

驱蚊香草叶片组织培养研究¹⁾

张子学, 孙金福, 丁为群, 崔广荣

(安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 实现驱蚊香草的快速繁殖。利用组织培养的方法, 采用激素调控技术, 对驱蚊香草叶片外植体进行脱分化、再分化、丛芽增殖及其生根技术研究。在添加 NAA 的 MS 培养基上, 驱蚊香草叶片能够形成愈伤组织, 并且在愈伤组织上有根的分化; 叶片在添加 BA 和 NAA 所有处理组合均有芽的分化, 最适宜的分化培养基: MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L; 丛芽增殖适宜的培养基: MS + BA 0.25 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 最佳的生根培养基: MS + NAA 0.05 mg/L。试管苗移栽基质以混合基质为宜。采用驱蚊香草叶片作为外植体利用组织培养的方法, 可以实现驱蚊香草的快速繁殖。

关键词: 驱蚊香草; 叶片培养; 快速繁殖

Tissue culture by the leaf blade of *Salvia officinalis*¹⁾

Zhang Zixue, Sun Jinfu, Ding Weiqun, Cui Guangrong

(Anhui Science and Technology University, Fengyang, 233100)

Abstract: Objective: Rapid propagation was achieved in driving mosquito herb. Method: Applying tissue culture method and hormone regulating technique, dis-differentiation, re-differentiation, cluster shoots proliferation and theirs rooting were studied in driving mosquito herb. Result: Leaves as explant can formed callus on MS of adding NAA and differentiated roots on callus in driving mosquito herb or differentiated Shoots on MS of all combinations adding BA and NAA. The best suitable medium of shoots differentiation in leaves is MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L. The best suitable medium of cluster shoots proliferating is BA 0.25 mg/L + NAA 0.1 mg/L. The best suitable rooting medium is MS + NAA 0.05 mg/L. The test tube seedlings were suitably transplanted in mixed matters. Conclusion: Applying leaves as explants, rapid propagation of seedlings can be achieved with plant tissue culture in driving mosquito herb.

Key word: driving mosquito herb; leaves culture; rapid proliferation

驱蚊香草, 又名蚊净香草, 是以天竺葵 (*Pelargonium hortorum*) 和香茅草 (*Cymbopogon citratus*) 为亲本, 通过细胞融合技术, 获得的具有新的遗传结构的芳香类植物。驱蚊香草能释放香叶醇、芳樟醇、香茅醇、异薄荷酮等^[1], 既能驱赶蚊虫, 又能抑制空气中有害细菌, 去除居室异味, 净化室内空气, 具有安神醒脑, 光洁皮肤等作用。其茎部柔韧, 易于造型, 也可制成盆景供观赏。其鲜干产品是提取芳香醇类的重要原料, 具有潜在的开发利用前景。

由于驱蚊香草是异源体细胞杂种存在花而不实的遗传缺陷, 不能进行有性繁殖, 生产上主要以扦插或压条方法进行无性繁殖, 但远远不能满足市场的需要, 本试验在引种驯化的基础上, 采用组织培养的方法^[2~3], 建立驱蚊香草的快速繁殖体系, 为实现驱蚊香草的工厂化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

驱蚊香草材料引自华中农业大学园艺学院, 试验于 2004 年 5 月~2004 年 12 月在安徽科技学院生物技术中心进行。

1.2 方法

试验首先以嫩芽和茎段为外植体, 采用常规的消毒和灭菌方法, 在 MS+NAA 0.05 mg/L 培养基上进行初代和继代培养, 在无菌材料满足需要的基础上, 对驱蚊香草组织培养进行较为系统的研究。

1.2.1 培养基配方。 愈伤组织诱导、芽的分化和增殖培养基: MS + BA (0.0, 0.25, 0.5, 1.0) mg/L + NAA (0.0, 0.05, 0.1, 0.2) mg/L 共 16 个处理, 其中 MS 处理为对照 (CK); 生根培养基: 1/2MS 及 MS 分别添加 NAA 或 IBA (0.0, 0.05, 0.1, 0.2) mg/L。

收稿日期: 2006-01-15

1) 基金项目: 安徽省科技厅项目 (04023069)

1.2.2 培养条件。培养室的温度控制在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照强度为 4000 lx, 光周期 12h/d。

1.2.3 培养方法

1.2.3.1 愈伤组织的诱导和芽的分化。将试管苗的叶片(包括带叶柄叶和无叶柄叶块)和叶柄分别接种到培养基上, 每瓶接种 6~8 个外植体, 每个处理接种 4 瓶。

1.2.3.2 增殖培养。将试管丛生芽切成小丛, 每丛 2~3 芽接种到增殖培养基上进行增殖培养, 接种 15d 后, 统计试验结果。

1.2.3.3 生根培养。将长势良好, 株高 3cm 左右的壮芽接种在生根培养基上, 每处理 8 瓶, 每瓶 4~5 株。

1.2.3.4 炼苗与移栽。试管苗生根培养 10d 左右, 苗高 5cm 以上, 根长 1~2cm, 不定根多, 幼苗长势旺盛, 便可进行移栽。移栽前洗去根部的培养基, 分别定植在细沙、田园土、珍珠岩和混合基质(细沙+田园土+珍珠岩 1:1:1)4 种不同基质的花盆中, 定植后 1 周内棚内相对湿度控制在 90%~100%, 温度控制在 $20 \sim 25^\circ\text{C}$, 缓苗后进行正常的管理。移栽后 20d 统计结果。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对叶片和叶柄外植体脱分化的影响

观察表明外植体接种 5d 后, 切口处开始膨大, 有少量白色的愈伤组织形成; 10d 后所有处理的大多数叶片、叶柄切口处愈伤组织明显增大(图 1A), 并且随着 NAA 浓度的提高, 愈伤组织的诱导率和愈伤组织

的增大有提高的趋势。并且添加 BA 与 NAA 复合处理形成的愈伤组织表面逐渐变成紫红色; 15d 后 CK 处理的外植体开始死亡, 仅添加 NAA 的处理, 其外植体所形成的愈伤组织生长停滞, 50% 左右的愈伤组织上分化出不定根。而添加 BA 与 NAA 的所有复合处理, 在叶片和叶柄切口处所形成的愈伤组织表面逐渐都变成紫红色(图 1B), 这种紫红色的愈伤组织随不同处理有不同程度芽的分化。

2.2 不同激素处理对叶片和叶柄外植体芽分化的影响

通过多次观察发现, 叶片和叶柄切口处的愈伤组织, 由乳白色变成紫红色是芽再分化的指示色。据观察接种 11d 后, BA0.25、BA0.25+NAA0.2 和 BA0.5+NAA0.05 等处理, 在叶片或叶柄切口处形成的紫红色愈伤组织上, 分化出可见的小芽(图 1C, D)。经过 15d 的培养后, 不同处理外植体分化结果见表 1, 由表 1 可以看出, 在试验区间范围内, 叶片外植体在低浓度 BA(0.25mg/L)下, 随着 NAA 浓度的提高, 分化率有逐渐下降的趋势; 相反在高浓度的 BA(1.0mg/L)下, 随着 NAA 浓度的提高, 分化率有逐渐升高的趋势; 当 BA(0.5mg/L)介于二者之间时, 随着 NAA 浓度的提高, 分化率有低—高一低的变化趋势。说明 BA 在驱蚊香草叶片外植体芽的分化中起主导作用, 在试验区间内低浓度的 BA 有利于提高叶片外植体芽的分化率, 中、高浓度的 BA 需要配合适当浓度的 NAA, 才能提高其分化率。

表 1 不同处理驱蚊香草叶片外植体的分化和丛芽的增殖

处理	组合(mg/L)		叶片外植体分化				丛芽的增殖				
	BA	NAA	接种数	分化数	分化率 (%)	差异 显著性	接种 芽数	增殖 芽数	平均数	差异 显著性	
1	0.25	0	27	7	25.9	c C	16	147	8.64	b A B	
2	0.25	0.05	23	6	26.1	c C	12	91	7.45	c B C	
3	0.25	0.1	20	4	20.0	d D	14	167	9.71	a A	
4	0.25	0.2	32	7	21.8	d D	11	82	7.45	c B C	
5	0.5	0	29	3	10.3	g G	12	100	8.33	b A B	
6	0.5	0.05	31	9	29	b B	9	70	7.78	c B C	
7	0.5	0.1	38	6	15.8	e E	9	71	7.89	c B C	
8	0.5	0.2	32	4	12.5	f F	9	70	7.78	c B C	
9	1.0	0	32	3	9.3	g G	9	63	7.00	c C	
10	1.0	0.05	34	3	8.8	g G	9	68	7.56	c B C	
11	1.0	0.1	20	3	15.0	e E	7	35	5.00	d D	
12	1.0	0.2	28	12	42.8	a A	12	51	4.25	d D	

2.3 不同激素处理对丛芽增殖的影响

由表 1 丛芽的增殖(图 1E)结果可以看出, 在试验区间范围内, 低浓度的 BA(0.25 或 0.5mg/L)与无或低浓度的 NAA(0~0.1 mg/L)有利于丛芽的增殖, 其中以 BA 0.25mg/L+NAA 0.1mg/L 丛芽的增殖数量最高, 平均增殖率达 9.71 倍; 在高浓度的 BA(1.0 mg/L)情况下, 丛芽的增殖率有所下降, 并且随着 NAA 浓

度的提高, 丛芽的增殖数量有明显下降的趋势。其中以 BA 1.0+NAA 0.2 处理丛芽的增殖率最低, 平均增殖率仅为 4.25。

2.4 不同处理对驱蚊香草生根的影响

接种处理 8d 后, 14 种不同的处理均能使驱蚊香草生根(图 1F, G)。但不同的处理之间存在明显的差异(表 2)。其中以 MS+NAA0.05 处理根的分化数最

多,单株生根数达 20.25;1/2MS 处理的生根数最少,仅有 4.33 条。根长以 1/2MS+IBA0.05 和 MS+NAA0.1 最长,长达 1.2cm;1/2MS+NAA1.0 或 0.2 根长最短,仅有 0.45cm。从表 2 也可以看出,采用 2 种不同的基本培养,在试验区内,随着 NAA 浓度增加,根分化量有增加的趋势,而根长有下降的趋势;同时,在同一 NAA 水平下,MS 较 1/2MS 处理根数和根长均有增加的趋势。2 种基本培养基添加 IBA 进行处理则有所不同,在试验区内,随着 IBA 浓度提高,在 1/2MS 上根的分化数逐渐减少;而在 MS 上根的分化数逐渐增加;根长均有下降趋势。

表 2 不同处理驱蚊香草生根情况

1/2MS			MS		
生长素 (mg/L)	平均 生根数	平均 根长(cm)	生长素 (mg/L)	平均 生根数	平均 根长(cm)
NAA 0.0	4.33	0.65	NAA 0.0	5.25	1.14
NAA 0.05	13	0.80	NAA 0.05	20.25	1.1
NAA 0.1	15.25	0.45	NAA 0.1	16.5	1.2
NAA 0.2	15.25	0.45	NAA 0.2	17.25	0.88
IBA 0.05	6.5	1.2	IBA 0.05	11.25	1.1
IBA 0.1	12.8	1.1	IBA 0.1	9.5	1.0
IBA 0.2	14.25	0.82	IBA 0.2	7.0	0.80

2.5 移栽

观察表明驱蚊香草移栽后有 10d 左右的缓苗期,主要表现为叶片边缘萎蔫,叶色变淡。缓苗后植株逐渐长出新叶,叶色变为浓绿,长势转旺。20d 后 4 种不同基质处理存在明显差异(表 3,图 1I)。从表 3 可以看出,以田园土作为移栽基质驱蚊香草的成活率最高,生长状况最好,其次是混合基质,珍珠岩作为基质最差。为了便于分苗,减少根系的损伤,又兼顾幼苗素质,以选用混合基质为宜。

表 3 驱蚊香草试管苗在不同基质中的生长状况

处理	移栽株数	成活株数	成活率	生长状况
田园土	36	36	100	++++
珍珠岩	36	30	83.3	+
沙土	36	33	91.7	++
混合基质	36	33	91.7	+++

3 讨论

3.1 不同外植体在脱分化和分化上存在差异

虽然不带叶柄的叶片、叶柄和带叶柄的叶片外植体均能诱导脱分化和再分化,但是以带叶柄叶片的叶柄切口处形成愈伤组织或再分化形成根或芽最早、最快、最多,其一可能是有机营养上的差异,带叶柄叶的光合作用产物从叶片向下运输,汇集到叶柄的切口处;不带叶柄叶光合作用产物也沿叶脉向下运输但汇集点分散,营养水平较低;叶柄本身光合作用量就少,运送到形态下端切口处的光和产物更少。其二可能是在形态学结构完整性上的差异,形成各种内源激素的水平

和分布上的不同,导致在形态学上和脱分化和分化时间上的表现差异。这与王忠^[4]的观点是基本一致的。

3.2 相同激素处理组合在分化和增殖时存在差异

同一处理在分化和增殖上存在差异的原因可能有以下几个方面,其一是外植体的种类不同,分化所采用的外植体是叶片,而增殖所用的是丛芽;二是芽的形态建成的过程不同,前者需要通过脱分化形成愈伤组织,愈伤组织再分化形成芽的过程,而增殖培养则是由腋芽启动再长出芽的过程;三是在诱导芽的分化和芽的增殖时所要求的最佳激素处理组合不同,在芽的诱导过程中,要求较高的 BA 和 NAA 水平,而在芽的增殖时,则需要较低的 BA 和 NAA 水平,否则二者水平过高,会造成玻璃化现象,从而影响芽的增殖和生长。

3.3 驱蚊香草快速繁殖过程中应注意的问题

首先在驱蚊香草连续继代增殖的过程中,会造成丛芽中激素的累积,因此,每间隔 2~3 代将添加激素的水平减少 50% 培养 1 代,使其恢复健壮生长再进行继代;其次驱蚊香草在增殖培养的过程中,比大多数植物生长速度快,增殖率高,营养消耗量大,注意及时进行继代,适宜的继代周期为 15~20d。超过 20d 丛芽的叶片会由下向上逐渐变黄直至枯死。要延长继代时间,可以在增加培养基的同时,适当降低培养温度,减少每瓶接种数量和选择较小的丛芽,从而达到延长继代周期的目的。

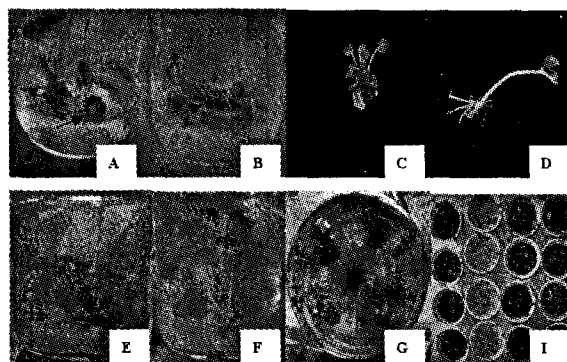


图 1 不同处理驱蚊香草的表现

- A. 叶柄脱分化形成的愈伤组织
B. 叶片在分化培养基上形成紫色的愈伤组织
C. 叶片在分化培养基上形成丛芽
D. 叶柄在分化培养基上形成丛芽 E. 丛芽的增殖
F、G. 试管苗生根 I. 移栽在不同基质的试管苗

参 考 文 献

- 1 和承尧,寸守铄. 滇产驱蚊香草芳香油化学成分分析研究,云南化工,2003,5,21~24.
- 2 熊丽,吴丽芳,屈云慧等. 观赏花卉的组织培养与大规模生产. 北京:化学工业出版社,2003. 1~195.
- 3 李军,柴向华,曾宝瑛等. 蝴蝶兰组培工厂化生产技术,园艺学报,2004,3,413~414.
- 4 王忠. 植物生理学. 北京:中国农业出版社,2001. 221~330.