

椒样薄荷的组织培养研究

王小敏¹, 李维林^{1*}, 梁呈元¹, 赵志强² (1.中国科学院植物研究所, 江苏南京 210014; 2.江苏省科技厅, 江苏南京 210008)

摘要 对椒样薄荷组织培养的外植体进行了筛选, 并对影响增殖与生长的激素种类及浓度进行了研究。结果表明, 不同材料的外植体和激素种类及浓度对椒样薄荷的组织培养都有显著影响。选用茎尖作为外植体, 有利于降低污染率和提高启动率; 不定芽诱导的最佳激素组合为 1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA; 继代增殖的最适激素组合为 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; 生根诱导的最佳激素组合为 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA。

关键词 椒样薄荷; 组织培养; 外植体; 激素
中图分类号 Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)11-03159-02

椒样薄荷(*Mentha piperita* L.)是唇形科薄荷属多年生宿根性长日照植物, 主要产区集中在美国的密执安纳、威斯康星、印第安纳等地^[1], 我国的黑龙江、陕西、新疆、河北、江苏、浙江、安徽等地有少量引种栽培^[2-4]。从椒样薄荷的茎叶中提取得到的芳香挥发油具有辛辣凉爽的香气, 被广泛用于医药、食品、日用品、化妆品等领域^[5-8]。

椒样薄荷是水薄荷与绿薄荷杂交而成的一个不育性中间类型^[9], 以分株繁殖为主。但长期采用无性繁殖, 易发生病毒病, 引起品种的退化和产量、质量的下降。利用组织培养技术可以对椒样薄荷进行脱毒复壮, 在短期内生产大量的无菌苗, 以及进行工厂化育苗^[10]。近年来, 随着国内薄荷栽培面积的逐年递减以及薄荷油市场需求量的加大, 国内外薄荷油的价格正逐步上升。在此现状下, 研究椒样薄荷的组织培养技术则有重要的现实意义。有关椒样薄荷组织培养的研究尚未见详细报道, 笔者对椒样薄荷组织培养中影响其分化、增殖与生长的因素进行了研究, 旨在为椒样薄荷的工厂化育苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验于 2005 年 8 月~2006 年 4 月进行。供试材料为从美国印第安纳引种、栽植于中国科学院植物研究所试验苗圃内的椒样薄荷。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选择及无菌系的建立。从苗圃中取椒样薄荷植株幼嫩茎尖(约 3 cm)、茎段、叶片, 用自来水冲洗 10 min 后, 置于浓度 0.1 %洗衣粉溶液中浸泡约 5 min, 取出后用流水冲洗 30 min, 滤干, 在超净工作台上用 75 %酒精溶液消毒 30 s, 0.1 %升汞溶液消毒 10 min 后, 用无菌水冲洗 3~5 遍, 吸干水后于无菌条件下用手术剪对外植体进行修剪, 并将一部分茎尖的分生组织切下作为一类外植体。整理好外植体后, 将其接种在 MS+0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中, 并添加 30 g/L 蔗糖和 6.5 g/L 琼脂。培养 15 d 后, 观察植株的污染率、启动率及生长情况。

1.2.2 不同激素种类及浓度对比对不定芽诱导的影响。选取“1.2.1”培养的无菌苗, 剪成 2 cm 左右长的茎段, 放置于不同激素种类及浓度配比的培养基中(表 1), 进行不定芽的诱导(附加 35 g/L 蔗糖和 6.5 g/L 琼脂)。培养 30 d 后, 调

查增殖系数和不定芽的长度。

表 1 不同激素种类及浓度配比				mg/L			
处理	6-BA	NAA	2,4-D	处理	6-BA	NAA	2,4-D
①	0	0.1	0.1	⑥	0.5	0.2	0
②	0	0.2	0	⑦	1.0	0.1	0
③	0.5	0	0.1	⑧	1.0	0.2	0
④	0	0	0.2	⑨	1.5	0.2	0
⑤	0.5	0.1	0				

1.2.3 6-BA 和 NAA 对不定芽增殖的影响。将诱导形成的不定芽切分后, 分别接种于不同浓度 6-BA 和 NAA 配比的 MS 培养基中, 并添加 35 g/L 蔗糖和 6.5 g/L 琼脂进行增殖培养。培养 20 和 30 d 后, 调查增殖系数和不定芽的长度。

1.2.4 6-BA 和 NAA 对试管苗瓶内生根诱导的影响。取 3~5 cm 长的健壮无根苗, 接种到不同浓度 6-BA 和 NAA 配比的 1/2MS 培养基中, 并添加 30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂进行生根诱导。培养 20 d 后, 统计生根率、根数和平均根长, 21 d 后进行比较分析。

1.2.5 培养条件。以上每处理各接种 10 瓶, 每瓶 2 株, 重复 3 次。培养基 pH 值均为 5.8, 培养室温度(25±3)℃, 生根光照时间为 12 h/d(日光灯光照强度 2 000 lx), 其他光照时间为 14 h/d。

对所得数据用 SPSS(13.0)软件包计算方差, 对处理间进行 0.05 水平上的差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对椒样薄荷初代培养的影响 由表 2 可以看出, 幼嫩茎尖和茎段的启动率较高, 但茎段的污染率相对茎尖较高, 所以茎尖相对较适合作为组织培养的外植体; 而叶片培养 7 d 后就卷曲, 上部还生有大量的愈伤颗粒, 但却不能分化出丛生芽, 且污染严重, 不适宜作外植体; 茎尖分生组织虽然污染率最低, 但启动率也最低, 外植体形成的愈伤组织只有个别分化出丛生芽, 因此也不适宜作组培快繁的外植体。茎尖、茎段和叶片的启动率差异不明显, 但这 3 种外植体的污染率却有较明显的差异。综合考虑降低污染率、提高启动率的因素, 选用茎尖作为椒样薄荷组织培养的外植体材料是最适宜的。

2.2 不同激素种类及对比对椒样薄荷不定芽诱导的影响 激素在植物组织培养中是必不可少的, 它对外植体的生长、分化和形态形成起决定性的作用, 其中生长素和细胞分裂素影响显著^[11]。该试验用 6-BA、NAA 和 2,4-D 作为椒样薄荷不定芽诱导的外源激素(表 3)。由表 3 可见, 处理④的诱导率最低, 不定芽的增殖系数也最低, 只有 0.58, 植株黄弱且

基金项目 科技部国家科技支撑计划项目(2006BAI06A12-12); 江苏省“十五”高技术研究项目(BG2005317)。
作者简介 王小敏(1980-), 女, 山东苍山人, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物栽培与生物技术。* 通讯作者。
收稿日期 2007-01-26

表 2 不同外植体对椒样薄荷初代培养污染率和成活率的影响

外植体	污染率 %	启动率 %	备注
茎尖分生组织	6.67 c	38.33 b	外植体大多形成愈伤组织
茎尖	11.67 c	81.67 a	只有少数茎尖底部产生愈伤颗粒
茎段	28.33 b	88.33 a	外植体无愈伤组织形成
叶片	56.67 a	75.00 a	叶片表面有大量的愈伤颗粒

注:表中所有数据均为 3 次重复的平均值。同一列中不同字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

大多枯萎,而处理①、②增殖系数也相对较低,说明 2,4-D 不适合椒样薄荷不定芽的诱导,对其有一定的抑制作用;处理②平均芽长较长但增殖系数较低,而且植株茎节较长不适宜芽的继代增殖;处理⑤~⑨的诱导率均可达 100%,且随着 6-BA/NAA 比值的增加,增殖系数也呈升高趋势,当 6-BA 浓度超过 1.0 mg/L 时增殖系数有降低的趋势,说明较高浓度的 6-BA 对不定芽的诱导有一定的抑制作用。通过该试验可以确定,处理⑧的激素组合即 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 是最适宜椒样薄荷不定芽诱导的激素组合。

表 3 不同激素种类及配比对椒样薄荷不定芽增殖系数和芽长的影响

处理	诱导率/%	增殖系数	芽长/cm	备注
①	45 c	1.15 e	2.19 cd	植株黄弱,底部有愈伤颗粒,少数植株枯萎
②	55 c	1.47 de	2.61 ab	植株茎节较长,叶色黄绿
③	80 b	1.60 d	0.88 e	植株黄弱,底部有愈伤颗粒
④	15 d	0.58 f	0.84 e	植株黄弱,底部有愈伤颗粒,大多植株枯萎
⑤	100 a	1.37 de	2.19 cd	植株稍健壮,叶色黄绿
⑥	100 a	2.30 c	2.35 bc	植株稍健壮,叶色深绿
⑦	100 a	2.65 b	1.85 d	植株健壮,叶色黄绿
⑧	100 a	3.72 a	2.71 a	植株健壮,叶色深绿,无黄叶
⑨	100 a	3.53 a	2.18 cd	植株健壮,叶色深绿,有少数黄叶

注:芽长为测量每丛中较高的 3 株,再取平均值。下表同。

表 4 6-BA 和 NAA 对椒样薄荷不定芽的增殖系数和芽长的影响

6-BA+NAA mg/L	20 d		30 d	
	增殖系数	平均芽长//cm	增殖系数	平均芽长//cm
0.5+0.1	2.38 c	0.95 c	3.92 e	1.27 c
0.5+0.2	2.58 c	1.12 b	3.94 e	1.53 a
1.0+0.1	3.15 bc	0.97 c	4.82 d	1.05 d
1.0+0.2	3.32 bc	1.17 ab	4.79 d	1.31 bc
1.0+0.5	3.59 bc	1.19 ab	4.59 d	1.58 a
1.5+0.2	4.28 ab	1.22 a	6.46 b	1.36 bc
1.5+0.5	3.28 bc	1.19 ab	5.61 c	1.38 b
2.0+0.2	5.05 a	0.93 c	7.75 a	1.09 d

培养基上,主根的形成量少但侧根和气生根较多。由表 5 可见,在 6-BA 浓度相同的条件下,外植体生根率、根数和根长除处理⑨外均随 NAA 浓度升高而增加。当 NAA 浓度超过 0.3 mg/L、6-BA 浓度超过 0.5 mg/L 时,外植体生根均受到抑制。综合分析认为,生根培养基以处理⑧即 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA 为最佳生根激素配比,根萌发的最早,生根率达 100%,且生根数最高,根也较粗较长。

表 5 不同浓度 6-BA 与 NAA 对比对椒样薄荷组培苗瓶内生根诱导的影响

处理	6-BA mg/L	NAA mg/L	生根率 %	根数 条/株	平均根长 cm	开始生根的天 数//d
①	0	0.1	100	7.6	0.87	13
②	0	0.3	83	11.2	1.30	10
③	0.1	0	37	3.7	0.46	11
④	0.1	0.1	71	8.8	0.94	9
⑤	0.3	0	32	2.0	0.53	8
⑥	0.3	0.1	100	13.5	1.70	6
⑦	0.5	0	24	1.6	0.35	5
⑧	0.5	0.3	100	17.4	2.50	3
⑨	0.6	0.4	58	3.2	0.51	3

3 小结与讨论

影响椒样薄荷组织培养的因素很多,如温度、光照、湿度、外植体种类、培养基成分、植物激素等。该试验是在外界培养条件不变的情况下,研究不同培养材料及不同激素组合对椒样薄荷组织培养的影响。结果表明:①最适宜椒样薄荷组织培养的外植体材料为幼嫩的茎尖;②生长素和细胞分裂素对椒样薄荷组培苗不定芽的诱导、增殖及生根都有一定的促进作用,特别是 6-BA 和 NAA 两者相互作用,不仅提高不定芽和根的诱导率,还促进组培苗健康生长;③通过筛选,最终确定不定芽诱导的激素组合为 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA,继代增殖的激素组合为 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA,生根诱导的激素组合为 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA。

椒样薄荷的组织培养较薄荷^[12]对激素浓度的要求较低,椒样薄荷只需较低的植物激素即可满足分化增殖的需要,这可能与不同植物内源激素含量有关。在试验中还发现,椒样薄荷较易生根,只需进行瓶内生根诱导即可产生大量的不定根,然后将生根苗进行适当的炼苗就可以移栽到大田中。

参考文献

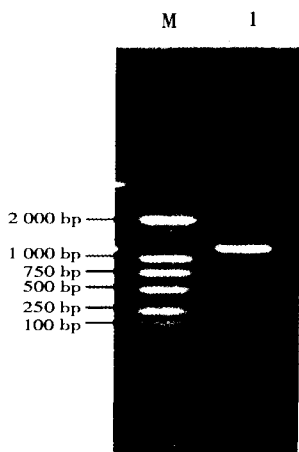
- [1] 左庆华,尹江,郝志君,等.冀西北高寒半干旱地区美国椒样薄荷越冬试验初报[J].河北农业科学,1995(2):39.
- [2] 李妍.椒样薄荷的栽培技术[J].北方园艺,2004(6):35.
- [3] 冯晓侠.椒样薄荷的栽培技术[J].陕西农业科学,2005(2):125.
- [4] 李冬梅,窦宏涛,赵朝毅,等.椒样薄荷最佳收获期的试验研究[J].陕西农业科学,2004(5):24.
- [5] 《中国香料植物栽培与加工》编写组.中国香料植物栽培与加工[M].北京:轻工业出版社,1985:367-369.

(下转第 3162 页)

2.3 6-BA 和 NAA 对椒样薄荷不定芽增殖的影响 一般来说,最优化的增殖培养基不仅要求有较高的增殖率,还要有适合继代的芽长,植株生长也要健壮。细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 互作,可以促进不定芽的增殖和生长(表 4)。由表 4 可见:观察时间相同时,在 NAA 浓度相同的情况下,当 NAA 为 0.1 或 0.2 mg/L 时,增殖系数随 6-BA 浓度的增加而增加;当 NAA 为 0.5 mg/L、6-BA 由 1.0 mg/L 增加到 1.5 mg/L 时,增殖系数和平均芽长都有降低的趋势,说明较高浓度 NAA 与 6-BA 配比利于椒样薄荷不定芽增殖和生长;当 6-BA 浓度增至 2.0 mg/L 时,增殖系数最高,但平均芽长却较低,芽苗也较黄弱不适宜继代;在 6-BA 浓度相同的情况下,当 NAA 浓度由 0.1 mg/L 增加到 0.2 mg/L 时,增殖系数随 NAA 浓度的增加而上升趋势。由表 4 还可以看出,20 与 30 d 的调查统计结果有较大差异。其中增殖系数增加较为显著,芽长略有增加,说明延长一定的培养时间有助于增殖系数的提高,同时也有一定的壮苗作用。通过该试验确定 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 是最适宜椒样薄荷不定芽增殖的激素组合。

2.4 不同浓度 6-BA 与 NAA 对比对椒样薄荷组培苗瓶内生根诱导的影响 试验中观察到,在 6-BA/NAA 比值较小的处理④或没有 6-BA 的处理①、②中,根萌发较迟;在同时含有 6-BA 和 NAA 2 种激素的处理⑧、⑨的培养基上,形成的根长且较粗壮;在没有 NAA 的培养基上,根萌发的也相对较晚且根的数量较少;在只含有 NAA 的处理①、②的培

12~16 h。以 *Dra* I、*Hind* III、*Sac* I、*Bam*HI、*Eco*RI 酶切片段的连接产物为模板,进行 PCR 反应。结果仅从 *Dra* I 酶切片段的连接产物中扩增得到了一长度约 800 bp 的片段(图 2)。



注: M 为 DNA 标准分子量 DL-2000;
I 为反向 PCR 产物。

图 2 反向 PCR 产物电泳

2.3 核苷酸序列分析 综合简并 PCR 和反向 PCR 测序结果,克隆得到了一个长度为 1 244 bp 的序列,Blast 搜索核苷酸同源序列表明其为葡萄糖 6-磷酸脱氢酶编码基因,命名为 CgZWF,该序列的 GenBank 序列登录号为 EF373653。根据 Blast 结果从 GenBank 数据库中选择 9 个与 CgG6pdp 氨基酸序列同源性高,且来源于酵母的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶氨基酸序列,用 DNAMAN 软件绘制系统进化树,其结果见图 3。CgG6pdp 氨基酸序列与 *K. lactis* (登录号为 XP_453944)和 *Candida albicans* (登录号为 Q5AQ54)的同源性分别为 62.7 %和 62.0 %,与其他酵母的 G6pdp 氨基酸序列相差较大。

3 讨论

伴随着人类基因组计划的完成,一些模式生物如酵母、线虫、果蝇和一些原核生物的基因组的序列测定相继完成,人类积累大量的 DNA 序列信息。利用这些信息资源,如基因数据库 GenBank、EMBL、DDBJ 来克隆和确定基因可能

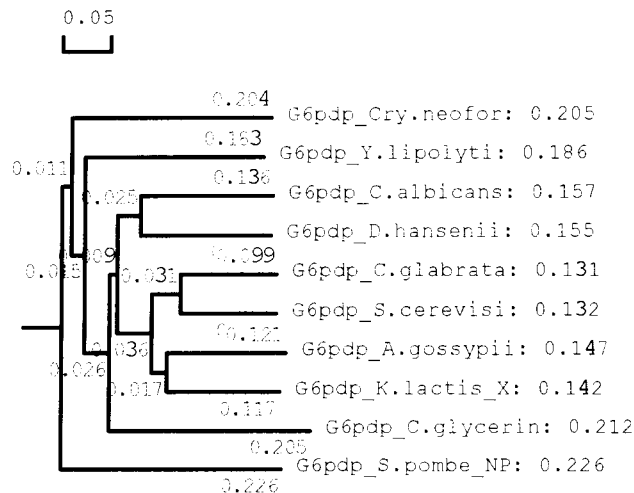


图 3 CgG6pdp 氨基酸序列系统进化树

的功能,是分子生物学常用的重要途径。通过分析已报道的酵母 6-磷酸葡萄糖脱氢酶氨基酸序列,设计了简并引物,通过简并 PCR 和反向 PCR 获得了 6-磷酸葡萄糖脱氢酶编码基因的部分序列,而且序列分析结果也证明了这一点。显然,在缺少基因文库和遗传背景不清楚的情况下克隆某些功能基因,利用网络上巨大的生物信息资源是一条捷径。由 CgZWF 编码的氨基酸序列与其他酵母的同源性不高,可能与产甘油假丝酵母特殊的遗传资源有关,所得到的 CgZWF 为阐明磷酸戊糖途径在耐高渗和甘油高产的中的作用奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 王正祥. 产甘油假丝酵母过量合成甘油的机理[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1998.
- [2] WANG Z X, ZhUGE J, FANG H Y, et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review[J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19:201-223.
- [3] ZHUGE J, FANG H Y, WANG Z X, et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast candida glycerinogenes[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55: 686-692.
- [4] BURKE D, DAWSON D, STEARNS T. *Methods in yeast genetics, a cold spring harbor laboratory course manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000:109-110.
- [10] 赖家业, 杨振德. 野薄荷的茎段培养[J]. *广西热作科技*, 2000(3): 9-11.
- [11] 李格. 薄荷再生植株构建中的产业化关键技术研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2004.
- [12] 王小敏, 李维林, 赵志强, 等. 不同培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响[J]. *植物资源与环境学报*, 2006, 15(3): 51-54.
- [6] 上海日用化学工业研究所. 薄荷的栽培与加工[M]. 北京: 轻工业出版社, 1975: 21-22.
- [7] 孙学忠. 胡椒薄荷及其栽培[J]. *香料香精化妆品*, 1991(1): 21.
- [8] 芮和恺. 中国精油植物及其利用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1987: 392.
- [9] 《天然香料手册》编委会. 天然香料手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989: 266.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对生长率), 单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时), 则可取各主要词首字母写成缩写, 但需在第一次出现处写出全称, 表及图中则用注解形式在下方注明, 以便读者理解。