

正交设计在驱蚊草组织培养中的应用

陈政, 李程斌, 何家宝, 郑艳, 杨雪

(安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要:以驱蚊草茎、叶为外植体, 筛选诱导愈伤组织、丛生芽增殖及生根的最佳培养基。结果表明: MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L 对愈伤组织的诱导效果最好; MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L 为丛生芽增殖的最佳培养基; 1/2MS+NAA 0.3 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L 生根效果最好。

关键词:驱蚊草; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-2443(2008)04-0364-06

牻牛儿苗科(Geraniaceae)天竺葵属(*Pelargonium*)植物驱蚊草(*Pelargonium × citrenella*), 又称蚊净香草, 为澳大利亚植物学家 Mr. Drik Van Lenan 以中国的香茅草和澳大利亚的天竺葵为亲本, 通过植物细胞分离、融合、基因重组等技术培育出来的一种多年生草本芳香植物。全株味辛性温, 具抗菌、抗疟、抗癌、利尿降压等作用, 主要用于治疗风湿、疝气、阴囊湿疹、疥癣等^[1]。除药用外, 驱蚊草主茎柔软, 生长期枝叶造型可人为改变而被制成各种盆景美化环境, 具较高的观赏价值; 当温度超过 15℃ 时, 因植株自身散发出的香茅醇、香茅醛等清新淡雅具柠檬香味的物质可以驱蚊、除异味和净化空气等, 被用作化妆品和食品香精等的母体调配香料^[2]。然而, 驱蚊草虽能正常开花但因种子不育而不能正常繁殖, 扦插(尤其连续扦插)繁殖不仅效率低且影响其经济价值。如何利用组织培养技术来确保种性稳定、快速增加幼苗数量, 实现驱蚊草的低成本高效率、高繁殖一直是人们研究的课题^[3-5]。本研究旨在利用植物组织培养技术, 筛选驱蚊草快速繁殖的最佳培养基以建立驱蚊草完整的生产流程。

1 材料与方法

实验所用驱蚊草植株经作者鉴定学名后, 栽种在安徽师范大学药用植物学实验室以供随时取材需要。

1.1 外植体的处理和无菌苗的获得

选取健壮驱蚊草茎、叶, 先用洗衣粉洗去表面灰尘后再用流水冲洗, 酒精、升汞消毒后无菌水冲洗 6-8 次, 之后将茎切成长约 1cm 的小段、叶切成 0.5cm×0.5cm 的方块, 接种到 MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.2 mg/L+2,4-D 0.1mg/L 培养基中得到无菌苗, 将无菌苗的茎、叶剪切接种到预先配制好的含不同浓度梯度的诱导愈伤组织和丛生芽分化的激素培养基中。

1.2 愈伤组织诱导和丛生芽分化

以 MS 为基本培养基进行愈伤组织诱导和丛生芽分化。其中 6-BA 浓度(单位: mg/L, 以下同)设 0.1、0.5、1.0 三个水平; NAA 浓度设 0.1、0.2、0.5 三个水平; 2,4-D 浓度设 0.1、0.2、0.5 三个水平, 正交设计共 9 个处理(表 1), 每处理重复 3 次; 同时统计愈伤组织的诱导率、污染率、褐化率和玻璃化率。

1.3 丛生芽增殖

以诱导产生的丛生芽为材料, 将其切分成小块,

表 1 正交实验(L9(3⁴))

Tab 1 Orthogonal design(L9(3⁴))

编号	暗培养天数 (d)	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	2,4-D 浓度 (mg/L)
1	0	0.1	0.1	0.1
2	0	0.5	0.2	0.2
3	0	1.0	0.5	0.5
4	3	0.1	0.2	0.5
5	3	0.5	0.5	0.1
6	3	1.0	0.1	0.2
7	5	0.1	0.5	0.2
8	5	0.5	0.1	0.5
9	5	1.0	0.2	0.1

收稿日期: 2007-10-26

基金项目: 安徽师范大学博士启动基金。

作者简介: 陈政(1975-), 男, 安徽肥西人, 硕士研究生。通讯作者: 郑艳(1967-), 安徽石台人, 教授, 博士。Email: zhengy@amail.ahuu.edu.cn

接种到增殖培养基中进行丛生芽增殖培养并统计丛生芽的增殖系数(增殖量/原质量).增殖培养基设为:

- ①MS+6-BA0.2+NAA0.1+AgNO₃1.0
- ②MS+6-BA0.5+NAA1.0+AgNO₃1.0
- ③MS+6-BA1.0+NAA0.1+AgNO₃1.0
- ④MS+6-BA0.2+NAA0.5+AgNO₃1.0
- ⑤MS+6-BA2.0+NAA0.1+AgNO₃1.0

1.4 生根培养

从增殖的芽丛中切取单个芽苗(高 1.5cm 以上)接种到生根培养基中并统计生根情况和生根率.生根培养基设为:

- ①MS+AgNO₃1.0
- ②1/2MS+AgNO₃1.0
- ③1/2MS+NAA0.3+AgNO₃1.0
- ④1/2MS+NAA0.5+AgNO₃1.0

以上各培养基均附加琼脂 6-8g/L,蔗糖 3%,pH 调至 5.8;培养温度为 25±1℃,光照强度为 2000Lux.

1.5 炼苗和移栽

选取根多、根系健壮的幼苗,将其培养瓶移出光照培养箱,放在 18-25℃ 的室温下进行炼苗.炼苗结束后,将幼苗从培养瓶中取出,洗净根部的培养基,将其移栽到已经过灭菌并完全冷却的基质(沙:珍珠岩:营养土=1:1:2)中.

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和丛生芽分化

所用 9 种培养基中均有愈伤组织的产生和丛生芽出现.接种 3-4d 后茎端开始膨大、叶片增厚弯曲、颜色变浅,愈伤组织逐渐增大并出现点状突起,15-25d 后愈伤组织基本形成并产生绿色的丛生芽.各种不同的培养基分化效果不同,其中 MS+6-BA0.1+NAA0.1+2,4-D0.1+AgNO₃1.0 培养基中愈伤组织产生最快、诱导率最高,丛生芽多,芽壮(表 2,图 1-a,b).

表 2 不同激素配比对驱蚊草愈伤组织诱导的影响

Tab 2 Effect of different hormone allocated proportion on inducing callus tissues of *Pelargonium × citrenella*

处理号	外植体 (个)	产生愈伤组织 的外植体(个)	愈伤组织 诱导率(%)	污染的外植体 个数(个)	污染率 (%)	褐化的外植体 个数(个)	褐化率 (%)	玻璃化外植体 个数(个)	玻璃化率 (%)
1	15	14.67	97.8	0	0	0	0	0	0
2	15	8	53.3	1	6.7	0	0	0	0
3	15	11.3	75.6	2	13	0	0	0	0
4	15	11.3	75.6	1.7	11.1	1	6.7	0	0
5	15	9.67	64.4	1.3	8.9	1	6.7	0	0
6	15	6.3	42.2	1	6.7	0	0	1	6.7
7	15	5.3	35.6	1.3	8.9	0.67	4.4	0	0
8	15	5.7	37.8	0.33	2.2	1	6.7	0	0
9	15	8.3	55.6	0	0	0.67	4.4	2	13.3

2.2 丛生芽增殖

表 3 不同激素配比对驱蚊草丛生芽增殖的影响

Tab 3 Effect of different hormone allocated proportion on inducing lateral bud of *Pelargonium × citrenella*

处理号	培养基(mg/L)	植入外植体质量(g)	增殖的质量(g)	增殖系数
1	MS+6-BA0.2+NAA0.1+AgNO ₃ 1.0	1.279	0.993	0.776
2	MS+6-BA0.5+NAA1.0+AgNO ₃ 1.0	1.835	0.86	0.469
3	MS+6-BA1.0+NAA0.1+AgNO ₃ 1.0	1.498	0.291	0.194
4	MS+6-BA0.2+NAA0.5+AgNO ₃ 1.0	1.513	0.491	0.325
5	MS+6-BA2.0+NAA0.1+AgNO ₃ 1.0	1.105	0.395	0.357

将丛生芽切成单个芽体接种到增殖培养基中,均有不同程度的增殖,其中以 MS+6-BA0.2+NAA0.1+AgNO₃1.0 培养基的增殖效果最好.丛生芽生长快,密集且健壮,增殖系数达 0.776(表 3,图 1-c).

2.3 根的发生

选取长 2-3cm 的苗接种到生根培养基中,约 5d 在外植体的基部出现白色米粒状根原基,7-15d 长出完整的根系(图 1-d).其中 1/2MS+NAA0.3+AgNO₃1.0 培养基的生根效果最好,生长速度快,根粗壮,根系多,生根率为 100%(表 4).

表 4 不同激素配比对驱蚊草生根的影响

Tab 4 Effect of different hormone allocated proportion on rooting of *Pelargonium × citrenella*

处理号	培养基	外植体个数(个)	生根的外植体个数(个)	生根率(%)	生根状况 (每棵生根数、根健壮与否等)
1	MS+AgNO ₃ 1.0	20	16	80	根少、细弱
2	1/2MS+AgNO ₃ 1.0	20	19	95	根少、细弱
3	1/2MS+NAA0.3+AgNO ₃ 1.0	20	20	100	根多、粗壮
4	1/2MS+NAA0.5+AgNO ₃ 1.0	20	19	95	根多、粗壮

3 结论与讨论

激素是组织培养过程中影响器官分化的关键因素,器官的形成受制于培养基中细胞分裂素和生长素之间的相对浓度比例,而不是激素的绝对浓度^[6-8].目前驱蚊草微繁研究中,所用植物激素的组合是否最佳难以比较^[3-5,10].本研究采用正交实验设计的方法,大大减少了试验次数、简化了实验方法,在优化愈伤组织诱导和丛生芽分化等培养基的同时提供了驱蚊草组织培养较完整的生产流程(图 1:a-g).

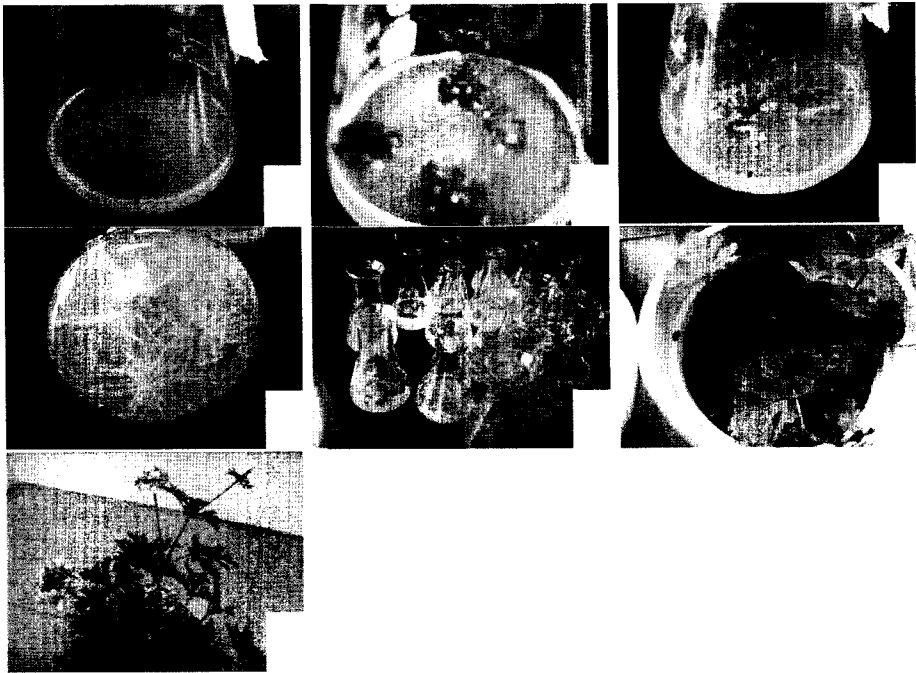


图 1 驱蚊草的微繁生产流程

a 外植体 b 愈伤组织 c 丛生芽增殖 d 生根 e 炼苗 f 移栽 g 开花

Fig.1 Process of producing *Pelargonium × citrenella* by using plant tissue culture technology

a: explants; b: callus tissues; c the inducing lateral bud of *Pelargonium × citrenella*; d the rooting of shoots of *Pelargonium × citrenella*; e the domestication of *Pelargonium × citrenella*; f the transplant of *Pelargonium × citrenella*; g the efflorescence of *Pelargonium × citrenella*.

3.1 首先建议在驱蚊草产业化育苗时,以 MS+6-BA0.1mg/L+NAA0.1mg/L+2,4-D0.1mg/L+AgNO₃1.0 mg/L 培养基诱导愈伤组织、以 MS+6-BA0.2mg/L+NAA0.1mg/L+AgNO₃1.0 mg/L 培养基进行丛生芽增殖培养、以 1/2MS+NAA0.3mg/L+AgNO₃1.0 mg/L 培养基进行生根培养.

3.2 用驱蚊草茎尖、茎段和叶片作外植体进行的组织培养均取得了较好效果. 在大规模微繁期间,即使外植体一开始进行了严格的表面消毒,某些病原菌(特别是内生细菌)可能依然存在,而内生细菌外被荚膜,很难杀死^[9]. 本试验通过预试验首先得到无菌苗,再从中挑选无污染、无褐化的健壮苗作为外植体进行试验,在降低试验污染率的同时大大提高了产率.

3.3 褐化是指外植体或愈伤组织在培养过程中,自身组织从表面向培养基释放褐色物质,以致培养基逐渐变成褐色,外植体、愈伤组织也随之进一步褐变而死亡的现象. 一般认为这是组织中酚类物质被氧化成褐色的醌类物质所致. 随着激素含量的增加,驱蚊草愈伤组织诱导过程中也有此现象^[10]. 针对驱蚊草的褐化现象,本试验采取在培养基中加入一定量的 AgNO_3 的方法,褐化率下降明显. 因此,在驱蚊草微繁时,适当添加一些抗氧化剂、吸收剂是十分必要的.

3.4 本研究初步建立起驱蚊草产业化育苗体系:茎、叶外植体→愈伤诱导→丛芽增殖→炼苗→移栽. 实践证明运用上述技术体系生产驱蚊草种苗,不仅生产周期短、繁殖系数高,而且种苗不带菌的,同时还可以延迟倒苗时间、延长有效生育期,提高产量.

参考文献:

- [1] 杨春燕,邓凤霞,周吉源. 驱蚊草的研究进展[J]. 湖北林业科技, 2005,135(5):40-43.
- [2] 李大红,姚雷,黄健. 两种天竺葵的精油成分和矿物元素的研究[J]. 香料香精化妆品, 2004, (1):8-11.
- [3] 孙世孟,王维华,等. 驱蚊草离体培养及快速繁殖[J]. 莱阳农学院学报, 2004,21(4):310-311.
- [4] 胡本祥,张琳,杨鲁. 驱蚊草的组织培养研究[J]. 陕西中医学院学报, 2005,28(5):56-57
- [5] 李庆伟,梁明勤,杨丽红. 驱蚊草组培快繁技术研究初报[J]. 中国农学通报, 2005,21(12):299-300.
- [6] 黄平,王荔,杨艳琼,等. 正交设计在灯盏花组织培养中的应用[J]. 云南农业大学学报, 2006,21(4):160-163.
- [7] 李春斌,方宏筠,王关林. 药用植物菰术的组织培养快速繁殖与植株再生的研究[J]. 中草药, 2000,31(11):853-856.
- [8] 谢晓蓉,刘金荣,张以顺. 扶桑组培最佳培养基配方及不同激素水平影响研究[J]. 西北民族学院学报:自然科学版, 2000,37(12):35-37.
- [9] 李浚明,朱登云. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2005:264-265.
- [10] 江新国,刘杏泉. 驱蚊香草的组织培养和快速繁殖[J]. 江西林业科技, 2004, (5):19,21.

Application of Orthogonal Design in Tissue Culture of *Pelargonium* × *citrenella*

CHEN Zheng, LI Cheng-bin, HE Jia-bao, ZHENG Yan, YANG Xue

(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: The stems and leaves of *Pelargonium* × *citrenella* were cultured as explants in different media with different hormone. And optimal culture medium was explored for the rapid propagation of the plant. The results showed that MS+6-BA0.1mg/L+NAA0.1mg/L+2,4-D0.1mg/L+AgNO₃1.0mg/L, MS+6-BA0.2mg/L+NAA0.1mg/L+AgNO₃1.0mg/L and 1/2MS+NAA0.3mg/L+AgNO₃1.0mg/L were most suitable for inducing callus tissues, proliferating buds and rooting of microshoots respectively.

Key words: *Pelargonium* × *citrenella*; tissue culture; rapid propagation