dendranthema indicum* var. *aromaticum*)是菊科菊属植物野菊的一个新变种,原植物产于湖北神农架地区,是目前湖北生长的稀缺本草植物,资源有限,主要分布在海拔 2 000 m 以上的向阳开阔的山坡、路旁、岩石缝、灌木丛边的空旷地中<sup>[1-2]</sup>。其形似野菊花,金黄

色,虽然朵小茎细,却郁香无比,具有平肝明目、清咽利喉、清热解毒、散风降压等功效。由于“神农”香菊现在广泛应用于医药、香料工业和日用化学工业中,其用量急剧增加,因此,开发利用率高,经济价值十分明显。“神农”香菊地理分布范围不大,资源非常有限,因此需要积极进行人工组培和栽培,并合理地开发利用<sup>[3-4]</sup>。

长期以来“神农”香菊的繁殖一直采用种子、分株和扦插等方法,繁殖速度较慢,受材料、季节、地理条件等的约束无法形成规模化种植,不能满足大面积生成的需要。而采用组培育苗繁殖系数大、速度快,种苗质量优。

**第一作者简介:**雷霄飞(1979-),男,硕士,讲师,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:48729155@qq.com。

**基金项目:**湖北省教育厅资助项目(B20129002);武汉市教育局科研资助项目(2010087)。

**收稿日期:**2014-03-19

## Study on Isolation of Full-length cDNA of HCD from Leaf of *Prunus salicina* and Its Expression

ZHAO Li<sup>1,2</sup>, WANG Yu-zhen<sup>1,2</sup>, LV Shi-heng<sup>1</sup>, PAN Dong-ming<sup>1,2</sup>, JIANG Cui-cui<sup>3</sup>, CHEN Gui-xin<sup>1,2</sup>

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 3. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013)

**Abstract:** Taking five different growth period of *Prunus salicina*'s leaves as material, a clone named *PsHCD* was separated from cDNA library prepared of five different growth and development periods of leaf in the *Prunus salicina*. The biological information of *PsHCD* was analyzed and gene expression levels in five different growth periods of *Prunus salicina*'s leaves were tested using Real-time PCR. The results showed that the gene cDNA open reading frame coding regions for the 322<sup>th</sup> nucleotide to 987<sup>th</sup>, encoding a 221 amino acid proteins, with 321 bp in the 5'UTR and 156 bp in the 3'UTR. Using TMHMM server software to analysis, the gene encoding the protein had four transmembrane domains. *PsHCD* was localized in endoplasmic reticulum, micro-bodies and lysosomes by PSORT II Prediction software. The results of Real-time PCR showed that the *PsHCD* gene was gradually increasing with development of leaves, reached to maximum at stage of unfold leaves, was stable during spire to climax leaves, then decreased, reached to minimum at stage of old leaves.

**Key words:** *Prunus salicina*;  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydratase; full-length cDNA; expression analysis

因此,推动“神农”香菊组培育苗将有着广阔前景。但目前对“神农”香菊的研究较少,有关“神农”香菊组织培养的研究更少<sup>[5-6]</sup>,而以顶芽为外植体的快繁体系更鲜见报道。为此,该研究以“神农”香菊的顶芽为外植体,对芽的增殖和幼苗的生根进行了系统的研究,旨在建立高效的“神农”香菊快繁体系,为标准化和规模化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用“神农”香菊长势良好,没有病虫害植株的顶芽为外植体。

生长素:激动素(KT)、萘乙酸(NAA)、6-苄基氨基嘌呤(6-BA)、75%乙醇(Alcohol)、0.1%升汞(HgCl<sub>2</sub>)、2%次氯酸钠(NaClO<sub>3</sub>)。

### 1.2 试验方法

以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,通过改变激素种类、浓度,形成不同培养基组合,pH 5.8。光照时间 12 h/d,光照强度 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,温度(25±2)℃。

**1.2.1 试验材料的获取及消毒** 外植体用洗衣粉上清液加少许吐温浸泡并振荡 1 次,自来水冲洗 3 次,再用无菌水冲洗 2~3 次;在超净工作台上将预处理后的顶芽分别采用 75% Alcohol、0.1% HgCl<sub>2</sub>、2% NaClO<sub>3</sub> 3 种灭菌剂,进行不同灭菌剂的效果试验,具体组合见表 2。然后将经表面灭菌处理的试验材料,用无菌水冲洗 4 次,剥取顶芽,迅速接种于 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的启动培养基表面,10 d 后观察不同消毒剂种类及消毒方法的灭菌效果。

**1.2.2 芽增殖培养基的筛选** 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验设计,比较不同浓度的 6-BA、KT 和 NAA 对“神农”香菊芽增殖的影响,以 6-BA(A)、KT(B)、NAA(C)的浓度为考察变量,每个变量设 3 个水平,设置空列误差项(D),正交表由 SPSS 21.0 软件随机生成,具体见表 1。每个处理接种 7 瓶,每瓶 5 个外植体,接种后定期观察,统计各处理的芽增殖情况和芽高。

表 1 “神农”香菊顶芽增殖诱导培养的正交实验影响因素及水平

Table 1 Effect of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* bud proliferation induced by orthogonal test factors and levels

水平 Level	因素 Factor			
	A 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	B KT/mg · L <sup>-1</sup>	C NAA/mg · L <sup>-1</sup>	D 空白
1	0.1	0.1	0.1	1
2	0.3	0.5	0.3	2
3	0.7	1.0	0.5	3

**1.2.3 生根培养的筛选** 以 1/2MS 为基本培养基,将 2 cm 左右的幼苗(由顶芽增殖分化所得),分别接种于添加了不同质量浓度 NAA 的培养基上,每种配比处理中

有 5 个外植体,分放在 7 个培养瓶中。培养 45 d 后统计苗的长势、平均根长、平均根数及根粗细情况。

### 1.3 项目测定

顶芽增殖诱导培养 30 d,测定各处理的芽增殖系数、新芽高度,并分别进行赋值,每个指标总分 10 分,并分别给予 50% 的权重,芽增殖系数 50%、新芽高度 50%。最后计算各个处理总的评分。生根培养 45 d 后,记录每株小苗的生根条数、根长。

### 1.4 数据分析

用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析,并对结果进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒剂及灭菌方法的比较

由表 2 可以看出,用方案 3 和 4 消毒,灭菌效果较好,外植体的污染率低,但对外植体的损害也较强,获得的无菌材料存活率较低。方案 3 中使用乙醇进行表面消毒,且时间较长,外植体容易发褐而导致生长缓慢,可能是酒精毒害所致。因此在选择消毒剂时既要考虑能杀死附着在外植体表面的微生物,又要尽量不伤害组织细胞;方案 4 存活率低的原因可能是 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间过长,以致对植物材料造成毒害作用,影响顶芽的生命活力。用方案 1 消毒,存活率很高,但污染率也很高;而用方案 2 消毒,污染率很低,存活率很高。因此“神农”香菊顶芽的最佳消毒方案为 75% Alcohol 溶液中荡洗 30 s,无菌水荡洗后,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液荡洗 2 min,无菌水荡洗后,再用 2% NaClO<sub>3</sub> 溶液荡洗 8 min。

表 2 不同消毒剂对“神农”香菊顶芽消毒效果的比较

Table 2 Comparison of the disinfection effect of different disinfectants on *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* shoot tips

方案 Scheme	消毒剂及消毒时间 Disinfectants and the disinfection time/min			污染率 Contamination rate/%	存活率 Survival rate/%
	75% Alcohol	0.1% HgCl <sub>2</sub>	2% NaClO <sub>3</sub>		
1	0	4.0	8.0	11.0	76
2	30 s	2.0	8.0	4.5	82
3	45 s	4.0	8.0	0.0	47
4	0	14.0	0	2.1	71

### 2.2 不同浓度激素对“神农”香菊芽增殖的影响

从表 3 可知,综合芽增殖系数和新芽高 2 项指标,该试验中 C3 最适合“神农”香菊的芽增殖。其次是 C8,效果最差的是 C2。通过对顶芽增殖状态的评价分析,发现 C3 中增殖系数的得分为 8.36,低于 C8 的增殖系数的得分,但是新芽高得分是 6.66,高于 C8 的得分。说明 C3 中的分化组织的紧实程度比 C8 的好,但分化程度要比 C8 低,总的芽增殖状况 C3 最好。

表 3 不同处理下“神农”香菊顶芽增殖状况评价

Table 3 Evaluation of chrysanthemum bud proliferation of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* under different treatments

处理号 Serial number	接种数 Inoculation number	芽增殖/×50% Bud proliferation/×50%		新芽高/×50% New high/×50%		总平均值 Total average value
		增殖系数评分 Multiplication factor score	得分 Score	新芽高分 New high score	得分 Score	
C1	35	5.41	2.71	8.21	4.10	6.810
C2	35	8.21	4.11	3.37	1.68	5.790
C3	35	8.36	4.18	6.66	3.33	7.510
C4	35	7.62	3.81	5.48	2.74	6.550
C5	35	6.33	3.17	6.17	3.08	6.250
C6	35	7.01	3.51	6.57	3.28	6.790
C7	35	5.98	2.99	7.7	3.85	6.840
C8	35	8.56	4.28	6.08	3.04	7.320
C9	35	7.43	3.72	6.39	3.19	6.910

从表 4、表 5 中各因素的极差值可以得出,空白列(误差列)的极差最小,只有 0.06,因此可以初步判段各因素之间不存在显著的交互作用,并且正交实验是成功的。各试验因素对“神农”香菊芽增殖状况的影响程度顺序为 A>B>C,即 6-BA 是最主要的影响因素、影响最小的是 NAA。单因素统计结果显示,A、B、C 3 个因素的最好水平分别为 A3、B2、C2。综上分析得出,“神农”香菊的芽增殖的最适培养基为 MS+0.7 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+0.3 mg/L NAA。

表 4 不同处理下“神农”香菊芽增殖正交设计及总平均值

Table 4 Orthogonal design of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* shoot proliferation and total average value

处理号 Serial number	A	B	C	空白 Blank	总平均值 Total average value
C1	3.000	2.000	3.000	1.000	6.810
C2	1.000	3.000	3.000	2.000	5.790
C3	3.000	1.000	2.000	2.000	7.510
C4	2.000	3.000	2.000	1.000	6.550
C5	1.000	2.000	2.000	3.000	6.250
C6	3.000	3.000	1.000	3.000	6.790
C7	1.000	1.000	1.000	1.000	6.840
C8	2.000	1.000	3.000	3.000	7.320
C9	2.000	2.000	1.000	2.000	6.910

表 5 各因素对“神农”香菊芽增殖影响的正交实验结果极差分析

Table 5 Range analysis of the orthogonal experiment results and effects of various factors on *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* shoot proliferation

因素 Factor	K1	K2	K3	k1	k2	k3	R
A	18.88	20.78	21.11	6.29	6.93	7.04	0.75
B	18.88	20.38	19.92	6.29	6.79	6.64	0.50
C	19.88	20.31	19.92	6.63	6.77	6.64	0.14
D	20.2	20.21	20.36	6.73	6.74	6.79	0.06

由于极差分析只能判断各因素对试验指标影响的主次关系,但是不能区分某因素各水平所对应的试验结果、其差异性的来源以及各因素的作用是否显著。因此根据试验结果进行了主体间效应的分析( $\alpha=0.05$ )。由表 6 可知,6-BA 的质量浓度的显著值为 0.006,KT 的质量浓度的显著值为 0.005,对芽增殖具有非常显著性差异( $P<0.05$ ),而 NAA 的质量浓度的显著值为 0.076,对芽增殖不具有非常显著性差异。同时比较  $F$  值,影响芽增殖的大小顺序为 B>A>C。方差分析表明,6-BA 和 KT 对芽增殖的影响较大,NAA 的影响较小,这和极差分析的结果一致。

表 6 单变量多因素的方差分析

Table 6 Analysis of variance univariate variables

方差来源 Sources of variance	平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F	P
A	0.966	2	0.483	180.328	0.006
B	1.116	2	0.558	208.448	0.005
C	0.065	2	0.033	12.228	0.076
误差	0.005	2	0.003		

### 2.3 不同激素水平对“神农”香菊生根的影响

将芽增殖培养基上分化出的长势健壮的幼苗接种于不同浓度配比的生根培养基上,在根系生长的同时,部分幼芽继续生长,20 d 后,幼苗基部出现明显根系,45 d 后观察生长发育情况,并记录结果。从表 7 可知,生长素 NAA 对“神农”香菊根的诱导起着重要作用,在 NAA 的质量浓度很低培养基中,小苗的生根率只有 41.2%,非常的低,平均生根数 1.2,并且根非常短,平均根长 0.4 cm;当培养基中激素 NAA 的质量浓度逐步增加时,小苗的生根率、平均生根数和平均根长逐渐发生变化,在 NAA 的质量浓度达到 0.50 mg/L 时生根率为 98.7%,幼苗的平均根数为 3.4,平均根长为 2.8 cm,小苗根粗壮,植株翠绿挺拔,为最佳生根配方;随着 NAA 质量浓度的升高,生根率和平均生根数都明显下降,根长度迅速变短,根变成短粗的鸡爪状,这说明 NAA 浓度太大,抑制了植株不定根的生长发育。

### 3 讨论

以往对“神农”香菊组织培养方面的研究较少,目前只有一篇关于花蕾的组织培养的报道。该试验以分生能力较强的顶芽为外植体,对外植体的消毒和培养液中激素质量浓度上做了初步的探讨,以便找到一种简便、高效的快速繁殖技术,从而获得“神农”香菊优良的种苗。用顶芽作“神农”香菊组织培养的外植体既可保持种性,又减少了时间,是很好的外植体。

该研究并未利用常用的正交设计表设计试验,而是利用 SPSS 21.0 软件随机生成正交设计表,并以此设计试验,这样有利于试验数据的统计。极差值分析虽然可

表 7

不同质量浓度 NAA 对“神农”香菊生根的影响

Table 7 Effect of different concentrations of NAA on rooting of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*

处理号	NAA 质量浓度	平均生根数	生根率	平均根长	根的生长情况
Serial number	NAA mass concentration/mg · L <sup>-1</sup>	Average root/条 · 株 <sup>-1</sup>	The rooting rate of/%	The average root length/cm	Root growth
N1	0.01	1.2	41.2	0.4	略细,很短,长势不好,有较少根出现
N2	0.10	2.0	79.3	1.7	粗壮,较长,长势良好,有较多根出现
N3	0.50	3.4	98.7	2.8	略粗,较长,长势良好,有大量根出现
N4	1.00	1.9	100.0	2.0	一般,较长,长势一般,有大量根出现
N5	1.50	2.2	90.4	1.5	略粗,较短,长势良好,有较多根出现
N6	2.00	2.1	85.1	1.3	略粗,较短,长势一般,有较多根出现

以判断各因素对试验指标影响的主次关系,但是不能判断这些因素中,哪个是影响试验指标的关键因素,也不能提供一个标准,来判断各个因素作用是否显著<sup>[7]</sup>。因此该研究对试验结果进行了方差分析,来分析各因素的试验结果是否显著。

不同外植体的消毒灭菌时间要求不完全一致,叶片、萼片和花瓣的灭菌时间相对较短,茎段和侧芽的时间较长,但是乙醇、升汞灭菌时间过长会导致外植体褐变率的提高,所以选取几种不同的消毒剂组合使用,既可以减少对外植体的损害,又能适当缩短灭菌时间来控制褐变率。综合考虑,75% Alcohol 溶液中荡洗 30 s,无菌水荡洗后,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液荡洗 2 min,无菌水荡洗后,再用 2% NaClO<sub>3</sub> 溶液荡洗 8 min,为最佳消毒方案。

在多数植物组织培养中,离体细胞在开始阶段往往缺乏合成生长激素和细胞分裂素的能力,为此需要在培养介质中添加不同的外源激素,以诱导细胞分裂、分化以及形态发生。不同激素类型和浓度对芽增殖的影

响不同,该试验考察了 6-BA 配合不同浓度 KT、NAA 对于“神农”香菊芽增殖诱导的影响。结果表明,顶芽最适增殖培养基为 MS+0.7 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+0.3 mg/L NAA,生根的最适培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA。

### 参考文献

- [1] 谢超,黄龙,彤霖,等. 正交试验优选“神农”香菊挥发油提取条件[J]. 湖北农业科学,2011,50(21):4451-4453.
- [2] 刘启去,张红旗,贾卫疆. 湖北新资源植物“神农”香菊的地理分布、生态习性与蕴藏量的调查研究[J]. 武汉植物学研究,1983,1(2):239-245.
- [3] 卢金清,万威,徐玉婷,等. “神农”香菊化学成分研究[J]. 中药材,2009,32(1):53-55.
- [4] 田耀平,卢金清. “神农”香菊的研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(2):468.
- [5] 何森,董春艳,冯博,等. “神农”香菊组织培养和植株再生[J]. 东北林业大学学报,2010,38(7):64-66.
- [6] 孙明,张启翔. “神农”香菊花蕾的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):348.
- [7] 张福生,郭顺星. SPSS 正交设计在福建金线莲组织培养中的应用[J]. 中国中药杂志,2009,34(20):2581-2595.

## Optimization of Culture Conditions *in vitro* *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* Buds of Orthogonal Test

LEI Xiao-fei<sup>1</sup>, YANG Xue-ling<sup>2</sup>

(1. Editorial Office of Journal, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415; 2. Scientific Research Division, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

**Abstract:** Taking buds of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* introduced from Shennongjia of Hubei as the explants, the sterilizing effect was studied through different disinfectors and methods, by hormone combination test on sprout medium and rooting medium, rooting hormone ratio were studied to selected the best medium for rapid propagation of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* were studied. The results showed that the suitable disinfectant was 75% Alcohol 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 2 min+2% NaClO<sub>3</sub> 8 min; the suitable sprout medium was MS+0.7 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+0.3 mg/L NAA; the suitable rooting medium was 1/2 MS+0.5 mg/L NAA.

**Key words:** *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*; tissue culture; rapid propagation technique; orthogonal test