

杏香兔耳风组培快繁技术

江香梅¹,戴小英¹,黄丽莉¹,于宏¹,曹正洪²,吴九妹²

(1.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;2.江西天佑药业有限公司,江西南昌 330032)

摘要:以杏香兔耳风根颈以上部位作为外植体,采用组织培养技术,对其进行芽的诱导、丛生芽增殖、试管苗生根及试管苗野外移栽技术等作了较系统研究。结果表明:基本培养基 MS 附加 6-BA2.0mg/L(单位下同)+NAA0.5 的培养基上进行芽的诱导,在 6-BA1.0+NAA0.5 的培养基上进行增殖培养,并在 1/2MS+NAA0.3 的培养基中进行生根培养,是较理想的组培再生条件,增殖系数为 5,生根率达 99.8%,平均每株苗木的根系数量达 10 以上,组培苗移栽成活率达 96.6%。

关键词:杏香兔耳风;组织培养

分类号: S567.23

文献标识码: A

文章编号: 1006-2505(2006)05-0024-03

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^[1,2],天然分布于长江以南的丘陵、山地阴湿林下。全草可入药,能清肺解毒,消积散结,用于治疗上呼吸道感染、肺结核咳血等,外用可医治中耳炎及毒蛇咬伤等^[3-5],药用价值高。但该植物的原料药材至今为止仍以野生资源为主,而且是整株采集,且采集时间是在植株开花、结实之前的 9、10 月份,致使野生资源无法实现世代更替而导致资源锐减。本研究以解决企业原料需求为目的,筛选出了杏香兔耳风组培快繁的优化条件,从而为杏香兔耳风规模化培育提供了一条快捷有效的繁殖途径。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

以野生杏香兔耳风地上部分为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件。1)培养基:①芽诱导:MS+6-BA0.5~2.0+NAA0.1~0.5;②增殖培养:MS+6-BA0.0~5.0+NAA0.1~0.5;③生根培养:1/2MS+NAA0.0~0.5 和 MS+NAA0.0~0.5。以上培养基均加糖 30g/L,卡拉胶 7g/L,pH 值为 5.6。2)培养温度:23℃±2℃;3)光照条件:1500 lx,光照时间 10h/d。

1.2.2 无菌系的建立。将野外采回的杏香兔耳风植株剪去叶片及根系,留取根颈部及其以上部位,用毛刷洗去外表泥土,在加有适量洗洁精的水液中刷洗后,置流水中冲洗 1~2h,置超净工作台上用 75%酒精灭菌 40s 后,再用 0.1%的 HgCl₂ 灭菌 4~6min,无菌水冲洗 5~6 遍后,将外植体接入培养基①中。在其后 20 天左右的培养时间内,外植体的

叶腋处先后长出白毛状小芽点、小芽点发育长成小枝,将未污染的小枝继代到培养基②中进行继代增殖培养。这种无菌小枝即为建立无菌系的基础材料。

2 试验结果与分析

2.1 诱导培养基筛选

本研究在第①类培养基中设计了 3 种培养基对杏香兔耳风进行芽诱导试验。结果表明,培养基 MS+6-BA2.0+NAA0.5 对杏香兔耳风的诱导效果最好,7 天后每个外植体的叶腋处即有 2~3 个白毛状小芽点长出,外植体诱导率 95%以上;继续发育至 15 天左右时,叶片开始展开,20 天左右时小枝已基本形成。培养基 MS+6-BA1.0+NAA0.5 则要 15 天以上才能诱导出芽,且出芽数通常只有 1~2 个,有的外植体上还不能诱导出芽,外植体诱导率只有 68%左右。培养基 MS+6-BA0.5+NAA0.1 则基本不能诱导出芽。

2.2 增殖培养条件的优化

杏香兔耳风增殖方式有芽生芽和丛生芽两种分化途径。将所获得的无菌材料继代到第②类培养基上进行增殖和分化培养试验,以期筛选出较理想的增殖培养条件。

2.2.1 细胞分裂素 6-BA 浓度对增殖培养的影响。在无菌系建立过程中,已对杏香兔耳风增殖培养条件进行了初步筛选,因此,在进一步设计细胞分裂素 6-BA 浓度对增殖培养的影响试验时,以初步筛选的较适宜的 NAA 浓度 0.5mg/L 为固定值,以 0,0.5,1,2,3,5 共 6 种 6-BA 浓度分别与之配比进行增殖培养试验并进行植株生长观测。结果(表 1)表明,随着 6-BA 浓度的提高,腋芽、不定芽的增殖系数呈上升趋势。但当 6-BA 浓度大于 2mg/L 时,增殖系

收稿日期:2006-08-16

作者简介:江香梅,女,江西省林业科学院研究员,主要从事林木遗传育种与资源培育研究。E-mail:xiangmeijiang@yahoo.com.cn

数虽然达到 5 以上(高者可达 6 以上),但植株茎干细弱成丝状,叶卷曲,畸形,叶片边缘呈水渍状,苗木玻璃化现象比较严重,有效苗明显减少。而在不添加 6-BA 的基本培养基 MS 上,基本不增殖;6-BA 浓度为 0.5mg/L 时,增殖系数和分化率均较高,分别为 2.98 和 83%,苗木生长也正

常。当 6-BA 浓度提高到 1.0mg/L 时,增殖系数(4.82)和分化率(100%)都是一个飞跃(表 1),植株也呈理想的生长状态。综合比较的结果,认为 6-BA 浓度为 1.0mg/L 时,最适宜杏香兔耳风的增殖培养和苗木生长。培养周期一般为 25 天左右。

表 1 6-BA 浓度对增殖培养的影响结果

6-BA 浓度(mg/L)	分化率(%)	增殖系数	植株生长情况
0	0	1	叶大芽少、苗粗壮
0.5	83	2.98	叶大芽少、苗粗壮
1.0	100	4.82	叶大苗粗壮,生长正常
2.0	100	4.93	叶一般、苗粗壮
3.0	100	5.05	叶小芽多,茎较细弱,叶卷曲,畸形,苗稍水渍状
5.0	100	5.3	叶小芽多,茎细弱,叶卷曲,畸形,苗多水渍状

2.2.2 细胞分裂素种类及其比对增殖培养的影响。本试验采用 6-BA、KT 和 ZT 3 种细胞分裂素的不同配比对杏香兔耳风增殖培养的影响进行试验,结果见表 2。

表 2 3 种细胞分裂素及其比对增殖培养的影响

培养基	植物生长调节剂				分化率%	增殖系数	瓶苗生长情况
	6-BA	KT	ZT	NAA			
1	0.5				73.7	2.50	芽少、叶一般、苗粗
2			0.5	0.5	74.6	2.64	芽少、叶一般、苗粗
3	1.0	0.5		0.5	100	4.75	芽多、叶大、苗粗
4	1.0		0.5	0.5	100	4.82	芽多、叶大、苗粗
5		0.5	0.5	0.5	83.5	3.15	芽少、叶一般、苗粗

从表 2 中可以看出,在 0.5mg/L 浓度时,KT 和 ZT 单独作用的结果(培养基 1 和 2)近似,分化率分别为 73.7% 和 74.6%,增殖系数分别为 2.50 和 2.64;同样浓度两种激素共同作用的结果(培养基 5),分化率和增殖系数有所提高,但也只有 83.5% 和 3.15。而 6-BA 分别与 KT 和 ZT 作用(培养基 3 和 4),都达到了较好的增殖效果,其结果与表 1 中 6-BA 单独作用的结果近似。说明 6-BA 在杏香兔耳风增殖培养过程中单独使用即可达到理想的增殖效果,可以不添加 KT、ZT 等细胞分裂素辅助。

2.3 不同光照强度对杏香兔耳风增殖培养的影响

在杏香兔耳风增殖培养过程中,光照强度对组培苗的生长影响较大。当光照强度为 1000 lx 时,基部以上 2/3 的叶片出现畸形,叶片及茎干均呈水渍状,玻璃化现象严重,致使瓶中有效苗大量减少,不足 30%;当光照强度达

1500~2000 lx 时,苗木玻璃化现象明显减少,茎干粗壮,有效苗率可达 95% 以上。当光照强度大于 2000 lx 时,苗木叶片子向背面反卷,不能正常伸展,芽分化多而小,茎干细弱。因此认为,在杏香兔耳风增殖培养过程中,光照强度以 1500~2000 lx 为宜。

2.4 根系的诱导和植株再生

将在增殖培养基上生长健壮、高 3cm 左右的无根植株切下转入第③类(基本培养基为 1/2MS)和第④类(基本

表 3 基本培养基和生长素种类对生根的影响

培养基	生根率(%)	发根时间(d)	根系数量(根)	平均根系数
1/2MS	89.9	10~14	8~16	13
1/2MS+NAA0.3	99.8	7~11	11~20	15.6
1/2MS+IBA0.3	92	10~15	9~15	14.5
1/2MS+IAA0.3	91.8	9~15	8~15	14.3
MS ₀	93	11~15	10~17	13.8
MS ₀ +NAA0.3	94.7	11~15	11~17	13.7
MS ₀ + IBA0.3	92.6	11~15	11~16	13.6
MS ₀ + IAA0.3	91.5	11~15	10~19	14.1

培养基为 MS)培养基上诱导生根。本试验共设计了 8 种生根培养基进行生根试验(见表 3)。

由表 3 可看出,基本培养基种类对开始发根时间有较大影响。以 1/2MS 为基本培养基,开始生根时间在第 8~10 天,而以 MS 为基本培养基,则均在第 11 天才开始生根,前者比后者提早 1~3 天生根,说明贫营养培养可使杏香兔耳风提早生根。



图 1 杏香兔耳风增殖和分化培养

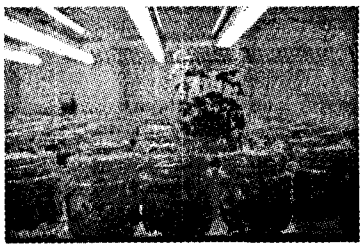


图 2 杏香兔耳风组培苗生根

其次,在可比条件下,相等浓度的不同生长素对杏香兔耳风生根的作用强度不同,其规律是 $NAA > IBA > IAA$; $1/2MS$ 与 $NAA0.3$ 配比的作用效果又比 MS 与 $NAA0.3$ 配比的作用效果强,前者 7 天左右可以看出基部有白点突出,10 天即可长出 10 多条长约 1cm 左右的白色根系,生根率可达 99.8%,生根整齐,同步性强,根系多达 20 条,而后的生根时间则推迟 3~4 天,生根率低约 5 个百分点,平均根系数量也少,约 2 根。此外,以 MS 为基本培养基的 4 种生根培养基所诱导的根系均会发生卷曲。综上试验结果,认为 $1/2MS+NAA0.3$ 是杏香兔耳风生根较理想的培养基。



左图:杏香兔耳风组培大田移栽苗



右图:组培容器移栽苗

图 3 杏香兔耳风组培苗移栽

3 讨论

1)杏香兔耳风是一种重要药用植物,全株均可入药,具有很高的药用和经济价值。但迄今为止,这种药用植物的原料药材还是以采集野生资源为主。由于原料药材的采集时间通常是在 8-9 月份生物量最大的时候,而这时的杏香兔耳风尚未开花、结实,因而,若毫无计划地乱采滥挖,势必导致无种下地,继而导致野生资源枯竭。近年来由于原料药材用量的大量增加,野生资源几近枯竭的边缘。大力培育人工资源才是解决杏香兔耳风原料药材短缺的根本出路。而有关杏香兔耳风人工繁殖和资源培育方面的研究,目前国内外还是空白。

2)杏香兔耳风为多年生宿根草本植物,世代周期为一年。但其开花时间一般在 9-10 月,种子成熟时间为 12 月至次年的 1 月,且种子极小,又有种翅,极易被风吹散而难于

2.5 组培苗的移栽

无根小植株在生根培养基上培养 10 天后即长成完整的小植株,在散射光下炼苗 2~3 天,即可把生根苗取出进行移栽。本研究设计了两种移栽方式对杏香兔耳风组培苗移栽成活率的影响试验。①移栽基质为泥炭土:珍珠岩=5:1,在阴棚中采用营养袋移栽育苗,根据需要适时浇水;②在松林下开出苗圃地作为移栽床,灭菌后将组培苗移栽到苗床上,浇透水后用农用薄膜覆盖 1 个月左右再揭去。结果表明,两种移栽方式的移栽成活率都很高,平均移栽成活率可达 96.6%。

收集。分苑繁殖的繁殖系数又很低,不易形成规模化生产。本研究首次采用组培繁殖技术解决了其繁殖技术难题,为其快速高效繁殖开辟了有效途径,可为规模化生产提供技术支持,在满足生产企业原料需求的同时,还可以有效保护该植物的野生资源,从而达到可持续利用的目的。

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]李以镛.江西野生观赏植物[M].北京:中国林业出版社,1995.
- [3]胡吕奇,王朴.杏香兔耳风的成分研究(I)[J].中草药,1983,14(11):486.
- [4]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.
- [5]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.

Tissue Cultural Techniques in *Ainsliaea fragrans*

JIANG Xiangmei¹, DAI Xiaoying¹, HUANG Lili¹, YU Hong¹, CHAO Zhenghong², WU Jiumei²

(1. Jiangxi Provincial Bio-tech Key Lab for Plant, Nanchang Jiangxi 330032, China;

2. Jiangxi Tianyou Medical Co. LTD, Nanchang Jiangxi 330032, China)

Abstract: There are tested on the buds inducing, the buds regenerating and the shoots rooting of *Ainsliaea fragrans*. The results demonstrated that the best medium for culture is $MS+6-BA2.0mg/L$ (the unit as same as follows)+ $NAA0.5$, $MS+6-BA1.0+NAA0.5$ and $1/2MS+NAA0.3$, respectively. And the coefficient of regenerating is about 5, the rooting rate reached 99.8%, and the amount of root is above 10. Meanwhile, the survival rate for tissue cultural seedling transplanting is 96.6%.

Key words: *Ainsliaea fragrans*; Tissue culture; Technique