

唇萼薄荷的组织培养与植株再生^{*}

李晓东¹, 程智慧², 文志华¹, 陈日聪¹

(1 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 518055;

2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以唇萼薄荷(*M. pulegium*)的叶片、顶芽、茎段作为外植体进行离体培养, 结果表明, 顶芽为最适的外植体, 最利于不定芽分化的培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 丛芽增值的最佳培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA, 最优的生根培养基为1/2 MS+0.05 mg/L NAA, 生根率达100%。

[关键词] 唇萼薄荷; 离体培养; 增殖; 植株再生

[中图分类号] Q 813.1⁺2; S567.23⁺5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)01-0087-04

Tissue culture and plantlet regeneration of penny royal mint (*M. pulegium*)

L I X iao-dong¹, CHEN G Z H i-hui², W EN Z h i-hua¹, CHEN R i-cong¹

(1 School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

2 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The leaves, tip buds and stem segments of *M. pulegium* as explants were cultured *in vitro*. The results showed that tip buds were the best explants, MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA was the most appropriate media for differentiation of adventitious shoots. MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA was the most appropriate media for differentiation and multiplication of adventitious shoots. 1/2 MS+0.05 mg/L NAA was the most appropriate media for rootage, and its efficiency was 100%.

Key words: *M. pulegium*; *in vitro* culture; multiplication; plantlet regeneration

薄荷为多年生宿根草本, 在我国种植历史悠久^[1]。中医学上以薄荷全草入药, 其性凉、味辛, 具有疏散风热、清理头目、理气解郁等功能, 主治外感发热、头痛目赤、咽喉肿痛、皮肤瘾疹等症。薄荷的茎叶可提取薄荷油、薄荷脑、薄荷素等香料, 是医药卫生、日用化工、食品工业的重要原料之一^[2-3]。薄荷原油及其产品在我国年消耗量为2 000 t, 正常年份出口量约5 000 t, 出口产品在国际市场上占主导地位^[4]。但目前生产上栽培的薄荷品种大多仍是20世纪70年代育成的老品种, 退化严重, 薄荷产量和原油质量逐年下降, 直接影响其在国际市场中的竞争力。因此, 薄荷的品种改良与更新研究成为我国发展薄荷生产和扩大出口创汇的迫切需要^[5]。大量研究

证明, 成熟完善的植物组织培养技术是解决品种退化和更新的有效手段之一^[6-7]。

唇萼薄荷(*M. pulegium*)系唇形科(Labiatae)薄荷属(*Mentha*)植物。除具有薄荷的一般功效外, 作为新兴的芳香植物和地被植物逐渐被大家接受与重视, 但对唇萼薄荷的组织培养还未见报道。本研究以唇萼薄荷的叶片、顶芽、茎段为外植体, 对唇萼薄荷离体培养条件进行了初步研究, 以期对唇萼薄荷的品种改良和快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用苗圃栽植的唇萼薄荷为试验材料, 要求植

* [收稿日期] 2005-12-26

[基金项目] 深圳职业技术学院双高项目(03KJb010)

[作者简介] 李晓东(1969-), 男, 陕西安康人, 副教授, 博士(博士后), 主要从事植物组织培养及植物转基因研究。

株生长健壮,多侧枝,茎段粗壮,无明显病虫害,能散发出强烈清凉气息。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选取 选取唇萼薄荷的顶芽、茎段、叶片为外植体。顶芽为主枝或侧枝顶端,长度约为 3 cm,带有两三片嫩叶;茎段取健壮者为佳,可留 1~2 片幼嫩小叶,茎段上端稍短,下端较长,长 2.5 cm;叶片以幼嫩叶片为佳,大小约为 1.0 cm²,带叶柄。

1.2.2 外植体消毒 外植体选取后先在流水下冲洗 20~30 min,去除表面灰尘及脏物,用纱布吸干水分。茎段、顶芽去除叶片,切成 1~2 cm 的小段,每一茎段至少有 1 对侧芽,叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的叶盘,然后用体积分数 70%~75% 酒精处理 1 s,随即转入 0.1% 升汞溶液(加 1~2 滴吐温-80),叶片消毒 5 min,茎段和顶芽消毒 7 min,无菌水冲洗 7 遍,无菌滤纸吸干水分,备用。

1.2.3 培养基 幼芽的诱导以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度的 6-BA (2.0, 4.0, 6.0 mg/L)、

NAA (0.1, 0.3, 0.5 mg/L); 幼芽的增殖以 MS 为基本培养基,添加 2.0 mg/L 6-BA, NAA (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/L); 生根培养基分别以 MS、1/2 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度的 NAA (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/L)。

培养基中蔗糖浓度为 3% (1/2 MS 培养基减半),琼脂浓度为 0.8%,pH 值为 5.8~6.0。

1.2.4 培养条件 培养室温度(24±2),光照强度 2 000 lx,每天光照 14 h。

2 结果与分析

2.1 不同部位外植体的分化表现

将顶芽、茎段、叶片 3 种外植体分别接种于不同的诱芽培养基中,15 d 后观察统计不同外植体的分化情况。表 1 结果表明,唇萼薄荷的叶片接种后,随着培养时间的延长,切口逐渐褐化且易污染,萌芽率较低,而顶芽切段污染程度较小,萌芽率也相对较高,茎段表现介于二者之间。因此,顶芽是唇萼薄荷组织培养和快速繁殖较为理想的外植体。

表 1 不同外植体在诱芽培养基上的表现

Table 1 Performances of different explants in media of induced shoots

培养基编号 Medium number	激素质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Hormone concentration		叶片 Leaves			茎段 Stem segment			顶芽 Tip buds		
	6-BA	NAA	外植体数 Number of explants	诱芽外植体数 No. of explants induced shoots	萌芽率/% Gemination ratio	外植体数 Number of explants	诱芽外植体数 No. of explants induced shoots	萌芽率/% Gemination ratio	外植体数 Number of explants	诱芽外植体数 No. of explants induced shoots	萌芽率/% Gemination ratio
D1	2.0	0.1	104	24	20.1	102	36	34.1	101	41	40.9
D2	4.0	0.1	124	31	24.6	114	41	38.1	154	66	42.4
D3	6.0	0.1	115	27	23.4	107	39	36.1	166	85	51.4

2.2 顶芽外植体的不定芽诱导分化

首先,设计 3 种培养基(D1,D2,D3 培养基),即固定培养基中 NAA 质量浓度为 0.1 mg/L,调节其中的 6-BA 质量浓度,4 周后比较不同质量浓度

6-BA 对分化的影响。从表 2 可知,尽管 D3 培养基的出芽时间最早,但从芽数和萌芽率来看,D1 培养基的效果最好,初步说明 6-BA 质量浓度为 2.0 mg/L 时分化效果较好。

表 2 顶芽在不同培养基上的诱导分化

Table 2 Induction and differentiation of tip buds in media of induced shoots

培养基编号 Medium number	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Hormone concentration		外植体数 Number of explants	出芽时间/d The time for inducing first bud(days)	诱芽外植体数 No. of explants induced shoots	萌芽率/% Gemination ratio
	6-BA	NAA				
D1	2.0	0.1	264	7	224	84.8
D2	4.0	0.1	241	8	103	42.7
D3	6.0	0.1	235	6	150	63.8
D4	2.0	0.1	287	7	246	85.7
D5	2.0	0.3	266	6	176	66.3
D6	2.0	0.5	214	7	60	28.0
D7	2.0	0	262	13	31	11.8
D8	0	0.1	242	14	19	7.85

在上一步试验的基础上, 固定 6-BA 质量浓度为 20 mg/L, 调节 NAA 的质量浓度, 即 D4, D5, D6, D7 4 种培养基, 以确定 NAA 的质量浓度, 同时设定 6-BA 为 0 的培养基 D8。表 2 结果表明, NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时的分化效果最好。因此, 培养基 MS + 20 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 是唇萼薄荷分化的最佳培养基。

观察发现, 在上述 8 种培养基上, 唇萼薄荷的顶芽均有不定芽分化, 分化过程中首先出现致密、颗粒状的愈伤组织, 初时为绿色, 随着生长时间加长的有的培养基上的愈伤组织会逐渐变为褐色或黑色。激素质量浓度配比不同, 愈伤组织形成的早晚、多少和衰亡时期亦有差别。在 6-BA 或 NAA 质量浓度为 0 的培养基上, 愈伤组织形成量很少, 在含有 6-BA, NAA 的培养基中愈伤组织量多, 且出现较早, 尤其

在 20 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 组合的培养基中, 愈伤组织、幼芽长势均好于其他培养基, 最适于芽的诱导和生长。

2.3 丛芽的增殖培养

当幼芽长到 1.5~2.0 cm 时, 从基部切下幼芽, 接种于增殖培养基, 4 周后统计出芽情况, 结果见表 3。表 3 结果表明, 在 6-BA 为 20 mg/L 的情况下, 外植体增殖芽数随 NAA 质量浓度升高而减少, NAA 质量浓度越高, 其对芽分化的抑制作用越大, 芽死亡率越高。在 MS + 20 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 的培养基上, 幼芽增殖倍数达 8.5, 平均芽长达 5.5 cm, 而在 MS + 20 mg/L 6-BA + 0.8 mg/L NAA 培养基上, 芽的增殖倍数只有 4.6, 平均芽长为 3.5 cm。因此, 唇萼薄荷最佳丛芽增殖培养基为 MS + 20 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA。

表 3 不同培养基的增殖效果

培养基编号 Medium number	激素质量浓度/(mg · L ⁻¹) Hormone concentration		外植体数 Number of explants	增殖芽数 Number of multiplication shoots	增殖倍数 Multiplication coefficient	平均芽长/cm Average length of shoots
	6-BA	NAA				
M 1	20	0.05	50	425	8.5	5.5
M 2	20	0.1	50	310	6.2	3.5
M 3	20	0.2	50	250	5.0	1.5
M 4	20	0.4	50	270	5.4	2.5
M 5	20	0.8	50	230	4.6	3.5

2.4 诱导生根培养基的筛选

当增殖的幼芽高度达到 1.5~2 cm, 带有 2~4 片叶时, 从基部切下幼芽接种于生根培养基, 3 周后统计生根情况。由表 4 可知, 幼芽在各种培养基上均能生根, 生根率达 100%, 但不同生根培养基中,

幼芽生根的快慢及根的数量和长度差别较大。最初 15 d, 在不含激素的 MS 与 1/2 MS 培养基中, 幼芽生根的数量最多, 根细长, 15 d 以后, 根的增加速度减慢, 侧根形成极少, 而在含低质量浓度 NAA 的培养基上, 根增殖速度加快, 且侧根和气生根较多。

表 4 不同培养基的诱根效果

培养基编号 Medium number	基本培养基 Basis medium	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种幼芽数 Number of buds	生根幼芽数 Number of buds induced roots	生根率/% Ratio of iduced roots	平均根数 Average number of roots	平均根长/cm Average length of roots
R 1	MS	0	60	60	100	2.0	1.0
R 2		0.05	60	60	100	13.5	3.5
R 3		0.1	60	60	100	11.0	2.0
R 4		0.2	60	60	100	8.0	1.5
R 5		0.4	60	60	100	7.5	1.5
R 6	1/2 MS	0	60	60	100	1.0	0.5
R 7		0.05	60	60	100	15.5	3.5
R 8		0.1	60	60	100	12.0	1.5
R 9		0.2	60	60	100	8.5	1.0
R 10		0.4	60	60	100	8.0	1.0

注: 平均根数、平均根长以随机抽取的 20 个幼芽计算。
Note: The average number of roots and average length of roots are based on 20 random young buds
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

添加低质量浓度 NAA 有利于根的长粗, 在高质量浓度 NAA 的培养基上, 根明显细短。不论以 MS 还是以 $1/2$ MS 为基本培养基, 平均生根数、根长均随 NAA 质量浓度的增大而减少, 添加 0.05 mg/L NAA 效果最佳, 所以低质量浓度 NAA 有利于根的生长。

添加相同质量浓度 NAA 情况下, $1/2$ MS 培养基较 MS 表现出更为明显优势, 其生根快, 根粗壮, 根数也相对较多。其中最佳的生根培养基为 $1/2$ MS + 0.05 mg/L NAA。在该培养基上, 5 d 就有根生出, 且根粗壮, 有明显气生根, 根尖呈乳白色, 表面无根毛。

3 讨 论

芳香植物是一类新兴的绿化、美化植物, 在欧美、日本、港台等地已普及到日常生活的方方面面, 既可用于食品烹饪、美容化妆等方面, 而且栽种芳香植物还可愉悦心情, 杀灭空气中的病菌, 提高空气质量, 利于身心健康。唇萼薄荷除具有传统薄荷的用途外, 更因其具有贴地平覆生长, 满坪快的特点, 以及较好的抗旱驱虫能力和特殊的芳香, 成为一种引人注目的地被芳香植物, 在园林绿化中日益受到重视。

本研究结果表明, 唇萼薄荷不同外植体诱导的效果差异较大, 利用顶芽可在短期内产生大量的不定芽, 增殖系数较高。取材于营养生长期健壮植株的顶芽, 离体培养的成活率高(85%以上)、分化快; 而进入生殖生长旺盛时期的植株顶芽, 成活率较低

(60%左右)、分化慢, 繁殖系数降低; 从诱导愈伤组织到不定芽出现的时间很短(6 d 左右), 故唇萼薄荷组织培养的变异几率较小。因此, 唇萼薄荷的离体培养体系的建立除了能够满足园林绿化对唇萼薄荷幼苗的大量需求外, 还可以直接用于园林苗木的生产。

传统薄荷栽培种植会出现品种的严重退化、薄荷产量及原油质量逐年下降等问题, 组织培养是解决这些问题的有效途径之一。虽然目前唇萼薄荷的繁殖有播种、扦插等多种方法, 但建立其离体培养的快速繁殖系统, 不但能提高繁殖系数, 加快繁殖速度, 还可为品种复壮、脱毒以及推广栽培提供技术支持。

【参考文献】

- [1] 李锡文. 我国一些唇形科植物学名的更动[J]. 植物分类学报, 1974, 12(2): 213-234
- [2] 王 晖, 吴 铁. 薄荷及其有效成分药理作用的研究概况[J]. 中草药, 1998, 29(6): 422-424
- [3] 刘金荣, 李晚情, 李萍西, 等. 新疆野生薄荷的研究[J]. 东北药学杂志, 1994, 9(1): 88-89
- [4] 王栋章, 赵国芳, 张祖尧. 中国薄荷生产与贸易[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992: 179-218
- [5] 孙 政, 张 祥, 缪传真. 我国薄荷产业的现状及思考[J]. 香料香精化妆品, 1999(2): 13-15
- [6] 陈 英. 植物体细胞无性系变异与育种[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991: 1-10
- [7] 王茂斌, 马宗新, 赵 红, 等. 薄荷品种提纯途径及程序[J]. 安徽农业科学, 2002, 28(2): 235-236