

# 留兰香微繁技术体系研究

申 顺 先, 李 学 慧, 贺 爱 利, 樊 亚 敏

(河南农业职业学院, 河南 中牟 451450)

**摘 要:**以留兰香春季萌发的含顶芽幼嫩茎段为外植体,利用正交实验设计等方法研究了留兰香微繁技术体系。结果表明:用 70%~75%酒精浸洗 30 s,0.1%升汞浸洗 6 min 对外植体消毒灭菌效果最好,适宜芽诱导的培养基是 MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,最佳芽增殖培养基是 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+20~30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,最佳生根培养基是 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+KT 0~0.05 mg/L+20~25 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。

**关键词:**留兰香;组织培养;微繁技术;正交实验

**中图分类号:**S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0146-04

留兰香(*Mentha spicata* Linn)属唇形科薄荷属多年生芳香性草本植物,原产于欧洲,在世界各地广泛栽培,在我国江苏、浙江、河南、山东、四川、新疆等地均有分布,俗称绿薄荷、十香菜<sup>[1-2]</sup>。可入药<sup>[3]</sup>,也可作为香料型蔬菜食用,并用于工业生产留兰香精油,留兰香精油广泛用于牙膏、胶姆糖及其它食品和药品中<sup>[4]</sup>。留兰香的常规繁殖多采用根茎繁殖、分株繁殖和扦插繁殖等方法<sup>[5]</sup>,繁殖系数有限。自杨乃博<sup>[6]</sup>首次报道通过其茎尖或茎段分化芽及试管无性繁殖留兰香以来,柴明良<sup>[7-8]</sup>对留兰香试管苗增殖与生根也进行了研究,沙红等<sup>[1]</sup>研究探讨了以留兰香种子为外植体的组织培养技术,王小敏等<sup>[9]</sup>以留兰香茎尖为外植体探索了不定芽增殖、试管苗移栽生根的最佳条件,都为留兰香的组培繁殖奠定了基础。该试验以留兰香含顶芽幼嫩茎段为外植体,从消毒方案筛选、诱导培养、丛生芽增殖、试管内生根、练苗移栽等方面进行探索,初步确立了留兰香微繁技术体系,为留兰香种苗快速生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试留兰香来自河南农业职业学院科技园。2010年4月下旬,选取春季萌发的含顶芽幼嫩茎段。

### 1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 将含顶芽的幼嫩茎段去叶留茎,放于洗洁精溶液洗涤,再用流水缓慢冲洗 1~2 h,蒸馏水漂

洗数次带入无菌操作室,在超净工作台上用 70%~75%酒精浸洗 30 s,迅速用无菌水漂洗 3 次,将水沥干;再用 0.1%升汞(注:其中加有适量的吐温-80)浸洗 4、6、8、10 min,无菌水漂洗 5 次,最后用无菌纸吸干残留水分,在无菌条件下将消毒灭菌后的材料剪成 1.5 cm 左右长的茎段,接种在琼脂含量为 7 g/L(下同)的固体 MS 培养基<sup>[10]</sup>上培养,培养基 pH5.6~6.0(下同)。培养条件(下同)为:温度(25±2)℃,光照强度 2 000~3 000 lx,每天光照时间 12 h,培养室空气相对湿度 70%左右。2 周后统计污染率、未萌芽率和存活率<sup>[11]</sup>。污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体数)×100%,未萌芽率(%)=[(死亡外植体数+未萌芽外植体数)/接种外植体数]×100%,存活率(%)=(萌芽不污染外植体数/接种外植体数)×100%。

1.2.2 芽诱导培养 将初代培养中获得的无菌材料重新剪成 1.5 cm 左右长的茎段,转接到 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+25 g/L 蔗糖与 MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+30 g/L 蔗糖固体培养基上进行诱导培养。

1.2.3 芽增殖培养 以 MS 为基本培养基,进行 4 因素 3 水平正交实验<sup>[12]</sup>,正交实验因素及水平见表 1。采用旺盛生长且健壮一致的绿苗,取含顶芽且带 2 对叶片

表 1 芽增殖试验生长调节剂处理因素水平

Table 1 Factors and levels of plant growth regulators in bud proliferation

水平 Levels	因素 Factors			
	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	GA <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	蔗糖 Sugar /g·L <sup>-1</sup>
1	0.01	0.1	0	20
2	0.05	0.5	0.1	30
3	0.2	1.5	0.2	40

**第一作者简介:**申顺先(1978-),男,本科,讲师,现主要从事作物遗传育种与植物组培快繁技术教学与科研工作。E-mail: shenshunxian@163.com.

**收稿日期:**2013-03-04

长度 2.5 cm 左右的茎段,接种于 9 组培养基中培养,每组试验做 5 次重复,3 周后统计芽增殖系数<sup>[9]</sup>。芽增殖系数=有效芽苗数/接种芽苗数,有效芽苗是指株高大于等于 0.5 cm 的组培苗。

1.2.4 生根培养 以 MS 培养基的微量、铁盐和有机物为培养基基本成分,对 MS 大量元素、IBA、KT 和蔗糖浓度进行 4 因素 3 水平正交实验,正交实验因素及水平见表 2。采用旺盛生长健壮一致的绿苗,取含顶芽且长

表 2 生根试验生长调节剂处理因素水平

水平 Levels	因素 Factors			
	MS 大量元素	IBA	KT	蔗糖 Sugar
	MS macroelement	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>	/g · L <sup>-1</sup>
1	1/4	0.2	0	15
2	1/2	1.0	0.05	20
3	1	2.0	0.5	25

表 3 不同消毒时间对留兰香外植体存活率的影响

Table 3 Effect of different disinfection time on explants survival rate of <i>Mentha spicata</i> Linn							
0.1% 升汞浸洗时间	接种株数	污染株数	污染率	未萌芽株数	未萌芽率	存活数	存活率
0.1% mercuric chloride dipping time/min	No. of shoots	No. of pollution	Pollution rate/%	No. without embryo	The rate without embryo/%	No. of survival	Survival rate/%
4	24	18	75.0	0	0	6	25.0
6	24	7	29.2	1	4.2	16	66.7
8	24	6	25.0	4	16.7	14	58.3
10	24	4	16.7	9	37.5	11	45.8

2.1.2 芽诱导情况 接种于 MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+30 g/L 蔗糖固体培养基上的留兰香在 7 d 内顶芽与腋芽就开始萌发,然后迅速生长;至第 14 天时,多个腋芽萌发,生长良好;第 21 天时,苗明显增多且健壮;接种于 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+25 g/L 蔗糖固体培养基上的留兰香生长势远不如前者,后期有气生根产生。所以芽诱导以采用 MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂培养基较好(图 1-1)。

## 2.2 芽增殖培养

第 7 天时,各组植株生长正常,腋芽有所增殖,有些植株茎基部呈浅红棕色;第 14 天时,绝大部分植株生长正常,芽增殖系数由高到低依次是第 5、3、2、6、1、9、7、4、8 组,且第 4、6、7 组各有 1~2 个茎段基部及下部腋芽处有白色根产生;第 21 天时,芽增殖系数试验结果见表 4。由表 4 可知,对芽增殖系数高低产生的效应由主到次的顺序是 6-BA、NAA、GA<sub>3</sub>、蔗糖(方差分析表明 6-BA 差异极显著,NAA、GA<sub>3</sub> 与蔗糖均不显著,说明 6-BA 浓度的变化会引起芽增殖系数的显著变化),四者引起平均芽增殖系数最高的水平依次是第 2、1、2、1 水平,即 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂就是比较适宜的芽增殖培养基配方。因该配方不在 9 组试验内,对其验证的平均芽增殖系数是 6.00,且芽质量良好,比表 4 中平均芽增殖系数的

度 3 cm 左右的茎段,接种于 9 组培养基中培养,每组试验做 5 次重复。2 周后统计生根率、生根数和平均根长。生根率(%)=(生根苗数/接种苗数)×100%;生根数,为根长大于等于 0.2 cm 的根数;平均根长=每株总根长/生根数。

## 2 结果与分析

### 2.1 无菌体系建立与芽诱导试验

2.1.1 外植体存活情况 由表 3 可知,随着浸洗时间(4~10 min)的延长,污染率降低的速度先快后慢,未萌发率升高的速度先慢后快,存活率增高的速度先快后慢,浸洗 6 min 的存活率最高,为 66.7%。可见,4 月下旬选取的留兰香春季萌发的含顶芽幼嫩茎段,以 70%~75%酒精浸洗 30 s,0.1%升汞浸洗 6 min 对外植体消毒灭菌效果最好。

最高值 5.80 略高,说明 2 号配方也是留兰香芽增殖的适宜培养基配方。综合考虑芽增殖系数与芽苗质量,MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+20~30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂就是最佳的芽增殖培养基配方(图 1-2)。

表 4 留兰香芽增殖培养正交实验设计方案与试验结果直观分析

Table 4 Orthogonal test design and visual bud proliferation analysis of <i>Mentha spicata</i> Linn					
试验号 Test numbers	因素 Factors				均芽增殖系数 Average coefficient of bud proliferation
	NAA /mg · L <sup>-1</sup>	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	GA <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	蔗糖 Sugar /g · L <sup>-1</sup>	
1	0.01	0.1	0	20	3.20
2	0.01	0.5	0.1	30	5.80
3	0.01	1.5	0.2	40	5.00
4	0.05	0.1	0.1	40	2.60
5	0.05	0.5	0.2	20	5.20
6	0.05	1.5	0	30	3.60
7	0.20	0.1	0.2	30	2.20
8	0.20	0.5	0	40	3.60
9	0.20	1.5	0.1	20	4.20
T <sub>1</sub>	4.66	2.67	3.47	4.20	
T <sub>2</sub>	3.80	4.87	4.20	3.87	
T <sub>3</sub>	3.33	4.27	4.13	3.73	
R	1.33	2.20	0.73	0.47	

注:表中所有数据均为 5 次重复的平均值。下同。

Note: All datums in the table are the average of five replications. Same the below.

### 2.3 生根培养

留兰香离体生根比较容易,早的第 3 天就产生了

根。第7天时,1~9组均有苗产生根,平均生根数由高到低依次是第4、6、8、2、1、8、5、7、9、3组,并且根大部分在茎节的叶腋处产生,少数在茎基部产生;第14天时,生根率、平均生根数与平均根长见表5。由表5可知,对平均生根数高低产生的效应由主到次的因素顺序是MS培养基大量元素、KT、IBA、蔗糖(方差分析表明,MS大量元素、KT浓度表现差异显著,IBA、蔗糖均不显著),四者最适的水平依次是第2、1、1、2水平,即1/2MS+IBA 0.2 mg/L+20 g/L蔗糖+7 g/L琼脂就是比较适宜的促进根分化的配方。对平均根长大小产生的效应由主

到次的因素顺序是MS培养基大量元素、IBA、KT、蔗糖(方差分析表明MS大量元素、IBA浓度表现差异显著,KT、蔗糖均不显著),四者最适水平依次是第2、1、2、3水平,即1/2MS+IBA 0.2 mg/L+KT 0.05 mg/L+25 g/L蔗糖+7 g/L琼脂就是比较适宜的促进根伸长生长的配方。综合正交实验结果,以生根数与平均根长为主要参考指标,并综合考虑生根率与组培苗生长状况,最终确定以1/2MS+IBA 0.2 mg/L+KT 0~0.05 mg/L+20~25 g/L蔗糖+7 g/L琼脂为最佳的生根培养基配方(图1-3)。

表 5

留兰香生根培养正交实验设计与结果直观分析

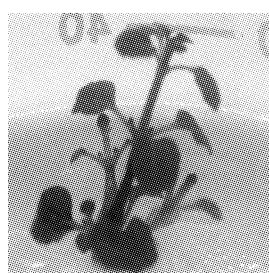
Table 5

Orthogonal test design and visual rooting analysis of *Mentha spicata* Linn

试验号 Test numbers	因素 Factor				生根率 Root rate/%	平均生根数 Average number of root	平均根长 Average length of root/cm
	MS大量元素 MS macroelement	IBA /mg · L <sup>-1</sup>	KT /mg · L <sup>-1</sup>	蔗糖 Sugar /g · L <sup>-1</sup>			
1	1/4	0.2	0	15	100	6.20	0.65
2	1/4	1.0	0.05	20	100	7.00	0.59
3	1/4	2.0	0.5	25	57	2.00	0.42
4	1/2	0.2	0.05	25	100	8.80	0.86
5	1/2	1.0	0.5	15	100	5.00	0.42
6	1/2	2.0	0	20	100	7.80	0.52
7	1	0.2	0.5	20	71	4.00	0.44
8	1	1.0	0	25	100	5.40	0.34
9	1	2.0	0.05	15	80	3.00	0.30
T <sub>1</sub>	5.07	6.33	6.47	4.73			
T <sub>2</sub>	7.20	5.80	6.27	6.27			
T <sub>3</sub>	4.13	4.27	3.67	5.40			
R	3.07	2.07	2.60	1.53			
T <sub>1</sub> '	0.55	0.65	0.50	0.46			
T <sub>2</sub> '	0.60	0.45	0.58	0.51			
T <sub>3</sub> '	0.36	0.41	0.42	0.54			
R'	0.24	0.24	0.16	0.09			

注:T<sub>1</sub>~T<sub>3</sub>为平均生根数水平均值;T<sub>1</sub>'~T<sub>3</sub>'为平均根长水平均值。

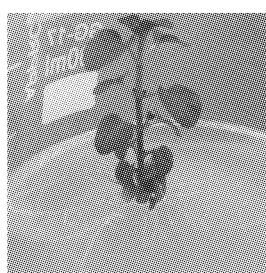
Note: T<sub>1</sub>~T<sub>3</sub> are level distance of average number of root; T<sub>1</sub>'~T<sub>3</sub>' are level distance of average length of root.



1.诱导培养 Induced culture



2.丛生芽增殖 Clump bud proliferation

3.留兰香生根 *Mentha spicata* Linn root

4.移栽成活 Transplanting survival

图1 留兰香组织培养过程

Fig. 1 Tissue culture process of *M. spicata*

## 2.4 练苗移栽

2011年4月上旬开始,在温室内对苗高3~5 cm,生根2~3条,根长0.5~1 cm的组培苗进行练苗。先闭瓶练苗7~10 d,然后开口加少量自来水半开口练苗3~5 d,再敞开口练苗3~5 d,每天都要更换自来水,待老叶逐

渐脱落新芽逐渐长出,准备移栽。首先用自来水洗净根上的培养基,在50%多菌灵可湿性粉剂600~800倍溶液中浸根10 min,移植入草炭:蛭石:珍珠岩(2:1:1)的基质中,浇透水(也可用多菌灵溶液浇灌),盖上小拱棚,7~10 d后撤去拱棚。期间控制温度20~30℃,遮



光,湿度 90%以上。成活率可达 93.3%以上(图 4)。

### 3 讨论与结论

切取外植体时供体植株的生理状态对于芽的反应能力有明显的影响。在生长季节开始时由活跃生长的枝条上切取的外植体,通常能产生最好的效果<sup>[10]</sup>。在每年 4 月选取留兰香春季萌发的含顶芽的幼嫩茎段作为外植体不仅培养效果好,而且比较容易消毒灭菌。试验表明,以 70%~75%酒精浸洗 30 s,无菌水漂洗 3 次,沥干水后再用 0.1%升汞浸洗 6 min,无菌水漂洗 5 次,存活率最高,为 66.7%。

在通过促进腋芽萌发来实现芽增殖的丛生芽增殖型中,培养基中适当浓度的细胞分裂素可增强腋芽生枝能力,使枝条的繁殖系数显著提高。当细胞分裂素的水平较高时,形成茎芽的数目可能较多,但每个茎芽的生长会受到抑制,有时还要加入 GA<sub>3</sub> 以促使茎的伸长<sup>[10]</sup>。芽增殖正交实验结果表明,细胞分裂素 6-BA 浓度对芽增殖系数影响极显著,而 NAA、GA<sub>3</sub> 与蔗糖浓度影响不显著。在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+20~30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂的培养基配方上留兰香芽增殖系数最高约为 6.00,其植株生产健壮。随着增殖培养的继代次数增多,较高浓度的 6-BA 会加速玻璃化苗的产生,可以通过降低温度如 18~22℃,或提高琼脂浓度如 7.5~8.0 g/L 等措施防止玻璃化,使苗健壮。通常认为生长素能促进植物生根,6-BA 抑制生根,但在芽增殖试验中观察到在 6-BA 浓度较高的 6 号配方中苗的下部腋芽处也分化出根,这一现象杨乃博<sup>[6]</sup>也有报道。

对大多数物种来说,生根培养基中盐的浓度应该减少,诱导生根需要有适当的生长素<sup>[10]</sup>。留兰香生根正

交实验表明,留兰香易生根,早的 3 d 就能长根。MS 大量元素、KT 浓度对生根数影响显著,IBA、蔗糖浓度影响不显著;MS 大量元素、IBA 浓度对平均根长影响显著,KT、蔗糖浓度影响不显著。综合考虑,1/2MS+IBA 0.2 mg/L+KT 0~0.05 mg/L+20~25 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂的培养基就是最佳的生根培养基配方。

留兰香练苗移栽中,温度是基础,控制在 20~30℃;湿度是关键,控制在 90%以上;避强光也很重要;移植入草炭:蛭石:珍珠岩(2:1:1),成活率达 93.3%以上。

### 参考文献

- [1] 沙红,廖康.药用植物留兰香的组织培养研究[J].新疆农业大学学报,2003,26(1):10-12.
- [2] 曹继华,朱聪明,李艳丽.薄荷及其伪品的鉴别[J].河南中医学院学报,2004,19(1):30-31.
- [3] 郑健,高慧媛,陈广通,等.留兰香的活性成分(D)[J].沈阳药科大学学报,2006,23(3):145-147.
- [4] 陈创成,万馥馨,杨国华,等.留兰香油成份分析[J].香料与香精,1981(1):1-10.
- [5] 钟敬凤.留兰香的栽培[J].现代农业,2001(9):17.
- [6] 杨乃博.十二种植物的试管无性繁殖[J].植物学报,1981,23(4):284-287.
- [7] 柴明良.留兰香玻璃苗愈伤组织化再生正常植株[J].植物生理学通讯,1991,27(5):371-376.
- [8] 柴明良.留兰香的试管增殖[J].植物生理学通讯,1994(1):30.
- [9] 王小敏,梁呈元,李维林.留兰香组织培养及快速繁殖条件的优化[J].植物资源与环境学报,2007,16(4):38-42.
- [10] 李俊明.植物组织培养教程[M].2 版.北京:中国农业大学出版社,2002(21):251-282.
- [11] 肖显华,王顺珍,藏林荣,等.植物材料表面消毒方法的改进[J].生物技术,1999,9(1):43-45.
- [12] 方萍.实用农业试验设计与统计分析指南[M].北京:中国农业出版社,2000:125-151.

## Study on Micropropagation Technique System of *Mentha spicata* Linn

SHEN Shun-xian, LI Xue-hui, HE Ai-li, FAN Ya-min

(Henan Vocational College of Agricultural, Zhongmu, Henan 451450)

**Abstract:** Using the tender stem containing terminal bud in spring as explants, the orthogonal test was used, the micropropagation technique system of *Mentha spicata* Linn were studied. The results showed that the best method for disinfectant was 70% to 75% alcohol (washed for 30 s) and 0.1% mercuric chloride (washed for 6 min). The optimal medium for inducing shoot was MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+30 g/L sugar+7 g/L agar; the optimal medium for shoot generation was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+20 g/L to 30 g/L sugar+7 g/L agar; the optimal medium for rooting was 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+KT 0 to 0.05 mg/L+20 g/L to 25 g/L sugar+7 g/L agar.

**Key words:** *Mentha spicata* Linn; tissue culture; micropropagation technique; orthogonal test