

馥芳艾纳香快繁体系的建立

姚绍嫦, 潘丽梅, 蓝祖栽, 凌征柱*

广西壮族自治区药用植物园, 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: 目的 建立馥芳艾纳香 *Blumea aromatica* 的快繁技术体系, 为大量生产种苗提供基础。方法 利用不同激素配比的培养基, 筛选出馥芳艾纳香快速繁殖的最适培养基。结果 带腋芽茎段是从生芽诱导的最佳材料; 丛生芽诱导的最适培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 诱导率为 100%; 最佳继代增殖培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+0.2 mg/L NAA, 增殖倍数为 6.83; 最适的生根培养基为 1/2 MS+0.3 mg/L NAA, 生根率 100%, 移栽成活率 84.07%。最适培养条件为温度 26 ℃、光照强度为 2 000 lx、光照时间 10 h。结论 快繁技术体系可在短时间内提供大量种苗, 并为馥芳艾纳香规模化生产种苗提供技术指导。

关键词: 馥芳艾纳香; 快繁; 组织培养; 丛生芽诱导; 带腋芽茎段

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)06-1182-04

Establishment of rapid propagation system of *Blumea aromatica*

YAO Shao-chang, PAN Li-mei, LAN Zu-zai, LING Zheng-zhu

Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China

Abstract: **Objective** To establish a rapid propagation system of *Blumea aromatica* through tissue culture technique for large-scale seedlings. **Methods** Using media with different hormones proportion to optimize the tissue culture of *B. aromatica*. **Results** Stems with axillary bud was the suitable explant for inducing and the cluster buds inducing medium consisted of MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA with inductivity of 100%. The best medium for subculture proliferation was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA with proliferation times of 6.83. The optimal medium for rooting was 1/2 MS + 0.3 mg/L NAA with rooting and survival rates of 100% and 84.07%, respectively. The optimal cultural condition was temperature 26 ℃, light intensity 2 000 lx, and illumination time 10 h. **Conclusion** The tissue culture technique and rapid propagation system of *B. aromatica* could be used for large-scale seedlings in short time and provide technical guidance for large-scale production.

Key words: *Blumea aromatica* DC.; rapid propagation; tissue culture; cluster buds inducing; stems with axillary bud

馥芳艾纳香 *Blumea aromatica* DC. 为菊科多年生草本植物, 又名山风、香艾、香艾纳^[1]。全草入药, 味辛、微苦, 性温, 气香。具有祛风消肿、活血止痒功效, 主治风湿性关节痛、湿疹、皮肤瘙痒、外出血等症^[2-3], 是国家中药保护品种“华佗风痛宝”的主要原料药。用药量的不断增加, 加剧了对野生药材资源的大量采集, 造成了资源严重匮乏。目前迫切需要进行人工栽培以满足日常用药和工业的原料药需求, 但尚未发现馥芳艾纳香人工栽培方面的研究报道。由于馥芳艾纳香在自然状态下依靠种子

繁殖, 但种子寿命较短, 发芽率极低, 在传播过程中很难遇到能够满足其发芽生根的环境条件^[4]。本课题组拟通过组织培养的方法, 建立其组培快繁的技术体系, 短时间内生产出大量种苗, 为其规模化生产提供种苗和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

馥芳艾纳香一年生植株的带腋芽茎段和嫩叶采自广西壮族自治区药用植物园引种繁育圃, 经中国医学科学院药用植物研究所马小军研究员鉴定为

收稿日期: 2012-01-12

基金项目: 广西卫生厅科研课题 (Z2009344)

作者简介: 姚绍嫦 (1980—), 女, 广西容县人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为药用植物组织培养技术。

Tel: 18677179284 E-mail: yaoshaochang@163.com

*通讯作者 凌征柱 Tel: (0771)2443040 E-mail: linzz1953@126.com

馥芳艾纳香 *Blumea aromatica* DC.

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌 将带腋芽茎段和嫩叶除表面污垢,洗净。在超净工作台上,用 0.1% HgCl_2 溶液分别进行 6、8、10 min 灭菌带腋芽的茎段,嫩叶用 0.1% HgCl_2 溶液灭菌 8 min,分别用无菌水摇荡洗涤 4 次,再用无菌吸水纸将水分吸干后,将茎段切成 0.5 cm 带一个腋芽的茎段,将嫩叶切成小块接种到初代诱导培养基上。

1.2.2 初代培养 将外植体接种到含不同质量浓度 6-BA 与 NAA 配比的初代培养基上,每种培养基 20 瓶,每瓶接种 3 块。随机选取未污染的 30 瓶观察记录诱导情况,30 d 统计诱导率,筛选出适合的外植体和初代诱导培养基。

1.2.3 继代增殖培养 将初代培养获得的丛生芽切下单个芽转接到继代培养基中进行增殖培养,采用正交试验设计方案,因素水平见表 1,共设计 9 组,每组培养基接种 10 个芽,重复 3 次,观察记录芽的生长情况,20 d 统计增殖情况,筛选出继代增殖的最佳培养基。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因素		
	6-BA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	KT / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	1.0	0.5	0.1
2	2.0	1.0	0.2
3	3.0	1.5	0.5

1.2.4 生根培养 当继代增殖芽苗长至 2 cm 以上,从基部切成带 3 叶 1 心高度为 2 cm 的单个芽,转接到不同的生根培养基中。每种培养基 30 瓶,每瓶 2 个芽。每天观察记录芽的生根情况,20 d 统计生根率、根长、株高、新叶数和最大新叶(长×宽)。

1.2.5 培养条件 初代和继代增殖培养的基本培养基为 MS,生根培养的基本培养基为 1/2 MS,培养基均附加 3.0%蔗糖和 0.5%琼脂, pH 6.0,配制分装后,于 121 °C 灭菌 20 min。培养条件为 26 °C、光照强度 2 000 lx、光照时间 10 h/d。

1.2.6 炼苗移栽 把生根的瓶苗搬到炼苗棚,炼苗 4 d,然后用镊子将瓶苗取出,用清水洗去粘附在根部的培养基,移栽到泥炭土-细河沙(3:1)的基质上,移栽后 10 d 内保持相对湿度 95%,温度白天控制在 23~25 °C,夜间 15~18 °C,无直射光的条件,

20 d 时统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

考察用 0.1% HgCl_2 溶液分别灭菌 6、8、10 min,见表 2。结果表明灭菌时间 8 min 带腋芽茎段的污染率最低 13.33%,成活率最高 80.00%。当灭菌 10 min 时,虽然污染也较少,但是时间过长,成活率(6.67%)较低。因此,最适宜的灭菌时间是 8 min。

表 2 不同灭菌时间对馥芳艾纳香外植体生长能力的影响
Table 2 Effect of different sterilization time on vitality of *B. aromatica* explants

HgCl_2 灭菌 时间 / min	带腋芽茎 段 / 个	污染 率 / %	成活 率 / %
6	15	46.67	13.30
8	15	13.33	80.00
10	15	20.00	6.67

2.2 外植体选择

将带腋芽茎段和嫩叶两种外植体接种至诱导培养基上,均能在切口处诱导出少量愈伤组织。继续培养一段时间,带腋芽茎段能诱导出丛生芽,但嫩叶的愈伤组织却逐渐变褐死亡而不能分化出芽。因此,带腋芽茎段是丛生芽诱导的最佳外植体。

2.3 诱导培养

将带腋芽茎段接种至添加不同质量浓度 6-BA 与 NAA 配比的 MS 培养基上(见表 3),结果表明,不同配比的培养基均能使带腋芽茎段诱导出丛生芽(见表 4)。培养 7 d,接触培养基的部分开始出现少量愈伤组织,且腋芽开始恢复生长。培养 15 d 时,在叶腋处诱导出具有 4~5 个小芽的丛生芽(图 1-A)。切口处出现的少量愈伤组织不分化形成芽。不同配比的培养基虽然都能诱导出丛生芽,但是在诱导率上存在较大差别。当 NAA 为 0.2 mg/L 时,与不同质量浓度的 6-BA 组合更有利于不定芽的诱导,均得到更高的不定芽诱导率。在 NAA 为 0.2 mg/L 的情况下,当 6-BA 达到 2.0 mg/L 时,丛生芽的诱导率达到 100%,且所需的时间最短,芽生长速度快,无玻璃化现象。但当 6-BA 质量浓度进一步增加到 2.5 mg/L 时,丛生芽诱导率反而下降,且开始出现玻璃化现象。因此,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基是最适宜馥芳艾纳香丛生芽诱导的培养基。

表 3 不同质量浓度 6-BA 与 NAA 的配比处理

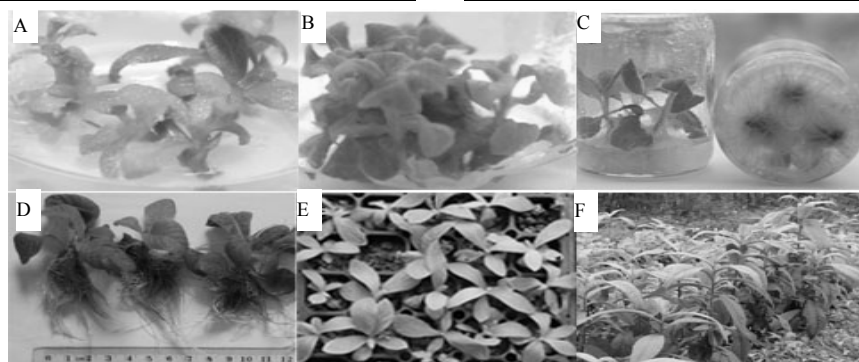
Table 3 Treatments of 6-BA and NAA at different concentration

处理	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)
1	0.5	0.2
2	1.0	0.2
3	1.5	0.2
4	2.0	0.2
5	2.5	0.2
6	0.5	0.5
7	1.0	0.5
8	1.5	0.5
9	2.0	0.5
10	2.5	0.5

表 4 不同处理对馥芳艾纳香丛生芽诱导的影响

Table 4 Effects of different treatments on induction of cluster buds of *B. aromatica*

处理	接种数 / 块	出现时间 / d	芽诱导率 / %
1	30	25	31.54
2	30	21	53.67
3	30	21	86.32
4	30	15	100.00
5	30	19	73.16
6	30	20	20.00
7	30	22	33.67
8	30	19	60.00
9	30	20	66.67
10	30	18	71.33



A-外植体诱导丛生芽 B-丛生芽增殖 C、D-生根苗 E-移栽的生根苗 F-生长半年的组培苗

A-explant inducing cluster buds B-cluster buds proliferation C and D-rooting seedlings E-transplanting seedlings F-half-year-old seedlings

图 1 馥芳艾纳香快繁体系的不同阶段

Fig. 1 Different stages of rapid propagation of *B. aromatica*

2.4 继代增殖培养

在继代培养过程中,不同激素组合对馥芳艾纳香丛生芽的增殖效果差别很大。由正交试验设计结果(表 5)中的极差 R 大小决定各因素对结果的影响程度依次为 $A > B > C$, 即 $6\text{-BA} > \text{KT} > \text{NAA}$, 最优搭配组合为 $A_2B_1C_2$ 。由方差分析表(表 6)可知, 6-BA 对丛生芽的增殖作用达到显著水平 ($P < 0.05$), KT 和 NAA 对丛生芽的增殖作用均不显著。因此, 6-BA 为主要因素, KT 和 NAA 为次要因素。在 6-BA 单因素的预试验中发现当 6-BA 大于 2.0 mg/L 时, 增殖系数开始下降, 且不定根开始增多并出现叶片畸形、组织玻璃化现象。所以采用 6-BA 2.0 mg/L 、KT 0.5 mg/L 、NAA 0.2 mg/L 的组合, 以此组合进行继代增殖可获得最高的增殖倍数 (6.83 倍), 且丛生芽质量很好, 无玻璃化现象(图 1-B)。

2.5 生根与移栽

馥芳艾纳香的试管苗在生根培养基中培养 7 d

表 5 馥芳艾纳香增殖培养基的正交试验

Table 5 Orthogonal test of proliferation media for *B. aromatica*

序号	A	B	C	误差列	增殖倍数
1	1.0	0.5	0.1	1	2.17
2	1.0	1.0	0.2	2	2.00
3	1.0	1.5	0.5	3	1.00
4	2.0	0.5	0.2	3	6.83
5	2.0	1.0	0.5	1	6.00
6	2.0	1.5	0.1	2	4.67
7	3.0	0.5	0.5	2	4.17
8	3.0	1.0	0.1	3	4.00
9	3.0	1.5	0.2	1	2.33
K_1	5.17	13.17	10.84	10.50	
K_2	17.50	12.00	11.16	10.84	
K_3	10.50	8.00	11.17	11.83	
k_1	1.72	4.39	3.61	3.50	
k_2	5.83	4.00	3.72	3.61	
k_3	3.50	2.67	3.72	3.94	
R	4.11	1.72	0.11		

表 6 馥芳艾纳香增殖培养基方差分析表
Table 6 Variance analysis of proliferation
media for *B. aromatica*

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
6-BA	25.49	2	12.75	80.09	0.01
KT	4.90	2	2.45	15.39	0.06
NAA	0.02	2	0.01	0.07	0.93
误差	0.32	2	0.16		

表 7 不同质量浓度 NAA 对馥芳艾纳香试管苗生根的影响

Table 7 Effects of NAA at different concentration on rooting of *B. aromatica* plantlets

NAA/(mg·L ⁻¹)	生根率 / %	根长 / cm	根数 /	新叶数 / 张	最大新叶长×宽 / cm ²	株高 / cm	成活率 / %
0.0	100	1.00	13	3.7	3.86×1.79	3.93	64.71
0.3	100	8.35	>30	3.9	5.19×2.50	4.02	84.07
0.6	100	7.55	>30	3.4	4.38×2.07	3.06	70.00
0.9	100	4.25	>30	1.9	3.25×1.86	2.24	66.67
1.2	100	5.90	>30	3.0	3.84×1.99	2.57	56.67
1.5	100	4.85	>30	2.9	3.38×1.88	2.12	53.33

最大 (4.02 cm), 移栽成活率最高 (84.07%), 因此, 馥芳艾纳香最佳的生根培养基是 1/2 MS+NAA 0.3 mg/L。

3 讨论

馥芳艾纳香自然状态下以种子进行繁殖, 但种子发芽率极低, 本课题组在前期实验研究中对种子的实验室萌发条件进行了考察, 结果发现在人工气候箱中种子的发芽率也很低 (不到 1%)。因此, 本实验选用带腋芽茎段和嫩叶两种外植体, 通过比较得出带腋芽茎段是从生芽诱导的最佳外植体。

在组织培养中, 人为添加植物激素 (包括细胞分裂素和生长素) 将调节和影响细胞的生长和分化以及组织形态的形成, 内、外源激素共同作用下将决定植物细胞总的生长状态。许多研究表明细胞分裂素可以促进丛生芽的增殖^[5-6], 本实验也证明了这一点, 在与低质量浓度的 NAA 配合使用时, 随着 6-BA 质量浓度的增加, 增殖倍数也随之增加, 当质量浓度为 2.0 mg/L 时最大, 继续增大, 增殖倍数反而有下降趋势, 并且逐渐出现叶片畸形、组织玻璃化等现象。KT 在一定程度上能延缓芽的衰老, 延缓其器官分化能力的丧失, 从而提高植株再生频率。在选择 6-BA 和 NAA 两种激素的基础上, 附加少量的 KT, 正交试验结果显示采用 6-BA 等 3 种激素组合得到了较好的增殖效果 (增殖倍数 6.83)。

利用组织培养技术能生产优质种苗, 但组培苗

开始长根, 培养 20 d 时的统计结果显示 (表 7), 芽苗在添加不同浓度 NAA 的生根培养基中均能诱导出根, 且生根率均为 100%, 但不同处理的生根苗根长、根数、新叶数、最大新叶长×宽、株高、移栽成活率等指标均各有不同 (图 1-C~F)。1/2 MS+NAA 0.3 mg/L 处理的各指标值均优于其他处理, 该处理的不定根根长最长 (8.35 cm), 根数>30 条, 新叶最多 (3.9 张), 最大新叶 (长×宽) (5.19 cm×2.50 cm), 株高

能否在生产上迅速应用推广, 与其移栽的便捷性、成活率、培养成本等密切相关^[7]。本实验结果表明馥芳艾纳香丛生芽容易诱导培养, 增殖和生根培养能产生大量的种苗, 以无菌试管苗为起始材料, 培养周期 20 d, 一年继代增殖 15 代, 生根培养 1 代, 炼苗移栽 1 代。以增殖倍数为 6.83 计算, 一株能扩繁 6.83¹⁵≈3 995 亿株, 移栽成活率达到 80%以上, 生根苗移栽成活后即可进行大田栽培, 因此, 本技术体系生产的组培苗具有扩繁系数大、栽培管理便捷、成活率高、成本低等优点, 能在生产上迅速应用推广。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西本草选编 (下册) [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974.
- [3] 黄泰康, 丁志遵, 赵守训, 等. 现代本草纲目 (上册) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000.
- [4] 袁媛, 庞玉新, 王文全, 等. 中国艾纳香属植物资源调查 [J]. 热带生物学报, 2011, 2(1): 78-82.
- [5] 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): 575-577.
- [6] 丁伟, 张立红, 潘晟昊, 等. 水半夏组培快繁体系的建立 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 585-588.
- [7] 叶祖云, 阮少江, 杨卓飞, 等. 四倍体太子参种苗繁育技术体系的建立 [J]. 中药材, 2011, 34(3): 340-342.