

严敏,刘艳,汤洪敏.艾纳香的组织培养[J].江苏农业科学,2014,42(2):33-35.

# 艾纳香的组织培养

严敏,刘艳,汤洪敏

(贵州民族大学,贵州贵阳 550025)

**摘要:**以贵州药用植物艾纳香的叶片为材料,MS 培养基为基本培养基,探讨影响艾纳香组织培养的因素,为艾纳香的组织培养快速繁殖提供重要的参考依据。结果表明:外植体灭菌组合以 0.1% 氯化汞 8 min + 75% 乙醇 5 s 最佳;诱导愈伤组织培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳,诱导率为 88.17%;愈伤组织继代培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳;愈伤组织分化为芽的培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳,以试管苗(由野外艾纳香培育出的完整幼苗)叶片为外植体诱导愈伤组织,其分化率为 93%;芽继代培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳,平均苗高 4.3 cm;IBA 有利于艾纳香的无根绿苗生根,以 MS + IBA 1.4 mg/L 培养基培养,生根率为 100%。

**关键词:**艾纳香;组织培养;愈伤组织;诱导;MS 培养基

**中图分类号:** Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0033-03

艾纳香(*Blumea balsamifera* DC)为菊科艾纳香属植物,在我国仅分布在贵州、云南、广东、广西等少数湿热地区<sup>[1]</sup>。艾纳香叶提取的挥发油有特殊的清香,具有显著的抗菌、消炎、消肿、止痛、止痒等作用<sup>[2]</sup>。艾纳香油的主要成分为 *L*-龙脑,主要用途之一是提制冰片(艾片),冰片具通窍、散热、明目、止痛等功能。艾纳香属多年生宿根植物,主要以宿根分株繁殖,分生苗移栽成活率低;艾纳香利用种子育苗,种子结实率低,休眠期长,发芽率低于 5.8%<sup>[3]</sup>。这些情况导致艾纳香种苗短缺,严重制约艾纳香大规模生产,因此必须研究艾纳香的组织培养以快速获得批量种苗,扩大种植规模以满足日益增长的市场要求。国内的报道主要着重在艾纳香药理研究上<sup>[4-5]</sup>,所以对艾纳香进行植物组织培养是一条全面研究艾纳香的重要途径。通过本项目的实施,以期对贵州省艾纳香成功培育试管苗作参考,同时也可对贵州省其他特色药用植物的组织培养快繁提供参考。

收稿日期:2013-07-12

基金项目:贵州省科技厅联合课题(编号:黔科合 J 字 LKM[2011]27、黔科合处 G 字[2011]7034 号)。

作者简介:严敏(1973—),贵州印江人,硕士,高级实验师,研究方向为植物化学。E-mail:577977087@qq.com。

通信作者:汤洪敏。E-mail:thm@gznc.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

来源于贵州省罗甸县,由贵州大学林学院熊中华副教授鉴定。

### 1.2 培养基

MS 培养基;以 MS 培养基为基本培养基,附加激素、白砂糖 30 g/L、琼脂 13 g/L。所有培养基均在 1.1 kg/cm<sup>2</sup>、121 ℃ 的灭菌锅中灭菌 25 min。

### 1.3 试验方法

1.3.1 艾纳香外植体的灭菌处理 将洗净的外植体叶片用氯化汞和乙醇进行不同灭菌剂、不同时间的比较试验及相同灭菌剂不同时间的比较试验,以筛选出外植体灭菌的最佳处理。

#### 1.3.2 艾纳香的接种

1.3.2.1 诱导接种 将已冲洗的外植体放入超净台中,并将其灭菌,然后把叶片剪成大小为 0.6 cm × 0.6 cm 的小块,接入诱导培养基中,每瓶接种 8 块叶片。

1.3.2.2 愈伤组织继代接种 将由外植体诱导出的愈伤组织接种于继代培养基中。

1.3.2.3 愈伤组织分化接种 将愈伤组织接入分化培养基中,分化出芽。

[5] Hanzawa Y, Money T, Bradley D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (21): 7748-7753.

[6] Chardon F, Damerval C. Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 61 (5): 579-590.

[7] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: W597-W603.

[8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary dis-

stance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28 (10): 2731-2739.

[9] Kotoda N, Hayashi H, Suzuki M, et al. Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus domestica* Borkh.)[J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51 (4): 561-575.

[10] Ahn J H, Miller D, Winter V J, et al. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*[J]. Embo Journal, 2006, 25 (3): 605-614.

[11] Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, et al. Functional divergence of the *TFL1*-like gene family in Arabidopsis revealed by characterization of a novel homologue[J]. Genes to Cells, 2001, 6 (4): 327-336.

1.3.2.4 芽继代培养接种 将分化出的芽切分,转入继代培养基,每瓶接 5 株左右。

1.3.2.5 生根壮苗接种 将继代培养出的具有 3 cm 左右的芽剪下来,接种在生根培养基中诱导生根。

1.3.3 培养气候条件 诱导愈伤组织阶段:将材料置于 25 ℃ 条件下培养,前 5 d 在黑暗条件下,之后每天接受自然光照。愈伤组织继代、愈伤组织分化、芽继代及生根壮苗阶段:将材料置于 25 ℃ 条件下培养,接受光照。

1.3.4 NAA 与 6-BA 对组织培养效果的影响 以 MS 为基本培养基,探讨不同浓度 NAA 与不同浓度 6-BA 组合对诱导愈伤组织、愈伤组织继代培养、愈伤组织分化、芽继代的效果的影响。

1.3.5 生根壮苗试验设计 试验材料为从艾纳香叶片上诱导的芽。经查阅相关文献可知,IBA 1.4 mg/L 的生根效果较好<sup>[6]</sup>,所以生根培养基设计为 MS + IBA 1.4 mg/L。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理对艾纳香外植体的灭菌效果

2.1.1 单一灭菌剂的灭菌效果 由表 1、表 2 可知,单独使用乙醇灭菌没有效果,材料全部被污染。高浓度的氯化汞虽然能降低外植体的污染率,但是外植体褐化严重,难以诱导出愈伤组织。所以,单一灭菌剂对外植体的灭菌效果不佳。

表 1 单独使用氯化汞对外植体叶片灭菌效果的影响

氯化汞浓度 (%)	时间 (min)	污染率 (%)
0.10	7	100
0.10	8	100
0.10	9	100
0.15	7	89.3
0.15	8	86.6
0.15	9	83.4

表 2 单独使用乙醇对外植体叶片灭菌效果的影响

乙醇浓度 (%)	时间 (s)	污染率 (%)
75	5	100
75	10	100
75	20	100
80	5	100
80	10	100
80	20	100

2.1.2 氯化汞和乙醇混合灭菌剂的灭菌效果 从表 3 可知,最佳灭菌组合为 0.1% 氯化汞 8 min + 75% 乙醇 5 s。由于氯化汞对外植体的伤害大,难以诱导出愈伤组织,所以其浓度不宜增大,其作用时间也不宜延长。因为乙醇会使外植体褐化,影响外植体诱导成愈伤组织,甚至使外植体死亡,所以在能灭菌的情况下其作用时间越小越好。

2.2 愈伤组织的诱导试验结果与分析

2.2.1 不同浓度 NAA 与相同浓度 6-BA 组合对愈伤组织诱导的效果 由表 4 可知,NAA 0.1 mg/L + 6-BA 3.0 mg/L 培养基最适合艾纳香诱导愈伤组织。

表 3 氯化汞和乙醇不同配组对外植体叶片的灭菌效果

不同灭菌剂组合的灭菌时间				污染率 (%)	褐化率 (%)
0.1% 氯化汞 (min)	0.15% 氯化汞 (min)	75% 乙醇 (s)	80% 乙醇 (s)		
8	—	5	—	6	52.00
—	8	5	—	5	70.00
8	—	—	5	6	68.00
—	8	—	5	6	71.00

表 4 不同浓度 NAA 与 6-BA 配组对叶片愈伤组织诱导的影响

NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	出愈数 (个)	出愈率 (%)
0.05	3.0	12	14.81
0.1	3.0	82	88.17
0.2	3.0	9	11.84
0.25	3.0	20	24.39

2.2.2 不同浓度 6-BA 和与相同浓度 NAA 组合对愈伤组织诱导的效果 由表 5 可知,6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基最适合艾纳香诱导愈伤组织。

表 5 不同浓度 6-BA 与 NAA 配组对愈伤组织诱导的影响

6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	外植体数 (块)	出愈数 (个)	出愈率 (%)
0.1	1.5	76	11	14.47
2.0	0.1	74	15	20.27
2.5	0.1	69	31	44.92
3.0	0.1	93	82	88.17

2.3 愈伤组织的继代培养试验结果与分析

2.3.1 不同浓度 NAA 和与相同浓度 6-BA 配组对愈伤组织继代培养的影响 由表 6 可知,NAA 0.1 mg/L + 6-BA 3.0 mg/L 处理的愈伤组织增殖倍数最高,为 2.98 倍,其褐化率也相对最低,所以 NAA 0.1 mg/L + 6-BA 3.0 mg/L 为最佳继代培养基。

表 6 不同浓度 NAA 与 6-BA 配组对叶片愈伤组织继代培养的影响

NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	20 d 后的 增殖倍数	褐化率 (%)
0.1	3.0	2.98	16.32
0.2	3.0	1.43	16.91
0.3	3.0	1.57	17.12
0.4	3.0	1.35	16.63

2.3.2 不同浓度 6-BA 和与相同浓度 NAA 配组对愈伤组织继代培养的影响 由表 7 可知,6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 处理的愈伤组织增殖倍数最高,为 3.2 倍,为最适宜愈伤组织继代培养的激素浓度

表 7 不同浓度 6-BA 与 NAA 配组对叶片愈伤组织继代培养的影响

6-BA 浓度 (mg/L)	NAA (mg/L)	20 d 后的 增殖倍数	褐化率 (%)
2.0	0.1	1.60	15.80
3.0	0.1	3.20	16.53
4.0	0.1	1.80	17.62
5.0	0.1	1.34	17.59

2.4 愈伤组织的分化培养结果与分析

2.4.1 不同浓度 NAA 和与相同浓度 6-BA 配组对愈伤组织分化的影响 由表 8 可看出,随着 NAA 浓度的提高,芽分化率呈先上升后下降的趋势,褐化率随之升高,只有在 NAA 0.1 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 条件下,芽分化率最高,为 4%。所以,只有添加适宜浓度的 NAA,才能使芽分化率最大。

表 8 不同浓度 NAA 与 6-BA 配组对叶片愈伤组织分化的影响

NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	分化率 (%)	褐化率 (%)
0.05	3.0	0	79.8
0.10	3.0	4	81.2
0.20	3.0	0	90.0
0.25	3.0	0	91.2

2.4.2 不同浓度 6-BA 和与相同浓度 NAA 配组对愈伤组织分化的影响 由表 9 可看出,随着 6-BA 浓度的提高,芽分化率呈上升的趋势,褐化率先降低后升高,只有在 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 处理时,芽分化率最高为 4%。所以,只有添加适宜浓度的 6-BA,才能使芽分化率达到最大。

表 9 不同浓度的 6-BA 与 NAA 配组对叶片愈伤组织分化培养的影响

6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	分化率 (%)	褐化率 (%)
1.5	0.1	0	88.0
2.0	0.1	0	82.1
2.5	0.1	0	89.3
3.0	0.1	4	80.1

2.5 芽继代培养试验结果与分析

2.5.1 不同浓度 NAA 和与相同浓度 6-BA 配组对芽继代的影响 由表 10 可知,芽在继代培养过程中,芽的增殖倍数差异不大;其平均苗高呈先升后降再升的趋势。

表 10 不同浓度 NAA 与 6-BA 配组对芽继代培养的影响

NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	20 d 后的 增殖倍数	平均苗高 (cm)
0.05	3.0	2.0	2.6
0.1	3.0	2.6	4.3
0.2	3.0	2.0	2.7
0.25	3.0	2.1	3.1

2.5.2 不同浓度 6-BA 和与相同浓度 NAA 配组对芽继代培养的影响 由表 11 可知,不同浓度的激素组合对芽继代培养的情况不同,以 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 组合为最佳组合,平均苗高 4.3 cm。

表 11 不同浓度 6-BA 与 NAA 配组对芽继代培养的影响

NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	20 d 后的 增殖倍数	平均苗高 (cm)
1.5	0.1	2.1	3.1
2.0	0.1	2.0	2.6
2.5	0.1	2.0	2.7
3.0	0.1	2.6	4.3

2.6 生根壮苗的试验结果与分析

经过生根培养基 MS+IBA 1.4 mg/L 培养出来的幼苗,1 个月生根率为 100%,平均根长为 4.3 cm,平均苗高为 7.4 cm。图 1 为生根培养基 MS+IBA 1.4 mg/L 培养出来的幼苗。



图1 生根培养基培养的幼苗

3 结论

本试验以艾纳香叶片为材料,筛选出最佳灭菌剂组合及灭菌时间、诱导愈伤组织的最佳培养基配方、愈伤组织继代培养的最佳培养基配方、愈伤组织分化的最佳培养基配方、芽继代的最佳培养基配方、生根壮苗的培养基配方。从外植体的灭菌到成为一株完整幼苗的过程中每一步都很重要,缺了任何一个步骤本试验都无法成功。本试验结果表明,对外植体进行灭菌的最佳组合为 0.1% 氯化汞 8 min+75% 乙醇 5 s;单独使用氯化汞或者乙醇对艾纳香灭菌效果不好。不同浓度的激素组合对艾纳香叶片诱导愈伤组织情况不同,以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合为最佳组合,诱导率为 88.17%;不同浓度的激素组合对愈伤组织继代培养的情况不同,以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合为最佳组合;不同浓度的激素组合处理的艾纳香叶片愈伤组织分化为芽的情况不同,以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合为最佳组合,以野外艾纳香叶片为外植体诱导出的愈伤组织分化率为 4%;以试管苗(由野外艾纳香培育出的完整幼苗)叶片为外植体诱导出的愈伤组织分化率为 93%;不同浓度的激素组合处理的叶片的芽继代培养情况不同,以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合为最佳组合,平均苗高 4.3 cm。IBA 有利于艾纳香的无根绿苗生根,以 MS+IBA 1.4 mg/L 培养基培养的生根率为 100%。

参考文献:

[1]《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编:上册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:49.  
[2]贵州省卫生厅. 贵州省药品标准[M]. 贵阳:贵州人民出版社,1994:43.  
[3]江兴龙,潘俊锋,司健. 艾纳香人工栽培技术[J]. 林业科技开发,2005,19(2):68-70.  
[4]许实波,林永成. 艾纳香素对实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学报,1993,14(4):376-378.  
[5]许实波,赵金华. 艾纳香二氢黄酮对大鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,1998,14(2):191-192.  
[6]高山林,朱丹妮,徐德然. 徐长卿组织培养技术的研究[J]. 药物生物技术,1995,2(4):33-36.