

梁文洁,张丽,郭新勇,等.薄荷组织培养及抗除草剂基因的遗传转化[J].江苏农业科学,2018,46(4):37-39.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.04.008

# 薄荷组织培养及抗除草剂基因的遗传转化

梁文洁,张丽,郭新勇,王爱英,向本春,祝建波  
(石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832003)

**摘要:**薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)是一类用途广泛的中药材,是世界三大香料之一,也是我国重要的经济作物。以薄荷茎段为外植体,建立高效的薄荷离体培养植株再生体系,确定草甘膦筛选的选择压,并将带除草剂标记的植物表达载体 pBI121-Ubi-epsps 通过农杆菌介导转化薄荷,用 PCR 和 RT-PCR 法对转化薄荷进行分子鉴定。结果表明,薄荷对除草剂草甘膦的最适筛选浓度为 10 mg/L,通过分子鉴定确定转基因薄荷已获得。试验结果对后期杂种优势的利用、种质资源的保存以及植物新品种的培育奠定基础,具有重要的理论与实践意义。

**关键词:**薄荷;除草剂;组织培养;遗传转化

**中图分类号:** Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)04-0037-03

全世界薄荷属植物(*Mentha* L.)约有 30 种,140 多个变种,其中有 20 多个变种在世界各地栽培<sup>[1-2]</sup>。我国约有 12 种,其中 6 种为野生品种,其余为引进栽培品种<sup>[3]</sup>。薄荷属植物常见的栽培种有薄荷(*M. haplocalyx* Briq.)、留兰香(*M. spicata* L.)、椒样薄荷(*M. piperita* L.)、唇萼薄荷(*M. pulegium* L.)、水薄荷(*M. aquatica* L.)及柠檬留兰香(*M.*

*citrata* L.)等。结合本种形态特征和地理分化趋势,可将薄荷划分为两大种群且作为 2 个种处理,即欧洲、西亚及北美地区的薄荷种群,用学名 *M. arvensis* L.,东亚及热带亚洲的薄荷种群,用学名 *M. haplocalyx* Briq.。

薄荷属植物是一种用途广泛的中药材,也是世界上主要的香料植物之一<sup>[4-6]</sup>。薄荷属植物种间杂交十分普遍,有性繁殖极易造成品种混杂,难以区分。一般都采用无性繁殖,但长期采用无性繁殖,导致病毒病十分普遍,引起品种的退化和产量、质量的下降。通过组织培养可以对植株进行脱毒复壮,并且可以保持植物优良性状遗传的稳定性,防止品种过快退化<sup>[7]</sup>。组织培养技术还可以用来进行薄荷的诱变育种和种质保存,如方晓志等在组织培养条件下进行了薄荷化学试剂和射线辐射诱变育种技术的研究,获得了多个薄荷株系<sup>[8]</sup>;

收稿日期:2016-09-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:30960034、31160049);国家转基因专项(编号:2011ZX08005-004)。

作者简介:梁文洁(1986—),山西定襄人,硕士研究生,主要从事植物基因工程研究。E-mail:1374357967@qq.com。

通信作者:祝建波,博士,研究员,主要从事植物基因工程研究。E-mail:zjbshz@126.com。

Acids Research,2005,33:D192-D196.

[12] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods,2011,8(10):785-786.

[13] Chen Y J, Yu P, Luo J C, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT [J]. Mammalian Genome,2003,14(12):859-865.

[14] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. Journal of Molecular Biology,2000,300(4):1005-1016.

[15] Sen T Z, Jernigan R L, Garnier J, et al. GOR V server for protein secondary structure prediction [J]. Bioinformatics,2005,21(11):2787-2788.

[16] Von Mering C, Jensen L J, Snel B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. Database Issue,2005,33:433-437.

[17] Aleem E, Arceci R J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2015,3(16):16.

[18] Lee J, Das A, Yamaguchi M, et al. Cell cycle function of a rice B2-

type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology,2003,34(4):417-425.

[19] Nieduszynski C A, Murray J, Carrington M. Whole-genome analysis of animal A- and B-type cyclins [J]. Genome Biology,2002,3(12):70.

[20] Ah F M, Judelson H S. Cell cycle regulator Cdc14 is expressed during sporulation but not hyphal growth in the fungus-like oomycete *Phytophthora infestans* [J]. Molecular Microbiology,2003,50(2):487-494.

[21] 赵伟,杨新宇,董莎萌,等.外源合成 dsRNA 介导大豆疫霉 PsCdc14 基因沉默后对孢子囊发育的影响 [J]. 中国科学:生命科学,2011,41(12):1177-1184.

[22] Tsuchiya E, Yukawa M, Ueno M, et al. A novel method of screening cell-cycle blockers as candidates for anti-tumor reagents using yeast as a screening tool [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry,2010,74(2):411-414.

[23] Gao Y M, Wang X J, Zhang J, et al. Borrelidin, a potent antifungal agent: insight into the antifungal mechanism against *Phytophthora sojae* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60(39):9874-9881.

Hirai 等利用留兰香组培苗的腋芽低温贮藏, 寻找到一种新的种质资源保存方法<sup>[9]</sup>。组织培养技术在薄荷属植物的生产中应用十分广泛。虽然针对薄荷属植物组织培养技术研究在国内外已有一些报道<sup>[10-12]</sup>, 但在某些技术环节方面还存在一些限制因素, 如外植体的污染、褐变、组培苗玻璃化现象以及病毒检测等。

本试验以薄荷茎段为外植体, 建立高再生率的薄荷离体培养植株再生体系, 确定草甘膦筛选的选择压, 并将带除草剂标记的植物表达载体 pBI121-Ubi-epsps 通过农杆菌介导转化薄荷, 用 PCR 和 RT-PCR 法对转化薄荷进行分子鉴定。获得能够耐受除草剂的转基因薄荷, 该试验对后期杂种优势的利用、种质资源的保存以及植物新品种的培育奠定基础, 具有重要的理论与实践意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与菌株

薄荷苗、pBI121-Ubi-epsps 农杆菌菌株均由石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室保存。

### 1.2 分子生物学试验材料

Taq DNA Polymerase、DNase-free Plant Kit 及普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒等均购自于北京天根生化科技有限公司; 引物合成、序列测定由北京华大基因科技股份有限公司完成; 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 薄荷除草剂耐受性分析

设置不同浓度梯度的草甘膦浓度(0、5、10、15 mg/L), 并将薄荷茎段接种到不同浓度梯度(100 mL MS 中含草甘膦 0、50、100、150  $\mu$ L)的分化筛选培养基上, 培养 5 d 观察筛选结果。

### 1.4 薄荷的遗传转化

剪取薄荷无菌苗的茎段, 在预培养基上培养 2 d, 通过农杆菌介导将 pBI121-Ubi-epsps 整合进薄荷基因组中, 茎段侵染后接种于铺有滤纸的共培养基(MS + 100 mg/L AS)上暗培养 3 d, 之后转接到延迟筛选培养基(MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 300 mg/L Cb)中培养 4~5 d。然后, 在选择培养基(MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 300 mg/L Cb + 10 mg/L PPT)中进行培养, 当出现抗性丛生芽生长至 2~3 cm 时, 切取分别放入生根培养基(1/2MS + 1.0 mg/L NAA + 300 mg/L Cb + 10 mg/L PPT)中诱导生根。待根系长至 2~3 cm 时移栽至花盆。

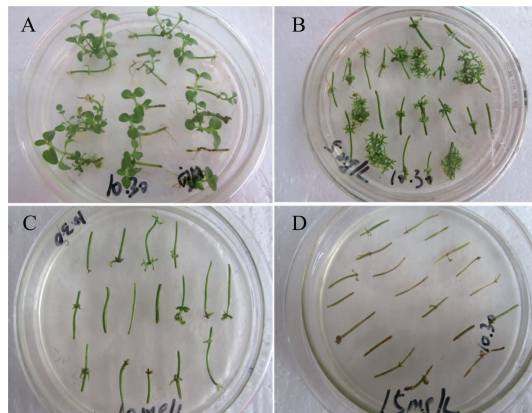
### 1.5 薄荷的分子检测

采用 CTAB 法<sup>[13]</sup>提取薄荷叶片基因组总 DNA, 以 pBI121-Ubi-epsps 质粒为阳性对照, 野生型薄荷的 DNA 为阴性对照, PCR 检测目标基因。用 TRNzol 法<sup>[13]</sup>提取阳性植株的总 RNA, 以 pBI121-Ubi-epsps 质粒为阳性对照, 相应的野生型薄荷为阴性对照, 进行 RT-PCR 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 空白薄荷抗除草剂耐受性分析结果

以 0、5、10、15 mg/L 的草甘膦浓度梯度对薄荷茎段进行培养。由图 1 可知, 在草甘膦浓度为 10 mg/L 的情况下, 薄荷茎段的生长是最好的。所以草甘膦浓度为 10 mg/L 时最适宜。



A—空白对照; B—5 mg/L 的草甘膦; C—10 mg/L 的草甘膦; D—15 mg/L 的草甘膦

图1 不同草甘膦浓度下的薄荷茎段

### 2.2 薄荷的遗传转化

经过鉴定为阳性 pBI121-Ubi-epsps 的载体通过茎段法转化普通野生型薄荷。侵染后培养 2 d, 将其转接到筛选分化培养基上进行芽分化, 10~15 d 茎段两端长出黄绿色的愈伤组织(图 2-A), 延迟培养 30~50 d, 茎段两端分化长出不定芽(图 2-B)。待不定芽生长到 2~3 cm 后剪下不定芽, 将其插入到筛选生根培养基中进行筛选培养。其中一部分不定芽白化, 继续培养会死亡, 这部分为逃逸芽; 还有一部分出现白绿各半的现象, 这部分为嵌合体; 最后一部分在筛选培养基中正常生长, 为转化植株(图 2-C)。将筛选出的转化植株移至生根培养基上, 待正常转化的植株生长到株高 8~10 cm、根长 2~4 cm 时(图 2-D), 提取该转化薄荷的 DNA 进行 PCR 检测。将检测为阳性的植株移栽至高 20 cm、直径 18 cm 的花盆中, 在光照度 10 000 lx、光照 16 h、黑暗 8 h、温度 26  $^{\circ}$ C、相对湿度 70% 的培养室生长, 并挑选生长相似的普通野生型薄荷种植在相同条件下培养观察(图 2-E), 一直培养至开花(图 2-F)。

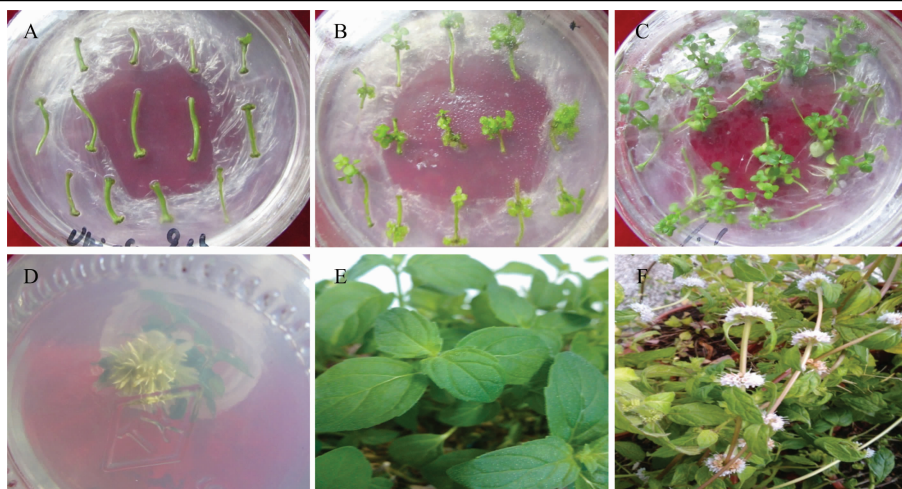
### 2.3 pBI121-Ubi-epsps 对薄荷的转化及转基因植株的分子检测

CTAB 法提取薄荷基因组总 DNA, 在 PCR 过程中, 要分别以植物表达载体为模板的 PCR 扩增产物作阳性对照, 野生型植株基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增反应产物为阴性对照。结果表明, 转基因株系中均能扩增出目的片段, 野生型薄荷中未能扩增出目的片段的条带, 说明目的基因完全插入薄荷基因组 DNA(图 3、图 4)。

## 3 结论与讨论

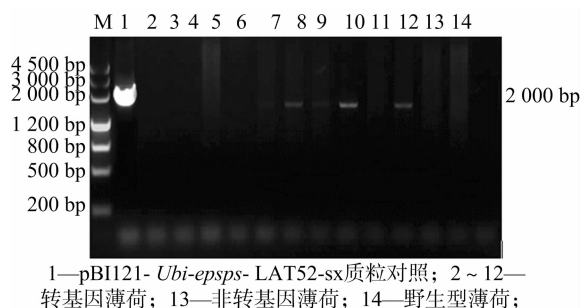
通过对薄荷抗除草剂耐受性的分析, 结果表明草甘膦浓度为 10 mg/L 时是最适宜的。导入外源抗除草剂基因是培育抗除草剂植株新品种的有效途径, 本试验将抗除草剂基因应用于经济作物中, 为改良作物的品种以及保持优良品种的优势奠定基础。

随着植物分子生物学、细胞学等学科的迅速发展及其研究水平的不断提高, 必将有助于我们了解植物雄性不育。对于植物雄性不育的研究, 不要仅从单一的生理生化方面进行研究, 应该和分子生物学等相结合, 更加全面地研究其发生机



A—侵染的薄荷茎段在MS培养基上长出愈伤组织；B—侵染的薄荷茎段在筛选培养基上长出不定芽；C—筛选培养基上长成正常植株；D—在1/2MS生根筛选培养基上诱导生根；E—移栽到花盆里的转基因薄荷；F—开花后的转基因薄荷

图2 薄荷的再生



1—pBI121-*Ubi-epsps*-LAT52-sx质粒对照；2~12—转基因薄荷；13—非转基因薄荷；14—野生型薄荷；M—Mark III；图4同

图3 转基因植株基因 *Ubi* 的 PCR 检测

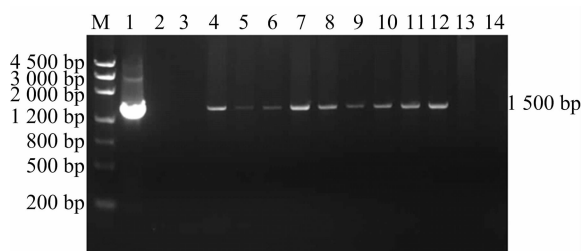


图4 转基因植株基因 *epsps* 的 PCR 检测

草剂标记的植物表达载体 pBI121 - *Ubi* - *epsps* 转化薄荷, 获得转基因薄荷植株, 导入外源抗除草剂基因是培育抗除草剂植株新品种的最有效途径, 该方法大大节省了人力以及财力等, 具有更强的实用性。期望通过本试验最终为创造具有商业推广前景的作物提供一个技术平台。

#### 参考文献:

- [1] 戴克敏. 国产薄荷属 (*Mentha* Linn.) 的栽培种类的初步研究[J]. 药学学报, 1981, 16(11): 349 - 353.
- [2] 黄士诚. 薄荷属植物的染色体数目及其栽培种的起源[J]. 香料香精化妆品, 1997(3): 24 - 25.
- [3] 中国植物志组委会. 中国植物志: 第 66 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1972: 260 - 274.
- [4] 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.
- [5] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
- [6] 鲁朝晖, 张少艾. 唇萼薄荷屋顶草坪建植与养护技术研究[J]. 草原与草坪, 2004(1): 58 - 59.
- [7] 汪茂斌, 马宗新, 赵红, 等. 薄荷品种提纯途径及程序[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(2): 235 - 236.
- [8] 方晓志, 高山林, 赵梦晗. 薄荷诱导株系田间农艺性状鉴定及挥发油含量测定[J]. 药物生物技术, 2005, 12(2): 93 - 97.
- [9] Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of in vitro - grown axillary shoot - tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification[J]. Plant Call Reports, 1999, 19(2): 150 - 155.
- [10] 柴明良. 留兰香的试管繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(1): 30.
- [11] 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), 22(4): 305 - 308.
- [12] Bhat S, Maheshwari P, Kumrr S. *Mentha* species: in vitro regeneration and genetic transformation[J]. Molecular Biology Today, 2002, 3(1): 11 - 23.
- [13] F. M. 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.

理。相信随着技术的不断发展, 将进一步深化植物雄性不育的研究, 揭示其发生机理, 选育出综合性状更加优良的不育系, 充分发挥杂种优势。

草甘膦是一种广谱灭生性、内吸传导型的优秀除草剂, 其杀草机理是抑制植物必需氨基酸合成途径中 5 - 烯醇式丙酮酰 - 莽草酸 - 3 - 磷酸合成的活性, 从而使杂草致死。但在其应用过程中, 对普通农作物同样具有非选择性的毒杀作用, 植物中 *epsps* 合成酶的过量表达或某些活性位点氨基酸的突变对高剂量的草甘膦有较强的耐受性。近年来, 抗草甘膦转基因作物在全球范围内的广泛应用得到了人们越来越多的关注。

本试验中将抗除草剂基因构建植物表达载体, 并转化薄荷, 为改良作物的品种以及保持优良品种的优势奠定了基础。本试验是以具有商业价值的薄荷为材料, 将构建好的带有除