

驱蚊草组织培养及其愈伤组织诱导研究

吴林, 吴飞, 余家平, 蒋琳, 张晨晨, 王钰

(安徽大学生命科学学院 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 合肥 230039)

摘要:运用正交设计方法, 利用植物组织、细胞培养技术, 成功地建立了驱蚊草组织培养快繁技术体系。研究出: 不定芽诱导的最适培养基为 MS + 6-BA 0.2mg/L + NAA 0.3mg/L, 增殖倍数为 6.73; 生根培养基为 1/2MS + NAA 0.4mg/L, 平均每株生根数为 11.2 条, 生根率为 90.0%。通过对其离体茎段的培养研究实验, 得出驱蚊草的最适愈伤组织诱导培养基为 MS + 2,4-D 0.5mg/L + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.3mg/L, 发愈率为 93.3%, 愈伤组织多为淡黄色, 质地疏松。

关键词:正交设计; 驱蚊草; 组织培养; 愈伤组织; 培养基
中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A

文章编号:1008-9632(2007)04-0045-04

驱蚊草 (*Mozzie buster*), 又名净蚊香草, 芳香类天竺葵多年生草本植物, 两年后主干木质化, 四季不落叶, 无花^[1,2]。它是非洲的天竺葵 (*Geranium*) 和中国的香茅草 (*Cymbopogon citrates*) 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^[3]。天竺葵能通过叶片释放大气。驱蚊草结合了二者的特点, 可以通过叶片散发一种驱虫物质香茅醛。香茅醛是一种常用香料, 柠檬香气, 具有良好的驱蚊效果, 同时具有提神醒脑、抗菌、抗忧郁、缓解压力的作用。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 m 左右^[4]。目前, 在国际环保、花卉市场上供不应求, 但由于驱蚊草是体细胞杂合产物, 所以种子不育, 而用常规扦插的方法繁殖率又很低^[5], 因此采用离体快速繁殖技术才是实际可行的技术手段。

植物的愈伤组织诱导是进一步进行研究分化再生植株和建立细胞悬浮系的有效方法和手段。而目前大部分关于驱蚊草的研究还只是停留在组织培养水平上, 本文以茎段为研究材料, 研究在不同激素组合培养基上诱导驱蚊草愈伤组织的产生, 为今后利用其愈伤组织分化再生植株和进行细胞悬浮培养提供有效途径和技术支持。

1 材料与方法

1.1 外植体消毒与接种

取盆栽驱蚊草幼嫩侧芽, 滴加少许洗洁精, 放置流水下冲洗 2 h, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 0.1% 次氯酸钠消毒 6.5 min, 进行表面杀菌至无菌, 再用无菌水冲洗 8 次, 接种于培养基上, 诱导生芽。

1.2 不定芽的诱导

将上述外植体接种于以 MS 为基本培养基, 不同浓度 6-BA 和 NAA 激素配比的 9 种培养基中, 每种培养基接种 30 株, 每瓶 3 株, 重复 3 次。各种培养基均加入蔗糖 30 mg/L, 琼脂 6.5 mg/L, 调节 pH 值至 5.8, 培养条件为 (25 ± 2) °C 下 2000 lx 光强每天照 13 h。

1.3 不定芽增殖、壮苗与继代培养

在原培养基上培养 3 周后, 将诱导出的不定芽接种到基本 MS 培养基上, 培养基加入蔗糖 30 mg/L, 琼脂 6.5 mg/L, 调节 pH 值至 5.8, 培养条件同上。每隔 20 d 继代一次, 可得大量驱蚊草组培试管苗。

1.4 根的诱导

挑选长势较好的无菌试管苗, 切成单株, 接种到不同配方组成的生根培养基上, 每种培养基接种 10 瓶, 每瓶 3 株, 重复 3 次。培养条件同上。20 d 后记数生根数量和生根率, 选择合适的生根培养基。

1.5 愈伤组织诱导

取驱蚊草无菌苗的茎段, 切成 0.5~1 cm 长的小段, 接种到含有 MS 基本培养基和不同浓度 2,4-D、6-BA 和 NAA 激素配比的培养基上, 每种培养基接种

收稿日期: 2007-04-11

作者简介: 吴林 (1983-), 男, 研究生, 主要从事植物组织培养和细胞融合研究, E-mail: wuli0919@163.com;

通讯作者: 王钰, Tel: 0551-5108373, E-mail: yuwang800@hotmail.com。

基金项目: 安徽省人才基金项目; 安徽省教委项目

10瓶,每瓶三株,重复3次。各种培养基均加入蔗糖30 mg/L,琼脂6.5 mg/L,调节pH值至5.8培养条件为(25±2)℃下暗培养。25d后,观察愈伤组织生长状况,选择最优愈伤诱导培养基。

1.6 驯化移栽

驱蚊草成苗生根后,打开瓶盖,放置于阴凉处炼苗3~5d,再将瓶苗取出,用清水洗净根部培养基,稍微蘸取IBA(0.1mg/L)溶液移栽至经高温灭菌过的含有蛭石和草木灰(1:1)的基质中,放置于遮阴的环境下培养,保持环境温度25℃左右,适当光照。驱蚊草喜湿怕旱,但过度潮湿会导致其根腐烂发霉,所以前一周不要大量浇水,用清水喷洒叶面,保持基质湿润即可。大约2周以后适当浇稀释营养液(1/10MS)。4周后,等试管苗根部与基质抱紧成团,即可移栽至花盆中,放入温室中培养。按此方法,驱蚊草试管苗移栽成功率可达90%以上。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对不定芽诱导的影响

外植体接种到培养基上30d后,统计不同激素浓度变化对不定芽增殖的影响,结果见表1。

从表1的水平和水平均值和表2可以看出:在选择2个因子中,随着A、B因子含量水平的上升,诱导外植体产生丛生芽数量均呈上升趋势,且三个水平差异显著。但是随着激素水平的升高,从NO 6开始,丛生芽开始出现玻璃化,尤其NO 8、NO 9玻璃化现象更加严重,有半数以上出现玻璃化。所以,综合以上两种情况,最优培养基为NO 5:MS + MS + 6 - BA0.2 (mg/L) + NAA(0.3mg/L)。

表1 不同激素配比对不定芽诱导的影响
Table 1 The influence of different hormone allocated proportion to the initiation of adventitious buds

序号	A(6-BA)/(mg/L)	B(NAA)/(mg/L)	丛生芽数量/株	玻璃化情况
1	0.1 (1)	0.1 (1)	2.30	-
2	0.1 (1)	0.3 (2)	2.58	-
3	0.1 (1)	0.5 (3)	3.78	-
4	0.2 (2)	0.1 (1)	4.90	-
5	0.2 (2)	0.3 (2)	6.73	-
6	0.2 (2)	0.5 (3)	5.87	+
7	0.5 (3)	0.1 (1)	5.73	++
8	0.5 (3)	0.3 (2)	6.77	++
9	0.5 (3)	0.5 (3)	7.23	+++
K ₁	2.89	4.31		
K ₂	5.83	5.36		
K ₃	6.58	5.63		

注:“-”:无玻璃化现象;“+”:有少量玻璃化;“++”:玻璃化较多;“+++”:有很多玻璃化或大部分丛生芽出现玻璃化,括号内的数字代表激素含量水平,K为平均数,1、2、3表示浓度水平。

表2 6-BA, NAA对不定芽诱导影响的方差分析
Table 2 ANOVA of influence of 6-BA, NAA to the initiation of adventitious buds

变异来源	SS	DF	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
A	22.821	2	11.411	207.473**	3.37	5.53
B	2.919	2	1.460	26.545**		
误差	1.205	22	0.055			
总变异	26.945	26				

2.2 不同培养基配方对驱蚊草生根的影响

单株驱蚊草试管苗接种到培养基上20d后,将其取出洗净根部培养基,记数生根情况,结果见表3。

从表3结果可以得出结论:(1)基本培养基中大量元素的高低对驱蚊草组培苗生根有较大的影响,实验结果表明:基本培养基为1/2MS的生根数量普遍比MS为基本培养基的高很多。因此,在驱蚊草生根培养中应降低大量元素含量,1/2MS优于MS;(2)适量的NAA含量对生根有积极的影响,无论是在以MS为基本培养基还是1/2MS,添加NAA都能显著提高生根数量。但是,随着激素含量达到一定水平,开始显现副作用,生根数下降。因此,综合以上分析,得出结论,驱蚊草生根最优培养基为:1/2MS + NAA(0.4mg/L)。

表3 不同激素配比对驱蚊草生根诱导的影响
Table 3 The influence of different hormone allocated proportion to the rooting of shoots of *Mozzie buster*

序号	基本培养基	NAA/(mg/L)	接种茎段数/(个)	平均生根数/(条)	生根率/(%)
1	MS	0	30	2.3	16.7
2	MS	0.2	30	5.7	41.0
3	MS	0.4	30	7.3	56.7
4	MS	0.6	30	6.8	53.3
5	1/2MS	0	30	7.2	46.7
6	1/2MS	0.2	30	9.4	73.3
7	1/2MS	0.4	30	11.2	90.0
8	1/2MS	0.6	30	10.0	80.7

注:培养基配方中1/2MS是指大量元素为基本MS培养基的1/2

2.3 不同激素配比对驱蚊草愈伤组织诱导的影响

本试验以MS为基本培养基,按照正交表L₉(3⁴)的设计,将驱蚊草试管苗茎段切成0.5~1cm长的小段,接种到含有MS基本培养基和不同浓度2、4-D、6-BA和NAA激素配比的培养基上,25d后统计每个组合的愈伤组织诱导情况,按下述公式计算诱导率:

诱导率(%) = 形成愈伤组织外植体数(块)/接种外植体总数(块) × 100

从表4的水平和水平均值和表5可以看出,在选择3个因子中,随着A因子含量水平的上升,愈伤组织诱导率呈上升趋势,达到一定程度保持稳定;随着B因子含量水平的上升,发愈率呈上升趋势,且三个水平差异显著;随着C因子含量水平的上升,发愈率先上升

后下降,三个水平差异显著。这说明不同的激素及其含量水平对发愈率的影响趋势是不同的。激素A诱导发愈率 $A_2 = A_3 > A_1$, 但愈伤生长情况以 A_2 为最好, 所以, $A_2 > A_3 > A_1$; 激素B为 $B_3 > B_2 > B_1$; 激素C为 $C_1 > C_3 > C_2$; 最优培养基激素含量组合为 $A_2B_3C_1$, 即NO 6号培养基, 在这种激素组合培养条件下, 愈伤组织的生长状况也是最好的。

表4 $L_9(3^4)$ 激素对比对驱蚊草愈伤组织诱导的影响
Table 4 The influence of $L_9(3^4)$ hormone allocated proportion to the inducement of callus tissues of *Mozzie buster*

序号	A(2,4-D)/(mg/L)	B(6-BA)/(mg/L)	C(NAA)/(mg/L)	发愈率 (%)	颜色	疏松程度
1	0 (1)	0.5 (1)	0.3 (1)	26.7	白色	硬
2	0 (1)	1.0 (2)	0.4 (2)	40.0	白色	硬
3	0 (1)	2.0 (3)	0.5 (3)	56.7	白色	较硬
4	0.5 (2)	0.5 (1)	0.4 (2)	53.3	白色	较硬
5	0.5 (2)	1.0 (2)	0.5 (3)	73.3	淡黄	疏松
6	0.5 (2)	2.0 (3)	0.3 (1)	93.3	淡黄	疏松
7	1.0 (3)	0.5 (1)	0.5 (3)	63.3	褐色	较硬
8	1.0 (3)	1.0 (2)	0.3 (1)	80.0	褐色	较疏松
9	1.0 (3)	2.0 (3)	0.4 (2)	76.7	褐色	较疏松
K_1	41.13	47.77	66.67			
K_2	73.3	64.43	56.67			
K_3	73.3	72.23	64.43			

注: 括号内的数字代表激素含量水平 K 为平均数, 1, 2, 3 表示浓度水平

表5 $L_9(3^4)$ 激素对比对驱蚊草愈伤组织诱导影响的方差分析
Table 5 ANOVA of influence of $L_9(3^4)$ hormone allocated proportion to the inducement of callus tissues of *Mozzie buster*

变异来源	SS	DF	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
A	2069.81	2	1034.91	69.69**	3.37	5.53
B	947.85	2	473.93	31.91**		
C	165.27	2	82.64	5.56**		
误差	296.96	20	14.85			
总变异	3479.89	26				

3 讨论

3.1 激素

在植物组织培养过程中, 不同的激素浓度组合对试验结果有很大的影响。正交设计的运用, 能大大减少试验次数, 同时准确率也较高^[7]。本研究正是运用正交设计来筛选驱蚊草不定芽增殖和愈伤组织诱导的最佳培养基配方, 并取得了良好的效果。

驱蚊草为植物体细胞杂交的产物, 对组织培养有良好的反映, 用茎尖、叶片和茎段进行快速繁殖能起到良好的效果^[4,6]。本研究中选取茎尖为外植体材料进行不定芽诱导, 其增殖较快, 壮苗、生根及移栽成活率结果均较好, 与前人研究结果相符。在试验中, 也发现了一些问题, 例如在丛生芽诱导过程中, 随着激素浓度的加大, 会出现比较严重的玻璃化现象, 玻璃化的幼苗

在继代培养中会成批死亡。这种情况在其他植物组培中也时有发生, 如: 李慧等在银白杨不定芽诱导中, 不定芽的再生系数随着6-BA浓度的提高而明显下降, 同时玻璃化程度也加重; 蔡宣梅等在百合花丝研究中也指出, 过高浓度的6-BA会导致小鳞茎呈丛生状态, 且有玻璃化现象^[8,9]。因此, 较高的不定芽增殖率和无玻璃化是选择最优培养基的两个基本条件。在继代培养中, 选用不含任何激素的基本MS培养基培养, 并适当降低蔗糖含量和光照强度, 以降低玻璃化苗率。

3.2 愈伤组织

植物的组织培养效果受到各种因素的影响, 而植物生长素和细胞分裂素的浓度和配比是最为关键的因素^[10]。采用相同的培养基和培养条件, 不同的激素配比所形成的愈伤有较大差别, 形成愈伤组织的胚性也有较大差别。

实验结果表明: 在不加2,4-D激素的培养基中, 发愈率普遍偏低, 当添加0.5 mg/L 2,4-D时各种培养基愈伤组织诱导都有很大提升, 而其他两个因子则不呈现这种状况, 说明2,4-D在驱蚊香草愈伤组织诱导中起主导作用, 这与2,4-D是诱导愈伤组织活力最高的激素这一事实也相符。但是, 其负作用也很明显, 表现在浓度提高到1.0 mg/L时, 不但不提高发愈率, 反而使愈伤褐化死亡; 添加6-BA的培养基愈伤组织诱导率有升高的趋势, 而且适当的生长素与细胞分裂素的比例有利于愈伤组织的诱导^[11]。此外, 不同的外植体类型、培养基、切割方式和摆放方法都能对驱蚊香草愈伤组织诱导产生影响, 有待于进一步的研究。

3.3 褐化现象

本文在驱蚊草愈伤组织培养中发现, 随着激素含量特别是2,4-D含量的升高, 极易发生褐化现象, 且难以消除。同类现象在前人研究中也时有发生: 李冬杰等曾报道, 红豆杉属植物在愈伤组织培养中, 常发生褐化现象, 导致细胞活力降低、增殖生长缓慢甚至死亡^[12]。褐化是指植物材料在进行培养时, 外植体、愈伤组织细胞或培养基颜色变深, 呈现褐色, 一般认为这是由于外植体或愈伤组织细胞所分泌的酚类物质被氧化成有色有害物质(主要是醌类)所致^[13]。因此, 在选择最佳激素浓度的同时, 合适添加其他有效成分来抑制褐化有时候是必要的, 如李丽等在其论文中指出, 培养基中添加0.01~0.2 mg/L Vc能较为有效抑制愈伤组织褐化, Vc能在一定程度上抑制褐化, 可能由于其抑制了促进褐化的多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)的活性^[10]。

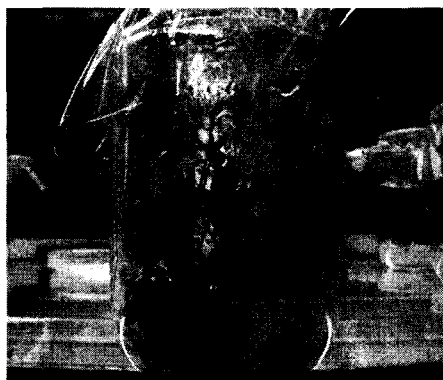


图1 驱蚊草组培苗

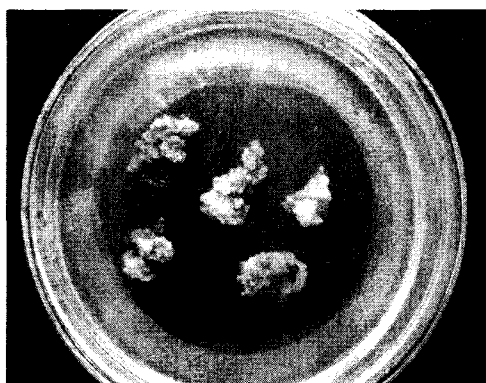


图2 驱蚊草愈伤组织

参考文献:

- [1] 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.
[2] 梁贵秋, 唐燕梅, 陆飞, 等. 驱蚊草的组织培养与快速

- 繁殖[J]. 广西热带农业, 2004, 94(5): 3~4.
[3] 和承饶, 寸守铤. 滇产驱蚊香草芳香油化学成分分析研究[J]. 云南化工, 2003, 30(5): 23~24.
[4] 崔群香, 朱士农, 刘卫东, 等. 驱蚊草组培快繁的工艺流程[J]. 江苏农业科学, 2005, (6): 94~95.
[5] 孙世孟, 王唯华, 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.
[6] 杨瑶君. 驱蚊香草的茎尖快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2005, (4): 110, 118.
[7] 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.
[8] 李慧, 陈晓阳, 等. 银白杨叶片不定芽再生影响因素的研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(3): 46~50.
[9] 蔡宣梅, 郑伟文, 等. 百合花丝组织培养试验[J]. 福建农业科技, 2001, (6): 13~14.
[10] 李丽, 何康, 等. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 复旦学报(自然科学版), 2006, 45(6): 705~707.
[11] 朱俊义, 刘雪莲, 秦佳梅, 等. 北五味子组织培养中愈伤组织的诱导[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(6): 41~42.
[12] 李冬杰, 张进献, 魏景芳, 等. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 95~98.
[13] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501~506.

Research on tissue culture and callus induction of *Mozzie buster*WU Lin¹, WU Fei¹, YU Jia - ping¹, JIANG Lin¹, ZHANG Chen - chen¹, WANG Yu¹

(Anhui Key Laboratory of Eco - engineering and Bio - technique, Department of Biology, Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract: Based on taking the orthogonal design experiments and by using the technique of plant tissue culture, the experiment - system of tissue culture and rapid propagation of *Mozzie buster* was successfully established. The result showed that: the most suitable medium for the initiation of adventitious buds was MS medium supplemented with 0.2 mg/L 6 - BA and 0.3 mg/L NAA, the ratio of buds propagation was 6.73; The best medium for the rooting of shoots was 1/2 MS medium supplemented with 0.4 mg/L NAA, the average number of roots per shoot was 11.2 and the rate of rooted shoots was 90.0%. The culture of the detached stems of *Mozzie buster* plantlets was studied, Result showed that the optimal medium for the inducement of callus tissues was MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2, 4 - D, 2.0 mg/L 6 - BA and 0.3 mg/L NAA, the rate of callus tissue inducement was 93.3% and the callus tissues were mostly yellowish and loose in texture.

Keywords: orthogonal design; *Mozzie buster*; tissue culture; callus; medium