

藿香植物组织培养技术研究

李 红, 李永文, 寇凤仙, 周彦珍, 温秀荣

(保定职业技术学院 农林与生物工程系 河北 保定 071051)

摘 要: 选用藿香健壮枝条和叶片作为试验材料, 进行组培技术的研究。结果表明: 藿香取材季节以夏季较好, 适宜的外植体种类为茎段。诱导愈伤组织形成的激素组合为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+2,4-D 0.3 mg/L, 具有愈伤组织生长速度快并易于分化; 不定芽分化激素组合为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 继代培养组合 6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+B₉ 0.3 mg/L, 增殖在 8 倍以上; 生根培养组合 1/2MS+NAA 0.6 mg/L, 一般 20 d 左右生根, 平均根量 4~5 条, 生根率达 92%。

关键词: 藿香; 植物组织培养; 外植体

中图分类号: S 567.23⁺9; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)09-0195-03

藿香(*Agastache rugosa*(Fisch. et Meyer) O. Ktze)又名川藿香、苏藿香, 属唇形科藿香属多年生草本植物, 株高 0.3~1.5 m, 有香气, 茎直立, 四棱形, 略带红色, 疏被柔毛及腺体。叶对生, 心状卵形至椭圆状卵形, 叶的边缘有锯齿^[1]。夏季, 叶顶开唇形花, 花白色或紫色, 在茎上部排列成多轮的穗状花序。全草含藿香素、藿香甙、异藿香甙、5-羟基-4-甲氧基-Y-葡萄糖基黄酮甙、1-胡薄荷酮、1-异薄荷酮以及挥发油等, 挥发油中主要含甲基胡椒酚、茴香醛、对甲氧基桂皮醛及少量柠檬烯、倍半萜烯等。中医学上以茎叶入药, 性微温, 味辛甘, 具有祛暑化湿、和胃止呕吐的功能^[2]。我国主要分布于辽宁、吉林、广东、四川、河北等地。目前藿香多为人工栽培, 应用植物组织培养技术可以在短时间内, 高效快速的繁殖大批量优质藿香种苗, 对满足市场的需求, 扩大藿香的种质资源提供有效途径。同时对保护藿香野生植物资源具有重要意义。

1 材料方法

1.1 试验材料

试验于 2005 年 5 月~2006 年 12 月在保定职业技术学院组培实验室和教学农场进行。选用藿香的健壮枝条和幼嫩叶片作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒和接种 选取健壮无病虫害的嫩茎、叶片, 首先进行材料的修整, 之后用洗涤灵液浸泡 20 min, 在自来水下流水冲洗 30 min, 于无菌室超净工作

台上, 用 70%酒精处理 30 s, 再用 0.1%升汞处理 4~12 min, 最后用无菌水冲洗 4~5 次, 并反复摇动以彻底洗掉升汞, 再用无菌滤纸吸干多余的水分, 用无菌的剪刀剪掉茎段两边接触升汞的部分, 接种到启动培养基上。

1.2.2 培养基 以 MS 作为基本培养基; (1) 启动培养基, 附加不同浓度激素 6-BA、NAA 和 2,4-D; (2) 分化培养基, 附加不同浓度激素 6-BA、NAA; (3) 继代培养基附加 6-BA、NAA 和 B₉; 以上均加入蔗糖 30 g/L, 琼脂 6 g/L, pH 值为 5.8; (4) 诱导生根的培养基为 1/2 MS 培养基, 附加不同浓度的 NAA, 蔗糖为 15 g/L, pH 值为 5.8。

1.2.3 培养条件 培养温度控制在 (25±1)℃, 光照强度为 1500~2000 Lx, 光照时间 13 h/d。

2 结果分析

2.1 不同时间 0.1%的 HgCl₂ 处理对藿香灭菌效果的影响

植物组织培养技术首先要解决的是对外植体的消毒, 继而建立无菌培养系, 此环节是植物组织培养中难度较大的技术环节之一。通过对夏、秋两个季节所取外植体进行不同时间 HgCl₂消毒试验表明, 在夏季, 0.1%的 HgCl₂对藿香外植体进行表面消毒, 随着消毒时间的延长, 污染率呈下降趋势, 而成活率虽然降低, 但均比处理 4 min 时高, 藿香夏季外植体的最好消毒时间为 6 min; 秋季用 0.1%的 HgCl₂对藿香外植体进行表面消毒, 随着处理时间不断的延长, 外植体污染率降低, 成活率在升高, 秋季外植体的消毒时间为 10 min。由此可以说明, 同样的外植体由于所处季节不同, 消毒所用时间差异很大, 秋季的材料要比夏季的材料难消毒, 适宜的取材季节还是应选在夏季(见表 1)。

2.2 藿香愈伤组织的诱导

第一作者简介: 李红(1970-), 女, 河北省定州市人, 讲师, 主要从事植物组织培养、花卉栽培等课程的教学与研究工作。

基金项目: 河北省科技厅资助项目(06225509)。

收稿日期: 2007-04-04

表 1 不同时间 0.1% 的 HgCl₂ 处理对藿香
灭菌效果的影响

处理时间/min	夏季		秋季	
	污染率/%	成活率/%	污染率/%	成活率/%
4	30	50	100	0
6	10	85	100	0
8	5	80	80	15
10	5	77	30	70
12	0	60	10	40

将藿香茎段接种到培养基上, 10 d 后, 部分茎节开始肿胀膨大, 约 17 d 后, 茎段两端有浅绿色的少量愈伤组织形成, 随着培养时间的延长愈伤组织面积逐渐扩大, 把叶片接种到培养基上 15 d 后, 叶的边缘逐渐变厚突起并扩大到叶片中部, 慢慢的大部分叶片形成愈伤组织。从试验结果(见表 2)可知, 诱导藿香愈伤组织的形成与外植体的取材部位有关, 茎段优于叶片, 培养基激素组合以 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+2,4-D 0.3 mg/L 为好, 所形成愈伤组织浅绿色、菜花状、形成速度快且致密易于分化。

表 2 不同激素组合对藿香愈伤组织诱导的影响

外植体种类	激素组合			接种数量	20 d 愈伤组织诱导率/%	生长状况
	6-BA	NAA	2,4-D			
叶片	1.5	0.5	0.5	20	15	最慢
	1.0	0.5	0.2	20	40	快
	0.5	0.1	0.6	20	30	慢
茎段	1.5	0.5	0.1	20	45	快
	1.0	0.3	0.3	20	85	最快
	0.5	0.1	0.4	20	60	快

注: 愈伤组织诱导率(%) = 外植体形成愈伤组织数/接种外植体数 × 100%。

2.3 藿香愈伤组织的不定芽分化

将藿香愈伤组织转入分化培养基进行培养, 适宜的激素组合为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。愈伤组织接种 10~15 d 后, 发现有少量的小芽点产生, 30 d 后,

表 3 不同浓度 NAA 对藿香生根的影响

组别	培养基	接种株数/株	生根株数/株	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm	生根状况
I	1/2MS+NAA0.3mg/L	25	11	44	1.9	1.7	生根不整齐
II	1/2MS+NAA0.5mg/L	25	16	64	3.4	1.9	生根较整齐
III	1/2MS+NAA0.6mg/L	25	23	92	4.8	2.2	根生长整齐健壮 根量多
IV	1/2MS+NAA1.0mg/L	25	18	76	3.1	2.0	根均匀而长较多

注: 生根率、平均根量及平均根长为随机选取 20 棵试管苗测量结果的平均值

2.6 练苗移栽

当生根小苗长至 2~3 cm 左右时, 把试管苗移到温室中, 打开封口膜加入少量水, 在温室中练苗 3~4 d 然后用镊子夹住植株的基部轻轻取出试管苗, 洗净根部的培养基, 注意少伤根, 用 60% 的多菌灵浸泡 20 min, 移栽到消毒过的基质中。移栽基质采用草炭土与珍珠岩、或蛭石等按 1~2:1 的比例混合, 具有保水、透气和重量轻等优点, 非常适宜藿香组培苗的移栽, 移栽成活率达

愈伤组织逐步扩大再分化产生大量不定芽, 继续培养形成许多小植株成丛状结构(见图 1)。

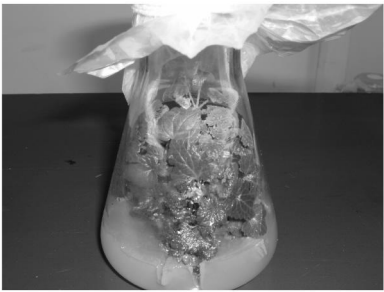


图 1 藿香茎段愈伤组织分化出大量的丛生芽

2.4 继代培养

把由茎段愈伤组织分化产生的丛生苗进行切割, 接种于继代培养基上。继代培养基采用 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+B₉0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8, 通过 3~5 周的继代培养, 增殖倍率在 8 倍以上。

2.5 生根培养

选择无根壮苗接种于生根培养基上, 生根培养基采用大量元素和微量元素均减半的 1/2MS 培养基, 附加不同浓度的 NAA 进行试验, 筛选藿香生根的最佳激素组合。试验表明, 接种 10 d 后, 试管苗分化出根的生长点, 并逐渐发育成根。20 d 后观察根数及生长状况。结果见表 3。从表 3 可以看出, NAA 对根的诱导有一定促进作用, 在不同浓度的 NAA(0.3~1.0 mg/L)培养基中均有根的分化现象。用 NAA 0.6 mg/L 诱导生根, 生根整齐、均匀、质量好, 因此对藿香的诱导生根最适宜的培养基为 1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+蔗糖 15 g/L+琼脂 6 g/L+活性炭 6 g/L。

95% 以上。

移栽后的第 1~2 周为管理的关键时期, 需保持湿度在 90% 以上, 可以在温室中再搭建小拱棚, 要注意遮荫, 温度保持在 20~25℃ 散射光, 同时还要注意适当的通风, 从第 3 周开始逐步降低空气湿度, 揭去棚膜, 增加光照强度; 为防止苗期病害的发生, 移栽基质每周要用 60% 多菌灵 1000 倍液消毒, 1 周后进行施肥, 用 3 倍 MS 大量元素液喷施, 每周 1 次。驯化 30 d, 苗高 5~7 cm

时, 试管苗可以进行定植。

3 结论与讨论

藿香外植体取材季节可直接影响试验的成功, 一般宜夏季取材, 秋季取材污染率相对较高要尽量避免。藿香茎段和叶片作为外植体, 均可进行愈伤组织诱导, 但以茎段外植体愈伤组织诱导分化速度快, 且质量高, 其愈伤组织诱导激素最佳组合为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+2,4-D 0.3 mg/L。将愈伤组织进一步培养、切割、转接到激素为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的分化培养基上, 继续培养 10~15d 后陆续分化出大量不定芽。

增殖培养选取长度为 2~3 cm 的茎段为材料进行培养, 培养基组成为 MS + 6-BA 0.1 mg/L +NAA 0.5 mg/L+ B₉0.3 mg/L, 继代培养其增殖倍率在 8 倍以上, 同时可以培育壮苗。适于生根的激素组合为 1/2 MS+NAA 0.6 mg/L, 一般培养 20 d 左右平均根量可达 4~5

条, 生根率高且根较粗壮, 适于进行练苗移栽和提高移栽成活率。试管苗增殖倍率和移栽成活率是植物组织培养工厂化育苗的关键技术环节, 增殖倍率和移栽成活率的高低将直接影响组培工厂化育苗的生产成本。

总之, 研究初步建立了适于藿香组培繁殖的技术体系, 为藿香组培育苗工厂化生产奠定了一定基础。

参考文献

[1] 姚振生. 药用植物学[M]. 北京: 中国中医药出版社 2003 1.
[2] 徐明, 孙宝俊, 刘娥. 藿香栽培与采摘食用技术[J]. 辽宁农业科学 2000(4): 49-50.
[3] 崔德才, 徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社 2003: 180-200.
[4] 李维林, 冯煦. 药用植物研究与中药现代化[M]. 南京: 东南大学出版社, 2004: 10.
[5] 曹孜义, 刘国民, 王蒂. 等. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 51-53.

Study on the Plant Tissue Culture Technology of *Agastache rugosa* (Fisch. et Meyer) O. Ktze

LI Hong, LI Yong-wen, KOU Feng-xian, ZHOU Yan-zhen, WEN Xiu-rong
(Baoding Vocational and Technical College, Hebei 071051, China)

Abstract: Selected the vigorous and healthy branch and leaf of *Agastache rugosa* (Fisch. et Meyer) O. Ktze as explants carried on the plant tissue culture technology research. The results showed that summer was the best season for plant tissue culture, plant hormone combination of 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 2,4-D 0.3 mg/L was good for callus induction, 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L was suitable for Adventitious bud formation, 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + B₉ 0.3 mg/L was good for cultivation of young plant, the coefficient of reproduction was up to 8 times. NAA 0.6 mg/L was best for rootage, rooting rate was 92%.

Key words: *Agastache rugosa* (Fisch. et Meyer) O. Ktze; Plant tissue culture; Explant

1 抹芽定梢。葡萄萌芽后, 对芽要进行选择, 留下健壮的、位置好的, 而将无用的芽除掉。定梢应在能明显辨认有无花序及花序的生育期, 则上应根据品种、树势和修剪方法而定。花期摘心可使新梢停止生长 10~15 d, 使养分流向花序, 能确保授粉良好, 提高坐果率。生长健壮的结果枝在花序以上留 4~5 片叶摘心, 延长枝留 12~20 片叶摘心, 预备枝留 10~15 片叶摘心, 这样有利于促进果实成熟和加速枝蔓木质化。后期摘心, 可改善架面的通风、透光条件, 促进花芽分化和果实发育, 充实枝蔓, 提高产量。

3 副梢处理。副梢的处理, 各地做法不同。但大部分地区是副梢萌芽后, 将花序以下全部副梢从基部去掉, 花序以上留 1~2 片叶摘心。枝蔓顶端附近的副梢可留 2~3 片叶摘心, 以减少刺激冬芽萌发的可能性。

4 疏花序和掐穗尖。这项措施对调整植株负载量, 提高一些品种的坐果率, 使果粒整齐、果穗紧密有较好的效果。一般宜在开花前两周进行。疏去弱小的和过多的花序, 弱枝叶片少的少留花序。

5 环状剥皮。在果穗下一节的中间部用小刀或环状剥皮剪围绕枝蔓剥去 3~5 mm 的皮层。

6 摘除老叶。摘叶就是为改善果穗附近的光照条件, 应摘除一部分老叶, 促使果实着色。一般在果实变软时摘叶。

7 除卷须和新梢引缚。对卷须若不加处理而任其在架面上缠绕, 将给新梢正确引缚、采收、冬剪和下架工作带来不便, 而卷须还消耗养分, 应结合夏剪随时摘除。当新梢长到 30~40cm 时, 将其绑在架上, 并注意摆布均匀, 防止风吹折断。随着新梢不断生长, 需绑 3~4 次。

葡萄夏季剪枝法

况时进行。去掉发育不良、花序少及过密枝蔓, 留枝数依架式、品种、树势和计划产量指标而定。

2 新梢摘心。摘心的早晚和次数原则上应根据品种、树势和修剪方法而定。花期摘心可使新梢停止生长 10~15 d, 使养分流向花序, 能确保授粉良好, 提高坐果率。生长健壮的结果枝在花序以上留 4~5 片叶摘心, 延长枝留 12~20 片叶摘心, 预备枝留 10~15 片叶摘心, 这样有利于促进果实成熟和加速枝蔓木质化。后期摘心, 可改善架面的通风、透光条件, 促进花芽分化和果实发育, 充实枝蔓, 提高产量。