

艾纳香特选种质组培特性及克隆后代 *L*-龙脑含量比较研究

湛婉赞^{1,2}, 黄 梅², 于福来², 罗雪婷^{2,3}, 杨跃生⁴, 黎行飞², 陈振夏², 黎玉兰², 庞玉新¹, 陈晓鹭^{2*}, 刘育辰^{1*}

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部中药材生物学与栽培重点实验室/海南省艾纳香工程技术研究中心, 海南 海口 571101

3. 云南农业大学热带作物学院, 云南 普洱 665000

4. 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 524000

摘要: **目的** 建立高效的艾纳香 *Blumea balsamifera* 特选种苗克隆技术体系并获得高质量的候选种质。**方法** 特选了通过初筛的 3 种 *L*-龙脑不同含量(低、中、高)的种质母株, 优化组培培养基配方, 再比较母株和克隆苗中 *L*-龙脑的含量。**结果** 确定了最佳培养基配方, GC-MS 分析证实, 克隆苗中 *L*-龙脑的含量与母株呈一致趋势。**结论** 成功地建立了一种保持遗传稳定性的高效组织培养技术。添加适量的胺鲜酯(diethyl aminoethyl hexanoate)可显著提高再生苗的生根效率。研究还表明, 所选艾纳香种质(H)中的高 *L*-龙脑含量是由遗传因素决定的, 并且高 *L*-龙脑的特性保留在克隆苗的后代中。为艾纳香无性繁殖选育优良种苗提供了宝贵的优质候选种质, 具有较好推广前景。

关键词: 艾纳香; *L*-龙脑; 组织培养; 胺鲜酯; 胺鲜酯

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)03-0937-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.024

Characteristics of tissue culture and *L*-borneol content in cloned progeny of selected *Blumea balsamifera* germplasm

SHEN Wanyun^{1,2}, HUANG Mei², YU Fulai², LUO Xueting^{2,3}, YANG Yuesheng⁴, LI Xingfei², CHEN Zhenxia², LI Yulan², PANG Yuxin¹, CHEN Xiaolu², LIU Yuchen¹

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Cultivation of Herb Medicine (Haikou), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R. China/Hainan Provincial Engineering Research Center for *Blumea balsamifera*, Haikou 571101, China

3. College of Tropical Crops of Yunnan Agricultural University, Puer 665000, China

4. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 524000, China

Abstract: **Objective** To establish an efficient cloning technology system for *Blumea balsamifera* (L.) DC. seedlings and obtain high-quality candidate germplasm. **Methods** In this study, three maternal plants with varying levels of *L*-borneol content (low, medium, and high) were selected through preliminary screening. Tissue culture was conducted using different media, and the effects of each medium were compared. The *L*-borneol contents in the cloned seedlings and maternal plants were also compared. **Results** The optimal culture medium formula was determined, and GC-MS analysis confirmed that the *L*-

收稿日期: 2023-09-09

基金项目: 海南省重点研发计划(ZDYF2020167); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630032022022, 1630032022008)

作者简介: 湛婉赞(1997—), 女, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 研究方向为中药民族药化学成分及品质评价研究。

E-mail: 770964760@qq.com

*通信作者: 陈晓鹭(1985—), 女, 广东湛江人, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为药用植物资源评价与保护利用。

E-mail: chenxl@catas.cn

刘育辰(1982—), 女, 吉林长春人, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药及民族药资源分类鉴定与质量控制等研究工作。

E-mail: lyc8564732@163.com

borneol contents in the cloned offspring exhibited a consistent trend with the mother plants. **Conclusion** An efficient tissue culture technique that maintains genetic stability was successfully established in this study. The rooting efficiency of regenerated seedlings was significantly improved by adding an appropriate amount of diethyl aminoethyl hexanoate (DA-6). The study also identified that the high *L*-borneol content in the selected *B. balsamifera* germplasm (H) is determined by genetic factors, and the characteristic of high *L*-borneol is retained in the offspring of cloned plants. These results provide valuable high-quality candidate germplasms and serve as technical references for selecting superior *B. balsamifera* seedlings through asexual reproduction, with promising prospects for further promotion.

Key words: *Blumea balsamifera* (L.) DC.; *L*-borneol; tissue culture; diethyl aminoethyl hexanoate; DA-6

艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 是艾片 (*L*-龙脑) 的基原植物^[1], 主要含挥发油等多种成分, 其具有祛风除湿、温中止泻、活血解毒的等功效, 同时有多种生理活性^[2-10]。目前艾纳香缺乏稳定遗传的良种良苗, 原因在于个体变异丰富且易受环境影响^[11-14]。组织培养属于无性繁殖技术, 在人工环境中, 组培后代能排除种子繁殖的实生苗性状分离和环境因素影响, 是快速繁殖种苗和保留良种优势的高效途径, 并为优质种苗的种质保存、快速扩繁以及后期再生研究提供充足的材料^[15-17]。艾纳香一般种质的组培技术研究较多, 主要以带腋芽茎段为外植体, 采用 MS 或 1/2MS 培养基, 诱导其增殖、生根、炼苗及移栽^[18-20]。以上均为普适性研究, 未有针对特选种质开展研究。根据 Yuan 等^[5]发现艾纳香嫩叶 *L*-龙脑含量高, 成熟叶含量下降并趋于平稳, 且功能叶生物量最大, 因此本研究选择采克隆苗后代的功能叶进行化学测定; 此外, 基于黄梅等^[21]发现艾纳香植株在苗期时 *L*-龙脑含量非常低, 不具采收价值, 此后随植株成长, *L*-龙脑含量升高至较稳定水平, 因此比较苗龄较短的克隆苗后代可能不足以准确反映克隆后代植株长大后的化学特性。为更准确反映克隆后代植株接近采收期状态时的龙脑含量, 本研究对克隆苗后代移栽 338 d 后测定。利用 GC-MS 技术研究艾纳香化学成分已经成熟^[22-25], 为本研究测定 *L*-龙脑含量的实验设计、培养和采样提供了基础资料和技术参考。

本团队前期对自建艾纳香种质资源圃中的种质母株单株进行初筛, 发现不同单株间 *L*-龙脑含量存在差异, 但由于每份种质资源都只有 1 棵母株单株, 因此无法判断其 *L*-龙脑含量的高低差异是遗传因素差异造成的, 还是个体受到外界环境差异影响造成的^[13,26]。因此, 本研究选择 3 个 *L*-龙脑含量 (低、中、高) 具有代表性的种质母株比较组培特性差异, 得到克隆苗后代, 利用 GC-MS

技术比较不同种质母株及克隆苗后代 *L*-龙脑含量, 对特选种质和配套组培技术的研究有望达到促进产业发展的目的。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 7890B-5977A 型气相色谱质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); ME104E/02 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Thermo scientific/Forma88400V 型超低温冰箱 (建发广州有限公司); Conviron/PGC20 型人工气候箱 (建发广州有限公司); MS 培养基 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 720F031); 6-苄氨基嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA) (北京索莱宝科技有限公司, 批号 721W051); 萘乙酸 (1-naphthaleneacetic acid, NAA) (北京索莱宝科技有限公司, 批号 1231P033); 胺鲜酯 (diethyl aminoethyl hexanoate, DA-6) (广东植物龙生物技术股份有限公司, 批号 HNP44089-E0629); 肌醇 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 1217J042); 维生素 C (北京索莱宝科技有限公司, 批号 906L035); 醋酸乙酯 (上海安谱实验科技股份有限公司, 批号 Z3660432); 水杨酸甲酯 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 A2211103); *L*-龙脑对照品 (阿发埃莎化学有限公司, 批号 10233613), 质量分数大于 98%。

1.2 试验材料

艾纳香 3 个种质二年生母株露天保存在海南省儋州市中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所艾纳香种质资源圃中, 经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所于福来研究员鉴定为菊科艾纳香属植物艾纳香 *B. balsamifera* (L.) DC., 统一水肥管理。基于前期研究^[13,26]筛选 *L*-龙脑含量分别为低、中、高的 3 个种质 (L、M、H), 每个种质单株于同一位置摘取 9 片功能叶, 分 3 组为 3 个重复, 阴干 7 d 后保存在 -80 °C 超低温冰箱中待测。

克隆后代为 3 个特选种质经离体保存后取得无病菌,经组培扩繁、炼苗、移栽后种植在花盆中,在人工气候箱中培养,统一光温水肥管理。炼苗 338 d 后,每个种质选 9 株长势一致、健康无病虫害的植株,于同一位置摘取 1 片功能叶,共 9 片,分 3 组为 3 个重复,阴干 7 d 后保存在 -80°C 超低温冰箱中待测。

2 方法

2.1 外植体消毒

取健壮艾纳香带芽茎,清洗后用 1%次氯酸钠溶液浸泡 15 min,无菌水冲洗 5 次,切除片叶,将其分段为 1~2 cm 的带腋芽茎段,作为外植体。

2.2 初代培养

将得到的艾纳香外植体接种到添加 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.3 mg/L、肌醇 20 mg/L、维生素 C 10 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L、pH 6.2 的 MS 培养基中启动诱导,培养 30 d。培养条件: 25°C , 12 h 光周期,光照强度 1 000~1 500 lx (以下组培试验培养条件一致)。

2.3 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基中不定芽增殖效率比较

将初代培养得到的再生苗,切成 1~2 cm 的带腋芽茎段,接种到含 NAA 0.3 mg/L、肌醇 20 mg/L、维生素 C 10 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L、pH 6.2、添加不同质量浓度 6-BA (0、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L) 的 MS 培养基中。每个浓度接种 20 瓶,每瓶接种 4 个,培养 30 d 后统计总芽数、芽长、单位外植体芽数。

单位外植体芽数=总芽数/总外植体数

2.4 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 NAA 的 MS 培养基中不定芽生根效率比较

从组培苗上切下 2 cm 长的单个芽条,接种到含肌醇 20 mg/L、维生素 C 10 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L、pH 6.2、添加不同质量浓度 NAA (0、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L) 的 MS 培养基中。每个浓度接种 20 瓶,每瓶接种 1 个,培养 30 d 后统计总根数、平均根数、根长、株高。

2.5 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 DA-6 的 MS 培养基中不定芽生根效率比较

将继代增殖得到的组培苗切成 2 cm 长的单个芽条,接种到含 NAA (“2.4”项所得最佳浓度)、肌醇 20 mg/L、维生素 C 10 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L、pH 6.2、添加不同质量浓度 DA-6 (0、0.08、

0.16、0.32 mg/L) 的 MS 培养基中。每个质量浓度接种 20 瓶,每瓶接种 1 个,培养 30 d 后统计总根数、平均根数、根长、株高。

2.6 炼苗及移栽

选择长势一致、健壮的艾纳香 3 个种质组培苗,移栽到花盆中,培养 338 d。培养条件: 白天 23°C , 夜晚 18°C , 12 h 光周期,光照强度 29 000 lx。

2.7 艾纳香 3 个种质母株与克隆苗后代叶 L-龙脑含量测定^[25]

2.7.1 GC-MS 检测条件 色谱柱为安捷伦 CycloSil-B ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) 毛细管柱,质谱条件: EI 源,溶剂延迟 6 min,离子源温度 230°C ,进样口温度 220°C ,扫描范围 m/z 45~500。

2.7.2 供试品溶液的制备 精密称取水杨酸甲酯 100 mg,置 100 mL 量瓶中,加入醋酸乙酯定容,摇匀,制成质量浓度为 1.016 mg/mL 的内标溶液。取艾纳香叶片,加入液氮快速研磨,精密称定粉末 0.2 g,加入醋酸乙酯 2.5 mL,称定质量,超声提取 30 min。放冷,称定质量,醋酸乙酯补足减失的质量,摇匀,滤过,取 1 mL 续滤液置 10 mL 量瓶中,加入内标溶液 1 mL,醋酸乙酯定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.7.3 对照品溶液的制备 精密称取 L-龙脑对照品适量,加入醋酸乙酯溶解并定容,制成质量浓度为 0.998 mg/mL 对照品储备液。

2.7.4 标准曲线的绘制 精密量取对照品储备液 0.1、0.2、0.5、0.7、1、2 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 内标溶液,醋酸乙酯定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,以对照品质量浓度为横坐标 (X),对照品与内标物水杨酸甲酯的峰面积比为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,得到线性回归方程 $Y=61.586 X+0.887 8$, $R^2=0.999 2$,线性范围为 0.010 1~0.202 0 mg/mL。

2.8 数据处理

用 SPSS 21.0 软件计算均值和方差,用 Duncan's 法进行单因素方差分析 (One-way-ANOVA),以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

3 结果与分析

3.1 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基中不定芽增殖效率比较

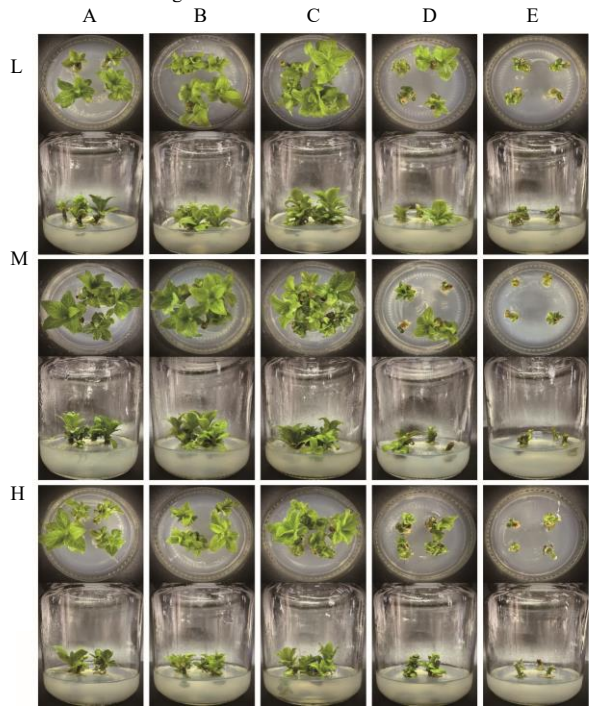
从表 1 和图 1 中可以看出,不同质量浓度的 6-BA 对 3 个种质增殖有显著影响。首先,从单位外

表 1 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基中不定芽增殖效率比较

Table 1 Comparison of adventitious bud proliferation efficiency of three germplasms of *B. balsamifera* in MS medium supplemented with different concentrations of 6-BA

处理编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	种质	接种外植体数/个	总芽数/个	单位外植体芽数	芽长/cm
A	0	0.3	L	85	79	0.94±0.12 e	1.82±0.15 b
	0	0.3	M	83	80	0.97±0.08 d	1.93±0.17 b
	0	0.3	H	82	78	0.95±0.10 c	1.77±0.13 b
B	1.0	0.3	L	83	262	3.17±0.38 b	1.78±0.12 b
	1.0	0.3	M	88	179	2.07±0.40 c	1.96±0.12 b
	1.0	0.3	H	81	152	1.82±0.32 c	1.61±0.12 c
C	1.5	0.3	L	84	378	4.54±0.67 a	2.02±0.22 a
	1.5	0.3	M	85	372	4.41±0.71 a	2.07±0.12 a
	1.5	0.3	H	85	337	4.00±0.65 a	1.88±0.12 a
D	2.0	0.3	L	87	187	2.17±0.48 c	0.81±0.16 c
	2.0	0.3	M	83	268	3.25±0.42 b	0.83±0.13 c
	2.0	0.3	H	83	232	2.82±0.44 b	0.73±0.13 d
E	3.0	0.3	L	83	109	1.32±0.39 d	0.49±0.10 d
	3.0	0.3	M	85	153	1.81±0.31 c	0.41±0.16 d
	3.0	0.3	H	85	105	1.25±0.33 d	0.39±0.10 e

采用 Duncan's 法进行单因素方差分析 (One-way-ANOVA), 表中每一列数值后的不同字母表示存在显著差异 ($P<0.05$), 下表同。
One-way analysis of variance (One-way-ANOVA) was performed using Duncan's method, data in the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$, as shown in the following table.



A~E-MS 培养基中添加 0.3 mg/L 的 NAA 和质量浓度分别为 0、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L 的 6-BA, L、M、H 对应 3 个种质。
A to E-MS medium was supplemented with 0.3 mg/L NAA and 6-BA at mass concentrations of 0, 1.0, 1.5, 2.0, and 3.0 mg/L; L, M and H corresponded to three germplasms.

图 1 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基中不定芽增殖效率比较

Fig. 1 Comparison of adventitious bud proliferation efficiency of three germplasms of *B. balsamifera* in MS medium supplemented with different concentrations of 6-BA

植体芽数上看, 当 6-BA 为 1.5 mg/L 时, 3 个种质均显著高于其他组, 此条件下 3 个种质间差异不显著; 当 6-BA 为 0 mg/L 时, 单位外植体芽数最低,

虽然原有的芽点仍可以继续生长, 但不会增殖出新的芽; 当 6-BA 为 1.0~3.0 mg/L 时, 有明显促进增殖的作用; 随 6-BA 质量浓度的增加, 单位外植体芽数先增加后降低, 在质量浓度为 1.5 mg/L 时达到峰值, 在 3.0 mg/L 时显著降低, 说明添加适量 6-BA 对于艾纳香增殖是必须的, 但过高反而会产生抑制作用。

其次, 从芽长上看, 当 6-BA 为 1.5 mg/L 时, 3 个种质[L: (2.02±0.22) cm, M: (2.07±0.12) cm, H: (1.88±0.12) cm]均显著高于其他组; 当 6-BA 为 2.0 mg/L 甚至更高时, 芽长随 6-BA 质量浓度的增高逐渐降低, 在质量浓度为 3 mg/L 时芽生长受到明显抑制, 继代后逐渐死亡。因此, 选择适合质量浓度的 6-BA 是十分有必要的。综合看, 当 6-BA 为 1.5 mg/L 时效果最佳, 3 个种质组培苗单位外植体芽数及芽长均达到最高, 植株鲜绿、茁壮。

3.2 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 NAA 的 MS 培养基中生长效果比较

结合表 2 和图 2 可以看出, 不同浓度 NAA 对 3 个种质生根有显著影响。首先, 从生根数上看, 当 NAA 为 0.3 mg/L 时, 3 个种质[L: (25.25±4.39) 条/棵, M: (28.60±1.64) 条/棵, H: (20.55±2.07) 条/棵]均显著高于其他组; 当 NAA 在 0.2~0.5 mg/L 时, 能显著增加生根数, 并且随 NAA 质

量浓度的升高, 生根数先增加后减少, 在 0.3 mg/L 时达到最高, 0.5 mg/L 时显著降低; 当 NAA 为 0 mg/L 时, 生根数最低, 虽然不添加 NAA 仍可以萌发出根, 但根的数量极少, 炼苗、移栽阶段均会受到抑制。

从根长上看, 当 NAA 质量浓度为 0 mg/L 时, 3 个种质[L: (4.86±0.23) cm, M: (4.65±0.37) cm, H: (4.06±0.23 cm)]均显著高于其他组; 其次为 0.3 mg/L 时; 当 NAA 添加在 0.2~0.5 mg/L 时, 根长随 NAA 质量浓度的增加逐渐升高后降低, 在 0.5 mg/L 时降至最低。

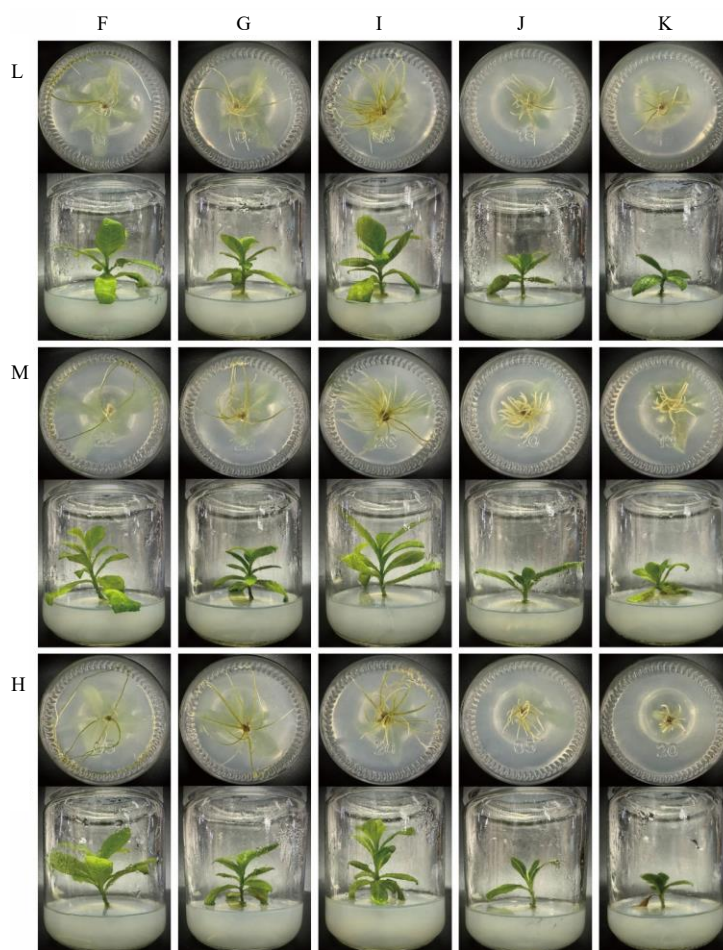
从株高上看, 当 NAA 为 0.3 mg/L 时, 其中 2 个种质[L: (3.22±0.43) cm, H: (3.08±0.17 cm)]显著高于其他组, M 种质在 0、0.3 mg/L 时没有显著差异, 但总的来看, NAA 在 0~0.3 mg/L 内时, 株高显著增加, 且在 0.3 mg/L 时促进作用最明显; 当 NAA 为 0.5 mg/L 时, 株高显著降低。

综合看, 当 NAA 在 0.2~0.5 mg/L 时, 对 3 个种质生根数均有促进作用, 其中 0.3 mg/L 时生根数最多, 在不添加 NAA 的情况下, 根长相对其他组较长, 但生根数极少, 当 NAA 在 0~0.3 mg/L 内时, 均能使植株增高, 但 0.3 mg/L 时株高达到最高。结果表明较低质量浓度的 NAA 促进植株生长, 较高浓度则抑制其生长。因此, NAA 为 0.3 mg/L 时效果最佳。

表 2 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 NAA 的 MS 培养基中生长效果比较

Table 2 Comparison of growing effects of three germplasms of *B. balsamifera* in MS medium supplemented with different concentrations of NAA

编号	NAA/(mg·L ⁻¹)	种质	处理苗数/棵	总生根数/条	生根数/(条·棵 ⁻¹)	根长/cm	株高/cm
F	0	L	20	69	3.45±0.94 d	4.86±0.23 a	2.96±0.30 b
	0	M	20	77	3.85±1.14 e	4.65±0.37 a	2.95±0.25 a
	0	H	20	82	4.10±1.02 e	4.06±0.23 a	2.91±0.21 b
G	0.2	L	20	286	14.30±2.89 b	2.47±0.21 b	2.88±0.33 b
	0.2	M	20	305	15.25±3.66 c	2.11±0.20 c	2.80±0.18 b
	0.2	H	20	269	13.45±3.16 c	2.24±0.20 b	2.73±0.21 c
I	0.3	L	20	505	25.25±4.39 a	2.51±0.20 b	3.22±0.43 a
	0.3	M	20	572	28.60±1.64 a	2.38±0.20 b	3.02±0.17 a
	0.3	H	20	411	20.55±2.07 a	2.27±0.18 b	3.08±0.17 a
J	0.4	L	20	308	15.40±4.17 b	1.86±0.21 c	2.55±0.29 c
	0.4	M	20	448	24.10±1.80 b	1.69±0.22 d	1.96±0.18 c
	0.4	H	20	325	16.25±2.01 b	1.54±0.15 c	2.16±0.19 d
K	0.5	L	20	251	12.55±4.24 c	1.25±0.21 d	1.41±0.19 d
	0.5	M	20	255	12.75±1.71 d	1.18±0.18 e	1.38±0.20 d
	0.5	H	20	242	12.10±1.79 d	1.01±0.14 d	1.20±0.16 e



F~K-MS 培养基中添加质量浓度分别为 0、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L 的 NAA；L、M、H 对应 3 个种质。

F to K-MS medium was supplemented with NAA at mass concentrations of 0, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg/L; L, M and H corresponded to three germplasms.

图 2 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 NAA 的 MS 培养基中生长效果比较

Fig. 2 Comparison of growing effects of three germplasms of *B. balsamifera* in MS medium supplemented with different concentrations of NAA

3.3 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 DA-6 的 MS 培养基中生长效果比较

在“3.2”项得到 3 个种质 NAA 最适质量浓度为 0.3 mg/L，结合表 3 和图 3，说明添加不同质量浓度的 DA-6 可以提升植株生根数、根长及株高。从生根数上看，当 DA-6 为 0.16 mg/L 时，3 个种质 [L: (29.80 ± 2.80) 条/棵，M: (30.20 ± 2.03) 条/棵，H: (29.90 ± 2.30) 条/棵] 均显著高于其他组；生根数随 DA-6 质量浓度的升高先增加后降低，在 0.32 mg/L 时降至最低；当 DA-6 为 0 mg/L，生根数较 0.08、0.16 mg/L 时显著较低，说明添加较低质量浓度的 DA-6 和 NAA 时生根数要比只添加 NAA 的效果更好。

从根长上看，当 DA-6 为 0.16 mg/L 时，3 个种质 [L: (2.44 ± 0.20) cm，M: (2.33 ± 0.16) cm，H: (2.24 ± 0.20) cm] 均显著高于其他组；当 DA-6

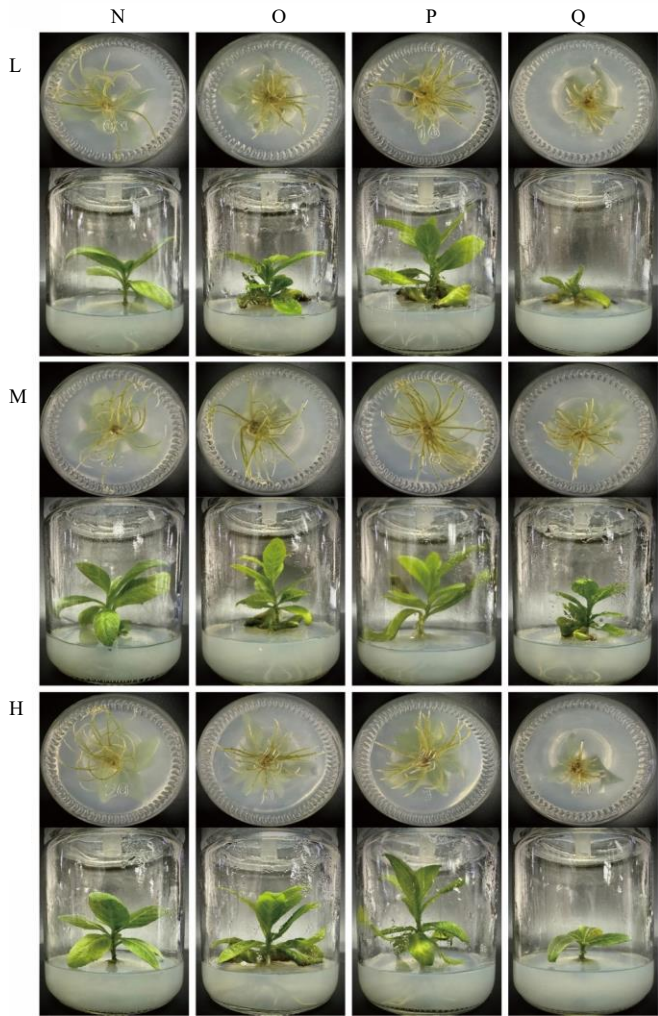
为 0、0.08 mg/L 时，根长没有显著差异，可能是 DA-6 质量浓度较低，生根效果不如较高质量浓度好；根长随 DA-6 质量浓度的升高先增加后降低，在 0.32 mg/L 时降至最低。

从株高上看，当 DA-6 为 0.16 mg/L 时，其中 2 个种质 [L: (3.46 ± 0.27) cm，M: (3.17 ± 0.21) cm] 显著高于其他组，H 种质在 DA-6 为 0.08、0.16 mg/L 时没有显著差异，总的来看，DA-6 为 0.16 mg/L 时对株高促进作用最明显；当质量浓度达到 0.32 mg/L 时，株高显著降低；当不添加 DA-6 时，株高显著低于添加低质量浓度 DA-6 的植株。

综上，当 DA-6 在 0.08~0.16 mg/L 时，能显著提升 3 个种质生长效果，当 DA-6 为 0.16 mg/L 时效果最佳，此时植株的生根数、根长以及株高均显著增加。

表 3 艾纳香 3 个种质在添加不同浓度 DA-6 的 MS 培养基中生长效果比较
Table 3 Comparison of growing effects of three germplasms of *B. balsamifera* in MS medium supplemented with different concentrations of DA-6

编号	DA-6/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	种质	处理苗数/棵	总生根数/条	生根数/(条·棵 ⁻¹)	根长/cm	株高/cm
N	0	0.3	L	20	507	25.40±2.24 c	2.26±0.20 b	3.11±0.25 c
	0	0.3	M	20	530	26.50±2.36 c	2.12±0.22 b	2.82±0.21 c
	0	0.3	H	20	496	24.80±2.05 c	2.03±0.24 b	2.69±0.25 b
O	0.08	0.3	L	20	484	26.50±2.65 b	2.23±0.18 b	3.24±0.23 b
	0.08	0.3	M	20	564	28.20±1.85 b	2.17±0.21 b	2.98±0.21 b
	0.08	0.3	H	20	554	27.60±1.59 b	2.07±0.18 b	2.91±0.23 a
P	0.16	0.3	L	20	596	29.80±2.80 a	2.44±0.20 a	3.46±0.27 a
	0.16	0.3	M	20	607	30.20±2.03 a	2.33±0.16 a	3.17±0.21 a
	0.16	0.3	H	20	597	29.90±2.30 a	2.24±0.20 a	3.03±0.19 a
Q	0.32	0.3	L	20	312	15.60±3.56 d	1.27±0.17 c	1.95±0.24 d
	0.32	0.3	M	20	350	17.50±3.15 d	1.01±0.10 c	2.34±0.23 d
	0.32	0.3	H	20	325	16.25±3.35 d	1.26±0.19 c	2.22±0.18 c



N~Q-MS 培养基中添加 0.3 mg·L⁻¹ 的 NAA 和质量浓度分别为 0、0.08、0.16、0.32 mg·L⁻¹ 的 DA-6；L、M、H 对应 3 个种质。
N to Q-MS medium was supplemented with 0.3 mg·L⁻¹ NAA and DA-6 at mass concentrations of 0, 0.08, 0.16, and 0.32 mg·L⁻¹; L, M and H corresponded to three germplasms.

图 3 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 DA-6 的 MS 培养基中生长效果比较
Fig. 3 Comparison of growing effects of three germplasms of *B. balsamifera* in MS medium supplemented with different concentrations of DA-6

3.4 艾纳香 3 个种质母株与克隆苗后代叶 *L*-龙脑含量比较

对 3 个母株单株完成组培扩繁后, 炼苗移栽后得到克隆苗后代, 观察结果显示植株外观差异较小 (图 4)。按照“2.7.1”项下进样, 得到 3 个种质母株与克隆苗后代叶提取物总离子色谱图 (图 5), 经计算后得相

应的 *L*-龙脑含量结果 (图 6), 结果显示: 母株间与克隆苗后代间 *L*-龙脑含量有显著差异, 母株 H 种质 *L*-龙脑含量 [9.12 ± 0.45] mg/g 显著高于 M [5.11 ± 0.31] mg/g 和 L [3.30 ± 0.32] mg/g, 克隆苗后代 H 种质 *L*-龙脑含量 [7.28 ± 0.34] mg/g 显著高于 M [5.71 ± 0.38] mg/g 和 L [4.41 ± 0.40] mg/g。

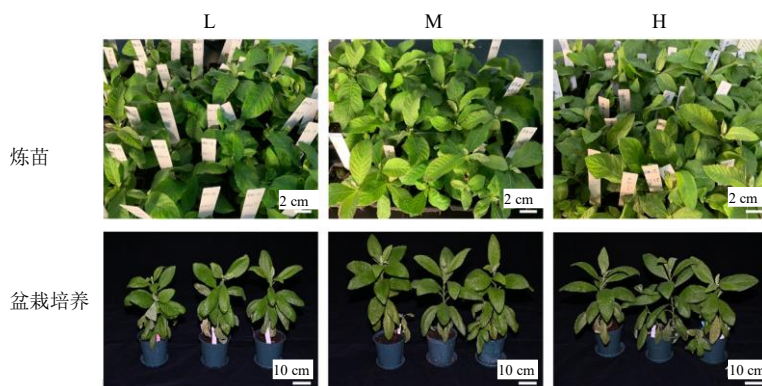


图 4 艾纳香 3 个种质克隆苗后代炼苗及移栽过程

Fig. 4 Process of refining and transplanting the cloned progeny of three *B. balsamifera* germplasms

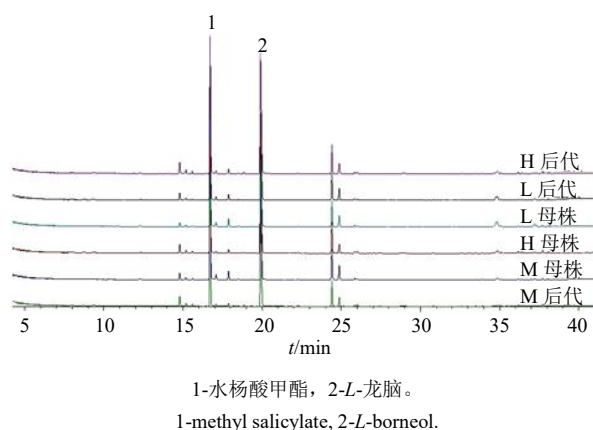


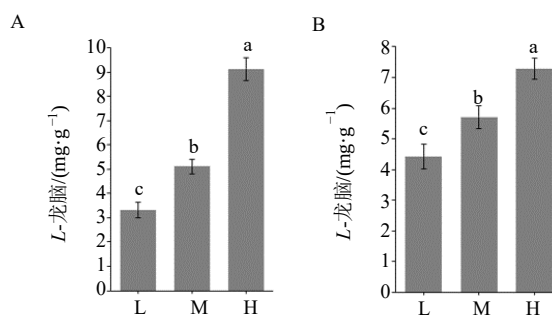
图 5 艾纳香 3 个种质母株与克隆苗后代叶提取物总离子色谱图

Fig. 5 Total ion chromatogram of leaf extracts from mother plants and cloned progeny of three *B. balsamifera* germplasms

4 讨论

4.1 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基中不定芽增殖效率比较

植物生长调节剂是培养基中的关键性物质, 根据组织培养的目的、外植体的种类、器官的不同和生长表现来确定植物生长剂的种类、浓度和比例关系, 对植物组织培养起着决定性作用^[24]。唐松等^[18]以艾纳香幼茎段为外植体, 得到最佳增殖培养基为 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 最佳生根培养基为



不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

different letters are significantly different at $P < 0.05$.

图 6 艾纳香 3 个种质母株 (A) 与克隆苗后代 (B) *L*-龙脑含量比较

Fig. 6 Comparison of *L*-borneol content between mother plant (A) and cloned progeny (B) of three *B. balsamifera* germplasms

1/2 MS+NAA 0.5 mg/L; 杨仕冠等^[19]研究显示艾纳香茎段最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 且增殖率随 6-BA 质量浓度的增加而增高; 肖永锋^[26]研究表明艾纳香增殖培养基中添加 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 时效果最佳, 增殖系数达到 3.91, 生根培养基中添加 0.1 mg/L NAA 时效果最佳, 平均每个幼苗可长 3.78 条根。前人研究 6-BA 用于增殖时质量浓度在 1.5~2.5 mg/L 内, 本研究结果显示 6-BA 为 1.5 mg/L 时, 艾纳香 3 个种质从单位外植体芽数和芽长上看, 均显著提高, 与之前

研究相比显著增加。NAA 与 DA-6 在增殖培养基中也起着重要作用,通过以上研究得到艾纳香 3 个种质最佳增殖的培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L+DA-6 0.16 mg/L+维生素 C 10 mg/L+肌醇 20 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L。

4.2 艾纳香 3 个种质在添加不同质量浓度 NAA 与 DA-6 的 MS 培养基中生长效率比较

研究表明 NAA 在 0.1~0.5 mg/L 时对艾纳香生根有促进作用^[18-19,26],本研究结果显示 NAA 浓度为 0.2、0.3 mg/L 时均可显著促进 3 个种质生根效果,其中 NAA 为 0 mg/L 时根长显著高于其他组,但生根数显著降低,根数量较少植株炼苗移栽后逐渐死亡,株高偏低会使植株发育迟缓,进而影响药用成分的有效利用。综合比较,当 NAA 为 0.3 mg/L 时为最适生长浓度。与前人研究有所不同的是,本研究初次在艾纳香组培中引入植物生长调节剂 DA-6,此前研究发现其能显著促进菊科植物紫锥菊再生芽的生长^[27-28],还能促进微藻生长^[29]。本研究结果也反映:培养基中添加 DA-6 对 3 个种质组培苗生长有显著影响,当添加 DA-6 0.08、0.16 mg/L 时,生根数、根长和株高都高于只添加 NAA 的处理组,但 DA-6 浓度过高时也会抑制生根。因此当 MS 培养基中同时添加 NAA 0.3 mg/L 和 DA-6 0.16 mg/L 时,生根效果最佳。前人研究还表明添加 NAA 艾纳香生根数大致为 12~18 条/棵^[18-19],而本研究引入 DA-6 优化后生根数近乎翻倍,最高达到 30 条/棵,表明 DA-6 在艾纳香生根培养基中是十分必要的。因此,最适合艾纳香 3 个种质生根的培养基为 MS+NAA 0.3 mg/L+DA-6 0.16 mg/L+维生素 C 10 mg/L+肌醇 20 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L。

4.3 艾纳香 3 个种质母株与克隆苗后代叶 L-龙脑含量比较

本研究通过完善培养基并获得克隆苗后代群体,再利用 GC-MS 分析技术分别对艾纳香 3 个种质母株单株、克隆后代群体 L-龙脑含量进行比较,调查 3 个种质母株的 L-龙脑含量是否由遗传因素决定,筛选可能外因导致其升高的单株。结果显示,艾纳香 3 个特选种质母株单株的 L-龙脑含量差异显著,通过组培克隆、增殖、诱导生根、炼苗、移栽后 3 个种质的克隆苗后代 L-龙脑含量也呈现一致的、低、中、高显著差异,与母株 L-龙脑含量规律一致,即确定了所选的 3 个种质母株单株的 L-龙脑含量高低差异规律是由遗传因素决定的, H 种质高含量得

以存续。

其中, L 种质母株的 L-龙脑含量明显低于克隆苗后代, M 种质母株 L-龙脑含量与克隆苗后代差异不显著,而 H 种质母株 L-龙脑含量明显高于克隆苗后代,存在这种差异的原因主要有 2 方面:一是母株受到生物和环境干扰较大。野外艾纳香种群既有种子繁殖又有孽生苗无性繁殖,无法确定野外资源中的多棵植株是否为同一种质,因此每个种质只收集一棵。收集到资源圃中的单株受到病虫害、光照和土壤等因素影响,导致母株中 L-龙脑的积累被促进或抑制,缺乏植株间的生物学重复使个体差异中非遗传因素无法排除。相比之下,通过组培克隆获得的多棵具有一致遗传背景的植株,克隆苗后代无病虫害,在统一的光、温、水、肥、基质条件下培养,排除了个体差异和环境差异的影响,因此更能准确地反映不同种质间的差异。二是母株与克隆苗后代的株龄不同。研究表明,植株的 L-龙脑含量随着株龄的变化而变化^[21]。因此,仅比较单个种质的母株和对应的克隆后代缺乏可比性,因为株龄不同,高含量母株的克隆后代在苗期仍然具有较低的含量。为排除株龄差异带来的干扰,本研究选择了 3 种含量不同的母株,同时获得克隆苗,同时种植,相互作为对照。总之,克隆后代中既存在高于母株的情况,也存在低于母株的情况,这是正常的现象,母株的 L-龙脑含量是基因和环境共同作用的结果,而克隆苗后代由于增加了生物学重复并排除了生物和环境影响,其 L-龙脑含量更准确地体现了种质特性。

本研究得到了具有推广前景的艾纳香优良种质 H,可通过无性繁殖获得优良种苗和保持遗传优势,并建立了能够保持特选种质优良品质遗传稳定性的高效组培技术,有望对特选种质及其配套组培技术进行推广,具有良好的产业前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范东生,李玲,王可可,等.艾纳香化学成分及药理活性的研究进展[J].中国药房,2022,33(10):1274-1280.
- [2] Pang Y X, Wang D, Fan Z W, et al. *Blumea balsamifera*: A phytochemical and pharmacological review [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9453-9477.
- [3] Liao J M, Xie X Y, Wang W L, et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Blumea balsamifera* (L.) DC. through inhibiting TLR4/NF- κ B

- signaling pathways and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells [J]. *J Essent Oil Bear Plants*, 2021, 24(2): 160-176.
- [4] Wang Y H, Zhang Y R. Variations in compositions and antioxidant activities of essential oils from leaves of Luodian *Blumea balsamifera* from different harvest times in China [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0234661.
- [5] Yuan Y, Huang M, Pang Y X, et al. Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1024.
- [6] Xiong Y, Yi P, Li Y H, et al. New sesquiterpenoid esters from *Blumea balsamifera* (L.) DC. and their anti-influenza virus activity [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(5): 1151-1160.
- [7] 袁媛, 庞玉新, 元超. 艾纳香醋酸乙酯部位抗菌活性成分研究 [J]. 热带作物学报, 2018, 39(6): 1195-1199.
- [8] Tan D P, Yan Q X, Kang H. Chemical constituents from *Blumea balsamifera* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 48(6): 1072-1073.
- [9] 胡永, 段玉书, 苑春茂, 等. 艾纳香中 1 个新倍半萜内酯及其细胞毒活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3274-3278.
- [10] Zhang B, Tang M H, Zhang W H, et al. Chemical composition of *Blumea balsamifera* and *Magnolia sieboldii* essential oils and prevention of UV-B radiation-induced skin photoaging [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(24): 5977-5980.
- [11] 何元农, 丁映, 冼福荣, 等. 贵州艾纳香种质变异结构的观察及初选 [J]. 贵州农业科学, 2005, 33(4): 33-36.
- [12] 苏宏娜, 李学学, 杨正明, 等. 壮药材滇桂艾纳香的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2255-2268.
- [13] 肖永锋, 黄梅, 于福来, 等. 艾纳香种质资源表型性状遗传多样性分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36(2): 157-167.
- [14] 胡璇, 王鸿发, 于福来, 等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的艾纳香药材质量评价 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3679-3688.
- [15] 黄璐琳, 胡尚钦, 杨晓. 药用植物生物工程研究进展 I. 组织和细胞培养研究 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 486-491.
- [16] 唐链, 田爽琪. 植物组织培养技术的应用进展 [J]. 现代园艺, 2022, 45(18): 24-26.
- [17] 吴港圆, 杨雅钧, 何石燕, 等. 植物组织培养技术研究进展 [J]. 壮瑶药研究, 2022, (1): 74-79.
- [18] 唐松, 黄燕芬, 孔丽, 等. 艾纳香种苗快繁技术研究 [J]. 贵州师范学院学报, 2015, 31(3): 38-40.
- [19] 杨仕冠, 杨美纯. 艾纳香组织培养技术研究 [J]. 现代农业科技, 2012(18): 151-153.
- [20] 张影波, 庞玉新, 王丹, 等. 一种胚状体途径的艾纳香组培方法: 中国, CN105309315 B [P]. 2017-05-17.
- [21] 黄梅, 于福来, 庞玉新, 等. 不同生长期艾纳香 *L*-龙脑和总黄酮含量变化 [J]. 贵州农业科学, 2016, 44(7): 101-103.
- [22] 孙绪, 付思红, 熊丹丹, 等. 艾纳香及其提取物的 GC-MS 指纹图谱和相关性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 693-699.
- [23] 王远辉, 田洪芸, 何思佳, 等. 不同方法提取艾纳香叶挥发性成分的气相色谱-质谱分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 97-101.
- [24] 张清风, 李啟菊, 马梅见, 等. 植物组织培养中的常见问题及对策 [J]. 现代园艺, 2022, 45(10): 177-179.
- [25] 庞玉新, 黄梅, 于福来, 等. 黔琼产艾纳香中主要化学成分含量差异分析 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(4): 448-452.
- [26] 肖永锋. 艾纳香种质资源评价及组培快繁体系研究 [D]. 海南: 海南大学, 2021.
- [27] Chen X L, Zhang J J, Chen R, et al. An uncommon plant growth regulator, diethyl aminoethyl hexanoate, is highly effective in tissue cultures of the important medicinal plant purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 540316.
- [28] 陈晓鹭, 杨跃生, 吴鸿, 等. 一种促进紫锥菊再生芽生长的培养基及培养方法: 中国, CN103477984A [P]. 2014-01-01.
- [29] Salama E S, Kabra A N, Ji M K, et al. Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 172: 97-103.

[责任编辑 时圣明]