

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201409036

莫小路, 欧阳蒲月, 曾庆钱, 等. 广藿香叶盘法高效再生体系主要影响因素的研究[J]. 广西植物, 2015, 35(5):715—720

Mo XL, Ouyang PY, Zeng QQ, et al. Main influential factors for efficient plant regeneration system established from leaf-disc of *Pogostemon cablin*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5):715—720

广藿香叶盘法高效再生体系主要影响因素的研究

莫小路^{1*}, 欧阳蒲月², 曾庆钱¹, 黄珊珊¹

(1. 广东省中药研究所, 广州 510520; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520)

摘要: 广藿香是重要的芳香药用植物, 利用基因工程技术对广藿香进行品种改良, 需要建立一个高效的广藿香植株再生体系。该研究以广藿香无菌苗叶片为材料, 将叶盘外植体分别置于不同条件下培养, 观察、统计其再生植株的数量及生长状况。通过研究 15~50 d 的苗龄、第 2~4 节上的叶及培养基中 2,4-D、NAA、BA 和 KT 的浓度和配比等因素对广藿香叶盘再生植株的影响, 在此基础上优化培养条件, 建立广藿香高效再生体系。结果表明: 广藿香无菌苗的苗龄、叶片在茎上的着生位置以及培养基中的植物生长调节物质浓度和配比都对广藿香的植株再生有显著影响; 优化培养条件为以培养 30 d 的广藿香无菌苗顶芽下第 2 对展开叶片切割的叶盘为外植体, 在含 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 的 MS 培养基中培养 28 d, 叶盘的不定芽发生频率达到 100%, 单个叶盘的平均再生芽数为 96.5 个, 经生根培养及温室炼苗, 再生植株的移栽成活率达到 96%。广藿香叶盘植株再生体系的建立为其基因转化研究及优良品种的快速繁育奠定了基础。

关键词: 广藿香; 叶盘; 植株再生

中图分类号: Q943.1, Q945.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0715-06

Main influential factors for efficient plant regeneration system established from leaf-disc of *Pogostemon cablin*

MO Xiao-Lu^{1*}, OUYANG Pu-Yue², ZENG Qing-Qian¹, HUANG Shan-Shan¹(1. *Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine*, Guangzhou 510520, China;2. *Guangdong Food and Drug Vocational College*, Guangzhou 510520, China)

Abstract: *Pogostemon cablin* syn. *P. patchouli*, is a perennial bushy herb introduced from Southeast Asia and has been extensively cultivated in South China, for both utilization in pharmaceutical and perfume industry. Patchouli cultivated in different regions has diverse morphological characteristics and essential oil constituents, which infect its therapeutic properties directly. It is necessary to established a cultivar with high quality of essential oil. This study aims to establish an efficient system of plant regeneration from the leaf-disc of *Pogostemon cablin*. The leaves of *in vitro* patchouli seedlings were used as materials. The effects of donor plant's age, leaf position and the concentration of plant growth substances used single or combined on plant regeneration of *P. cablin* were studied. The results showed that low concentration's benzylaminopurine (BA) combined with naphthaleneacetic acid (NAA) induced the high frequency of prolific adventitious shoots regeneration directly from leaf with less or without callus, the age of donor plant and position of leaf on stem both effected the frequency of shoot regeneration and the mean number of shoots. The high efficient plant regeneration system was established from leaf disc explants prepared from the leaves

收稿日期: 2014-11-29 修回日期: 2015-01-22

基金项目: 广东省科技厅粤港关键领域重点突破项目(2009A030901011); 广州市科技计划基础研究项目(2009J1-C201); 广东食品药品职业学院自然科学研究项目(2012YZ002)。

作者简介: 莫小路(1967-), 女(壮族), 广西柳州人, 博士, 教授, 从事生物技术与药用植物资源研究, (E-mail) moxl@gdzy.edu.cn。

* 通讯作者

of the second nodes of thirty-day old-*in vitro* plant. The culture medium for the prolific shoot inducing was MS culture medium supplemented with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA. The regeneration frequency was 100% and the maximum mean number of shoot per leaf disc was 96.5. Regenerated shoots were elongated and rooted on the half strength MS medium with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA. The rooting frequency was 100%. The plantlets with well-developed roots were successfully acclimatized in the greenhouse, and planted in the field with a survival rate of 96%. The established plant regeneration system from leaf-disc of *P. cablin* would lay foundation for the gene transformation of *P. cablin* and its fast breeding for good cultivars.

Key words: *Pogostemon cablin*; leaf-disc; plant regeneration

广藿香(*Pogostemon cablin*)为唇形科刺蕊草属植物,原产于菲律宾、马来西亚等东南亚国家,在我国广东、海南和云南等地都有栽培,因在广东栽培供药用历史最为悠久,故名“广藿香”。广藿香是广东道地药材之一,具有芳香化湿、温中止呕、发表解暑(国家药典委员会,2010)及抑菌抗病毒(Yang *et al.*,2013;莫小路等,2011)等功效,是“藿香正气丸(水)”、“抗病毒口服液”和“藿胆丸”等中成药的主要原料;从广藿香中提取的精油除用于医药原料外,还广泛应用于香料和化妆品工业,近来还应用于绿色农药的生产开发上(莫小路等,2004)。

广藿香主产于广东的肇庆、阳春和湛江地区以及海南省,各产地的广藿香品质差异较大(Wu *et al.*,2010;罗集鹏等,2002),广藿香主要靠扦插繁殖育苗,长期的无性繁殖带来的品种退化、病虫害等问题日趋严重,而广藿香罕见开花,难以用传统遗传育种方法培育优质品种。运用基因工程技术进行品种改良是现代农业的发展趋势之一,通过基因工程技术可以将其药用成分合成的控制基因转化到生长快速的广藿香品种中,从而获得高产、高药效成分的改良品种。在植物基因转化方法中,农杆菌介导的叶盘法转化是使用最广、最有效的方法之一,而通过叶盘外植体建立高效的植株再生体系是实现叶盘法转化的前提条件(Wedzony *et al.*,2014)。尽管国内外通过广藿香叶片、茎段外植体获得再生植株的研究有诸多报道(Swamy *et al.*,2014;林小桦等,2007;莫小路等,2008),而针对叶片转化的高效植株再生体系的研究则少有报道。因此,本项目对广藿香叶盘再生植株的影响因素进行研究,为叶盘法转化和优质广藿香品种的快速繁育奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 按莫小路等(2008)培养广藿香无

菌苗,每隔 50 d 继代培养 1 次,培养基为附加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基。培养条件为 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$,16 h 光照/8 h 黑暗。

1.1.2 试剂 萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、激动素(KT)、6-苄氨基腺嘌呤(BA)、吲哚丁酸(IBA)、赤霉素(GA₃)、蔗糖及 MS 培养基配制所需的各种大量、微量元素均购自广州威佳生物科技有限公司,琼脂粉购自广州环凯生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备 以 MS 为基本培养基,按实验设计添加不同的植物生长物质,加入 3% 的蔗糖、0.65% 的琼脂粉,调整 pH 为 5.8,加热搅拌至沸腾后,将培养基以每瓶约 30 mL 的量分装至 300 mL 容量的组培瓶中,121 $^\circ\text{C}$,0.1 MPa 灭菌 20 min,冷却后备用。

1.2.2 不同植物生长物质对广藿香叶盘的愈伤组织生成和植株再生的影响 分别添加不同植物生长物质,配制 10 组愈伤组织诱导培养基(表 1)。取继代培养 30 d 的广藿香无菌苗顶芽下的第 3 对展开叶片(面积约 $15 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$),在无菌条件下切成 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 大小的叶盘,分别置于各组诱导培养基上,每组 10 瓶,每瓶放置 5 个叶盘,于 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 黑暗培养。每隔 7 d 观察 1 次,不定芽萌出后移至 16 h 光照/8 h 黑暗培养。30 d 后统计愈伤组织形成和不定芽形成的外植体数,计算愈伤组织的发生频率、不定芽再生频率及每叶盘的平均出芽数。

愈伤组织发生频率 = 形成愈伤组织的叶盘数 / 接种的叶盘数 $\times 100\%$

不定芽再生频率 = 产生不定芽的叶盘数 / 接种的叶盘数 $\times 100\%$

每叶盘的平均出芽数 = 所有叶盘生成的不定芽总数 / 接种的叶盘数量

1.2.3 广藿香苗龄、叶片外植体的位置对不定芽再生

表 1 植物生长物质对广藿香叶盘愈伤组织形成及植株再生的影响

Table 1 Effects of plant growth substances on callus induction and plant regeneration of *Pogostemon cablin*

培养基 编号 No. of medium	植物生长物质及浓度 Plant growth substances and their concentrations (mg · L ⁻¹)	愈伤组织颜色 Color of calli	愈伤组织质地和生长状态 Status and quality of calli	愈伤组织发生的频率 Callus induction frequency (%)	不定芽发生频率 Shoot regeneration frequency (%)
A	2,4-D 0.05+KT 0.5	黄色 Yellow	中间较硬,外部疏松;愈伤覆盖叶盘,生长旺盛 Fragile appearance, compact heart; callus cover whole leaf disc	96	0
B	2,4-D 0.2+KT 0.5	黄白色 Yellow-white	疏松;仅在叶盘边缘生成 Fragile; callus formed in leaf disc edge	84	0
C	2,4-D 0.2+BA 0.5	白色 White	疏松、表面湿润;覆盖叶盘,生长旺盛 Fragile and wet; callus cover whole leaf disc	96	0
D	NAA 3.0+KT 2.0	黄白色 Yellow-white	疏松;在叶盘边缘生成,量少 Fragile; a little callus formed in leaf disc edge	54	0
E	NAA 2.0+BA 0.5	黄白色 Yellow-white	表面颗粒状;叶盘边缘生成,量少;有不定芽 Granular appearance; a little callus formed in leaf disc edge, with adventitious bud	56	0
F	NAA 1.0+BA 0.5	黄白色 Yellow-white	颗粒状、较紧密;有少量不定芽 Granular and compact; with a few adventitious bud	70	28
G	NAA 0.5+BA 0.5	黄色 Yellow	较紧密;愈伤量少;有不定芽 Compact; a little calli, with adventitious buds.	72	66
H	NAA 0.1+BA 0.5	黄绿色 Yellow-green	湿润,极少量;有大量不定芽 A little wet calli, with large amount of adventitious buds	24	94
I	BA 0.5	黄色 Yellow	未见愈伤组织 No callus formed	0	84
J	NAA 0.1+BA 1.0	灰褐色 Grey	较硬,紧密;有少量不定芽 Hard and compact; with a few adventitious buds	12	23

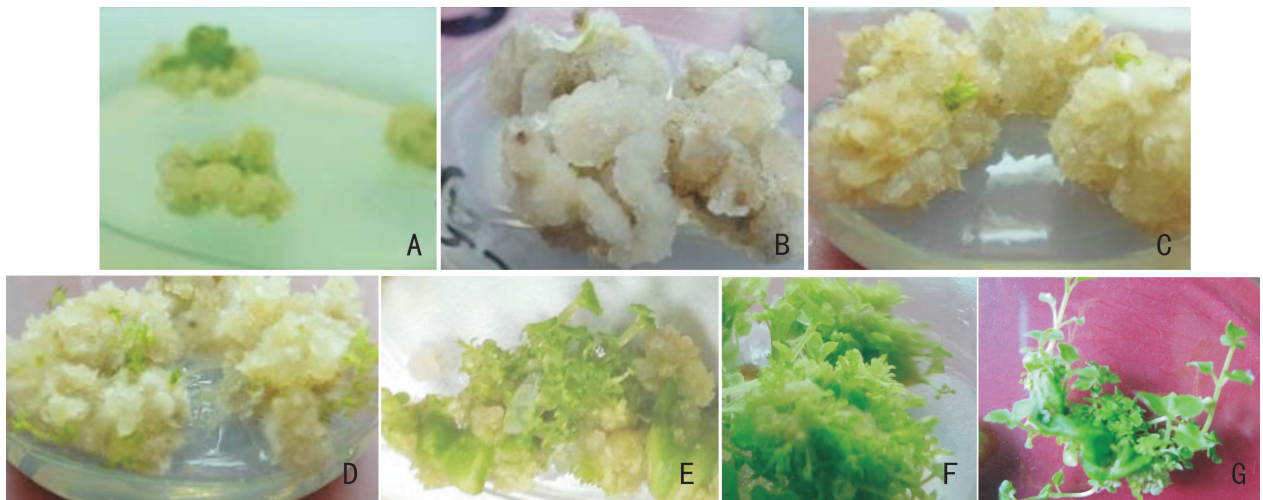


图 1 植物生长物质对广藿香愈伤组织的形成和植株再生的影响 A. 在 H 培养基上培养 15 d 的叶盘愈伤组织; B. 在 C 培养基上培养 30 d 的叶盘愈伤组织; C. 在 F 培养基上培养 30 d 的叶盘愈伤组织; D. 在 G 培养基上培养 30 d 的叶盘愈伤组织; E. 在 E 培养基上培养 30 d 的叶盘愈伤组织及不定芽; F. 在 H 培养基上培养 30 d 的叶盘上的不定芽; G. 在 I 培养基上培养 40 d 的叶盘上的不定芽。

Fig. 1 Effects of plant growth substances on callus induction and plant regeneration of *Pogostemon cablin* A. fifteen-day-old callus in medium H; B. Thirty-day-old callus in medium C; C. Thirty-day-old callus in medium F; D. Thirty-day-old callus in medium G; E. Thirty-day-old callus and adventitious buds in medium E; F. adventitious shoots from Thirty-day-old leaf disc in medium H; G. Adventitious shoots from Forty-day-old leaf disc in medium I.

的影响 分别以继代培养 15~50 d 的广藿香无菌苗茎上第 2~4 对叶片为外植体,在无菌条件下切成 5 mm × 5 mm 大小的叶盘,置于含 0.1 mg · L⁻¹ NAA 和 0.5 mg · L⁻¹ BA 的 MS 培养基上,于(26 ±

1) °C, 黑暗培养 21 d 后,移至光照培养 7 d 后,统计有不定芽分化的叶盘数及每个叶盘生成的不定芽数量,同 2.2 方法计算叶盘不定芽的萌发频率、每叶盘的平均出芽数。采用 SPSS(17.0) 软件进行数据统

计及数据间的差异显著性分析。

1.2.4 再生植株的壮苗及生根培养 待叶盘上长出的不定芽高 1.5~2 cm 时,分别转移至含 0.5 mg · L⁻¹ GA₃、0.1 mg · L⁻¹ IBA 和 0.1 mg · L⁻¹ NAA 的 1/2MS 培养基上,于 (26±1) °C,16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 35 d,统计再生苗的高度,计算生根率。

生根率=生根的无菌苗数量/接种的无菌苗数量×100%

1.2.5 再生植株移栽试验 经壮苗、生根后,将苗高 3~5 cm 的广藿香再生植株从培养瓶中取出,洗净根部的固体培养基,种植于温室内带自动感应喷水设备的珍珠岩基质育苗床进行炼苗。前 2 周每天喷施稀释 5 倍的 MS 液体培养基 1 次,接着 2 周每天喷施稀释 10 倍的 MS 液体培养基 1 次,之后只喷水,4 周后移栽大田,计算移栽成活率。

移栽成活率=移栽大田的株数/移栽的瓶苗株数×100%

2 结果与分析

2.1 植物生长物质对广藿香叶盘愈伤组织的形成和植株再生的影响

A-J 组培养基上的广藿香叶盘在培养后第 15 天有了明显变化,其中 A 和 C 组的大部分叶盘及 B 组的少量叶盘周围开始有黄白色的愈伤组织形成;F、G 和 H 组的部分叶盘边缘也有少量愈伤形成,但多为黄绿色,结构较紧密(图 1:A),D 和 J 组的部分叶盘褐化,J 组有少量形成愈伤组织但很快褐化;30 d 时 A 和 C 组的愈伤组织旺盛,大部分愈伤团直径在 2 cm 以上(图 1:B),F 和 G 组叶盘形成的愈伤组织结构相似,呈明显颗粒状,在愈伤团中有少量的不定芽萌出(图 1:C,D),而 E 组叶盘只在边缘有少量颗粒状愈伤,同时有不定芽萌出(图 1:E),H 组叶盘仅有极少量愈伤组织,叶盘大部分被密集的不定芽覆盖(图 1:F);而 I 组叶盘几乎未见愈伤组织分化,而是在叶盘边缘分化出大量不定芽(图 1:G);H 和 I 组的不定芽发生频率都很高,但 I 组单个叶盘再生的不定芽数量较少,为 15~25 个,且不定芽发育不整齐;而 H 组中每个叶盘上的不定芽密集整齐,单个叶盘再生的不定芽数量最多,在 120 个以上;J 组仅少量叶盘有愈伤组织生成且都褐化。各组的愈伤组织和再生芽的情况见表 1。

2.2 外植体植株的培养时间和叶片位置对广藿香叶盘不定芽分化的影响

每个不同时期的叶片分别接种了 10 瓶,每瓶 3 个叶盘,表 2 数据为 30 个叶盘的统计和计算结果,结果显示:作为外植体材料的广藿香苗的培养时间和叶片在茎上的位置对叶盘不定芽分化的影响极显著,培养 30 d 的广藿香无菌苗的不定芽发生率及单个叶盘上的不定芽数量都高于 15 d 和 50 d 的广藿香苗;而对于茎上不同位置的叶片,则是顶芽下第 2、3 对展开叶的不定芽的发生频率都很高,但第 2 对叶片平均每个叶盘上的不定芽数量(95.5)却显著高于第 3 对叶片(64.5)。

表 2 无菌苗的培养时间及叶片位置对广藿香叶盘不定芽分化的影响

Table 2 Effects of age of donor plant and leaf position on adventitious shoot proliferation of *Pogostemon cablin*

项目 Item	叶片外植体在茎上的位置 (自顶芽以下) Leaf position on the node of plant (from shoot apex)	苗龄 Age of donor plant (d)		
		15	30	50
不定芽发生频率 Regeneration frequency (%)	第 2 节 The 2nd node	23.3	100	46.7
	第 3 节 The 3rd node	36.7	93.3	50
	第 4 节 The 4th node	40	53.3	16.7
	不定芽的 平均数量/ 叶盘 *	1.7±0.36Bc	96.5±1.26Aa	6.3±0.78Ab
Mean number of shoot / Leaf-disc *	第 2 节 The 2nd node	3.4±0.83Ab	64.5±1.55Ba	5.27±0.91Ab
	第 3 节 The 3rd node	4.5±0.37Ab	22.6±0.64Ca	1.13±0.46Bc
	第 4 节 The 4th node	4.5±0.37Ab	22.6±0.64Ca	1.13±0.46Bc
	第 4 节 The 4th node	0.37Ab	0.64Ca	0.46Bc

注: * 数据为 30 个重复的平均值±标准误,大写字母不同表示同列中各组数据的差异极显著($P<0.01$),小写字母不同表示同行中各组数据的差异极显著($P<0.01$)

Note: Data shown are mean values±standard errors from measurements of 30 leaf discs. In columns,different capitals indicate significant differences($P<0.01$) between leaf positions,lowercases indicate significant differences($P<0.01$) between ages of donor plants.

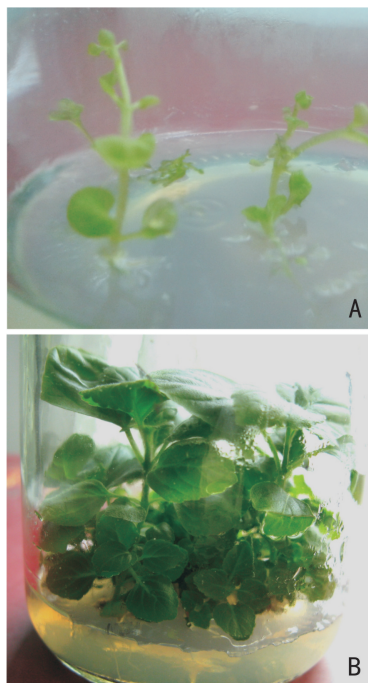
2.3 广藿香再生植株的壮苗及生根培养

将叶盘诱导生成的高度约为 2 cm 的无根苗转移至添加植物生长物质的各组培养基中,培养约 15 d,无根苗开始分化出根,35 d 统计生根率及再生植株的高度,结果见表 3,图 2。结果显示:广藿香无根苗在添加了 0.5 mg · L⁻¹ GA₃ 和 0.1 mg · L⁻¹ IBA、NAA 的 1/2 MS 培养基上的生根率达到 100%,每株分化出的根数量都在 10 条以上,在未添加植物生长物质的 1/2 MS 培养基上的生根率也能达到 96.7%,但每株生根数量较少,为 3~5 条。培养基中添加 0.5 mg · L⁻¹ GA₃ 能有效促进茎的生长,添

表 3 添加植物生长物质对广藿香再生苗生根的影响

Table 3 Effects of plant growth substance on the root inducing of *Pogostemon cablin*

植物生长物质及浓度 Plant growth substances and their concentrations ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	再生苗的生根率 Frequency of rooting (%)	再生苗的平均高度 Mean height of regenerated seedling (cm)
GA_3 0.5+IBA 0.1	100	3.2
GA_3 0.5+NAA 0.1	100	3.8
GA_3 0.5	93	2.8
—	96.7	2.3

图 2 生根培养初期(A)及培养 35 d 后(B)的广藿香
Fig. 2 Root induction of *Pogostemon cablin* in the beginning (A) and after 35-day culture (B)

加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 的 1/2 MS 培养基是广藿香的最适壮苗及生根培养基。

2.4 再生植株移栽试验

采用带自动喷淋系统的育苗床进行广藿香的温室炼苗, 试验 3 批共 300 株瓶苗, 在育苗床炼苗期间, 有 12 株苗未能成活。主要原因是在自动喷淋的育苗温室里的湿度较大, 育苗床内的部分弱小瓶苗会因烂根等原因而死亡, 8 周的温室炼苗后, 成活率为 96%, 苗高达 15 cm。经炼苗后, 移栽至大田的广藿香苗成活率达 100%(图 3)。

3 讨论与结论

植物生长调节剂 BA 能促进植物细胞分裂、诱



图 3 炼苗 4 周(A)和移栽大田 3 周后的广藿香再生植株(B)

Fig. 3 Regenerated plantlet of *Pogostemon cablin* planted in greenhouse for 4 weeks (A) and in field for 3 weeks (B)

导组织分化, 在植物离体培养中广泛应用于愈伤组织不定芽分化诱导和芽增殖培养。在本研究 10 组培养基中, 在添加了 BA 的培养基上大部分叶盘有一定的不定芽分化; 此外, 在 A、B、C 组以及 E、F 组培养基上形成的愈伤组织在转移到含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA}$ 的培养基后 20~30 d, 也有不定芽分化。但在仅含有 BA 的培养基上, 叶盘外植体分化的不定芽数量较少。在仙茅(Tomas, 2007)、石竹(Kantia *et al.*, 2002)以及产精油植物野薄荷(Phatak *et al.*, 2002)和罗勒(Dode *et al.*, 2003)等植物离体培养中, 在含 BA 的培养基中添加 NAA 都能促进叶外植体的不定芽分化。本研究 E、F、G、H 和 J 组培养基均含有 NAA 和 BA, 但只有低浓度的 BA 与 NAA 配合能促进广藿香叶盘不定芽发生, 在含 BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上, 叶盘的不定芽发生率达 100%。Sugimura *et al.* (2005)报道提高培养基中的 NAA 浓度会降低广藿香的芽分化频率, 而 BA 浓度过高($1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)则抑制不定芽的数量。本研究中, 最低浓度的 NAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)与 BA($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)配合, 能获得最高的叶盘不定芽诱导频率, 而 NAA 的浓度提高至

1.0~2.0 mg · L⁻¹时,则促进叶盘的脱分化,形成愈伤组织,与 Sugimura *et al.*(2005)的研究结果一致。

建立高效的植株再生体系是叶盘法转化的一个先决条件。植株再生可以通过直接器官发生的途径或间接器官发生途径(经过愈伤组织)获得再生器官(芽或根),再经诱导培养发育成完整植株。国内外报道的广藿香离体培养研究,大部分植株再生都是通过间接器官发生途径,即需要经过愈伤组织的培养,再将愈伤组织转移至分化培养基上诱导芽分化和植株再生(Misra,1996;Sugimura *et al.*,2005)。直接器官发生途径与间接发生途径相比,其优势首先表现在培养周期上,其次是能保持原植物的遗传稳定性,因为不经过愈伤组织再分化的阶段,再生植株产生变异的几率更小。本研究中,在H组培养基上的叶盘获得高频的再生芽即是通过直接器官发生途径,叶盘上只有极少量的愈伤组织生成,大大缩短了再生植株的培养周期。

植物的器官发生与植物的发育时期和细胞所处的生理状态有直接关系。本研究的结果表明,广藿香的苗龄和叶片的生长状态(部位)对叶盘的不定芽再生能力都有显著影响。继代培养时间太短或者太长,都会降低广藿香无菌苗的叶盘不定芽再生频率;而同一时期植株中,幼嫩叶片的不定芽再生频率以及单个叶盘的不定芽数量都要比较老的叶片高,这可能是因为幼嫩器官对培养基中的生长调节剂更为敏感。此外,我们在分离第2节上叶盘的再生芽时,观察到有少量的苗已长出细根,因此推测这些再生苗可能是通过体细胞胚的途径直接发育成的,而体胚直接发育的植株再生途径用于植物转化将更为有效,可以避免多细胞起源的再生带来的假阳性转化,但要明晰这些体细胞胚形成的原因及控制条件还需要做进一步的研究。

通过本研究确定的广藿香叶盘法高效植株再生体系是以继代培养30d的广藿香无菌苗的顶芽下第2对展开叶为叶盘外植体,在含0.1 mg · L⁻¹ NAA和0.5 mg · L⁻¹ BA的MS培养基上培养30d(暗培养,至不定芽萌发后转移至16h光照/8h黑暗培养),再转移至生根培养基上培养35d,经温室炼苗,移栽成活率达96%。

参考文献:

Board of Pharmacopoeia of China(国家药典委员会). 2010. Phar-

- macopoeia of the People's Republic of China. Part I(中华人民共和国药典(一部)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(中国医药科技出版社):42
- Dode BL, Bobrowski LV, Braga BJE, *et al.* 2003. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae)[J]. *Acta Sci*, **25**: 435—437
- Kantia A, Kothari SL. 2002. High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L.[J]. *Sci Hort* **96**: 205—212
- Lin XH(林小桦), He H(贺红), Wu LR(吴立蓉), *et al.* 2007. *In vitro* culture of different explants from *Pogostemon cablin* (广藿香不同外植体离体培养的研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **27** (4): 658—661
- Luo JP(罗集鹏), Zeng MH(曾梅华). 2002. Study on morphological and histological identification of Herba *Pogostemonis* (广藿香的形态组织学鉴别研究)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), **25**(3): 166—171
- Mo XL(莫小路), Cai YW(蔡岳文), Yuan L(袁亮), *et al.* 2011. Antimicrobial and antigungal effects of essential oil from two cultivars of *Pogostemon cablin* (两种广藿香精油的抗菌作用研究)[J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), **13**(9): 34—36
- Mo XL(莫小路), Wang XG(汪小根), Qiu WF(邱蔚芬), *et al.* 2008. Planting by tissue culture and essential oil analysis of *Pogostemon cablin* (组织培养法生产石牌广藿香及其质量分析)[J]. *Chin Mat Med* (中国中药杂志), **33**(7): 840—842
- Mo XL(莫小路), Yan Z(严振), Wang YS(王玉生), *et al.* 2004. Studies on inhibitive activity of essential oil from *Pogostemon cablin* to phytopathogenic fungi (广藿香精油对植物病原真菌的抑菌活性研究)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), **27** (11): 805—807
- Misra M. 1996. Regeneration of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) plants from leaf and node callus, and evaluation after growth in the field[J]. *Plant Cell Rep*, **15**: 991—994
- Phatak VS, Heble MR. 2002. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*[J]. *Fitoterapia* **73**: 32—39
- Sugimura Y, Kadotani N, Ueda Y, *et al.* 2005. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated transformation[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **82**: 251—257
- Swamy MK, Mohanty SK, Anuradha M. 2014. The effect of plant growth regulators and natural supplements on *in vitro* propagation of *Pogostemon cablin* Benth[J]. *J Crop Sci Biotechnol*, **17**: 71—78
- Thomas TD. 2007. High-frequency, direct bulblet induction from rhizome explants of *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered medicinal herb[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, **43**: 442—448
- Wedzony M, Szechynska-Hebda M, Zur I, *et al.* 2014. Tissue culture and regeneration: a prerequisite for alien gene transfer [J]. *Alien Gen Transf Crop Plants*, **1**: 43—75
- Wu YG, Guo Q, He J, *et al.* 2010. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers[J]. *Biochem Syst Ecol*, **38**: 63—72
- Yang X, Zhang X, Yang SP, *et al.* 2013. Evaluation of the antibacterial activity of patchouli oil[J]. *Iran J Pharm Res*, **3**: 307—316