

不同取材柠檬马鞭草快速繁殖

张艳玲,姚 雷,申晓辉,郝俊蓉

(上海交通大学 农业与生物学院,上海 201101)

摘要:研究了柠檬马鞭草快速繁殖过程中外植体取材时间、取材部位对灭菌效果、褐化控制、腋芽诱导等环节的影响,结果显示:取4~5月间带腋芽的幼嫩茎段,灭菌效果好,污染率在8.94%以下,材料的褐化率控制在7%以下;以新抽出枝条顶芽下部2、3节带腋芽的茎段作为外植体,在 $MS+6-BA\ 1.0\ mg\cdot L^{-1} + IBA\ 0.1\sim 0.3\ mg\cdot L^{-1}$ 培养基上能正常萌发生长,并迅速进入增殖状态,20 d转接1次,增殖倍数在3倍以上。

关键词:柠檬马鞭草;组织培养;外植体

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

Rapid Propagation of *Lippia triphylla* by the Explants Adopted Differently

ZHANG Yan-ling, YAO Lei, SHEN Xiao-hui, HAO Jun-rong

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong Univ., Shanghai 201101, China)

Abstract: The impact on the effect of sterilize, control of browned and bud induction by the time and part of plant for selecting explants had been studied. The result indicated that the effect of sterilize and control of browned would be better if the axillary was adopted during the 4~5th month of the year, with the rate of pollution under 8.94% and the rate of browned under 7% respectively; When the new sprout stems located in the 2~3th burl of plant was selected as explants and were cultured in the $MS+6-BA\ 1.0\ mg\cdot L^{-1} + IBA\ 0.1\sim 0.3\ mg\cdot L^{-1}$ medium for bud axillary induction, the buds grew normally and multiplied quickly, with the multiplication coefficient being 3 when the buds were transferred every 20 days.

Key word: lemon verbena; tissue culture; explant

柠檬马鞭草(*Lippia triphylla*)又名防臭木、香水木。为马鞭草科,马鞭草属,多年生灌木,株高可达120 cm,原产于热带南美洲的智利、阿根廷和秘鲁等地,在北非的摩洛哥也有栽培。柠檬马鞭草含有丰富的挥发油,是提取精油、食品、茶饮料等的主要原料,还有很高的药用价值^[1];因其特有的柠檬芬芳倍受人们的青睐,也可作为庭园绿化、净化空气的建植用材料。目前,国外只有关于柠檬马鞭草的栽培、药用等方面研究报道^[2,3],成熟的组培技术尚未见报道。由于柠檬马鞭草用种子繁殖极为困难,扦插繁殖又受环境温度、湿度及土壤酸碱性等诸多因素影响,成活率很低,远远不能满足市场需求,故对其进行繁殖技术研究有积极意义。

张艳玲等^[4]在柠檬马鞭草快速繁殖的培养基激素配方研究过程中发现外植体材料的老嫩程度和取材部位不仅影响材料的灭菌效果和控制褐化效果,还直接影响腋芽的诱导率,成为影响快速繁殖成功的主要因素。本试验从外植体的取材时间、取材部位两方面对柠檬马鞭草快速繁殖中的材料灭菌、褐化控制、

收稿日期:2005-09-29

基金项目:上海市科委重大专项(05DZ19104)——循环型生态农业示范园

作者简介:张艳玲(1965-),女,主管中药师,研究方向:药用芳香植物的开发利用;姚 雷为本文通讯作者。

腋芽诱导等培养环节的影响进行研究,旨在建立成熟的快速繁殖技术流程。

1 材料与方法

1.1 取材

本试验所用柠檬马鞭草是 2001 年从日本引进,扦插于上海交通大学农业与生物学院农场塑料大棚中,生长良好。取材时间为 4 月、5 月、6 月中旬,晴朗天气的 10:00 以前,用剪刀切取健壮植株地上部分 20 cm 处新生枝条,去除叶片。

1.2 外植体无菌体系的建立及褐化的控制

将去除叶片的新生枝条在洗洁精水中浸洗 20 min,然后用自来水冲洗 1 h,沥干,置于 70% 的酒精中快速搅拌 15 s,取出再转入含吐温-80 的 2% 次氯酸钠溶液中浸泡 10 min,其间用软毛刷不断刷拭材料尤其是腋芽部位,然后在超净工作台上取出,用无菌水冲洗 3~4 次,再用灭菌吸水纸将水吸干备用。

切取新生枝条顶芽下部 1、2、3、4 节带腋芽的茎段,接种到 MS 基本培养基上,每皿接种 10 个,设 10 个重复,于温室 25 ± 2 °C 暗培养。分别按 4 月、5 月、6 月 3 个不同取材时间统计灭菌效果和材料褐化情况。

1.3 腋芽诱导

将无污染不再褐化的带腋芽茎段,按 1、2、3、4 节分别接种到培养基 MS+ 6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 上,琼脂 $7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 5.8。培养温度为 25 ± 2 °C,光照时间为 $10\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,光照强度为 1 500 lx。观察腋芽开始萌发时间,20 d 后统计各皿中腋芽萌发数及增殖倍数,并以芽发育正常、长势旺、节间适中、苗无畸形、叶绿无黄化为标准,统计有效得苗数。

2 结果与分析

2.1 灭菌效果和褐化控制

本试验分别在 4 月、5 月、6 月中旬 3 个时间段进行,灭菌时间、灭菌方法、接种培养方法相同。接种培养方法采取将材料在接种后放入暗处培养,接种 1 周后统计灭菌效果、材料褐化情况。根据有效材料数来确定最佳取材时间。结果显示:在 4、5 月间切取的新生枝条,灭菌效果好,污染率在 8.94% 以下,材料的褐化率控制在 7% 以下;而在 6 月份取材的污染率和褐化率都高于 4、5 月间数值。由此可见,选用 4、5 月份期间取材效果最佳(表 1)。

表 1 不同取材时间对柠檬马鞭草灭菌效果和褐化控制的影响

Table 1 The impact on the effect of sterilize and control of browned by the different time for adopting explants

取材时间 Time to adopt buds	接种数 No. of grow	污染数 No. of pollution	褐化数 No. of browned	有效茎段 No. of the valid stems
4月	100	7	4	89
5月	100	6	7	87
6月	100	16	33	51

2.2 腋芽诱导

将初代培养无褐化的有效茎段接种在腋芽诱导培养基上,10 d 后 1、2、3 茎节的基部有少量的愈伤组织形成,66% 的茎节腋芽开始萌发;4 茎节无腋芽萌发和愈伤形成,且又有许多材料褐化。20 d 后统计腋芽增殖数,并以长势旺、节间适中、苗无畸形、叶绿无黄化为标准来统计有效得苗数,按不同取材月份和不同取材节位进行统计分析,以确定最佳取材时间和取材部位。结果见表 2、表 3。

20 d 后观察腋芽萌发情况,发现不同取材时间其腋芽诱导顺序为 4 月>5 月>6 月,不同取材部位其腋芽诱导顺序为 2、3 茎节>1 茎节>4 茎节,1 茎节的腋芽诱导数虽多,但其苗生长势弱,有效苗数少。2、3 茎节腋芽诱导情况与 1、4 茎节差异显著,且 4 月、5 月的 2、3 茎节比 6 月的 2、3 茎节腋芽诱导数多。由此可见,在 4、5 月份期间,切取柠檬马鞭草新生枝条上 2、3 茎节带腋芽的幼嫩茎段为外植体,腋芽诱导效果好。

表 2 不同取材时间腋芽诱导效果
Table 2 The bud induction effect of different time for adopting explants

取材时间 Time to adopt buds	接种数 No. of grow	腋芽萌发数 No. of bourgeoning	有效苗数 No. of the valid seedling
4月	89	229A	170A
5月	87	221A	164A
6月	51	87 C	63 C

注:A,B,C 表示处理间 $P=0.01$,水平极显著差异。
Notes: A,B,C indicate significant difference level at 0.01 level.

表 3 不同取材部位腋芽诱导效果
Table 3 Effect of induction of bud adopted from different part of plant

取材时间 Time to adopt bud	材料部位 Part for adopting bud	接种数 No. of grow	腋芽萌发数 No. of bourgeoning	增殖倍数 Multiplication coefficient	有效苗数 No. of the valid seedling
4月	1 茎节	24	55 B	2.3	21 B
	2 茎节	24	72A	3.0	64A
	3 茎节	25	80A	3.2	67A
	4 茎节	16	22 C	1.36	18 B
5月	1 茎节	23	52 B	2.26	19 B
	2 茎节	24	76A	3.17	66A
	3 茎节	25	76A	3.04	65A
	4 茎节	15	17 C	1.13	14 B
6月	1 茎节	18	31A	1.7	15 B C
	2 茎节	14	34A	2.42	29A
	3 茎节	13	19 B	1.46	16 B
	4 茎节	6	3 C	0.5	3 C

注:A,B,C 表示处理间 $P=0.01$,水平极显著差异。
Notes: A,B,C indicate significant difference level at 0.01 level.

3 讨论

3.1 外植体的取材时间对灭菌效果的影响

柠檬马鞭草表面密布腺毛,客观上存在着消毒时间长又易造成材料损伤的矛盾,为组织培养带来不便。外植体的消毒是一个重要的环节,本试验参照杨增海等^[5,6]方法,在 2%次氯酸钠溶液中添加 Tween-80 浸泡 10 min,其间用软毛刷不断刷拭材料尤其是腋芽部位,这样不仅可避免对组织的破坏和机械损伤,也可使消毒液与材料充分接触。灭菌试验结果显示:在 4、5 月间切取的新生枝条灭菌效果好,污染率在 8.94%以下;而在 6 月份取材的污染率高于 4、5 月间的材料。这是由于在春季取的材料比夏季的嫩,材料本身受污染的机率也比夏季低。

3.2 外植体的取材时间对褐化控制的影响

就褐化的程度来讲,木本高于草本材料,老的外植体材料高于幼嫩的,生长旺盛期的高于生长初期的,分泌物多的材料高于分泌物少的^[7,8]。柠檬马鞭草属于木本芳香植物,加之其产生精油等次生代谢分泌物质较多,在组织培养时更易造成材料和培养基褐化,所以控制外植体褐化就成其组培技术的关键环节之一。结果显示:在 4、5 月期间选用新抽出枝条的幼嫩茎段,灭菌后的材料褐化程度轻,而在 6 月份选用的材料灭菌后褐化程度重。这是由于柠檬马鞭草精油分泌最高时期在生长最为旺盛的 6 月中旬^[9],4、5 月间取材避开了精油物质分泌高峰期,且此时的材料幼嫩、分泌物含量相对较少^[10],木质化程度也低于 6 月份。

此外,消毒液浓度高、消毒时间长都易引起材料的褐化^[11],为此,在消毒时严格控制消毒液浓度和消毒时间,有效地控制了材料的褐化。

3.3 外植体的取材部位对腋芽诱导的影响

组织培养无性快繁技术能够保存优良品种的遗传稳定性和一致性,并且除去顶芽,可以解除顶端优势,腋芽可不断分化和生长^[12]。本试验分别在 4、5、6 月选用新抽出枝条顶芽下部 1、2、3、4 节带腋芽的茎段

为外植体,进行腋芽诱导试验,结果显示:4、5月间取第2、3节带腋芽的幼嫩茎段腋芽萌发数高,分化倍数为2~3倍。

参考文献:

- [1] Carnat A, Carnat A P. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea [J]. *Fitoterapia*, 1999, 70(1): 44-49.
- [2] 姚 雷. 芳香植物[M]. 上海: 上海教育出版社, 2002. 61-62, 110.
- [3] Vogel H, Silva M L. Seasonal fluctuation of essential oil content in lemon verbena [J]. *International Society horticultural science*, 1999, 70(6): 44-49.
- [4] 张艳玲, 姚 雷, 申晓辉, 等. 柠檬马鞭草快速繁殖技术研究[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(11): 2325-2329.
- [5] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1999. 48-52, 82-85.
- [6] 张艳玲, 姚 雷, 申晓辉. 芳香植物唇萼薄荷组织培养中的污染控制[J]. *上海农业学报*, 2005, 21(1): 4-6.
- [7] 叶 梅, 王伯初, 段传人. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(4): 426-428.
- [8] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. *园艺学报*, 2000, 27(S0): 481-486.
- [9] 沈校军, 姚 雷, 黄 健. 柠檬马鞭草在不同生长期精油含有率及组分变化的研究[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2004, 22(1): 22-25.
- [10] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 83-84.
- [11] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2003. 50-90, 61-64, 153-157.
- [12] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 26-31, 62-82.

(上接第 156 页)

- [6] Punja Z K. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii* *C. melo* and *C. meluliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1990, 21: 93-102.
- [7] Mohiuddin A K, M Chowdhury M K U, et al. Influence of silver nitrate on cucumber *in vitro* shoot regeneration [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 51: 75-78.
- [8] 赵军良, 马丽蓉, 李昌华. 黄瓜子叶组织培养再生植株[J]. *山西农业科学*, 1996, 24(1): 39-41.
- [9] Fangming Xiao, S. Mark Goodwin, Yanmei Xiao, et al. Arabidopsis CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type genes and is required for cuticle development [J]. *EMBO*, 2004, 23: 2903-2913.
- [10] 孙兰英, 卢淑雯. 黄瓜组织培养研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2004, (4): 25-27.
- [11] Plader W, Malep sz S, Burza W, et al. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Euphytica*, 1998, 103: 9-15.
- [12] Vassilia A D, Antonios K D. Effect of genotype and explant type on regeneration frequency of tomato *in vitro* [J]. *Acta Hort*, 1997, 447: 231-234.
- [13] J S Han, C K Kim, S H Park, et al. *Mok* Agrobacterium-mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl) [J]. *Plant cell reports*, 2005, 23: 692-698.
- [14] Clark M S. 植物分子生物学-实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 3-4.
- [15] 梅 茜, 张兴国. 黄瓜组织培养研究[J]. *西南农业大学学报*, 2002, 24(3): 266-267.
- [16] 贾士荣, 罗美中, 林 云. 黄瓜胚性细胞悬浮培养及原生质体的植株再生[J]. *植物学报*, 1988, 30(5): 463-467.
- [17] Mohiuddin A K M, Chowdhury M K U, Zaliha C, et al. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1997, 51: 75-78.
- [18] 张 鹏, 凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究[J]. *植物学报*, 1995, 37(11): 902-908.
- [19] Holford P, Hernandez N, Newbury H J. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 11: 196-199.
- [20] Howe G T, Goldfarb B, Strauss S H. Agrobacterium-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1994, 36: 59-71.
- [21] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 392.