

文章编号: 1000-5277(2006)01-0072-05

驱蚊草组织培养及其再生体系的建立与优化

董倩, 李凤玉*

(福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007)

摘要: 通过对驱蚊草离体叶片和茎段的培养及植株再生的研究, 成功地建立了驱蚊草组织培养快繁技术体系。用0.1%升汞对叶片、叶柄和茎段进行消毒, 最佳消毒时间分别为6.5、6.0、7.0 min; 叶片和茎段不定芽诱导的最适培养基为MS+BA (1.0 mg/L) +NAA (1.0 mg/L), 叶柄为MS+BA (0.5 mg/L) +NAA (0.5 mg/L); 不定芽的最适增殖培养基为MS+BA (0.75 mg/L) +NAA (0.6 mg/L) +GA₃ (0.2 mg/L), 增殖倍数为6.1; 最适生根培养基为1/2 MS培养基, 生根率92%, 平均每株生根数为10条。

关键词: 驱蚊草; 组织培养; 再生体系

中图分类号: Q943.1; S336

文献标识码: A

The Establishment and Optimization of the Regeneration System of *Mozzie buster* in Vitro

DONG Qian, LI Feng-yu

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: By studying the culture of the detached leaves and stems and the regeneration of *Mozzie buster* plantlets, the experimental-system of rapid propagation of *Mozzie buster* in vitro have been successfully established. With 0.1% HgCl₂, the optimum sterilization times for leaves, petioles and stems are 6.5, 6.0, 7.0 min respectively. The most suitable medium for the initiation of adventitious buds from leaves and stems is MS medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA, and that from petioles is MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA. The best medium for the propagation of adventitious buds is MS medium supplemented with 0.75 mg/L BA, 0.6 mg/L NAA and 0.2 mg/L GA₃. The ratio of buds propagation is 6.1, 1/2 MS medium is most suitable for the rooting of shoots. The rate of rooted shoots is 92% and the average number of roots per shoot is 10.

Key words: *Mozzie buster*; tissue culture; regeneration system

驱蚊草 (*Mozzie buster*), 又名净蚊香草, 是荷兰遗传学家迪克经多年潜心研究而得, 它是非洲的天竺葵 (*Geranium*) 和中国的香茅草 (*Cymbopogon citrates*) 的细胞融合的产物。香茅草含有多种精油, 主要有香茅醛 (citrosa), 还有香茅醇、金合欢醇和二戊烯等。天竺葵能通过叶片释放大量气体。驱蚊草结合了二者的特点, 可以通过叶片散发一种驱蚊物质——香茅醛。香茅醛是一种常用香料, 柠檬香气, 具有良好的驱蚊效果, 对人体无害, 从而可以间接地预防由蚊虫传播的疾病。经科学鉴定, 一盆冠幅直径为20~30 cm的驱蚊草的有效驱蚊面积可达15 m²左右。

驱蚊草能正常开花, 但由于是融合体, 所以种子不育。用常规扦插的方法繁殖率低, 因此采用离体快速繁殖技术才是实际可行的技术手段。本文作者旨在建立和优化驱蚊草的组织培养及再生体系, 为

收稿日期: 2005-03-08

基金项目: 福建省教育厅基金资助项目 (JB02162)

作者简介: 董倩 (1981—), 女, 辽宁辽阳人, 硕士研究生, 主要从事植物生理生化研究。

* 通讯作者: fyli@fjnu.edu.cn

驱蚊草的商业化生产提供基础技术资料。

1 材料与方法

1.1 外植体的消毒

驱蚊草的茎和叶用流水冲洗 2 h, 用 75% 酒精漂洗 30 s, 无菌水洗 2~3 次, 再用 0.1% 升汞经不同时间消毒后, 用无菌水洗 6~8 次, 然后将叶片切成含主脉近叶柄端约 0.5 cm² 大小的叶块, 茎和叶柄切成长 0.5 cm 的小段, 备用。

1.2 不定芽的诱导

上述外植体接种于以 MS 为基本培养基的含不同体积分数 BA 和 NAA 激素组合的 10 种不定芽启动培养基中, 各种培养基均加入蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, 调 pH 值至 5.8。培养条件是: (25±1)℃, 光强为 2000 lx, 光照每天 13 h。

1.3 芽的增殖和壮苗

将诱导出的不定芽接种于以 MS 为基本培养基的含不同激素组合的增殖培养基中, 进行不定芽的增殖和壮苗, 各种培养基均加入蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, pH 5.8。培养条件同上。

1.4 根的诱导

将经过增殖和壮苗的驱蚊草无菌苗切成单株, 转到生根培养基中, 观察不同生根培养基对驱蚊草幼苗生根的影响, 并筛选最适生根培养基。

1.5 移栽及后期护理

驱蚊草幼苗生根后, 打开瓶盖, 置阴凉处炼苗 2~3 d。用清水洗净幼苗根部培养基, 于傍晚将幼苗种植于经高压灭菌过的土壤 (1:2) 中, 用 0.1% 多菌灵溶液浇透, 放置于遮光率为 60% 的阴棚下培养, 前一周不要额外浇水, 只要喷湿叶面, 保持介质湿润即可。4 周后浇施稀的营养肥 (1/10 MS), 每周一次, 大约一个半月后, 当小苗根系与介质抱紧成团时, 即可将小苗移栽定植。驱蚊草对土壤无特殊要求, 土壤平时偏干, 略显湿润即可。其适宜生长温度为 10~40℃ 左右。

2 结果与分析

2.1 消毒时间对外植体成活率的影响

培养 7 d 后, 统计不同消毒时间对外植体污染率 (污染的外植体数 / 总外植体数 × 100%) 和成活率 (成活的外植体数 / 未污染的外植体数 × 100%) 的影响, 结果见表 1。

从表 1 可以看出茎段的最佳消毒时间是 7.0 min, 叶柄的最佳消毒时间是 6.0 min, 叶块的最佳消毒时间是 6.5 min。

表 1 不同消毒时间对外植体的影响

外植体	消毒时间/min	外植体数	污染率/%	成活率/%
茎段	6.0	15	100.0	0.0
	7.0	16	31.6	76.9
	8.0	16	23.5	53.8
叶柄	5.0	115	21.4	43.9
	6.0	115	14.8	81.0
	7.0	98	34.5	0.0
叶块	6.0	83	46.0	0.0
	6.5	84	40.9	45.5
	7.0	86	11.1	8.3

2.2 不同激素组合对外植体不定芽诱导的影响

将外植体接种 20 d 后, 统计不同激素组合培养基对不定芽诱导的影响, 结果见表 2。结果显示: (1) 叶块在 No 4、No 5、No 7 培养基上均能产生不定芽, 但 No 5 培养基 (BA 1.0 + NAA 1.0) 诱

导不定芽较多且较快. 一般是在叶脉切口处和叶片叶柄端切口处的细胞先脱分化形成愈伤组织, 再由愈伤组织分化形成不定芽^[1], 这可能是叶脉维管束的形成层细胞及薄壁细胞的全能性较好, 能够诱导产生不定芽 (见图 1: 1~2). (2) 茎段也可以诱导产生不定芽, 其中以 No 5、No 7 (BA 2.0+NAA 0.5) 培养基的效果较好, 茎段经过脱分化——再分化的过程形成大量不定芽. 而其他培养基中的茎段大部分只是表现为腋芽生长. (3) 叶柄在 No 1、No 3、No 5、No 9 培养基上均能产生不定芽, 以 No 1 培养基 (BA 0.5 + NAA 0.5) 的诱导效率最高. (4) 不同的外植体需要不同的诱导条件. 可见对于叶块和茎段的最适诱导培养基是 No 5, 而对于叶柄的最适诱导培养基则是 No 1.

表 2 不同激素组合对外植体诱导不定芽的影响

序号	BA+NAA/ (mg · L ⁻¹)	叶块		茎段		叶柄	
		外植体数	启动情况	外植体数	启动情况	外植体数	启动情况
1	0.5+0.5	25	/	6	—	11	++
2	0.5+1.0	25	/	6	+	11	—
3	0.5+2.0	25	—	6	/	12	+
4	1.0+0.5	25	+	7	—	12	—
5	1.0+1.0	25	++	6	++	12	+
6	1.0+2.0	25	—	7	+	12	—
7	2.0+0.5	26	++	6	++	12	—
8	2.0+1.0	26	—	6	+	13	—
9	2.0+2.0	26	—	6	+	12	+
10	0.0+0.0	25	/	7	+	8	—

注: “—”: 未启动; “+”: 启动且有少量不定芽 (平均每个外植体产生的不定芽少于 5 个); “++”: 启动且有大量不定芽 (平均每个外植体产生的不定芽大于 5 个); “/”: 由于污染和死亡而没有统计结果的

2.3 不同激素组合对驱蚊草丛生芽增殖的影响

本试验以 MS 为基本培养基, 按照正交表 L₉ (3⁴) 的设计, 制备好添加不同质量浓度和组合的 BA、NAA 和 GA₃ 的系列培养基, 再将丛生芽块随机接种于各培养基, 20 d 后统计每个组合的增殖情况和水渍化情况.

结果显示 No 12、No 16 号培养基有利于驱蚊草的增殖, 增殖率高, 水渍化程度低. 表 3 显示, 芽增殖效果和水渍化程度并不取决于参试激素中的任何一种, 也不受制于激素的某一质量浓度, 而是不同的激素组合产生显著不同的效果. 对表 3 所示正交试验结果进行分析, 可以获得如下线索: 对于芽增殖效果适宜的剂量和组合可能为: (BA 0.5+NAA 0.6+GA₃ 0.4) mg/L; 对于减轻水渍化有效的剂量和组合可能为: (BA 0.75+NAA 0.4+GA₃ 0.4) mg/L. 如果将上述二点结合起来, 可设计一个处理为 No 20: (BA 0.75+NAA 0.6+GA₃ 0.4) mg/L.

表 3 L₉ (3⁴) 激素组合对不定芽增殖的影响

序号	BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	GA ₃ / (mg · L ⁻¹)	接种芽块数	增殖情况	水渍化程度
11	0.50	0.2	0.2	7	—	+
12	0.50	0.4	0.4	7	+++	—
13	0.50	0.6	0.6	9	—	+++
14	0.75	0.2	0.4	7	—	+
15	0.75	0.4	0.6	8	—	+
16	0.75	0.6	0.2	6	++	—
17	1.00	0.2	0.6	6	—	+++
18	1.00	0.4	0.2	12	—	+++
19	1.00	0.6	0.4	6	+	++

注: 增殖列: “—” 无增殖, “+” 低增殖 (<3 倍), “++” 中等增殖 (3~5 倍), “+++” 高增殖 (>5 倍); 水渍化列: “—” 无水渍化, “+” 低水渍化 (0~1/4), “++” 中等水渍化 (1/4~1/2), “+++” 高水渍化 (1/2 以上)

将设计的培养基 No 20、No 12、No 16 以及不定芽启动最适培养基 No 7 组成后续试验表 4, 检验表 3 实验结果的分析 and 认识, 并获得较理想组合. 表 4 显示进一步的增殖培养试验结果还是以 No 16 的

增殖效果为最好(见图1:4)。同时为了降低水渍化,作者添加0.1%活性炭,结果发现添加活性炭有助于降低水渍化程度。

表4 不同激素组合对不定芽增殖的影响

序号	BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	GA ₃ / (mg · L ⁻¹)	接种芽块数	增殖芽总数	增殖倍数
7	2.00	0.5	0.0	42	198	4.71
12	0.50	0.4	0.4	48	191	3.98
16	0.75	0.6	0.2	40	244	6.10
20	0.75	0.4	0.4	38	184	4.84

注:增殖倍数=增殖芽数/组织块数

2.4 不同激素组合对驱蚊草生根的影响

生根培养转接后,分别于第8、15天统计不同培养基对生根速度以及平均根数的影响。结果如表5所示:(1)基本培养基质量浓度的高低,对驱蚊草的生根速度及生根数的影响较大,表现为1/2 MS>1/4 MS>MS。实验结果表明,驱蚊草组培苗生根培养时需要降低基本培养基的质量浓度,以1/2 MS为佳。(2)NAA的影响比较复杂:在以MS为基本培养基的生根培养中,适量的NAA有利于生根;但在1/2 MS、1/4 MS培养基中则无激素培养表现明显的早发根和平均根数多的结果,NAA则表现为延缓生根及根数减少的作用。(3)各种培养基所诱导的根在形态上无差别,均为白色、细长的大量侧根(见图1:3)。

表5 不同组合培养基对生根的影响

序号	基本培养基	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种株数	8 d	15 d	
				生根率/%	生根率/%	平均根数
21	MS	0.0	24	16.67	66.7	3.8
22	MS	0.1	23	16.67	78.3	5.4
23	MS	0.2	24	32.00	91.7	7.0
24	MS	0.4	20	45.83	90.0	5.2
25	1/2 MS	0.0	24	58.33	91.7	10.0
26	1/2 MS	0.1	25	32.00	92.0	8.3
27	1/2 MS	0.2	25	37.50	96.0	7.0
28	1/2 MS	0.4	23	50.00	91.3	8.2
29	1/4 MS	0.0	24	37.50	91.7	7.2
30	1/4 MS	0.1	24	29.17	91.7	7.0
31	1/4 MS	0.2	24	33.33	91.7	6.7
32	1/4 MS	0.4	24	24.00	91.7	6.6

注:基本培养基中1/2 MS、1/4 MS是指大量元素为MS基本培养基的1/2、1/4

2.5 移栽

采用以上方法移栽,一个月后的幼苗成活率达85%以上(见图1:5)。两个月后,发现有两种株型:(1)集中型——叶柄、节间短,整株显得非常集中,约占25%。(2)分散型——叶柄、节间长,整株显得非常分散,占75%以上。集中型和母株更相似。究竟是什么原因引起的株型变化,还有待进一步研究。

3 讨论

3.1 外植体的选择

本试验发现叶块、叶柄的叶柄端切口和茎段均可诱导产生不定芽。这和李正理等^[2]所报告的香叶天竺葵在叶插时首先在叶柄切口处形成愈伤,后在愈伤处形成芽和根的结果相一致。

叶产生不定芽的部位主要在叶片的叶脉切口处和叶片的叶柄端切口处,其形态发生过程基本为:外植体在切口处先脱分化形成愈伤组织,愈伤组织再分化形成不定芽。整个过程大约需要20 d。茎段通过两种途径形成不定芽:一是叶腋生芽,即腋芽生长;二是从茎段切口处细胞脱分化形成愈伤组织,再分化形成不定芽。

从以上叶块和茎段不定芽的诱导途径来看,二者有一定的共同点,即都是在有维管组织部位的切口处细胞启动,例如叶脉周围和叶片的柄端.这与细胞结构和细胞全能性是否良好保持有密切的关系.叶片的叶肉细胞,以及茎段的表皮细胞都是已经比较特化的细胞,而一般维管组织周围都有一层或多层的薄壁细胞,这些薄壁细胞的特化程度较低,比较容易脱分化进入再分化的过程^[3-4].

实验过程中发现一个有趣的现象,就是叶柄的接种方式严重影响叶柄的启动情况.当叶柄被平铺在培养基上培养时,叶柄只生长愈伤,并在一定时期后愈伤逐渐褐化死亡.结合前面的分析,叶块的叶柄端切口处最容易分化出不定芽,所进行的黄瓜离体子叶成花培养研究中,也有子叶柄必须带有残留子叶身才能培养成花的现象^[5].因此,作者认为叶片或子叶对叶柄或子叶柄具有滋养看护作用.然而情况更加复杂,当叶柄被插入培养基中培养时,则先愈伤化,然后分化大量的不定芽.可能是脱离了叶片的叶柄缺少了启动不定芽的必要的物质基础,平铺时维管组织无法从培养基中获得这些物质,所以不能启动,而当叶柄被插入培养基后,就可以充分的吸收营养,以满足启动不定芽时的物质和能量需求.这也间接的说明了叶片的滋养看护作用.

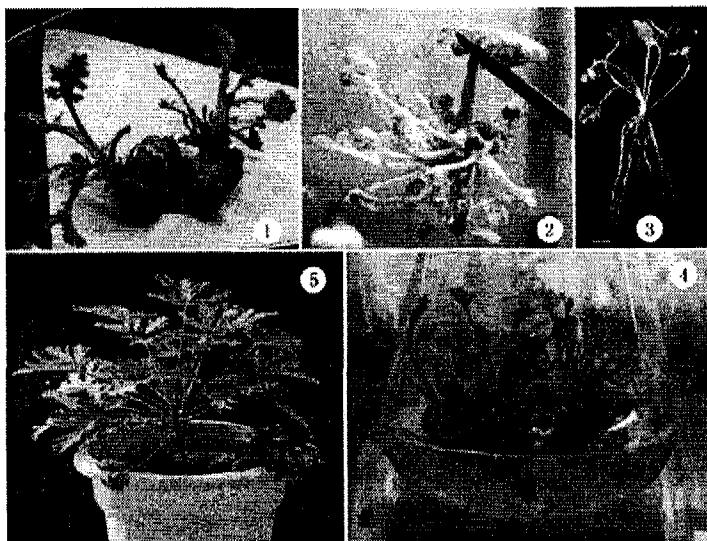
3.2 后期栽培时的遗传变异现象

驱蚊草是细胞融合的产物,本实验将材料继代多次,结果发现稳定性还比较高.前人对细胞融合产物的组织培养方面的研究还很少,尤其是在组培过程中融合细胞可能产生的形态、生理、生化等方面变化的报道很少.陈丽萍等^[6]曾对萝卜和甘蓝属间嵌合体再生苗的遗传稳定性做了分析,这种嵌合体在植株形态上的差异很大.而本实验中驱蚊草再生植株除了在株型上有所差异外,叶型、叶色、叶表绒毛和香味等都没有变化.

本文不仅以驱蚊草的茎尖为材料^[7-9],同时研究了叶柄、叶块的不定芽诱导和再生体系的建立,发现叶柄、叶块都可以诱导产生不定芽,尤其是叶块,其繁殖率高,这样可大幅度降低生产成本,为驱蚊草的规模化、工业化生产提供指导作用.另外研究过程中也发现一些现象,如叶柄接种方式的问题,平铺不能产生不定芽,而插入培养基就能产生大量不定芽,细胞融合产物——驱蚊草经组培后驱蚊效力是否改变等.这些都有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] 许智宏,刘桂云.烟草叶组织培养中愈伤组织和芽形成的细胞学观察[J].植物学报,1980,22(1):1-5.
- [2] 李正理,胡玉嘉.香叶天竺葵离体叶柄上发生不定根和不定芽观察[J].植物学报,1965,13(1):117-126.
- [3] 张新英,韩厉玲,李白玲.离体培养下白杜木质部的形态发生研究[J].植物学报,1989,31(7):489-494.
- [4] 柯善强,傅俊,桂耀林,等.裂叶悬钩子器官发生的细胞组织学观察[J].植物学报,1989,31(11):889-891.
- [5] 朱睦元,李亚南.生命科学探索与进展[M].杭州:杭州大学出版社,1998.650-653.
- [6] 陈丽萍,徐春霞,肖秋滨,等.萝卜和甘蓝属间嵌合体的离体繁殖[A].植物组织培养与试管育苗[C].北京:中国农业科学技术出版社,2004.110-115.
- [7] 样瑶君,黄明远,弓加文,等.驱蚊香草茎尖培养研究[J].乐山师范学院学报,2004,19(12):84-85.
- [8] 江新国,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.
- [9] 孙世孟,王维华,盖树鹏,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.



1. 驱蚊草叶脉切口处形成的不定芽; 2. 驱蚊草叶片叶柄端切口处形成的不定芽; 3. 生根后的驱蚊草幼苗; 4. 驱蚊草组织块分化的丛生芽; 5. 移栽一个月后的驱蚊草再生植株

图1 驱蚊草的离体培养