

李小泉, 韦坤华, 王 艳, 等. 地枫皮组织培养获得再生植株的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 87–89.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.024

# 地枫皮组织培养获得再生植株的研究

李小泉<sup>1</sup>, 韦坤华<sup>2</sup>, 王 艳<sup>1</sup>, 石云平<sup>1</sup>, 李林轩<sup>2</sup>

(1. 广西农业科学院生物技术研究所, 广西南宁 530007;

2. 广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023)

**摘要:**采用组织培养快繁技术培养地枫皮种苗, 为人工栽培提供优良地枫皮种苗。以地枫皮的茎段、顶芽作为外植体, 用不同的培养基进行诱导培养获得丛生芽, 进而生根获得再生植株。结果表明, 地枫皮初代诱导较好的培养基为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; 培养基 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 0.3 mg/L NAA 较有利于丛生芽继代增殖, 增殖系数为 3.2; 培养基 1/2MS + 1.0 mg/L IAA 较适宜诱导地枫皮无菌芽的生根; 在适宜的基质上移栽, 地枫皮种苗成活率为 70%。得出的方法具有不受季节和地点限制、繁殖系数较高等优点, 随着研究不断深入, 技术不断完善, 将为地枫皮种苗繁育提供技术支持。

**关键词:**地枫皮; 组织培养; 丛生芽; 生根

**中图分类号:**Q943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0087-03

地枫(*Illicium difengpi* K. I. B. et K. I. M.) 别称钻地风、追地风、山八角, 地枫皮为其干燥树皮, 为木兰科八角属珍稀濒危药用植物<sup>[1]</sup>。地枫皮主要分布于广西靖西、天峨、都安、马山、龙州等县的岩溶石山山顶, 为广西的特有中药材<sup>[2-3]</sup>, 其茎皮、根皮具有祛风除湿、行气止痛等功效, 常用于治疗风湿痹痛、气滞腹痛、妇人经期腹痛等症状, 治疗效果好, 药用价值高, 为多种中成药的主要原材料<sup>[4]</sup>。地枫皮生境分布范围狭窄, 生长缓慢, 且药用部位为茎皮与根皮, 因此采收后植株也无法成活。目前地枫皮药用资源来源于野生自然资源, 由于地枫皮种子皮较薄, 干燥时种子的油脂会变质, 过湿时又容易腐烂, 极易丧失发芽能力, 加上其生长所需的石灰岩土壤稀少, 无法为地枫皮种子的萌芽提供适宜的环境, 造成地枫皮繁殖能力弱。随着地枫皮药用需求量不断增加, 野生自然资源不断减少, 在很多地区濒临灭绝或已绝迹, 1999 年地枫皮被批准为国家Ⅱ级重点保护野生植物<sup>[1]</sup>。目前对地枫皮的研究主要集中在资源调查<sup>[3]</sup>、真伪鉴别<sup>[5]</sup>、分子标记<sup>[6]</sup>、化学成分<sup>[7]</sup>、药理作用<sup>[8]</sup>等方面, 在种苗培育方面还未见报道。因此, 本研究通过对地枫皮进行组织培养研究, 以期地为地枫皮人工栽培提供大量优良种苗, 对于保护地枫皮野生种质资源和维护生态系统多样性具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

收稿日期: 2015-03-09

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划(编号: 桂科合 14125008-2-21); 广西医疗卫生重点科研课题(编号: 重 2012115、重 200908); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(编号: GZBZ14-14); 广西自然科学基金重点项目(编号: 2011GXNSFD018037)。

作者简介: 李小泉(1968—), 男, 广西全州人, 硕士, 副研究员, 从事植物组织培养研究。E-mail: 1941243276@qq.com。

通信作者: 李林轩, 助理研究员, 从事中药资源保护与开发利用研究。

E-mail: starry1125@sina.com。

采集广西药用植物园大棚内盆栽的地枫皮, 剪取健壮无病虫害植株的茎段、顶芽为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体灭菌及培养条件** 将地枫皮茎段、顶芽用洗洁精水浸泡 10 min, 用清水冲洗 15 min, 滤干水后在超净工作台用 75% 乙醇浸泡 30 s, 用无菌水清洗 1 次; 在 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液中浸泡 5~12 min, 用无菌水冲洗 3 次, 每次浸洗 3 min, 用无菌滤纸吸干外植体表面水分后, 接种于诱导培养基中。培养条件为培养温度(25±3)℃、光照时间 12 h/d、光照度 1 500~2 000 lx。培养基中含 2% 蔗糖、5% 琼脂, pH 值 5.8~6.2。

**1.2.2 初代诱导培养基筛选** 初代诱导以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的植物生长调节剂, 诱导培养基分别为: 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA(A<sub>1</sub> 处理)、1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA(A<sub>2</sub> 处理)、1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA(A<sub>3</sub> 处理)、2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA(A<sub>4</sub> 处理)。最佳基本培养基的筛选: 将诱导得到的无菌芽分别接入上述试验中获得的最佳生长调节剂组合的 MS、B<sub>5</sub>、N<sub>68</sub>、VW、N<sub>6</sub>、ER 基本培养基中, 观察其生长状况。

**1.2.3 继代增殖培养** 以初代诱导培养试验为基础, 考察植物生长调节剂对地枫皮丛生芽的影响, 设计激素种类和浓度组合为: 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA(B<sub>1</sub> 处理)、2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 0.3 mg/L NAA(B<sub>2</sub> 处理)、1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L ZT + 0.1 mg/L NAA(B<sub>3</sub> 处理)、2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L ZT + 0.1 mg/L NAA(B<sub>4</sub> 处理)。

**1.2.4 生根培养** 生根培养基: 1/2MS + 1.0 mg/L NAA(C<sub>1</sub> 处理)、1/2MS + 1.0 mg/L IBA(C<sub>2</sub> 处理)、1/2MS + 1.0 mg/L IAA(C<sub>3</sub> 处理)。

### 1.3 计算公式

相关计算公式如下:

污染率 = 污染外植体数/接种数 × 100%; (1)

死亡数 = 死亡外植体数 / 总外植体数 × 100% ; (2)

诱导率 = 出芽外植体数 / 总外植体数 × 100% ; (3)

增殖系数 = 增殖芽数 / 接种数 ; (4)

诱导率 = 出芽数 / 接种数 × 100% 。 (5)

2 结果与分析

2.1 灭菌时间筛选

分别设 5、8、10、12 min 4 个灭菌时间进行试验,外植体接入初代诱导培养基中培养 10~15 d,记录污染的外植体数,统计污染率。30 d 时分别记录死亡的外植体数,统计死亡率、成功率。由统计结果可以看出,在不同灭菌时间里,地枫皮的茎段、顶芽的污染率、死亡率均有差异,其中顶芽灭菌 8 min 时效果最好,污染率仅为 20%,死亡率为 0;而茎段的灭菌时间以 10 min 效果最好,污染率为 30%,无死亡(表 1、表 2)。

表 1 0.1% HgCl<sub>2</sub> 不同消毒时间对地枫皮顶芽灭菌效果的影响

消毒时间 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	污染率 (%)	死亡率 (%)	成功率 (%)
5	10	4	0	40	0	60
8	10	2	0	20	0	80
10	10	0	3	0	30	70
12	10	0	4	0	40	60

表 2 0.1% HgCl<sub>2</sub> 不同消毒时间对地枫皮茎段灭菌效果的影响

消毒时间 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	污染率 (%)	死亡率 (%)	成功率 (%)
5	10	6	0	60	0	40
8	10	4	0	40	0	60
10	10	3	0	30	0	70
12	10	0	4	0	40	60

2.2 初代诱导培养基筛选

外植体培养 10~15 d 时,顶芽、腋芽开始萌动,长出小芽(萌芽情况见图 1、图 2)。A<sub>3</sub> 培养基中的萌芽率最高,顶芽诱导为 100%,茎段诱导率达到 90%;因此,初代诱导最佳培养基为 1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA(表 3)。

将初代培养中诱导出来的芽接入附加 1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的 MS、B<sub>5</sub>、N<sub>68</sub>、VW、N<sub>6</sub>、ER 培养基中培养。由于不同基本培养基中元素的种类和浓度均有所不同,培养 30 d 时,在不同培养基中芽的长势、芽数均有很大区别,其中 MS 培养基中的芽壮且数目较多,而在 VW 培养基中的芽细且数量少。不同培养基中芽的长势从壮到弱顺序为:MS>ER>B<sub>5</sub>>N<sub>6</sub>>N<sub>68</sub>>VW。

2.3 植物生长调节剂对地枫皮继代增殖的影响

将初代诱导得到的健壮单芽接入附加 6-BA、KT、ZT、NAA 浓度组合的 MS 培养基上培养,12 d 后形成丛生芽,30 d 后统计各培养基中的芽数、增殖系数,观察芽的长势。从表 4 可以看出,培养基 B<sub>2</sub> 对地枫皮增殖作用比较好,增殖系数为 3.2。因此,地枫皮继代增殖最佳培养基为 2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/LKT+0.3 mg/L NAA。

2.4 生长素对地枫皮组培苗生根的影响

地枫皮增殖芽长至 2~3 cm 高时,切分成单芽,接入 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub> 处理 3 种生根培养基中培养,在 C<sub>1</sub> 处理培养基中无菌芽基部膨大,形成大量愈伤组织;在 C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub> 处理培养基中均能

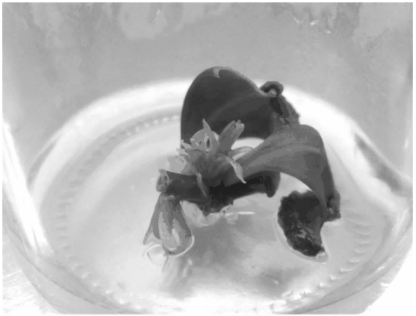


图 1 茎段腋芽诱导情况

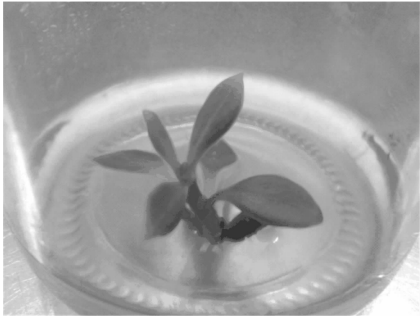


图 2 顶芽诱导情况

表 3 不同外植体诱导率

外植体种类	培养基编号	接种数 (个)	出芽外植体数 (个)	诱导率 (%)
顶芽	A <sub>1</sub>	10	5	50
	A <sub>2</sub>	10	7	70
	A <sub>3</sub>	10	10	100
	A <sub>4</sub>	10	8	80
茎段	A <sub>1</sub>	10	4	40
	A <sub>2</sub>	10	6	60
	A <sub>3</sub>	10	9	90
	A <sub>4</sub>	10	8	80

表 4 植物生长调节剂对地枫皮继代增殖的影响

培养基编号	接种数 (个)	增殖芽数 (个)	增殖系数	芽的长势
B <sub>1</sub>	10	24	2.4	较粗壮,叶为绿色
B <sub>2</sub>	10	32	3.2	较粗壮,叶色翠绿
B <sub>3</sub>	10	22	2.2	粗壮,叶色翠绿
B <sub>4</sub>	10	26	2.6	较粗壮,叶色翠绿

长根,但根的粗细和数量有所不同。其中在 C<sub>2</sub> 处理培养基中无菌芽的根数较少,为 5~10 条,根较细;在 C<sub>3</sub> 处理培养基中的无菌芽根数较多,为 10~20 条,粗细适中(图 3)。因此,地枫皮无菌芽生根较好的培养基为:1/2MS+1.0 mg/L IAA(表 5)。

2.5 炼苗移栽

地枫皮组培苗长至 3~4 cm 高时,根据地枫皮的生长特性在温室中将已生根的试管苗炼苗 3 d,洗净试管苗根部的培养基,移栽到灭过菌的沙子中,成活率为 70%。

3 结论与讨论

自 1937 年 White 建立第 1 个植物组织培养基以来,许多研究者报道了各种培养基,其数量多,配方各异。基本培养基

图3 地枫皮组培苗的 C<sub>3</sub> 培养基生根诱导情况

表5 植物生长调节剂对地枫皮生根培养的影响

培养基编号	接种数 (个)	生根数 (条)	生根率 (%)	生长情况
C <sub>1</sub>	10	0	0	基部膨大,大量愈伤组织
C <sub>2</sub>	10	10	100	根细,根系少
C <sub>3</sub>	10	10	100	根粗细适中,根系多

的筛选对植物组织培养有着重要的影响。随着组织培养技术飞速发展,根据植物种类和部位的不同要求,研制出的基本培养基多达 685 种<sup>[9]</sup>。由于同一科属植物生长习性相近,其所用的基本培养基也相似。地枫皮原生境为岩溶石山顶,生长的土壤为黑色石灰土,土壤含有较高的交换性钙和有机质<sup>[10]</sup>,本试验研究表明,地枫皮组织培养最适的基本培养基为 MS,MS 具有较高的无机盐浓度,能够保证组织生长所需的矿质营养,非常适合地枫皮生长,与其同科属八角组织培养的基本培养基相同<sup>[11]</sup>。

在植物组培快速繁殖技术研究中,为了提高增殖系数,缩短培育时间,便于大规模生产种苗,在其基本培养基中附加不同种类、浓度的激素,以满足不同培养阶段需求。在继代增殖阶段,许多研究已经表明细胞分裂素可以促进丛生芽的增殖<sup>[12-13]</sup>,本试验以 6-BA、ZT、KT 与 NAA 联合配比使用,发现 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 0.3 mg/L NAA 诱导效果较好,芽长势好、叶色翠绿。在生根阶段,生长素类物质对植物生根具有促进作用,本试验以 NAA、IBA、IAA 3 种生长素与 6-BA 配比使用,研究不同生长素对地枫皮无菌苗生根诱导的影响。结果表明 IAA 对地枫皮无菌芽生根诱导优于 IBA,NAA 可以诱导地枫皮无菌芽产生愈伤组织,但对生根诱导作用甚微。NAA 是一种广谱的植物生长调节剂,具有促进细胞分裂、诱导不定根形成的作用<sup>[14]</sup>,但是在培养过程中也经常出现致使材料老化、形成愈伤组织<sup>[15]</sup>的现象;而 IBA、IAA 则是植物自身能够形成的内源生长素,能促进细胞分裂与生长,诱导形成不定根<sup>[16-21]</sup>。

综上所述,在地枫皮组培快繁技术研究中,地枫皮的茎段、顶芽均可作为组织培养的外植体,MS 为较适合的基本培养基,初代诱导较好的培养基为 MS + 1.5 mg/L 6-BA +

0.1 mg/L NAA;最佳继代增殖培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 0.3 mg/L NAA,增殖系数为 3.2;最佳生根培养基为:1/2MS + 1.0 mg/L IAA。本研究为地枫皮种苗繁育打下良好的基础,也为地枫皮良种选育提供技术平台。

#### 参考文献:

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物:第 1 册[M]. 北京:科学出版社,1991:62.
- [2] 黄宝优,吴庆华,柯芳. 中药地枫皮的研究概况[J]. 大众科技,2008(1):126,117.
- [3] 唐辉,史艳财,孔德鑫,等. 岩溶特有植物地枫皮的种质资源调查及地理分布[J]. 广东农业科学,2011,38(12):113-117.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2009.
- [5] 陈瑞生,陈相银,张露露. 地枫皮真伪鉴别[J]. 首都医药,2013(17):41.
- [6] 唐辉,陈宗游,史艳财,等. 正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中草药,2013,44(5):610-615.
- [7] 霍丽妮,李培源,邓超澄,等. 广西地枫皮不同部位挥发油化学成分比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):81-84.
- [8] 王洪禄,何永志,史利利,等. 地枫皮研究进展[J]. 实用中医药杂志,2011,8(8):577-578.
- [9] 肖尊安. 植物生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:21.
- [10] 王满莲,孔德鑫,邹蓉,等. 不同土壤环境对地枫皮幼苗生长和生物量分配的影响[J]. 作物杂志,2013(3):67-71.
- [11] 邓茂林. 八角组织培养试验初报[J]. 四川林业科技,2008,29(6):72-73,87.
- [12] 陈丽静,齐欣,王玉坤,等. 北五味子快繁体系的建立[J]. 中草药,2011,42(3):575-578.
- [13] 丁伟,张立红,潘晨昊,等. 水半夏组培快繁体系的建立[J]. 中草药,2011,42(3):585-588.
- [14] 李林轩,吴庆华,蔡锦源,等. 五指毛桃组织培养获得再生植株的研究[J]. 中草药,2014,45(17):2547-2551.
- [15] 邱运亮,段鹏慧,赵华. 植物组培快繁技术[M]. 北京:化学工业出版社,2010:68-69.
- [16] 余桂红,张旭,孙晓波,等. 大麦苏啤 4 号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):953-956.
- [17] 李林轩,凌征柱,李翠,等. 珙菲亚组织培养条件的优化研究[J]. 中草药,2013,44(10):1334-1337.
- [18] 曾爱松,宋立晓,高兵,等. 结球甘蓝小孢子胚植株再生体系的优化[J]. 江苏农业学报,2013,29(1):228-230.
- [19] 石虎,杨永智,周云,等. 马铃薯新品种青薯 9 号高效再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):14-19.
- [20] Hagen G, Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49(3/4):373-385.
- [21] 杜敏华,柯涛,韩雪梅,等. 连香树下胚轴高频离体再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):47-49.