

野薄荷脱毒苗低成本组培快繁研究

谢文申¹, 周恒苍¹, 付晏昆², 周宇航³

(1. 云南农业大学香料研究所, 云南昆明 650051; 2. 昆明学院, 云南昆明 650214; 3. 北农海利涿州种衣剂有限公司, 河北涿州 072750)

摘要 [目的]探讨低成本下薄荷脱毒苗的快繁技术。[方法]以脱毒野薄荷试管苗为外植体,以1/2MS为基本培养基,配制不同培养基,对液体培养与固体培养的薄荷脱毒苗继代、生根及移栽过程进行了比较。[结果]浅层液体培养继代增殖系数、根长、根数、生根率均优于固体培养;来源于浅层液体培养生根的薄荷脱毒苗移栽成活率明显高于来源于固体培养基的脱毒苗;与固体培养基相比,采用浅层液体培养可节约成本57.44%,同时减少大量用工。[结论]以30 g/L食用白糖代替蔗糖,以凉开水代替蒸馏水的浅层液体培养更适用于脱毒薄荷种苗的大量繁殖。

关键词 野薄荷脱毒苗;快繁技术;低成本;浅层液体培养

中图分类号 S503.53 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)09-174-03

The Low-cost Rapid Propagation of Virus-free Mint by Tissue Culture

XIE Wen-shen¹, ZHOU Heng-cang¹, FU Yan-kun² et al (Flavor Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650051;

2. Kunming University, Kunming, Yunnan 650214)

Abstract [Objective] To explore the rapid propagation technique of virus-free mint in vitro with low cost. [Method] With virus-free mint in vitro as explants, 1/2 MS was used as the basic medium to prepare different culture mediums. Comparative test between liquid culture medium and solid culture medium was carried out in subculture, rooting and transplanting of virus-free mint. [Result] The multiplication coefficient, root length, root number, and rooting rate in shallow liquid culture were prior to those in solid culture. Virus-free seedlings from shallow liquid culture had significantly higher survival rate than those from solid culture. The cost of chemicals of shallow liquid culture system reduced by 57.44%; and a large amount of labor force was saved. [Conclusion] The cost can be decreased markedly with 3% edible sugar instead of sucrose and boiled water instead of distilled water. The shallow liquid culture system is proposed during rapid propagation process of virus-free mint.

Key words Virus-free mint; Rapid propagation; Low cost; Shallow liquid culture

薄荷为唇形科薄荷属多年生草本植物,以全草入药,用于治疗风热感冒、风温初起、头痛、目赤、喉痹、咽喉肿痛、口舌生疮、牙痛、荨麻疹、风疹等^[1-2],是药食两用的经济作物,也是世界三大香料之一,广泛应用于食品、化妆品、香料、医药等领域,具有栽培容易、产量高、经济效益好等特点。在薄荷生产中长期采用无性繁殖,反复重茬,致使薄荷体内积累多种病菌病毒,导致优良性状退化,经济产量降低,对薄荷种植构成严重威胁。如何快速获得大批量的脱毒种苗、降低脱毒种苗的生产成本成为脱毒种苗大量推广的技术关键。

近年来,关于薄荷组培快繁技术研究较多^[3-4],主要集中在激素配比在薄荷继代、诱导和生根上。液体培养在马铃薯、草莓、甘薯、香蕉、生姜^[5-11]等几种作物上的应用已有报道,而应用浅层液体培养进行薄荷脱毒苗快繁与生根,国内鲜见报道。笔者以脱毒野薄荷试管苗为供试材料,对薄荷脱毒试管苗的继代和生根阶段进行了浅层液体培养,旨在为其规模化生产提供种苗和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为已经鉴定确认无毒、且经过不同培养基诱导30 d后的薄荷试管苗。

1.2 培养基

以1/2MS为基本培养基,pH 5.8,分装于100 mL三角瓶中,经121 ℃高温、高压消毒灭菌20 min,冷却后备用。具体配方见表1。

表1 培养基配方

Table 1 Formula of the culture medium

培养基	基本培养基	琼脂	蔗糖	食用白糖	6-BA	NAA
Culture medium	Basal medium	Agar//g/L	Saccharose//g/L	White sugar//g/L	mg/L	mg/L
M1	1/2MS	8	25	-	0.3	0.1
M2	1/2MS	-	25	-	0.3	0.1
M3	1/2MS	-	-	25	0.3	0.1
M4	1/2MS	8	25	-	-	0.1
M5	1/2MS	-	25	-	-	0.1
M6	1/2MS	-	-	25	-	0.1

注:M1、M2、M3为继代培养基,M4、M5、M6为生根培养基。

Note: M1, M2 and M3 were subculture mediums; M4, M5 and M6 were rooting culture mediums.

以上培养基分别配成固体和液体2种状态的培养基;其

中固体培养基加入8 g/L琼脂,30 mL/瓶;液体培养基设置5、15和20 mL/瓶共3个处理,其他同固体培养基,以凉开水代替蒸馏水。

1.3 试验方法

接种外植体采用二叶单节茎段,每个处理10瓶,每瓶接种10个茎段,重复5次。移栽基质分别为土壤

基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目(2014y203)。

作者简介 谢文申(1968-),女,广东肇庆人,工程师,从事香料植物组织培养研究。

收稿日期 2016-03-11

(A)、土壤:珍珠岩=3:1(B)、珍珠岩(C)。试验设3次重复。

当株高达4~5 cm时从培养室移至普通室2 d,使其适应自然环境,然后打开瓶盖在室温下炼苗3 d,最后移栽至不同基质中,移栽后第15天统计成活率。

1.4 培养条件 培养温度(23±2)℃,光照时间12 h/d,光照强度1 000~1 500 lx。25~30 d继代1次。

2 结果与分析

2.1 不同状态培养基对薄荷脱毒苗继代生长的影响 从表2可以看出,在相同激素水平的培养基中液体培养基增殖系数均略高于固体培养基。观察发现在液体培养基中培养的

植株生长状况优于固体培养基;液体培养基中叶片更绿,植株长势更好。液体培养从第6天开始萌芽,比固体培养基提前2~3 d。虽然液体培养基前期生长速度和成苗率不及固体培养基,但生长后期液体培养的试管苗长势好,植株健壮,叶大色绿,说明液体培养适合薄荷脱毒苗二叶单节茎段快繁。这是因为液体培养使外植体与培养基的接触面积增大,各种养分和激素补充速度快,外植体排出的一些代谢废物能够快速扩散开,从而提高了组织的代谢活性。同时,浅层培养时,培养物大部分露在液面上,解决了液体培养透气性差的问题。

表2 不同状态培养基对薄荷脱毒苗生长状况的影响

Table 2 Effects of different culture mediums on the growth of virus-free mint seedlings

培养基	接种数	增殖系数	根长	株高	生长状况
Culture medium	Inoculation number//个	Multiplication coefficient	Rooting length//cm	Plant height//cm	Growth status
M1	50	3~4	3.5~5.6	4.3~5.6	叶绿,茎略细,节间长
M2	50	5~6	4.3~6.2	3.8~5.3	叶深绿,茎粗嫩,节间短
M3	50	5~6	4.6~6.7	3.5~5.2	叶浓绿,茎粗嫩,节间短

注:接种25 d的结果。

Note: Observation results on 25 d after inoculation.

2.2 不同状态培养基对薄荷脱毒苗生根的影响 从表3可以看出,薄荷脱毒苗在不同培养基中的生根率均达100%,从根长和生根数来看,液体培养基比固体培养基的根长且条数多。观察发现液体培养的株高比固体培养高,叶片更浓绿,植株生长也更旺盛。M5和M6中试管苗的长势无明显区别,从节约成本的角度考虑,宜采用不加琼脂、以食用白糖代替蔗糖的M6培养基。

表3 不同状态培养基对薄荷脱毒苗生根的影响

Table 3 Effects of different culture mediums on the rooting of virus-free mint seedlings

培养基	接种数	生根率	生根数	根长
Culture medium	Inoculation number//个	Rooting rate//%	Rooting number//条	Rooting length//cm
M4	50	100	3~4	2.5~3.5
M5	50	100	5~6	3.8~4.5
M6	50	100	5~6	3.5~4.3

注:接种10 d的结果。

Note: Observation results on 10 d after inoculation.

2.3 不同液体培养基用量对薄荷脱毒苗生长的影响 试验结果表明,在不同处理的液体培养基中,所有处理芽萌动时间均为转接后第5~6天,转接25 d后,5 mL培养基浅层培养无法满足薄荷组培苗的增殖生长,而15 mL培养基浅层培养增殖效果明显优于20 mL培养基的增殖效果。这是因为过量的液体易淹埋薄荷组培苗的分生点使其生长缓慢,甚至导致植株因缺氧而溺亡。而15 mL浅层培养并未完全淹没丛生芽的分生点,不仅能有效地吸收培养基中的营养与激素,也能给原生质提供有效的伸展空间,继而保证了丛生芽的萌发及增殖率。但过于少量的培养基会造成营养与激素供应不足,从而影响薄荷组培苗的生长。因此,10~15 mL/瓶(100 mL三角瓶)是薄荷组培苗浅层培养基的最适容量。

2.4 不同基质对薄荷脱毒苗移栽成活率的影响 从表4可

以看出,无论哪种基质,来源于液体培养基的薄荷脱毒苗的成活率在不同移栽基质中均高于来源于固体培养基,其中基质以土壤:珍珠岩=3:1为佳,成活率可达100.0%。

表4 不同基质对薄荷脱毒苗移栽成活率的影响

Table 4 Effects of different culture mediums on the survival rate of virus-free mint seedlings %

基质	固体	液体
Substrate	Solid	Liquid
A	80.2	83.5
B	96.8	100.0
C	92.7	95.5

2.5 浅层液体培养与固体培养的成本比较 从表5可以看出,由于液体培养基M5省去价格较贵的琼脂,成本比固体培养基M4降低了34.42%;液体培养基M6在M5的基础上,以廉价的食用白糖代替蔗糖,其成本比固体培养基M4降低了57.44%。在液体培养基之间,虽然加蔗糖的培养基M5中脱毒苗比培养基M6中生长更旺盛,但M6的根数、株高2个主要指标仍能达到快速繁殖的要求,也是较为理想的培养基。而以食用白糖代替蔗糖能使培养基成本下降35.11%,故大规模育苗中以M6培养基为宜。

表5 液体和固体培养基成本比较

Table 5 Comparison between solid and liquid culture mediums

培养基	培养基成本	与M4相比减少		与M5相比减少	
		成本	百分比	成本	百分比
Culture medium	Cost of culture medium 元/L	Cost 元/L	Percentage %	Cost 元/L	Percentage %
M4	4.30	-	-	-	-
M5	2.82	1.48	34.42	-	-
M6	1.83	2.47	57.44	0.99	35.11

注:培养基折算成本不包括水电费、人工成本。

Note: Cost of culture medium included neither water and electricity fees nor labor cost.

3 结论与讨论

(1) 该试验结果表明,在相同温度和光照条件下,在1/2MS+食用白糖25 g/L+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基中,试管苗均表现为叶大色绿,既不影响增殖效果又可节省培养基成本,可用于薄荷脱毒苗的继代培养。采用1/2MS+食用白糖25 g/L+NAA 0.1 mg/L培养基,既节约了培养成本,又能保证试管苗健壮生长,可用于薄荷脱毒试管苗生根培养。

(2) 琼脂条目前的市场售价是200元/kg左右,在整个培养基生产成本中约占75%。若采用液体培养,且以廉价的食用白糖代替蔗糖、以凉开水代替蒸馏水生产薄荷脱毒苗,将能显著降低薄荷脱毒苗规模化生产成本,提高工厂化生产的经济效益,对工厂化育苗具有重要意义。

(3) 使用液体培养基,无需加热溶解,节省了加热所耗的电费;移栽时,由于液体培养基中未添加琼脂,清洗阶段可节省大量人工;移栽过程中来源于液体培养基的薄荷脱毒苗成活率高,从而降低了单株薄荷脱毒苗的生产成本。

(4) 液体培养基用量不宜过多,以每瓶(100 mL三角瓶)10~15 mL为宜,用量过多,接种茎段完全沉入瓶底会影响通气,从而导致试管苗成株率降低;用量不足,培养物会因营养不足而无法达到继代和移栽的相应生长指标,从而导致培养失败。培养25 d后营养液消耗殆尽,最好以25 d为一周期进行继代培养。

(上接第173页)

哆醛的再生基因(*pdxH*)在质粒pHT01上串联表达,构建了一株高产L-谷氨酸脱羧酶的重组枯草芽孢杆菌*B. subtilis* 168/pHT01-*gadA-pdxH*。反应24 h时,重组菌*B. subtilis* 168/pHT01-*gadA-pdxH*催化谷氨酸转化生成GABA的含量达252 g/L,转化率明显高于*B. subtilis* 168/pHT01-*gadA*,较对照菌株提高了约61 g/L。其最优转化体系:缓冲液为pH 5.0的0.1 mol/L Tris-HCl,转化温度为40℃,激活剂为5 mmol/L Ca^{2+} 与5 mmol/L Mg^{2+} 。在上述最优条件下,催化24 h生成的GABA浓度达327 g/L,且在转化体系中L-谷氨酸的残留小于1%,这为后续GABA的分离纯化奠定了基础。该研究所获得的重组菌转化效率较高,具有一定的工业化应用前景。

参考文献

[1] 许建军,江波,许时婴. γ -氨基丁酸(GABA)——一种新型的功能食品

(5) 液体培养基由于透气性差,很多植物组织培养很难应用该体系。应用浅层液体培养进行薄荷脱毒苗快繁与生根,国内鲜见报道。该试验采用固态和液态2种培养方式,结果表明,采用液体浅层培养薄荷脱毒苗途径可行;无论是在薄荷继代还是生根试验中,具有相同激素水平的液体培养基增殖与生根在一定程度上均优于固体培养基,且采用液体培养基可降低培养成本。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2010:262-263.
- [2] 中华人民共和国卫生部国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:310.
- [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] 张倩,管远清,李青. 不同培养基类型对薄荷组织培养的影响[J]. 山东农业科学,2014,46(11):30-31.
- [5] 庞淑敏,方贵娜. 马铃薯脱毒苗快繁低成本培养基改良试验[J]. 河南农业科学,2004(12):59-61.
- [6] 谭体琼,艾勇,鲍菊,等. 马铃薯脱毒试管苗简化培养、低成本扩繁技术研究[J]. 种子,2009,28(1):85-88.
- [7] 桑有顺,冯焱,陈涛,等. 成都平原冬季繁育马铃薯脱毒苗水培技术优化研究[J]. 西南农业学报,2014(3):1014-1017.
- [8] 张恒. 草莓脱毒苗组培快繁工艺的简化及降低成本研究[J]. 河北农业科学,2013(1):68-71.
- [9] 朱勤,杨许琴,杨六萍,等. 浅层液体静置培养快繁甘薯脱毒苗[J]. 现代农业科技,2006(9):109-110.
- [10] 王星. 香蕉组培苗浅层液体培养试验[J]. 广西园艺,2001,37(2):3-4.
- [11] 罗天宽,张小玲,陈珍,等. 浅层液体培养在生姜脱毒苗快繁体系中的应用[J]. 中国农学通报,2006,22(4):75-77.

因子[J]. 食品工业科技,2003(1):109-110.

- [2] 张忆如. γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)在保健品之应用[J]. 中国食品添加剂,2013(S1):285-289.
- [3] 王辉,项丽丽,张锋华. γ -氨基丁酸(GABA)的功能性及在食品中的应用[J]. 食品工业,2013(6):186-189.
- [4] 杨胜远,陆兆新,吕凤霞,等. γ -氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J]. 食品科学,2005(9):546-551.
- [5] 包华琼,王新庄. γ -氨基丁酸(GABA)的生殖生理作用[J]. 动物医学进展,2002(3):39-41.
- [6] 曹德瑞,邹晓庭. γ -氨基丁酸在畜牧生产上的应用[J]. 中国饲料,2010,23(3):30-32.
- [7] 莫征杰,冯凤琴,叶慧. 重组*Bacillus subtilis*(PMA5/lapgd)的构建及其在 γ -氨基丁酸合成中的应用[J]. 食品科技,2014(9):26-31.
- [8] ZHANG X Z, ZHANG Y H P. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial biotechnology, 2011, 4(1):98-105.
- [9] 李晓燕,谢力昌,张伟东,等. γ -氨基丁酸:QB/T 4587-2013[S]. 北京:中国轻工业出版社,2013.
- [10] 张天萌. 谷氨酸脱羧酶的克隆表达及酶学性质研究[D]. 无锡:江南大学,2012:28-30.