

文章编号: 1000-5471(2006)03-0148-05

# 狭叶松果菊的组织培养和植株再生

闫晓慧<sup>1,2</sup>, 谈 锋<sup>1,2</sup>, 胡 凯<sup>3</sup>, 李连强<sup>1,2</sup>, 张莲莲<sup>1,2</sup>

1. 西南大学 生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715;
3. 重庆文理学院 生命科学系, 重庆 永川 402168

**摘要:** 以狭叶松果菊无菌苗叶片为外植体, 通过正交试验筛选出最佳的愈伤组织诱导培养基: MS+6-BA0.5 mg/L+NAA1.0 mg/L; 最佳的丛芽诱导培养基为: MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L. 再生芽经附加 IBA0.5 mg/L 的 1/2MS 培养基生根后移栽成活获得再生植株.

**关键词:** 狭叶松果菊; 组织培养; 植株再生; 正交试验

**中图分类号:** Q948

**文献标识码:** A

狭叶松果菊(*Echinacea. angustifolia*)也称狭叶紫锥菊, 是菊科(Compositae)紫菀族(Aster family)松果菊属(*Echinacea*)植物, 原产美洲, 是印地安人的传统草药, 被用作治疗外伤、蛇咬、头痛及感冒已有上百年的历史<sup>[1]</sup>. 松果菊的治疗用途十分广泛, 可以治疗各种炎症和感染<sup>[2]</sup>, 最近的研究表明松果菊提取物还有抗氧化、抗衰老<sup>[3]</sup>、调控细胞凋亡<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等作用, 其疗效得到了越来越多的临床肯定, 是国际市场需求量最大的植物药之一. 由于狭叶松果菊种子的深度休眠性, 严重制约了种苗的繁育, 笔者采用组织培养技术, 以无菌苗叶片作为外植体, 成功诱导出愈伤组织和丛芽, 实现了植株再生.

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

狭叶松果菊种子购自加拿大.

### 1.2 培养基和培养条件

培养基: MS 培养基, 加 30 g/L 蔗糖, 7 g/L 琼脂, 调 pH 值为 5.8

培养条件为: 温度(23±1)℃, 照度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d.

### 1.3 试验方法

狭叶松果菊种子剥去外种皮流水冲洗 1 h 后, 于 75% 的酒精溶液浸泡 30 s, 转入 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 中灭菌 10 min, 用无菌水冲洗 5 次, 在无菌滤纸上吸干种子表面水分后, 将种子接种到 MS 培养基中, 于(23±1)℃, 照度 2 000 lx, 12 h/d 光照条件下萌发. 30 d 后可获得无菌苗, 剪取无菌苗叶片作为愈伤组织和丛芽诱导的试验材料.

采用三因素三水平正交试验的方法筛选出最适宜的愈伤组织和芽诱导培养基. 获得的丛芽切下后接种到添加不同激素的 1/2 MS 培养基上使之生根, 然后移栽. 正交表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>), 表头设计见表 1, 9 种培养基及三因素的详细配比见表 2.

收稿日期: 2005-11-28

作者简介: 闫晓慧(1980-), 女, 辽宁朝阳人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术和生化工程方面的研究.

通讯作者: 谈 锋, 教授, 博士生导师.

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验表头设计表  
Table 1 The Design form of Orthogonal Test  $L_9(3^4)$

水 平	因 素		
	A(6-BA)/mg · L <sup>-1</sup>	B(NAA)/mg · L <sup>-1</sup>	C(蔗糖)/g · L <sup>-1</sup>
1	0.5	0.1	20
2	1.0	0.5	30
3	2.0	1.0	40

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导及芽的分化

将无菌苗叶片切下接种在  $L_9(3^4)$  正交试验的 9 种培养基(表 2)中, 每个处理接种 12 瓶, 每瓶接种 1~2 个外植体. 1 周后叶片外植体切块出现不同程度卷曲, 并整体膨大; 2 周后从外植体切口处产生大量疏松浅绿色或淡黄色愈伤组织(图 1), 并且随着培养时间延长, 愈伤组织体积逐渐增大, 20 d 左右 9 号处理最先出现芽的分化. 随着培养时间的延长 9 种处理陆续出现芽的分化.

表 2 中列出了 30 d 时愈伤组织的诱导率, 表 3 列出了愈伤组织诱导的直观分析. 正交试验结果表明: 在各个试验条件下狭叶松果菊叶片均出现了不同程度的愈伤组织分化, 且愈伤组织的生长情况与 NAA 的浓度密切相关. 试验结果的直观分析显示出 C 因素的极差最大, A、B 因素次之, 即蔗糖对愈伤组织的诱导影响最大, 30 g/L 的蔗糖最有利于愈伤组织诱导和生长. 进一步将试验结果中愈伤组织诱导率最好的 2 组即 2 号处理 A1B2C2 和 9 号处理 A3B3C2 与直观分析筛选出来最佳组合 A1B3C2, 进行比较, 分别接种 20 瓶, 均诱导出愈伤组织, 但愈伤组织的长势明显不同, 6-BA 浓度高时愈伤组织生长较缓慢且比较致密, NAA 浓度高, 愈伤组织生长快. 通过上述分析可知, 最佳愈伤组织诱导培养基应为: MS+6-BA0.5 mg/L+NAA1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L.

表 2 狭叶松果菊愈伤组织及芽诱导正交试验结果

Table 2 The Results of Callus and Shoot Induction of *E. angustifolia* in Orthogonal Test  $L_9(3^4)$

实验代码	因 素			外植体数	芽诱导数	愈伤组织诱导率 /%
	A	B	C			
1=A1B1C1	1	1	1	16	8	94.4
2=A1B2C2	1	2	2	22	13	100
3=A1B3C3	1	3	3	16	9.5	84.2
4=A2B1C2	2	1	2	16	23	89.5
5=A2B2C3	2	2	3	18	27	82.4
6=A2B3C1	2	3	1	10	5	90.0
7=A3B1C3	3	1	3	14	7	60.0
8=A3B2C1	3	2	1	12	6	88.2
9=A3B3C2	3	3	2	19	16.5	100

注: 1. 每个处理 12 瓶, 每瓶 1~2 个外植体, 每瓶的出芽率=出芽数/外植体数, 60 d 时统计出芽率; 2. 30 d 统计愈伤组织诱导率.

表 3 狭叶松果菊愈伤组织诱导正交试验结果的直观分析

Table 3 Audio Visual Analysis Concerning to the Results of Callus Induction in *E. angustifolia*

因素和	A	B	C	平均值	A	B	C
K1	278.6	243.9	272.6	X1	92.9	81.3	90.9
K2	261.9	270.6	289.5	X2	87.3	90.2	96.5
K3	248.2	274.2	226.6	X3	82.7	91.4	75.5
R(极差)	30.4	30.3	62.9	R'(极差)	10.1	10.1	21.0
最优水平	A1	B3	C2	最佳组合	A1B3C2		

接种 20 d 时 9 号处理最先出现了芽的分化, 表明高浓度的激素能够快速诱导芽的分化, 但随着培养时间的延长, 激素浓度高的处理会出现玻璃化现象. 60 d 时各个处理芽分化的结果显示中等浓度(1.0 mg/L)

的 6-BA 最有利于芽的分化和生长,且长出的芽健壮.当 NAA 为中等浓度(0.5 mg/L)时分化的芽数目较多.表 4 列出了芽分化方差分析结果,结论:条件 C(蔗糖浓度)对松果菊组织培养中芽的分化有显著影响,30 g/L 的蔗糖最有利于狭叶松果菊芽的分化.表 5 利用邓肯氏新复极差法(SSR 法)对蔗糖诱导芽分化的效果进行多重比较;结果表明培养基中 30 g/L 与 40 g/L 蔗糖浓度对松果菊组织培养中芽的分化有显著差异,培养基中 30 g/L 与 20 g/L,40 g/L 与 20 g/L 蔗糖浓度对松果菊组织培养中芽的分化没有显著差异,最终结论:狭叶松果菊芽分化的最佳培养基应为 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖.

表 4 狭叶松果菊芽分化正交试验结果方差分析

Table 4 The Variance Analysis of Shoot Induction in *E. angustifolia*

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	$F_{0.01(2, 101)}$	$F_{0.05(2, 101)}$
A	11.58	2	5.79	2.72	4.82	3.09
B	3.13	2	1.57	0.74	4.82	3.09
C	16.69	2	8.35	3.92*	4.82	3.09
Se1	9.78	2	4.89			
Se2	205.82	99	2.08			
合并误差	215.6	101	2.13			

\* 表示有显著差异.

表 5 蔗糖诱导芽分化效果的多重比较

Table 5 The Multi-Comparison of Shoot's Differentiation Effect Induced by Sucrose

蔗糖浓度/g·L <sup>-1</sup>	平均芽数/外质体	$\bar{X}_i-0.53$	$\bar{X}_i-1.21$	差异显著性 <sub>0.05</sub>
30	1.46	0.93*	0.25	a
40	1.21	0.68		ab
20	0.53			b

\* 表示有显著差异.

## 2.2 根的诱导和植株再生

根据方差分析结果将叶片产生的新鲜浅黄绿色愈伤组织转接至含 6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L 的 MS 培养基上诱导芽的分化,1 周后愈伤组织变得更疏松,呈浅绿色或部分愈伤组织呈绿色,并开始出现零星的绿色或紫红色小芽点,约 2 周后,从愈伤组织上长出黄绿色或绿色小芽,至 30 d 后发育成具许多绿色小芽的芽丛(图 2),将诱导得到的丛芽从基部切下接种到下述几种培养基中诱导生根(表 6).接种 3~5 d 后 4 号和 5 号最先出现根的分化,表明高浓度的激素生根快,10 d 后各个处理均出现了根的分化(图 3).30 d 统计试验结果见表 6.结果显示添加 NAA 的根粗壮,但愈伤组织化严重,移栽不易成活. IBA 诱导的根较细,浓度过高过低根的数目都较少,以 0.5 mg/L 最有利于根的分化,并且生的根健壮,数目多,愈伤组织少,移栽易成活.1 个月后根长度 3~4 cm,打开培养瓶盖炼苗 3~4 d 后移栽到花盆中,得到再生植株(图 4).

表 6 狭叶松果菊生根试验结果(30 d 统计结果)

Table 6 The Results of Root Induction of *E. angustifolia*

培养基	丛芽数	生根数	生根率/%	根的性状
1 号 1/2MS+NAA0.5 mg/L	17	16	94.1	根短粗,光滑,愈伤化严重,数目多,4 根以上,生长快
2 号 1/2MS+IBA0.1 mg/L	19	12	63.2	较细,有分枝有根毛,数目少,平均不到 2 根,生长慢
3 号 1/2MS+IBA0.5 mg/L	18	17	94.4	根较细,多分支,数目多,平均 3~4 根,长势较快,愈伤组织少
4 号 1/2MS+IBA1.0 mg/L	14	10	71.4	根较细,尖端有根毛,数目少,平均不到 2 根,生长较慢
5 号 1/2MS+NAA0.5 mg/L +IBA0.5 mg/L	16	13	81.3	粗壮,愈伤组织化,尖端有根毛,生长快



图 1 狭叶松果菊愈伤组织  
Fig. 1 Callus of *E. angustifolia*

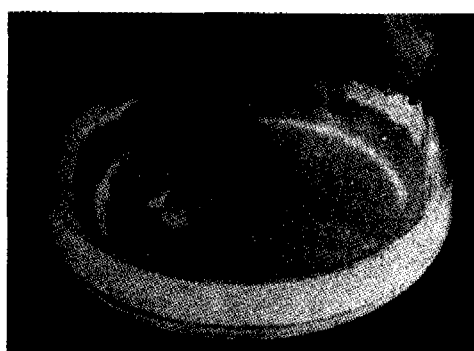


图 2 狭叶松果菊丛生芽  
Fig. 2 Shoots of *E. angustifolia*



图 3 丛芽诱导生根  
Fig. 3 Roots of *E. angustifolia* Induced from Shoots



图 4 组培苗移栽成活  
Fig. 4 Regeneration Plantlet of *E. angustifolia*

### 3 讨 论

正交设计是多因素多水平分析的有力工具, 采用正交设计的方法, 可以精简试验次数, 大大提高试验结果的正确性和可靠性. 本文采用正交设计的方法, 仅用较少的试验组合, 通过统计学分析, 明确了影响狭叶松果菊愈伤组织与芽诱导的主要因素, 筛选出愈伤组织诱导和丛生芽诱导的最佳培养基, 大大提高了试验效率. 本试验中, 各试验条件下均有愈伤组织和丛生芽生成. 试验证明, 培养基中蔗糖浓度对狭叶松果菊愈伤组织和芽的诱导有显著影响, 而在本试验条件下, 激素浓度对实验结果影响的差异并不显著, 表明狭叶松果菊的愈伤组织和丛生芽诱导较为容易.

松果菊属共有植物 9 种<sup>[6]</sup>, 常作为药用的为紫花松果菊、淡紫松果菊和狭叶松果菊. 目前国际上有关松果菊属药用植物制剂已连续 3 年名列榜首, 是国际流行免疫调节剂. 关于紫花松果菊的组织培养文献报道较多, 而对于淡紫松果菊和狭叶松果菊的组织培养至今无人报道, 本文所建立的狭叶松果菊的植株再生体系在很大程度上克服了种子繁育的局限性, 为狭叶松果菊规模化育苗及其有效成分的开发利用提供了理论支持, 为进一步建立狭叶松果菊的遗传转化体系奠定了基础.

#### 参考文献:

- [1] Hostettmann K. History of a Plant; the Example of *Echinacea* Forsch Komplementarmed [J]. *Klass Naturheilkd*, 2003, 10(1): 9-12.
- [2] Barrett B. Medicinal Properties of *Echinacea*; a Critical Review [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(1): 66-86.

- [3] Sloley B D, Urichuk L J, Tywin C, *et al.* Comparison of Chemical Components and Antioxidants Capacity of Different Echinacea Species [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(6): 849 — 857.
- [4] Di Carlo G, Nuzzo I, Capasso R, *et al.* Modulation of Apoptosis in Mice Treated with *Echinacea* and St. John's Wort [J]. *Pharmacological Research*, 2003, 48(3): 273 — 277.
- [5] Schulz Osowski S, Rostock M, Bartsch H H, *et al.* Pharmaceutical Comparability of Different Therapeutic Echinacea Preparations [J]. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 2000, 7(6): 294 — 300.
- [6] Yan xiaohui, Tan feng. Identification of Three Echinacea Species and Their Active Ingredients and Progress in Biotechnology [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006, 37(2): 300 — 304.

## Tissue Cultivation and Plants Regeneration of *E. angustifolia*

YAN Xiao-hui<sup>1,2</sup>, TAN Feng<sup>1,2</sup>, HU Kai<sup>3</sup>,  
LI Lian-qian<sup>1,2</sup>, ZHANG Lian-lian<sup>1,2</sup>

1. School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Plant Ecology and Resources in Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China;

3. Life Science Department, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan Chongqing 402168, China

**Abstract:** Efficient plant regeneration was achieved via organogenesis from callus cultures derived from leaf tissue of *Echinacea angustifolia*. Proliferating shoot cultures were obtained by placing leaf explants on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 6-benzylaminopurine (6-BA) and naphthaleneacetic acid (NAA) combinations. According to the results of Orthogonal Test  $L_9(3^4)$  MS medium supplemented with 6-BA (0.5 mg/L) and NAA (1.0 mg/L) was the most effective for callus induction while MS medium supplemented with 6-BA (1.0 mg/L) and NAA (0.5 mg/L) was the most effective for shoots induction. Plantlets were rooted on 1/2MS medium supplemented with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA), and high rooting and survival was achieved when the IBA concentration was 0.5 mg/L. All plantlets survived acclimatization producing healthy plants in the greenhouse.

**Key words:** *Echinacea angustifolia*; tissue cultivation; plants regeneration; orthogonal test

责任编辑 胡 杨