

不同培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响

王小敏^{1,2}, 李维林^{2,①}, 赵志强³, 梁呈元², 房海灵²

[1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095;

2. 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; 3. 江苏省科学技术厅, 江苏 南京 210008]

摘要:以江苏东台产薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)的茎尖为外植体,以MS为基本培养基,研究了培养基添加物和培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响。结果显示,导致薄荷玻璃化苗产生的主要因素是培养基中的6-BA、蔗糖和琼脂浓度以及培养温度和光照时间;当6-BA浓度为 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖浓度为4%、琼脂浓度为0.70%、培养温度 25°C 、光照 $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (2 000 lx)时,薄荷试管苗的繁殖系数较高,玻璃化苗率较低。

关键词:薄荷;组织培养;玻璃化;影响因素

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)03-0051-04

Effects of different conditions of tissue culture on vitrification of *Mentha haplocalyx* Briq. plantlets

WANG Xiao-min^{1,2}, LI Wei-lin^{2,①}, ZHAO Zhi-qiang³, LIANG Cheng-yuan², FANG Hai-ling² (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Science and Technology Department, Nanjing 210008, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(3): 51-54

Abstract: The shoots of *Mentha haplocalyx* Briq. from Dongtai of Jiangsu Province were cultured in MS medium to observe the influence of additives and culture condition on vitrification of plantlets. The results showed that the main factors leading to vitrification of *M. haplocalyx* plantlets were concentrations of 6-BA, sucrose and agar in the culture medium, culture temperature and irradiation time. Under the condition of $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, 4% sucrose, 0.70% agar and culture temperature 25°C , irradiation time $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (2 000 lx), the coefficient of proliferation is higher, the rate of vitrification is lower.

Key words: *Mentha haplocalyx* Briq.; tissue culture; vitrification; influence factor

薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)是中国传统的重要中药材之一^[1-3],各地多有栽培,入药以江苏产为佳^[2]。长期以来,薄荷主要以无性方式进行繁殖,病毒病十分普遍,引起薄荷品种的退化和产量、质量的下降。通过组织培养可以对薄荷进行脱毒复壮,但是在组织培养过程中由于各种因素的影响,导致试管内丛生苗出现嫩绿透明、愈伤组织出现鲜绿水渍状,即玻璃化现象。玻璃化现象是植物组织培养中特有的一种生理失调或生理病变。玻璃化苗不易生根,有的即便能生根,生长出的根也呈玻璃化状态,移栽成活率很低^[4,5]。薄荷组培过程中出现大量的玻璃化苗,在一定程度上造成了资源的浪费,也影响了薄荷试管苗质量的提高。尽管在有些研究中薄荷试管苗没有出现玻璃化现象^[6,7],但并未对其原因进行深入的研究。Debergh、Kevers等曾对玻璃化现象做过研究^[8,9],但是有关薄荷试管苗玻璃化现象的影响因素及控制措施的研究尚未见报道。为

此,作者对薄荷试管苗玻璃化现象的影响因素进行了研究,以期预防玻璃化苗的产生,提高薄荷试管苗的质量提供有效的手段和措施。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于2005年10月至2006年3月进行,以江苏东台产薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)苗做为实验材料。

收稿日期: 2006-03-17

基金项目: 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2002309)和江苏省“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,研究方向为药用植物栽培与生物技术。

① 通讯作者 E-mail: lwlcnb@ mail. cnbg. net

1.2 方法

切取薄荷茎尖约 2 cm, 去掉外层较大的叶片。先用 0.1% 洗衣粉溶液浸泡约 10 min, 用清水冲净后再用 75% 酒精消毒 30 s, 最后用 0.2% HgCl_2 浸泡 10 min。吸干表面水分后, 用手术刀剥掉外面 2~3 层叶片, 切成 0.5 cm 长的茎尖, 接种在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基中, 于 25°C 、光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (日光灯, 光照强度 2 000 lx) 的条件下培养 3 周后, 选取健康无菌的丛生芽进行继代培养。

取继代培养 2 周的试管苗 (株高约 1~2 cm) 接种在 MS 基本培养基中, 以 6-BA、蔗糖、琼脂浓度及温度和光照时间为实验因子, 设置不同处理 (见表 1)。其中处理 12 至 15 各接种 10 株苗, 其他各处理组接种 20 株苗, 重复 3 次。培养 30 d 后, 观察和统计试管苗的生长状况。用 SPSS (10.0) 软件进行单因素的差异显著性分析, 并按下列公式计算增殖系数及玻璃化率:

表 1 薄荷茎尖组织培养的单因素实验设计¹⁾

Table 1 The design of single factor experiment for tissue culture of *Mentha haplocalyx* Briq. shoot-tips¹⁾

处理号 No. of treatment	6-BA 浓 度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of 6-BA	蔗糖浓 度/% Conc. of sucrose	琼脂浓 度/% Conc. of agar	温度/ $^\circ\text{C}$ Temperature	光照时 间/ $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ Irradiation time
1	0.5	3	0.65	25	12
2	1.0	3	0.65	25	12
3	2.0	3	0.65	25	12
4	4.0	3	0.65	25	12
5	6.0	3	0.65	25	12
6	1.5	3	0.65	25	12
7	1.5	4	0.65	25	12
8	1.5	5	0.65	25	12
9	1.5	3	0.50	25	12
10	1.5	3	0.60	25	12
11	1.5	3	0.75	25	12
12	1.5	3	0.65	22	12
13	1.5	3	0.65	25	12
14	1.5	3	0.65	28	12
15	1.5	3	0.65	30	12
16	1.5	3	0.65	25	10
17	1.5	3	0.65	25	12
18	1.5	3	0.65	25	14
19	1.5	3	0.65	25	16
20	1.5	3	0.65	25	18

¹⁾ 所有处理以 MS 为基本培养基, pH 5.8, 附加 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; 光照强度 2 000 lx All treatments use MS medium, pH 5.8, adding $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; The light intensity is 2 000 lx.

增殖系数 = 培养 30 d 后的有效苗总数/接种苗数 (有效苗指苗的高度 $> 0.5 \text{ cm}$ 的试管苗)^[10]; 玻璃化率 (%) = 培养 30 d 后的玻璃化苗总数/培养 30 d 后的有效芽苗总数。

2 结果和分析

2.1 6-BA 浓度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响

培养基中添加不同浓度 6-BA 对薄荷试管苗玻璃化现象的影响见表 2。在蔗糖浓度 3%、琼脂浓度 0.65%、培养温度 25°C 、光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (2 000 lx) 的条件下, 当 6-BA 浓度低于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着浓度的增加, 薄荷试管苗增殖系数提高, 玻璃化率降低; 当 6-BA 浓度达 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 薄荷增殖系数提高至 5.37, 与其他处理组相比差异显著, 玻璃化率显著低于 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理组; 当 6-BA 浓度超过 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 玻璃化苗率显著增高, 且增殖系数也显著降低。由此可见, 培养基中的 6-BA 浓度达 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数最高, 玻璃化率较低。

表 2 6-BA 浓度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响 (接种 30 d 后)¹⁾
Table 2 Effect of 6-BA concentration in culture medium on vitrification of plantlets of *Mentha haplocalyx* Briq. (30 d after inoculation)¹⁾

6-BA 浓 度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of 6-BA	接种苗 数/株 Number of inoculated bud	有效苗 数/株 Number of plantlet	增殖 系数 Coefficient of proliferation	玻璃化苗 数/株 Number of vitrification plantlet	玻璃化 率/% Rate of vitrification
0.5	20	24.33	1.22e	1.33	5.48c
1.0	20	26.33	1.32d	1.00	3.85c
2.0	20	107.33	5.37a	11.00	10.25c
4.0	20	75.67	3.78b	10.00	13.24b
6.0	20	66.67	3.34c	16.33	24.60a

¹⁾ 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 ($P < 0.05$) All data are the average of three replications; The different letters in the same column indicated the significant difference at $P < 0.05$.

2.2 蔗糖浓度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响

当培养基中添加 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 及 0.65% 琼脂, 并于 25°C 、光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (2 000 lx) 的条件下, 改变培养基中的蔗糖浓度, 薄荷试管苗的玻璃化率见表 3。表 3 结果显示, 当蔗糖浓度较低时, 薄荷试管苗的增殖系数偏低, 玻璃化率显著较高; 当蔗糖浓度增加至 4% 时, 薄荷新分化植株健壮, 丛生芽多, 玻璃化率相对较低。

表3 蔗糖浓度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响(接种30 d后)¹⁾
Table 3 Effect of sucrose concentration in culture medium on vitrification of plantlets of *Mentha haplocalyx* Briq. (30 d after inoculation)¹⁾

蔗糖浓度/% Conc. of sucrose	接种苗数/株 Number of inoculated bud	有效苗数/株 Number of plantlet	增殖系数 Coefficient of proliferation	玻璃化苗数/株 Number of vitrification plantlet	玻璃化率/% Rate of vitrification
3	20	95.67	4.78b	7.00	7.60a
4	20	109.33	5.47a	4.67	4.27b
5	20	63.33	3.16c	2.33	3.89c

¹⁾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($P < 0.05$) All data are the average of three replications; The different letters in the same column indicated the significant difference at $P < 0.05$.

2.3 琼脂浓度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响

当培养基中添加 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 3% 蔗糖,改变琼脂浓度,并于 25°C 、光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ($2\ 000 \text{ lx}$) 的条件下培养 30 d 后,薄荷试管苗的玻璃化率见表 4。结果表明,随琼脂浓度的增加,薄荷试管苗的玻璃化率明显降低。当琼脂浓度达 0.60% 时,试管苗的增殖系数显著高于其他处理组,达 5.47,且玻璃化率较低,仅为 4.57%;而琼脂浓度较低时(0.50%),新生幼苗呈水浸状,叶片缩短肥厚,植株呈莲花状,玻璃化现象严重,玻璃化率达 25.35%。

表4 琼脂浓度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响(接种30 d后)¹⁾
Table 4 Effect of agar concentration in culture medium on vitrification of plantlets of *Mentha haplocalyx* Briq. (30 d after inoculation)¹⁾

琼脂浓度/% Conc. of agar	接种苗数/株 Number of inoculated bud	有效苗数/株 Number of plantlet	增殖系数 Coefficient of proliferation	玻璃化苗数/株 Number of vitrification plantlet	玻璃化率/% Rate of vitrification
0.50	20	25.00	1.25c	6.33	25.35a
0.60	20	109.33	5.47a	5.00	4.57c
0.75	20	78.67	3.93b	5.00	6.36b

¹⁾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($P < 0.05$) All data are the average of three replications; The different letters in the same column indicated the significant difference at $P < 0.05$.

2.4 培养温度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响

植物组织培养所需温度一般为 $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$,在这个温度范围内,试管苗生长正常,超过这个温度,就易产生玻璃化现象。表5 结果表明,当培养温度为 25°C 时,薄荷试管苗玻璃化率最低(2.33%);超过 28°C 时,薄荷试管苗玻璃化率显著升高,且增殖系数也无明显提高;超过 30°C 时试管苗不能正常生长。

表5 培养温度对薄荷试管苗玻璃化现象的影响(接种30 d后)¹⁾
Table 5 Effect of culture temperature on vitrification of plantlets of *Mentha haplocalyx* Briq. (30 d after inoculation)¹⁾

温度/ $^\circ\text{C}$ Temperature	接种苗数/株 Number of inoculated bud	有效苗数/株 Number of plantlet	增殖系数 Coefficient of proliferation	玻璃化苗数/株 Number of vitrification plantlet	玻璃化率/% Rate of vitrification
22	10	15.67	1.55c	1.00	6.45c
25	10	21.33	2.15b	0.67	2.33d
28	10	24.67	2.45a	2.00	8.16b
30	10	22.67	2.25ab	3.00	13.33a

¹⁾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($P < 0.05$) All data are the average of three replications; The different letters in the same column indicated the significant difference at $P < 0.05$.

2.5 光照时间对薄荷试管苗玻璃化现象的影响

植物组织培养过程中一般1个培养架采用40 W 日光灯管2~3只^[11],要求光照 $10 \sim 14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。光照时间过长或过短,都容易导致试管苗的玻璃化现象。表6 的结果表明,光照时间为 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,薄荷试管苗的玻璃化率较高;光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,试管苗玻璃化率最低,增殖系数较高;光照时间达 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,增殖系数最高,玻璃化率较低;光照时间超过 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,增殖系数降低,玻璃化率升高,严重影响薄荷试管苗的生长。

表6 光照时间对薄荷试管苗玻璃化现象的影响(接种30 d后)¹⁾
Table 6 Effect of irradiation time on vitrification of plantlets of *Mentha haplocalyx* Briq. (30 d after inoculation)¹⁾

光照时间/ $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ Irradiation time	接种苗数/株 Number of inoculated bud	有效苗数/株 Number of plantlet	增殖系数 Coefficient of proliferation	玻璃化苗数/株 Number of vitrification plantlet	玻璃化率/% Rate of vitrification
10	20	49.67	2.48d	7.67	15.32c
12	20	89.67	4.48b	4.33	4.29e
14	20	109.33	5.47a	5.33	4.88d
16	20	73.33	3.66c	12.33	16.94b
18	20	41.67	2.08e	12.33	29.41a

¹⁾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($P < 0.05$) All data are the average of three replications; The different letters in the same column indicated the significant difference at $P < 0.05$.

3 结论和讨论

薄荷组织培养中出现的玻璃化现象是许多因素综合作用的结果,因此,在生产实践中应该综合考虑各方面因素,选择最佳的培养条件。综合本实验结果,并考虑培养成本及培养周期等因素,确定以 MS 为基本培养基,并添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 4% 蔗

糖、调整琼脂浓度为0.70%,并在25℃、光照12 h·d⁻¹(2 000 lx)的条件下进行组织培养,薄荷试管苗的增殖系数较高,试管苗的玻璃化率较低。

6-BA 浓度的高低影响薄荷组织培养中玻璃化试管苗的形成,表现为6-BA 浓度越高,玻璃化苗率越高,这一现象与赵佐敏、王爱勤等的研究结果一致^[12,13]。综合考虑增殖系数的因素,6-BA 浓度应以2 mg·L⁻¹为宜,在此条件下,薄荷的增殖系数最高,玻璃化苗率较低。

培养基的渗透压影响着植物细胞脱分化、再分化及器官的形成,而糖对培养基的渗透压起决定性作用^[14]。适当提高蔗糖浓度,可降低玻璃化苗率。从本实验来看,当蔗糖浓度为4%时,芽分化多,薄荷试管苗增殖系数高,玻璃化苗比率较低。

琼脂在培养基中不仅有支撑试管苗平衡的作用,也影响培养基中可利用水分的量。琼脂浓度较低时,培养基中可利用水分过多,不利于培养基中的渗透压平衡,影响苗的生长和分化,新生的幼苗呈水浸状,导致玻璃化现象严重;琼脂浓度过高,培养基内可利用水分少,营养物质难以被培养的组织吸收利用^[14],芽分化力减弱,增殖系数较低。结合成本等因素,在薄荷组织培养中,琼脂的浓度可选择0.70%。

植物组织培养所需温度一般在22℃~28℃,在这个温度范围内,试管苗生长正常,超过这一温度范围,就易产生玻璃化现象^[15]。这可能是因为低温使植物体代谢缓慢,新生的幼苗细胞分化不完全,从而导致玻璃化;而高温则刺激细胞新陈代谢,细胞快速分裂,愈伤组织疏松,从而导致玻璃化。本实验证明,培养温度为25℃时最适合薄荷试管苗的生长,玻璃化现象较轻。

光照时间少于10 h·d⁻¹或超过14 h·d⁻¹时容易导致薄荷试管苗玻璃化,这可能是因为薄荷为光敏感植物,光照时间过长或过短都会导致新陈代谢的过快或受抑制,从而造成试管苗玻璃化。根据本实验结果,光照时间12 h·d⁻¹对薄荷试管苗的组织

培养最为有利。

本研究的结果提示,通过调控组织培养条件可以减少以致避免薄荷试管苗玻璃化现象的发生,从而提高试管苗的产量和质量。有关薄荷试管苗玻璃化现象的发生机理尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘慎谔文集编辑组. 刘慎谔文集[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 67.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975. 924.
- [3] 袁昌齐. 天然药物资源开发利用[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2000. 472-475.
- [4] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992. 352.
- [5] 胡彦, 赵艳. 植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2004, 32: 133.
- [6] 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.
- [7] 李格, 吕国华, 贾晓鹰, 等. 6-BA、NAA 及其组合对诱导薄荷茎段分化与增殖的影响[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2004, 22(4): 305-308.
- [8] Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, et al. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1992, 30: 135-140.
- [9] Gaspar T, Kevers C, Debergh P, et al. Vitrification, morphological and ecological aspects [A]. Bonga J M, Durzan D. Cell and Tissue Culture in Forestry [C]. Dordrecht: Kluwer Academic Press Publ, 1987. 152-166.
- [10] 周俊彦, 郭复兴. 植物快速营养繁殖中的繁殖速度及产率的计算[J]. 植物学通报, 1991, 8(2): 60-63.
- [11] 高文远, 贾伟. 药用植物大规模组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 67.
- [12] 赵佐敏. 非洲菊组培苗玻璃化控制的研究初报[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(3): 77.
- [13] 王爱勤, 何龙飞, 裴润梅, 等. 组培条件对不同芦荟试管苗玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18(15): 47.
- [14] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.
- [15] 孙满芝, 尹成涛. 植物组培过程中玻璃化现象的发生与解决措施[J]. 山东林业科技, 2001(6): 19.