

两个薄荷品种叶片愈伤组织的诱导及增殖

于 盱, 李维林^①, 梁呈元, 刘 艳

(江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014)

摘要: 采用正交实验设计, 研究了诱导培养基中 6-BA、NAA 和 V_C 浓度及基本培养基类型 4 个因素对薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq.) 品种‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织诱导的影响, 并研究了增殖培养基中 6-BA、NAA、IBA 和 2,4-D 浓度对愈伤组织增殖的影响, 筛选出适宜于品种‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织诱导和增殖的最适培养基。结果表明, 培养基中 6-BA、NAA 和 V_C 浓度及基本培养基类型对品种‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织的诱导率和褐化率均有一定的影响, 但不同品种适宜的培养基配比有一定的差异; NAA 浓度对品种‘687’愈伤组织诱导的影响作用显著, 影响品种‘沪 39’愈伤组织诱导的主要因素是 V_C 浓度和基本培养基类型。适宜于品种‘687’叶片愈伤组织诱导的培养基为含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 B_5 培养基, 适宜于品种‘沪 39’愈伤组织诱导的培养基为含 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ V_C 的 1/2MS 培养基, 均含 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 (pH 5.5 ~ pH 5.8)。2 个品种叶片愈伤组织增殖所需的生长调节剂浓度及比例也有一定的差异, 较高浓度的细胞分裂素有利于愈伤组织的增殖, 品种‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织增殖的适宜培养基分别为 B_5 培养基和 1/2MS 培养基, 均含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 以及 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 (pH 5.5 ~ pH 5.8)。

关键词: 薄荷; 愈伤组织; 诱导; 增殖; 培养基

中图分类号: S567.23⁺5; Q943.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)02-0084-05

Induction and multiplication of leaf callus from two cultivars of *Mentha haplocalyx* YU Xu, LI Wei-lin^①, LIANG Cheng-yuan, LIU Yan (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(2): 84-88

Abstract: Effects of concentrations of 6-BA, NAA, V_C and type of basic medium in induction medium on induction of leaf callus from two cultivars ‘687’ and ‘HU 39’ of *Mentha haplocalyx* Briq. were studied by orthogonal experiment and effects of concentrations of 6-BA, NAA, IBA and 2,4-D in multiplication medium on multiplication of the callus were also researched, and the best media for induction and multiplication of leaf callus from ‘687’ and ‘HU 39’ were selected. The results show that the concentrations of 6-BA, NAA, V_C and type of basic medium have a certain influence on induction rate and browning rate of leaf callus, but the suitable proportion of medium for the two cultivars is not the same. The effect of NAA concentration on callus induction from ‘687’ leaf is significant, and V_C concentration and basic medium type are the main factors affecting callus induction from ‘HU 39’ leaf. The best medium for callus induction of ‘687’ leaf is B_5 medium containing $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, the best medium for that of ‘HU 39’ leaf is 1/2MS medium containing $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ V_C , both of the two media have $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar and $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose (pH 5.5 - pH 5.8). Amount of growth regulators needed for multiplication of leaf callus of the two cultivars is different, and a higher concentration of cytokinin is favorable for the multiplication of leaf callus. The best callus multiplication medium for ‘687’ and ‘HU 39’ leaf is B_5 medium and 1/2MS medium, respectively, and both of the two media contain $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar and $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose (pH 5.5 - pH 5.8).

收稿日期: 2009-01-05

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI06A12-12); 江苏省高新技术研究项目(BG2005317)

作者简介: 于 盱(1984—), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源和育种研究。

^①通讯作者 E-mail: lwlcnb@mail.cnbg.net

Key words: *Mentha haplocalyx* Briq.; callus; induction; multiplication; culture medium

薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq.) 为唇形科 (Labiatae) 薄荷属 (*Mentha* L.) 多年生草本植物, 是重要的香料植物和中药材。薄荷以干燥的地上部分入药, 常用于治疗风热感冒、目赤、喉痹及风疹等症^[1]。薄荷在世界各地广泛分布, 中国的主产区为江苏省和安徽省。中国的薄荷产品以香气纯正、异味少而享誉世界, 但由于长期连作栽培, 品种退化严重, 品质下降, 国际市场多被印度和巴西等国抢占^[2], 因此, 急需对国内现有薄荷品种进行改良和选育。

利用组织培养技术对薄荷属植物进行新品种的选育, 既可以保持薄荷优良性状的稳定遗传、防止品种退化, 也可对薄荷属资源的遗传转化和微型种质资源库的建立创造条件^[3]。有关薄荷属植物组织培养技术的研究在国内外已有较多报道^[3-7], 但在实际应用过程中还存在外植体的污染、褐变及组培苗玻璃化等问题, 使其应用推广受到一定的限制。

愈伤组织培养是优良品种选育的有效生物技术手段之一, 通过愈伤组织培养可以产生染色体加倍、耐盐和耐旱等突变体植株, 也是转基因和体细胞杂交等技术的重要环节, 因而, 愈伤组织培养也是目前薄荷组织培养研究中亟待解决的关键技术之一。薄荷组织中含有大量的多酚类成分, 诱导出的愈伤组织存在易褐化和再生率低等问题, 通过培养条件的优化可以解决以上问题, 而目前国内对薄荷愈伤组织诱导和增殖培养条件优选的研究较少^[8-9]。作者以薄荷品种‘687’和‘沪39’ (‘HU39’) 叶片为外植体, 对愈伤组织的诱导及增殖培养条件进行了筛选, 以期对薄荷叶片愈伤组织诱导率的提高和褐化率的降低提供实验基础, 也为薄荷的生物技术育种提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

供试薄荷品种为‘687’和‘沪39’, 其中‘687’于2003年5月引自浙江杭州, ‘沪39’于2003年4月引自安徽太和。在第2年早春尚未萌发之前选择白色粗壮、节间短、无病害的根茎作种根, 扩大繁殖, 在出苗后进行2~3次去杂, 适时浇水追肥。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导培养基筛选的正交实验 愈伤组织诱导培养基的筛选采用L9(4³)正交实验设计, 设置6-BA浓度、NAA浓度、V_C浓度及基本培养基类型4个因素, 其中, 6-BA浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹; NAA浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹; V_C浓度为0、100和200 mg·L⁻¹; 基本培养基类型为1/2MS、MS和B₅, 共9组处理。各培养基均含5.5 g·L⁻¹琼脂和30 g·L⁻¹蔗糖, pH 5.5~pH 5.8, 于121℃灭菌20 min。

于2008年春季分别采集薄荷品种‘687’和‘沪39’最靠近顶芽的全展叶片, 先用洗衣粉溶液浸泡15 min后, 用自来水冲洗干净, 接种前用体积分数75%乙醇浸泡40 s, 最后用质量体积分数0.1% HgCl₂溶液灭菌7 min, 无菌水冲洗3~4次。将叶片切成边长0.5 cm的小方块, 叶背面朝下接种在按上述实验设计配制的固体培养基上, 每瓶接种1个外植体, 每处理30瓶, 于温度25℃、黑暗条件下培养, 30 d后统计愈伤组织的诱导率及褐化率。

1.2.2 愈伤组织增殖培养基的筛选实验 分别以B₅和1/2MS培养基为品种‘687’和‘沪39’叶片愈伤组织增殖的基本培养基, 均含5.5 g·L⁻¹琼脂和30 g·L⁻¹蔗糖, pH 5.5~pH 5.8, 于121℃灭菌20 min。调整培养基中的6-BA、NAA、IBA和2,4-D浓度, 配制成15组愈伤组织增殖培养基。其中, 6-BA浓度分别为0.5、1.0、1.5和2.0 mg·L⁻¹; NAA浓度分别为0、0.5、1.0、1.5和2.0 mg·L⁻¹; IBA浓度分别为0、1.5和2.0 mg·L⁻¹; 2,4-D浓度分别为0和0.2 mg·L⁻¹。将培养15 d的‘687’和‘沪39’叶片愈伤组织分别转入上述增殖培养基中, 在温度25℃、每天光照8~10 h、光照度1500~2000 lx条件下培养。每种培养基接种20瓶, 每瓶接种1块愈伤组织, 2次重复。30 d后观察愈伤组织的生长及褐化状况, 计算愈伤组织增殖率。

1.3 评价指标及数据分析

愈伤组织的诱导率、褐化率和增殖率按下列公式计算: 诱导率 = (诱导愈伤组织的叶片数/接种叶片数) × 100%; 褐化率 = (褐化的愈伤组织数/接种愈伤组织数) × 100%; 增殖率 = (培养结束时愈伤组织鲜质量/接种时愈伤组织鲜质量) × 100%。

实验数据采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 薄荷叶片愈伤组织诱导培养基筛选的正交实验结果

培养基中添加的激素类型及浓度、 V_C 浓度和基本培养基类型对品种‘687’叶片愈伤组织的诱导率和褐化率均有一定的影响(表1)。由 R 值可以看出,4 个因素对品种‘687’叶片愈伤组织诱导率和褐化率的影响效应由大至小依次为:NAA 浓度、基本培养基类型、6-BA 浓度、 V_C 浓度。由 K 值可以看出,在添加了 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 B_5 培养基中,‘687’叶片愈伤组织的诱导率最高;在添加了 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 1/2MS 培养基中,‘687’叶片愈伤组织的褐化率最低。方差分析结果表明,除了 NAA 浓度对‘687’叶片愈伤组织诱导率有显著影响外,其他因素对其愈伤组织诱导率的影响均不显著;4 个因素

对其愈伤组织褐化率的影响均不显著。由于在 B_5 和 1/2MS 培养基中褐化率均较低,且培养基类型对褐化率的影响不显著,因此选择 B_5 为‘687’愈伤组织诱导的基本培养基。综合以上结果,选择添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 B_5 培养基(含 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $\text{pH} 5.5 \sim \text{pH} 5.8$)为‘687’愈伤组织诱导的最佳培养基。

培养基中的 NAA 浓度、6-BA 浓度、 V_C 浓度及基本培养基类型对品种‘沪39’叶片愈伤组织的诱导率和褐化率均有一定的影响(表2)。4 个因素对‘沪39’叶片愈伤组织诱导率的影响效应由大至小依次为: V_C 浓度、基本培养基类型、NAA 浓度、6-BA 浓度,对褐化率的影响效应由大至小依次为: V_C 浓度、NAA 浓度、基本培养基类型、6-BA 浓度。由 K 值可以看出,在添加了 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ V_C 的 1/2MS 培养基中,‘沪39’叶片愈伤组织的诱导率最高;在添加了 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ V_C 的 1/2MS 培养基中,‘沪39’叶片愈伤组织的褐化率最低。方差分析结果表明,6-BA、

表1 薄荷品种‘687’叶片愈伤组织诱导培养基筛选的正交实验结果

Table 1 Result of orthogonal experiment on medium selection for callus induction from *Mentha haplocalyx* ‘687’ leaf

编号 No.	因素和水平 ¹⁾ Factor and level ¹⁾				诱导率/% (I) Induction rate	褐化率/% (II) Browning rate
	A	B	C	D		
1	0.5	0.5	0	1/2MS	41.0	57.1
2	0.5	1.0	100	MS	55.6	55.5
3	0.5	1.5	200	B_5	97.5	40.0
4	1.0	0.5	100	B_5	30.0	69.0
5	1.0	1.0	200	1/2MS	60.4	41.4
6	1.0	1.5	0	MS	74.0	50.0
7	1.5	0.5	200	MS	1.0	80.0
8	1.5	1.0	0	B_5	67.4	47.0
9	1.5	1.5	100	1/2MS	68.0	50.0
$K I_1$	64.7	24.0	60.8	56.5		
$K I_2$	54.8	61.1	51.2	43.5		
$K I_3$	45.5	79.8	53.0	65.0		
$R I$	19.2	55.8	9.6	21.5		
$K II_1$	50.9	68.7	51.4	49.5		
$K II_2$	53.5	48.0	58.2	61.8		
$K II_3$	59.0	46.7	53.8	52.0		
$R II$	8.1	22.0	6.8	12.3		

¹⁾ A: 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); B: NAA 浓度 Concentration of NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C: V_C 浓度 Concentration of V_C ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D: 基本培养基类型 Type of basic medium.

表2 薄荷品种‘沪39’叶片愈伤组织诱导培养基筛选的正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal experiment on medium selection for callus induction from *Mentha haplocalyx* ‘HU39’ leaf

编号 No.	因素和水平 ¹⁾ Factor and level ¹⁾				诱导率/% (I) Induction rate	褐化率/% (II) Browning rate
	A	B	C	D		
1	0.5	0.5	0	1/2MS	73.3	60.0
2	0.5	1.0	100	MS	66.5	40.0
3	0.5	1.5	200	B_5	68.3	54.2
4	1.0	0.5	100	B_5	77.8	46.4
5	1.0	1.0	200	1/2MS	55.5	50.0
6	1.0	1.5	0	MS	72.0	50.0
7	1.5	0.5	200	MS	46.6	63.3
8	1.5	1.0	0	B_5	75.0	100.0
9	1.5	1.5	100	1/2MS	94.7	36.8
$K I_1$	69.4	65.9	73.4	74.5		
$K I_2$	68.4	65.7	79.7	61.7		
$K I_3$	72.1	78.3	56.8	73.7		
$R I$	3.7	12.6	22.9	12.8		
$K II_1$	51.4	65.9	70.0	48.9		
$K II_2$	48.8	63.3	41.1	51.1		
$K II_3$	66.7	47.0	55.8	66.9		
$R II$	17.9	18.9	28.9	18.0		

¹⁾ A: 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); B: NAA 浓度 Concentration of NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C: V_C 浓度 Concentration of V_C ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D: 基本培养基类型 Type of basic medium.

NAA 和 V_C 浓度及基本培养基类型对‘沪 39’叶片愈伤组织诱导率和褐化率的影响均不显著。综合以上实验结果, 确定添加了 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ V_C 的 1/2MS 培养基(含有 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.5 ~ pH 5.8) 为‘沪 39’叶片愈伤组织诱导的最佳培养基, 在该培养基上, ‘沪 39’叶片愈伤组织的诱导率和褐化率分别为 94.7% 和 36.8%。

在实验中还观察到, 薄荷叶片在适宜的培养基上一般培养 7 d 开始出现膨大卷曲现象, 10 d 后叶片边缘切口及叶脉处最先出现黄色颗粒状的致密愈伤组织。在各自的最适培养基上, 品种‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织的诱导率都可达到 90% 以上, 并且愈伤组织的出现时间、颜色及质地都相似; 在品种‘687’叶片愈伤组织的诱导过程中需要较高浓度的生长素及较低浓度的细胞分裂素, 而在品种‘沪 39’叶片愈伤组织的诱导过程中两者的浓度都较高; 添加抗氧化剂 V_C 对于防止‘687’叶片愈伤组织褐化的作用不明显, 但对品种‘沪 39’有一定的防褐化作用; B_5 培养基比 MS 培养基更适合‘687’叶片愈伤组织的诱导, 而 1/2MS 培养基对‘沪 39’叶片愈伤组织的诱导效果更好。

2.2 不同培养基对薄荷叶片愈伤组织增殖的影响

薄荷属于芳香类植物, 细胞内含有大量的酚类物质, 因此愈伤组织在后期生长过程中易褐化, 且不能正常增殖生长。在增殖培养基中添加适量的植物生长调节剂可以降低愈伤组织的褐化程度, 使愈伤组织能正常增殖。根据不同培养基中薄荷品种‘687’和‘沪 39’愈伤组织增殖状况可知(表 3), 添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 B_5 培养基和 1/2MS 培养基(均含 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.5 ~ pH 5.8) 分别最有利于‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织的增殖生长。

在实验中还观察到, 在不添加任何生长调节剂的增殖培养基上, 愈伤组织褐化死亡; 在添加了 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的增殖培养基上, 大部分愈伤组织外观呈黄褐色, 且增殖率较低; 在添加了 $1.0 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的增殖培养基上, 愈伤组织呈黄绿色, 当 6-BA 浓度大于 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织增殖率较高; 在添加了 IBA 和 2,4-D 的培养基上愈伤组织增殖率较低, 前者易褐化, 后者愈伤组织的颜色和质地发生较大改变, 呈白色松软状。在增殖培养过程中, 2 个品种叶片愈伤组织对不同生长调节剂的反应相似, 都需要较高浓度的细胞分裂素。

表 3 增殖培养基中添加不同浓度植物生长调节剂对薄荷叶片愈伤组织增殖生长的影响

Table 3 Effect of multiplication culture media adding plant growth regulators with different concentrations on multiplication growth of callus from *Mentha haplocalyx* Briq. leaf

编号 No.	各生长调节剂的浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of growth regulator				不同品种的增殖率/ $\%^{1)}$ Multiplication rate of different cultivars ¹⁾		愈伤组织外观 Appearance of callus
	6-BA	NAA	IBA	2,4-D	‘687’	‘HU39’	
1	0.5	0.5	0	0	1.78c	3.37bcd	黄褐色, 致密 Yellow-brown, compact
2	0.5	1.0	0	0	2.04bc	2.59def	黄褐色, 致密 Yellow-brown, compact
3	0.5	2.0	0	0	1.79c	2.54cd	黄褐色, 致密 Yellow-brown, compact
4	1.0	0	0	0.2	2.39bc	2.73bcd	白色, 松软 White, soft
5	1.0	0.5	0	0.2	3.27ab	3.15bcd	白色, 松软 White, soft
6	1.0	1.0	0	0	2.45bc	3.10bcd	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
7	1.0	1.5	0	0	2.31bc	3.07cd	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
8	1.0	2.0	0	0	1.61c	2.47cde	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
9	1.0	0	1.5	0	2.11bc	1.63ef	褐色, 致密 Brown, compact
10	1.5	1.0	0	0	2.75bc	3.21abc	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
11	1.5	2.0	0	0	3.32a	3.39abc	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
12	2.0	1.0	0	0	3.04a	3.10abc	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
13	2.0	1.5	0	0	3.63a	4.79a	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
14	2.0	2.0	0	0	2.30bc	3.94ab	黄绿色, 致密 Yellow-green, compact
15	2.0	0	2.0	0	1.41c	1.45f	褐色, 致密 Brown, compact

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 The datums are the average of three replications; 同列中不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$) The different letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$); 用于品种‘687’和‘沪 39’叶片愈伤组织增殖培养的基本培养基分别为 B_5 培养基和 1/2 MS 培养基(均含 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.5 ~ pH 5.8) The basic medium used for callus multiplication of ‘687’ and ‘HU39’ leaf is B_5 medium and 1/2 MS medium, respectively, both containing $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar and $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, pH 5.5 ~ pH 5.8.

3 讨论和结论

在离体条件下植物细胞全能性的实现受到植物内在遗传因素、所处发育阶段及外界环境的共同影响^[10],外源激素通过内源激素发挥传递开启遗传物质进行脱分化和再分化等发育表达信号的作用^[11],因此,外源激素的种类及浓度合适与否是愈伤组织诱导、增殖及分化成败的关键。师素云等的研究结果显示^[8],以茎尖为外植体,添加了 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的 B_5 培养基适合薄荷品种‘738’愈伤组织的诱导;周伟香等^[9]在诱导培养基中添加6-BA和NAA的同时附加了 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D,也成功地诱导出了薄荷叶片愈伤组织。

降低培养基中的铵态氮和硝态氮浓度以及加入抗氧化剂 V_C 在一定程度上均能降低愈伤组织的褐化率和推迟褐化时间^[12-13]。本实验结果显示,在 $1/2\text{MS}$ 培养基中添加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ V_C 可以降低品种‘沪39’叶片愈伤组织的褐化率。

薄荷品种‘687’和‘沪39’叶片愈伤组织诱导所需的激素种类及浓度均有一定的差异,品种‘687’需要较高浓度的生长素,而品种‘沪39’则需生长素与细胞分裂素维持1:1的浓度比例,推测可能与这两个品种具有不同的遗传背景和代谢特点有关。根据正交实验结果,确定薄荷品种‘687’叶片愈伤组织诱导的最适培养基为添加了 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的 B_5 培养基,品种‘沪39’叶片愈伤组织诱导的最适培养基为添加了 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ V_C 的 $1/2\text{MS}$ 培养基,均含有 $5.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖,pH 5.5~pH 5.8。在愈伤组织增殖阶段,2个品种所需的激素浓度及比例也有一定差异,但较高的细胞分裂素水平有利于叶片愈伤组织的增殖,因而,品种‘687’和‘沪39’叶片愈伤组织增殖的适宜培养基分别为添加 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的 B_5 培养基和 $1/2\text{MS}$ 培养基,均含 $5.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂和 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖,pH 5.5~pH 5.8。

在本实验中作者还观察到,在叶片愈伤组织增殖过程中,个别处理的培养基上可分化出芽,这些芽从原叶片中间的叶脉处长出,因此不能完全判断是

否实现了脱分化和再分化的过程,且已有研究表明^[8,14-17],薄荷属植物的愈伤组织较难分化。因此,要实现薄荷愈伤组织再分化和建立高效再生体系,需要进行进一步的摸索和实验研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005年版(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:310.
- [2] 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.
- [3] 王小敏,李维林,赵志强,等. 薄荷属植物的组织培养研究进展[J]. 江苏农业科学,2007(4):117-121.
- [4] 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.
- [5] 王小敏,李维林,梁呈元,等. 椒样薄荷试管苗生根的影响因素分析[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(3):73-75.
- [6] 臧玉琦,吴涛,朱玉灵,等. 薄荷茎尖生长点离体培养[J]. 中国农学通报,1998,14(1):47,73.
- [7] Hiroshi S, Suelo E, Seibi O, et al. Plant regeneration from protoplasts of peppermint (*Mentha piperita* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 546-550.
- [8] 师素云,练兴明,薛启汉,等. 薄荷离体培养愈伤组织诱导与植株分化[J]. 江苏农业科学,2000(6):27-28.
- [9] 周伟香,龚宁. 薄荷叶片愈伤组织的诱导与增殖[J]. 黔东南民族师范高等专科学校学报,2006,24(6):42-43.
- [10] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报,1999,16(3):238-244.
- [11] 吴雪峰,赵开军,陈毓荃. 植物启动子的诱导模式[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(12):14-21.
- [12] 周晓鹿. 降低皂质芦荟诱导愈伤组织褐化的初步研究[J]. 江西农业大学学报,2007,29(4):539-544.
- [13] Ogawa T, Fukuoka H, Yano H, et al. Relationships between nitrite reductase activity and genotype-dependent callus growth in rice cell cultures[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 576-581.
- [14] Rangaswamy N S. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures[J]. Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Plant Sciences, 1986, 96(4): 247-271.
- [15] Caissard J C, Faure O, Jullien F, et al. Direct regeneration *in vitro* and transient GUS expression in *Mentha × piperita* [J]. Plant Cell Reports, 1996, 16: 67-70.
- [16] Faure O, Diemer F, Moja S, et al. Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(3): 209-212.
- [17] Van Eck J M, Kitto S L. Callus initiation and regeneration in *Mentha* [J]. HortScience, 1990, 25(7): 804-806.