

薰衣草叶片高频再生体系的建立

许耀祖^{1,2,3} 韦彦余¹ 王晓军^{1*} 赵民安¹ 赵海清¹

(¹中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; ²中国科学院研究生院, 北京 100830; ³浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 以薰衣草叶片为外植体进行了离体再生研究。结果表明: 叶片愈伤组织诱导最佳的培养基是 MS+2,4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, 诱导率高达 100%; 液体悬浮—固体培养芽分化率达 92.5%, 芽数/愈伤组织达 6.6; 正交试验筛选出芽增殖最佳培养基为 MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1.0 mg/L, 其增殖系数高达 8.7; 在芽增殖培养基上可直接生根, 生根率达 100%。

关键词: 薰衣草; 液体悬浮—固体培养; 再生植株

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0182-04

Establishment of High-frequency Regeneration System from Leaf Explants of *Lavandula angustifolia* 'Munstead'

Xu Yaozu^{1,2}, Wei Yanyu¹, Wang Xiaojun¹, Zhao Min'an¹, and Zhao Haiqing¹

(¹Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100830, China; ³Institute of Nuclear-agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The regeneration system of *Lavandula angustifolia* 'Munstead' in vitro was studied with leaves as explants, and the results showed the optimal medium for callus induction was MS+2,4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L with the induction frequency of 100%. Liquid suspension-solid culture can achieve adventitious bud differentiation rate of 92.5% and 6.6 bud per callus. Best bud multiplying medium which was MS medium supplemented with NAA 2.0 mg/L and 6-BA 0.5 mg/L and IAA 1.0 mg/L was sifted through orthogonal experiment with multiplying coefficient of 8.7. The rooting of rootless bud could be accomplished directly in the bud multiplying medium with rooting frequency of 100%.

Key words: *Lavandula angustifolia*; Liquid suspension-solid culture; Regenerated plantlet

1 目的、材料与方法

薰衣草不仅是重要的化工、医药原料, 而且也是美化环境的优良植物, 其外形美观且香气浓郁。目前生产上栽培的薰衣草多为 20 世纪 60 年代育成的老品种, 精油质量和观赏价值严重下降, 而且在新疆等干旱地区严寒的冬天, 薰衣草必须覆土才能过冬, 生产成本较高。为了迅速改变这一状况, 我们从法国引进新的优良品种 (*Lavandula angustifolia* 'Munstead'), 建立薰衣草高频植株再生系统, 为规模化快繁带有外源抗冻基因的转基因薰衣草奠定基础, 从而达到降低生产成本, 提高经济效益的目的。

最近廖苏梅等^[1]进行了芽增殖培养而实现薰衣草微繁的研究, 国外学者通过器官发生途径从分化外植体如叶、茎或愈伤组织获得了多种薰衣草的再生植株^[2~7], 但利用叶片得到 '孟斯泰德' 薰衣草再生植株及通过液体悬浮—固体培养得到薰衣草再生植株的研究尚未见报道。

'孟斯泰德' 薰衣草由新疆芳香科技股份有限公司提供。取幼嫩叶片, 用 75% 酒精表面灭菌 25 s, 0.1% 升汞溶液浸泡 3 min, 用无菌水冲洗至干净, 切成 0.5 cm² 左右的小片, 叶面朝上接种。

收稿日期: 2004-12-06; 修回日期: 2005-05-18

基金项目: 中国科学院西部行动高新技术资助项目 (KGX2-SW-506)

* 通讯作者 Author for correspondence

从愈伤组织的诱导和增殖到芽分化和增殖,均以MS培养基为基本培养基(pH 5.80~5.90,蔗糖3%)。调整芽分化培养基激素的浓度,观察其对芽分化的影响并比较固体培养和液体悬浮-固体培养对芽分化的影响。如无特别说明,培养条件由人工气候箱调控:光强2000~4000 lx,光照时间12 h/d,温度(25±1),湿度(65±5)%;每次接20个外植体,试验重复2次,取平均值。

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行芽增殖培养基的优选,以芽继代培养20 d后的增殖系数为考察指标。根据设计安排9组试验(见表4),每组接种30个外植体,每组重复2次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和继代

从表1可见,2,4-D对薰衣草叶片愈伤组织的诱导影响很大,随2,4-D浓度升高,愈伤发生速度增快,3~5 d可见切口处膨大,25 d左右黄褐色愈伤组织可覆盖整个外植体(图版,1),但2,4-D浓度超过0.1 mg/L,愈伤组织变硬,容易褐化。单独使用2,4-D或6-BA,不能诱导出愈伤组织。6-BA 0.5~2.0 mg/L对愈伤组织诱导影响不大。当2,4-D为0.1 mg/L,6-BA为0.5 mg/L时,愈伤组织诱导率为100%,且松散的愈伤组织比例最高,为20%~35%。故诱导愈伤组织的最佳培养基为MS+2,4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。

愈伤组织继代培养时我们适量降低2,4-D浓度,选用培养基MS+2,4-D 0.05 mg/L+6-BA 0.5 mg/L作为继代培养基。挑取松散易碎的愈伤组织接种于琼脂固化的继代培养基,继代3~5代才可得具有分化能力、颗粒状的红色愈伤组织(图版,2);继代时间视愈伤组织生长量而异,一般25~30 d为宜。继代后的愈伤组织在3~10 d即可恢复生长。

2.2 不同植物生长调节剂对芽分化的影响

挑取新鲜、颗粒状的红色愈伤组织接入附加不同植物生长调节剂的MS培养基中,诱导芽分化。从表2可以看出,6-BA对薰衣草芽分化影响很大,其最适浓度是2.0 mg/L。单独使用NAA,芽分化率为0,单独使用6-BA,芽分化率很低。最佳组合是6-BA 2.0 mg/L和NAA 0.5 mg/L,此时芽分化率可达65%。若再添加1~10 mg/L $Ce(NO_3)_2$,芽分化率可提高至75%,芽数愈伤组织可达3.1。我们还发现,蔗糖浓度减半,芽分化率变化不大。因此,最佳芽分化培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+ $Ce(NO_3)_2$ 1~10 mg/L+蔗糖15 mg/L。

表2 不同植物生长调节剂对比对芽分化率的影响

Table 2 Effects of different hormones combination on bud differentiation frequency of *Lavandula angustifolia*

'Munstead' (%)				
NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
0.0	0	5	15	25
0.1	0	30	50	30
0.2	0	25	55	55
0.4	0	30	60	45
0.5	0	10	5	50

表1 不同植物生长调节剂对比对愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effects of different hormones combination on callus induction frequency of *Lavandula angustifolia* 'Munstead' (%)

2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)			
	0.0	0.5	1.0	2.0
0.0	0	0	0	0
0.05	0	97.5	90	95
0.1	0	100	95	97.5
0.2	0	100	100	95
0.5	0	100	92.5	95

表3 不同培养方式对芽分化率和芽数愈伤组织的影响

Table 3 Effects of different subculturing methods on bud differentiation frequency and number of bud per callus of

<i>Lavandula angustifolia</i> 'Munstead'		
培养方式	分化率 Differentiation frequency (%)	植株数 培养物 Number of bud per callus
Culture methods		
固体培养 Solid culture	75	3.1
液体悬浮-固体培养 Liquid suspension-Solid culture	92.5	6.6

2.3 不同培养方式对芽分化的影响

挑取新鲜的红色愈伤组织转入培养液MS+2,4-D 0.05 mg/L+6-BA 0.5 mg/L(250 mL三角瓶内装100 mL),在100 r/min的转速下振荡培养约15 d,取出,接入优选出的琼脂固化的芽分化培养基,30 d时统计发现愈伤组织分化率和芽数愈伤组织远高于固体培养(表3;图版,3~5)。

2.4 芽增殖

芽增殖培养基的正交试验结果及其极差分析如表 4 所示。

从表 4 可以看出, A 因子 (NAA) 极差 (R) 最大, B (6-BA) 因子和 C 因子 (IAA) 次之, D 因子 (蔗糖) 最小。这反映 NAA 对增殖系数影响最大, 其次是 6-BA 和 IAA, 蔗糖的影响最小。

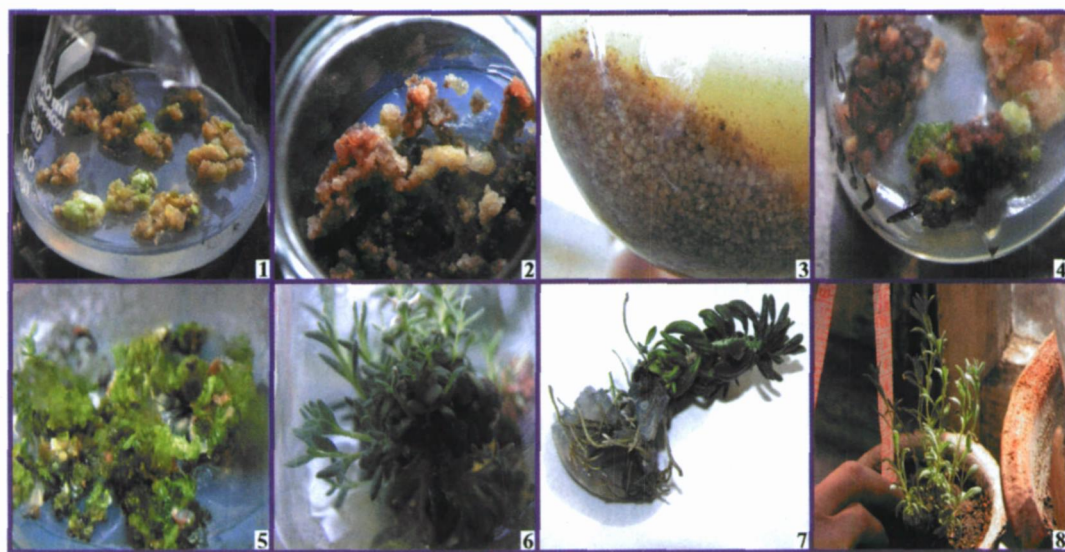
考察各因子水平均值发现, A、B、C、D 因子均以第 2 水平均最大, 故最佳培养条件组合为 $A_2B_2C_2D_2$, 即最佳芽继代培养基为 MS + NAA 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + IAA 1.0 mg/L + 蔗糖 30 mg/L。以该组合进行芽继代, 15 ~ 20 d, 增殖系数达到 8.7, 可见薰衣草芽增殖培养基的筛选是成功的。

2.5 生根和移栽

分化组培苗在芽增殖培养基上生长 30 ~ 35 d, 可见白色根点长出, 40 ~ 45 d, 长出较长的根, 炼苗 2 ~ 3 d, 将生根苗从培养基中取出, 流水洗去根上的培养基, 移栽到栽培基质 (蛭石 : 土壤 = 1 : 1) 中。每周浇 1 次水, 浇透。半个月长出新的小叶即表明移栽成活。成活率可达 100% (图版. 6 ~ 8)。

表 4 $L_9 (3^4)$ 正交试验结果

处理 Treatment	A NAA (mg/L)	B 6-BA (mg/L)	C IAA (mg/L)	D 蔗糖 Sucrose (g/L)	增殖系数 Multiplying coefficient
1	1 (1.0)	1 (0.1)	1 (0.5)	1 (15)	3.18
2	1 (1.0)	2 (0.5)	2 (1.0)	2 (30)	5.87
3	1 (1.0)	3 (1.0)	3 (2.0)	3 (45)	2.73
4	2 (2.0)	1 (0.1)	2 (1.0)	3 (45)	7.33
5	2 (2.0)	2 (0.5)	3 (2.0)	1 (15)	8.22
6	2 (2.0)	3 (1.0)	1 (0.5)	2 (30)	6.75
7	3 (3.0)	1 (0.1)	3 (2.0)	2 (30)	4.02
8	3 (3.0)	2 (0.5)	1 (0.5)	3 (45)	5.25
9	3 (3.0)	3 (1.0)	2 (1.0)	1 (15)	3.83
K_1	11.78	14.53	15.18	15.23	
K_2	22.30	19.34	17.03	16.64	
K_3	13.10	13.31	14.97	15.31	
X_1	3.93	4.84	5.06	5.08	
X_2	7.43	6.45	5.68	5.55	
X_3	4.37	4.44	4.99	5.10	
R	3.50	2.01	0.69	0.47	



图版说明: 1. 叶片外植体产生的愈伤组织; 2. 继代 3~5 代的愈伤组织; 3. 悬浮培养的愈伤组织; 4. 固体培养的愈伤组织分化的丛生芽; 5. 悬浮培养的愈伤组织分化的丛生芽; 6. 增殖培养基上的丛生苗; 7. 增殖培养基上的生根小苗; 8. 移栽成活的试管苗。

Explanation of plates: 1. Calli from leaf explants; 2. Calli subculturing 3-5 subculture; 3. Suspension culture calli; 4. Multiplying buds from calli cultured in solid culture medium; 5. Multiplying buds from suspension calli; 6. Multiplying buds in multiplying medium; 7. Rooting plantlet from rootless bud in multiplying medium; 8. The transplanted plantlet

参考文献:

- 廖苏梅, 周 巍, 徐 程. 薰衣草的组织培养. 植物生理学通讯, 2004, 40 (3): 336
Liao SM, Zhou W, Xu C. Tissue culture of *Lavandula angustifolia*. Plant Physiology Communications, 2004, 40 (3): 336 (in Chinese)
- Jordan A M. Micropropagation of adult *L. dentate* plants. Biotech, 1998, 73 (1): 93 ~ 96
- Dias M C, Almeida R, Romano A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through in vitro axillary bud proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 68 (1): 99 ~ 102
- Calvo M C, Segura J. In vitro morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* Seedlings. Scientia Horticulturae, 1988, 36 (1-2): 131 ~ 137

- 5 Tsuru M, Koda M, Inoue M. Efficient plant regeneration from multiple buds formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the 'open culture system'. *Scientia Horticulturae*, 2000, 86 (1): 81~88
- 6 Tsuru M, Koda M, Inoue M. Comparative effect of different types of cytokinin for bud formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). *Scientia Horticulturae*, 1999, 81 (3), 331~336
- 7 Panizza M, Tognoni F. Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin. *Scientia Horticulturae*, 1988, 37 (1-2): 157~163

两种牡丹胚珠与幼胚离体培养的初步研究

何桂梅 成仿云* 李 萍 (北京林业大学园林学院, 国家花卉工程研究中心, 北京 100083)

Preliminary Studies on Culture in Vitro of Ovule and Immature Embryo of Two Tree-peony Cultivars

He Guimei, Cheng Fangyun*, and Li Ping (College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Floriculture Engineering Research Center, Beijing 100083, China)

关键词: 牡丹; 胚珠; 幼胚; 离体培养

中图分类号: S 685.11 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 01-0185-01

开展牡丹选择育种和杂交育种时, 从开花授粉得到种子, 再经播种繁殖获得种苗至少需要约 1 年的时间, 自然状态下仅种子萌发就要 3 个月以上的时间, 而且萌发率较低, 很难获得整齐一致的种苗。胚珠及幼胚离体培养可使牡丹种胚快速萌发成苗, 提高其种子萌发率, 缩短萌发时间, 加速育种进程。

试材为紫斑牡丹 '书生捧墨' (*Paeonia rockii* hybrid 'Shusheng Pengno'), 杨山牡丹 '凤丹白' (*Paeonia ostii* 'Fengdanbai') 开花后约 20、28、48、66、90 d 的胚珠和约 90 d 的幼胚。健壮母株树龄 12 年。基本培养基为 MS 和 1/2MS (Ca^{2+} 均加倍) + $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, 附加 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖及不同浓度的生长调节剂 (BA $0 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IAA $0 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、GA₃ $0 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), pH 5.8。培养温度 (25 ± 1) , 光照 16 h/d, 光强 $1\,600 \sim 2\,000 \text{ lx}$ 。

试验结果表明, 两种牡丹早期胚珠 (48 d) 离体培养不成功; 内部种胚完成器官分化的胚珠可离体培养成苗, '书生捧墨' 和 '凤丹白' 花后 66 d 与 90 d 的胚珠离体培养成苗率分别为 0、4.4% 和 21.4%、1.7%。接种时去掉种皮与胚根伸出后及时去掉胚乳, 均有助于种胚迅速增大变绿及随后的正常生长。花后 90 d 的幼胚离体培养最快在 5 周内成苗, 培养 3~4 个月后, '书生捧墨' 与 '凤丹白' 的成苗率分别为 7.4% 与 13.5%。启动培养时 IAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 仅促进上胚轴萌动, 与 GA₃ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 配合时成苗率高, 速度快; BAP $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 促进子叶扩大、胚轴增粗, 但浓度 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制上胚轴萌动, 与 GA₃ 配合时玻璃化较明显; GA₃ $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 解除部分胚轴的休眠, 促进抽枝; 三者配合比例适宜时萌发率高, 生长快, 整齐度较高。培养基中加入维生素 C $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及活性炭 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 可有效防止褐化; 提高 IAA/BAP 比值有利于幼胚生根成苗, 反之则有利于产生丛生芽, 但二者浓度升高导致幼苗胚轴膨大及产生大量愈伤组织, 丛生芽分割增殖培养还需进一步研究。



图版说明: 1. '书生捧墨' 胚珠 (90 d) 培养 7 d, 胚根伸出 (箭头); 2. '书生捧墨' 幼胚离体培养苗开瓶炼苗 3 d; 3. '凤丹白' 幼苗移栽成活, 上盆 30 d。

Explanation of plates: 1. Ovules (90 d) of 'Shusheng Pengno' cultured in vitro for 7 days and the radicles throwing out (arrow); 2. A seedling of 'Shusheng Pengno' from immature embryos cultured in vitro was under acclimatization in open bottle for 3 days; 3. Seedlings of 'Fengdanbai' from immature embryos cultured in vitro survived for 30 d after being transplanted

收稿日期: 2005-04-28; 修回日期: 2005-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170784); 国家 '863' 计划项目 (2002AA241041)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chengfy8@263.net)