

香水草组织培养植株再生系统建立

刘明志, 唐玲, 候帆

(长沙大学生物工程与环境科学系, 湖南长沙 410003)

摘要:香水草(*Heliotropium arborescens*)无菌实生苗下胚轴和子叶接种于含1.0mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)或2.0mg/L 6-苄氨基嘌呤(BA)的MS培养基上能脱分化形成白色松散状或绿色致密状愈伤组织,但愈伤组织诱导率较低,分别为8.3%和26.5%。愈伤组织培养于含2.0mg/L NAA和0.5mg/L BA的MS培养基上建立了具再生能力的愈伤组织继代培养方法,愈伤组织转移至含2.0mg/L BA和含0.1mg/L NAA的MS培养基上建立了不定芽分化再生方法,不定芽分化率最高91.3%。不定芽长大后,转移至含1.0mg/L IBA的减半MS培养基中不定芽生根率可达87.6%。

关键词:香水草;愈伤组织;脱分化;分化

中图分类号:Q942.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-4681(2007)02-0026-03

香水草(*Heliotropium arborescens*),又叫天芥菜,洋茉莉,海南沙,为紫草科天芥菜属植物。原产秘鲁,英文名叫Common heliotrope。香水草植株可达70厘米,茎基部木质化,为一种亚灌木多年生草本状植物,但常作一年或二年栽培。春至秋季开花,适合花坛,盆栽或切花。香水草广泛种植于庭院、小区、别墅,是香化、绿化、美化的香味植物和室内盆栽的香花^[1,2]。

香水草全株具甜香味,花序为聚伞状花序,顶生,花小,花紫色繁密,有时为白色,花冠漏斗状,有暗紫、紫、淡紫和白色等色。香水草是极佳的诱蝶植物。花粉加入肥皂中增添香气,可制成沐浴保养品。从花中抽出的精油可用于香水中。因而,香水草具有较高的观赏和美化价值。

香水草主要依靠种子繁殖,市场价格昂贵。经检索,目前在国内外尚无香水草组织培养和无性繁殖方面的报道。香水草在其它方面的研究报道也较少。香水草作为一种具有开发潜力的香味植物和观赏植物,其组织培养具有重要应用价值。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料及培养条件

实验材料为香水草(*Heliotropium arborescens*)种子。种子萌发及愈伤组织诱导和培养均在光照培养箱LRH-300-G中进行,培养温度控制在某种程度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期为每天12小时光照,光照强度在培养过程中按要求而改变。愈伤组织诱导时

光照强度为1500—3000lx,愈伤组织生长和分化时光照强度为7000—10000Lx。

1.2 愈伤组织诱导

香水草种子用0.1%升汞溶液消毒15分钟,再用无菌水洗3-4次,然后种于MS^[3]无激素培养基上萌发,1周后,得到无菌实生苗。再经过1周后,小苗长到约5厘米左右用于接种。愈伤组织诱导时,取无菌实生苗下胚轴和子叶接种于含1.0mg/L 2,4-D或2.0mg/L BA的MS培养基上诱导愈伤组织脱分化及分化。所有培养基均加入0.8%琼脂,3%蔗糖,高压灭菌前pH值调整为5.8。

1.3 愈伤组织继代及分化诱导

愈伤组织继代采用含有2.0mg/L NAA+0.5mg/L BA,或含有1.0mg/L 2,4-D+0.2mg/L KT的MS培养基。愈伤组织分化采用含有2.0mg/L BA+0.5mg/L NAA或1.0mg/L BA+0.1mg/L NAA的MS培养基。

1.4 完整植株再生

小芽分化形成后,转移至含1.0mg/L BA的MS培养基上,使小苗继续发育长大,然后将小苗转移至含0.5mg/L IBA(吲哚丁酸)或1.0mg/L IBA的减半MS培养基上诱导小苗生根。

1.5 数据分析

脱分化率=形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$ 。

愈伤组织分化率=分化形成不定芽的愈伤组织块数/总愈伤组织块数 $\times 100\%$ 。

收稿日期:2006-10-08;修回日期:2006-11-08

作者简介:刘明志(1963-),男,湖南岳阳人,长沙大学生物技术研究所副教授,博士。研究方向:细胞生物学和植物细胞工程。

生根率 = 形成根的小苗 / 全部小苗 × 100%

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

香水草下胚轴和子叶均能在含有 1.0mg/L 2,4-D 或 2.0mg/L BA 的 MS 培养基上脱分化形成愈伤组织,但两者的脱分化率明显不同(见表 1)。

表 1 香水草外植体在两种不同激素的培养基上的脱分化率

	外植体数	脱分化外植体数	脱分化率
含 1.0mg/L 2,4-D 的 MS 培养基	21	12	57.1%
含 2.0mg/L BA 的 MS 培养基	22	2	9.1%

注:表中的外植体数包括下胚轴和子叶两者的外植体数

在含 2,4-D 的培养基上下胚轴和子叶脱分化形成的愈伤组织为白色颗粒状,在含 BA 的脱分化培养基上形成的愈伤组织为黄绿色致密状.在上述两种培养基中,当愈伤组织形成后,外植体均褐化坏死.这表明,这两种培养基可能并不适合脱分化后愈伤组织的生长.将在含 2,4-D 培养基上脱分化形成的愈伤组织转移至含 1.0mg/L 2,4-D+0.2mg/L KT 的 MS 培养基上继代,而将在含 BA 培养基上脱分化形成的愈伤组织转移至含 2.0mg/L NAA+0.5mg/L BA 的 MS 培养基上继代.在这两种培养基上继代培养的愈伤组织呈现明显差异,前者为淡黄色或黄白色,疏松细碎的颗粒状愈伤组织,并出现大量紫色分泌物(见图 1);后者愈伤组织中一部分为淡黄色,带少许绿色,粒径较大颗粒状,另一部分为淡紫色,粒径较小的颗粒状,并出现少许紫色分泌物。

此外,在实验中发现,在愈伤组织继代培养基上,愈伤组织的生长与光照强度密切相关.当光照强度控制在 2000—3000lx 时,愈伤组织生长缓慢,并伴随着变褐和逐渐坏死,愈伤组织难于继代.当光照强度控制在 7000—8000lx 时,愈伤组织生长十分旺盛,生长量迅速增加,如果超过 10 天不转移,愈伤组织就会褐化坏死.这表明愈伤组织的生长并非完全异养,而是半异养和半自养.光照强度增加有利于愈伤组织通过光合作用并促进了对营养物质的吸收,提高了代谢水平,因而有利于愈伤组织生长,抑制了愈伤组织褐化和坏死;反之,愈伤组织生长不充分,容易造成其褐化和坏死。

2.2 愈伤组织分化和完整植株再生

愈伤组织分化培养基有两种.第一种为含有 2.0mg/L BA+0.5mg/L NAA 的 MS 培养基,第二种

分化培养基为含 1.0mg/L BA+0.1mg/L NAA 的 MS 培养基.当继代培养的愈伤组织转移至第一种分化培养基上时,愈伤组织转变这黄绿色,致密颗粒状,并能分化形成绿色不定芽(图 2).不定芽分化率可达 91.3%.继代培养的愈伤组织转移至第二种分化培养基上也可诱导不定芽分化,不定芽分化率为 36.2%.在相同培养基上经 1-2 次继代,或转移至 1.0mg/L BA 的 MS 培养基上 1-2 次后,不定芽长大成为小苗(图 3),且随着小苗的长大,可观察到大量愈伤组织褐化和坏死.2 个月后,将小苗转移至含 1.0mg/L IBA 的减半 MS 培养基上可诱导小苗生根,并形成完整植株(图 4).经过几次转移后,小苗生根率可达 87.6%。

实验中我们发现,香水草愈伤组织的生长和分化取决于生长素和细胞分裂素的配比.适合愈伤组织分化的细胞分裂素 BA 的浓度范围为 1.0—2.0mg/L,且 2.0mg/L BA 更有利于愈伤组织分化形成不定芽.同时也发现当生长素 NAA 浓度提高到 2.0mg/L 时可抑制分化,有利于愈伤组织生长,而当 NAA 浓度降低到 0.5mg/L 时,愈伤组织可分化形成不定芽.在实验中也发现,当 BA 浓度为 3.0mg/L 时,在愈伤组织分化形成不定芽的同时,愈伤组织本身也出现褐化坏死.这说明不定芽的分化启动,是涉及到基因的表达过程,是一个从量变到质的过程。

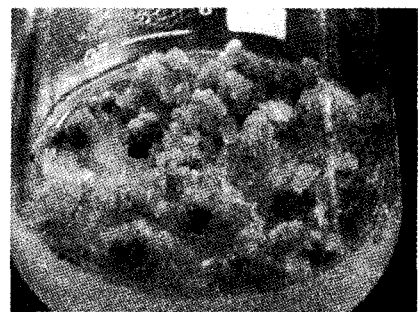


图 1 生长于 2.0mg/L NAA+0.5mg/L IBA 的 MS 培养基上的香水草愈伤组织



图 2 生长于 2.0mg/L BA+0.5mg/L NAA 的 MS 培养基上的香水草愈伤组织,出现了分化



图3 在 1.0mg/L BA MS 培养基上生长的根形成完整植株



图4 在 1.0mg/L IBA 的 1/2MS 培养基上小苗生小苗

3 讨论

植物组织培养中,植物的再生能力依赖于植物本身的基因型,这表现为某些植物种易于再生,而某些植物种却难于再生。通常,在植物组织培养中,实际上不知道某种植物是易于再生种,还是难于再生种。因而,植物组织培养过程实际上是寻求最合适培养条件的过程,如脱分化过程中的激素配比,继代培养基的选取,分化培养的激素种类和浓度配比,光照强度和光照周期,温度和湿度等。如果能找出某种植物最合适的分化再生条件,则这种植物为易于再生种,否则为难于再生种。

在本实验中,首先发现香水草下胚轴和子叶外植体在脱分化过程中,对激素种类无严格要求。通常认为,生长素是外植体脱分化的必要条件,如 2,4-D,而本实验中仅仅使用细胞分裂素 BA 也能诱导外植体脱分化和形成愈伤组织,这表明,外植体本身所含的内源生长素和外源细胞分裂素也可诱导外植体脱分化。其次发现香水草愈伤组织的生长与光照

强度密切相关,高光照强度有利于愈伤组织生长,并抑制愈伤组织变褐。愈伤组织变褐是植物组织培养中最常见的现象之一,关于褐化现象的原因和机理也有较多报道。在本实验中,发现高光照强度抑制褐化对于其它植物组织培养具有重要的参考价值。

香水草因具有强烈的香味而深受人们喜爱。其香味还具有驱虫效果。用香水草研磨成粉后可提取制作成婴儿沐浴露。香水草也可作切花观赏,在国际市场上,一株 60 公分高的香水草可卖 3 美元。目前,有关香水草的研究报道较少,Donnelly 等研究了高压钠光灯对香水草切花的影响。Fekete 等研究了香水草切花从顶端到基部的过氧化酶(POD)活性变化,证实基部的过氧化物酶活性最高^[4]。Shahidi Bonjarr 等的研究证实香水草的香味具有抗菌作用^[4,5]。

在本实验中,香水草具有较强的再生作用,可通过器官发生实现植株再生。在进行香水草试管苗大规模产业化生产方面存在两个方面的问题:一是香水草是否能通过体细胞胚胎发生实现植株再生,二是在培养条件下,如何保使香水草不失去分化能力,而保持较高的再生频率。第二个的问题实际上依赖于第一个问题的解决。目前正在进行香水草体细胞胚胎发生的研究。

参考文献:

- [1] 王传忠. 介绍几种名优香草品种[J]. 北京农业, 2004, (1): 35.
- [2] 长胜. 几种香味草的栽培[J]. 农民致富之友, 2003, (2): 12.
- [3] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol. Plant*, 1962, (15): 473-497.
- [4] Fekete S, Mándy A, Stefanovits-Bányai E. Change of peroxidase enzyme activities in annual cuttings during rooting[J]. *Acta Biologica Szegediensis*, 2002, 46(304): 29-31.
- [5] Shahidi Bonjar G H S, S. Aghighi S, Karimi Nika A. Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal medicine of south east regions of Iran[J]. *Journal of Biological Science*, 2004, 4(3): 405-412.

(作者本人校对)