

# 杏香兔耳风叶外植体组培高效繁育体系建立

戴小英,于宏,江香梅\*

(江西省林业科学院省植物生物技术重点实验室,江西南昌 330032)

**摘要:**以杏香兔耳风无菌苗叶片、叶柄为外植体开展芽诱导试验。结果表明:在基本培养基 MS 附加 6-BA2.0 mg/L(单位下同)+NAA0.2+2,4-D0.1+糖 40g/L 的培养基上进行叶片外植体芽的诱导,在 6-BA2.0+NAA0.5+糖 30g/L 的培养基上进行叶柄外植体芽的诱导,是建立叶外植体组培高效繁育体系较理想的再生条件。

**关键词:**杏香兔耳风;叶片;叶柄;外植体;组织培养

分类号:Q813.12:S567.239

文献标识码:A

文章编号:1006-2505(2008)06-0023-02

杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ 为菊科兔耳风属植物,别名白走马胎,金边兔耳草,一枝香等<sup>[1]</sup>,全草可入药,主要有效药用成分有无羁萜酮、羊齿烯醇、三十二烷酸、二十六醇、 $\beta$ -谷甾醇<sup>[2]</sup>、倍半萜内酯、丁香烯、豆甾醇<sup>[3-4]</sup>、黄酮类<sup>[5-6]</sup>、绿原酸<sup>[7]</sup>等。可用于治疗湿热下注所致慢性宫颈炎、子宫内膜炎、阴道炎、白带等症。还可治疗咽喉炎,口腔炎,鼻炎及气管炎等粘膜组织炎症,上呼吸道感染、肺结核咳血等,外用可医治中耳炎及毒蛇咬伤等。还能清肺解毒,消积散结,药用价值高。然而,随着其药用价值的被广泛认知,原料药材使用量大量增加,而该植物的原料药材至今为止仍以野生资源为主,且药材又是整株采集,采集时间又是在植株开花、结实之前的 8~10 月,致使野生资源无法实现世代更替而导致资源锐减,天然资源储量已近枯竭的边缘。本研究旨在建立叶外植体组培高效繁育体系,达到规模化培育的目的。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料取自本实验室杏香兔耳风组培试验苗。从茎外植体建立的无菌苗上,剪取中下部叶为外植体,并将叶片和叶柄分别进行诱导培养。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 叶片、叶柄外植体芽诱导培养基配制及培养条件

培养基:MS+6-BA0.5~5.0+NAA0.05~0.5+2,4-D0.0~1.0+糖 20~50g/L

卡拉胶 7 g/L,pH 值为 5.6

培养温度:23℃±2℃

光照强度:1 500 lx

光照时间:10h/d

1.2.2 外植体处理。在以茎为外植体建立的无菌系基础上,进一步以继代过程中须剪除的叶为外植体,建立叶片和叶柄组

培高效繁育体系。具体操作步骤如下:

在超净工作台上,从无菌苗上剪取中下部叶片。剪去叶片边缘后,再剪成 1cm<sup>2</sup> 大小的叶盘(叶片中部带主脉)作为叶片外植体,叶背面朝下平放于诱导培养基表面;另将叶柄从叶片基部剪下,长 0.5~1cm,平放于诱导培养基表面。

1.2.3 试验设计。以 MS 为基本培养基,对叶片和叶柄外植体诱导培养基中激素种类 6-BA、NAA、2,4-D 及其浓度,糖含量等因素,采用正交试验设计 L16(4<sup>4</sup>)进行优化筛选试验,以期筛选出最佳诱导培养基。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 以叶片为外植体的诱导培养基筛选

采用 L16(4<sup>4</sup>)正交试验设计,将激素种类、浓度、配比及糖含量设计了 16 种试验处理对叶片外植体进行芽诱导试验。结果表明,以叶片为外植体诱导芽发生的途径是:叶片→愈伤组织→不定芽→植株。由表 1 可见,试验处理 11 对叶片外植体诱导效果最好,诱导率达 82.5%;其次是试验处理 15 和 1,诱导率分别为 67.5%和 62.5%。

方差分析结果(表 2)进一步表明,糖含量在叶片外植体不定芽诱导中起主导作用,处理间差异达到极显著水平。添加 40 g/L 糖的培养基均诱导出了不定芽,最高达 82.5%;添加 20 g/L 糖的培养基只有处理 13 诱导出了芽;而添加 50 g/L 糖的培养基则均未诱导出不定芽。可见,糖浓度过高或过低都会抑制不定芽产生。

6-BA 浓度在 0.5~5.0 mg/L 范围内均能诱导出不定芽,且叶片外植体芽诱导率和不定芽发生率随 6-BA 浓度增加呈由低到高再由高到低的曲线分布。当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,诱导效果最好,不仅外植体诱导率最高(达 82.5%),诱导的不定芽数量也多,分化培养的苗生长也健壮。而当 6-BA 浓度过低(0.5 mg/L)或过高(为 5 mg/L)时,诱导效果均不理

收稿日期:2008-10-10

基金项目:江西省财政厅重大科研及成果推广专项“杏香兔耳风等森林中药材 GAP 种植技术及产业化开发”的研究内容。

作者简介:戴小英,女,工程师,从事植物组培繁育等研究。

\*通讯作者

想,诱导出的不定芽生长细弱,且分化培养出的苗玻化现象严重。

表 1 激素种类、浓度、糖含量及其配比对叶片和叶柄外植体芽诱导结果

试验处理	6-BA mg/L	NAA mg/L	2,4-D mg/L	糖浓度 g/L	接种数	叶片诱导率%	叶柄诱导率%
1	1(0.5)	1(0.05)	4(1.0)	3(40)	40	62.5	0
2	2(1.0)	1	1(0.0)	1(20)	40	0	0
3	3(2.0)	1	3(0.5)	4(50)	40	0	0
4	4(5.0)	1	2(0.1)	2(30)	40	0	0
5	1	2(0.1)	3	2	40	0	0
6	2	2	2	4	40	0	0
7	3	2	4	1	40	0	0
8	4	2	1	3	40	60	0
9	1	3(0.2)	1	4	40	0	0
10	2(1.0)	3(0.2)	4(1.0)	2(30)	40	0	40
11	3(2.0)	3(0.2)	2(0.1)	3(40)	40	82.5	0
12	4	3	3	1	40	0	0
13	1	4(0.5)	2	1	40	25	0
14	2	4	3	3	40	15	0
15	3(2.0)	4(0.5)	1(0)	2(30)	40	67.5	25
16	4	4	4	4	40	0	0

而未添加 2,4-D 的培养基,叶片外植体边缘通常产生深绿色、致密的愈伤组织,难以诱导出不定芽。低浓度 2,4-D(0.1mg/L)有利于不定芽的诱导,诱导率达 82.5%,且有效芽多,植株长势旺盛;高浓度 2,4-D(0.5mg/L 以上)反而不利于叶片外植体芽的诱导,有效芽少,玻化现象严重,诱导率下降。

在影响叶片外植体芽诱导效果的因素中,各试验因素的配比及其相互作用才是最终决定因素。本试验结果表明,试验处理 11(MS+BA2.0+NAA0.2+2,4-D0.1+糖 40)是叶片外植体芽诱导的最佳组合,不定芽诱导率高达 82.5%,且有效芽多,分化培养后植株长势旺盛,继代培养后增殖效果好。其次是试验处理 15(MS+BA2.0+NAA0.5+糖 30),所诱导的愈伤组织深绿色,结构紧密,诱导率达 67.5%,但分化培养后植株长势一般,叶片发黄。

综合评价认为,试验处理 11 是本试验叶片外植体诱导最佳试验组合,不仅诱导率高,而且不定芽长势良好(图 1)。

表 2 叶片外植体芽诱导结果方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F
6-BA	1324.063	3	441.3542	1.405402	$F_{0.05}(3,15)=3.29$
NAA	537.6151	3	179.205	0.570641	$F_{0.01}(3,15)=5.42$
2,4-D	1119.023	3	373.0076	1.187766	
糖浓度	5343.1	3	1781.033	5.671333**	
误差	942.1241	3	314.0414		
总和	9265.924	15			



图 1 叶片外植体诱导建立的组培再生体系

## 2.2 以叶柄为外植体的诱导培养基筛选

将处理好的叶柄外植体置于叶片外植体诱导培养基上进行芽诱导试验,结果表明:叶柄外植体诱导芽发生的途径与叶片一致,即叶片→愈伤组织→不定芽→植株。但在相同诱导培养条件下,叶柄外植体诱导难度较大,诱导率较低,本试验只有处理 10 和 15 诱导产生了不定芽,诱导率只有 40%和 25%(表 1),且只有后者诱导出的不定芽在继代培养后长势良好。

方差分析结果(表 3)表明,糖浓度仍是影响叶柄外植体诱导的主导因素,达 0.1 的显著性水平,且仅在糖含量为 30g/L 的培养基上诱导产生了不定芽。

6-BA、NAA、2,4-D 对芽诱导均有一定的影响,但都未达到显著水平。

表 3 叶柄外植体芽诱导结果方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F
6-BA	310.1987	3	103.3996	1	$F_{0.05}(3,15)=3.29$
NAA	310.1987	3	103.3996	1	$F_{0.01}(3,15)=5.42$
2,4-D	310.1987	3	103.3996	1	$F_{0.10}(3,15)=2.49$
糖浓度	898.6487	3	299.5496	2.89701*	
误差	310.1987	3	103.3996	1	
总和	2139.443	15			

## 3 小结

本试验在以茎为外植体建立的无菌系<sup>[7]</sup>基础上,进一步以继代过程中须剪除的叶为外植体进行诱导培养试验,分别筛选出了叶片外植体和叶柄外植体诱导优化培养基,在无菌苗基数不大的情况下,为快速建立杏香兔耳风组培高效繁育体系并进行规模化培育奠定了良好的物质和技术基础,同时开辟了新的繁殖途径。

## 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志·第七十九卷[M].北京科学出版社,1996:31-33.
- [2] 胡昌奇,王朴,姚辉农.杏香兔耳风的化学成分研究(I)[J].中草药,1983,14(11):486.

(下转第 27 页)

# Anatomy on Roots Development for Tissue Cultural Plantlets of *Ainsliaea fragrans*

YU Hong, DAI Xiaoying, JIANG Xiangmei\*

(Jiangxi Provincial Bio-tech Key Lab for Plant, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang Jiangxi 330032, China)

**Abstract:** Taking different plants of the same clones of tissue culture rooted seedlings of *Ainsliaea fragrans* as test materials. With continuous collecting material a time for each day, the root development process in vitro was observed and analyzed systematically by micro-anatomizing in *Ainsliaea fragrans* in this paper. The results showed that the primordial for the adventitious root in vitro was originated in the pith ray cells, the development process of the adventitious root could be divided into three stages, just as the pith ray meristematic cells differentiation stage, the primordial root formation stage and the adventitious root formation stage; it needed about 13 days for a cycle. This research can provide a foundation for optimizing the rooting culture conditions in vitro of *A. fragrans*.

**Key words:** *Ainsliaea fragrans*; Tissue culture; Primordial rooting; Adventitious root; Anatomy

(上接第 24 页)

[3] 中华本草编委会. 中华本草·第 7 册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999:641.

[4] 江西省卫生厅. 江西省中药材标准 1996 年版[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1997:122.

[5] 宋友昕, 吕武清. 高效液相色谱法测定杏香兔耳风药材中绿原酸含

量[J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(2):36-37.

[6] 蒋俊毅, 曹凯, 吴德康, 等. 紫外分光光度法测定杏香兔耳制剂中总黄酮含量[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(3):178-179.

[7] 江香梅, 戴小英, 黄丽莉. 杏香兔耳风组培快繁技术[J]. 江西林业科技, 2006(5):24-26.

# Construction on Efficient Regeneration System with Explants of *Ainsliaea fragrans* Leaves

DAI Xiaoying, YU Hong, JIANG Xiangmei\*

(Jiangxi Provincial Bio-tech Key Lab for Plant, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang Jiangxi 330032, China)

**Abstract:** With leave and petioles as explants, the regeneration system for the buds inducing in *Ainsliaea fragrans* was constructed in this paper. The tested results demonstrated that the optimization medium for the buds inducing from leave was MS+6-BA2.0mg/L(the same as follows)+NAA0.2+2,4-D0.1+Sugar 40g/L, the buds inducing medium from petioles was 6-BA2.0+NAA0.5+Sugar30g/L, which was the ideal conditions of constructing efficient tissue regeneration system with leaf explants.

**Key words:** *Ainsliaea fragrans*; Leaf; Petiole; Explant; Tissue culture