

东北刺人参组培快繁培养基的筛选*

顾地周, 朱俊义, 姜云天, 周 磊

(通化师范学院生物系, 吉林 通化 134002)

关键词: 东北刺人参; 愈伤组织; 再分化; 均匀设计

中图分类号: S567.5⁺1

文献标识码: A

Study on Culture Media for Micropropagation of *Oplopanax elatus* Nakai.

GU Di-zhou, ZHU Jun-yi, JIANG Yun-tian, ZHOU You

(Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, Jilin, China)

Abstract: Taking the tender leaves of *Oplopanax elatus* as explants for the experiment, Uniform Design were used to test the most suitable media for callus induction, differentiation of shoot and rooting. The results showed that $N_6 + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Vc } 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was fitted for callus induction, the medium for differentiation of shoot was $N_6 + 6\text{-BA } 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Vc } 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the medium for rooting was $1/4\text{MS} + \text{IBA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Tissue culture required different kinds of culture media in different phases.

Key words: *Oplopanax elatus*. ; callus; differentiation; Uniform Design

东北刺人参 (*Oplopanax elatus* Nakai.) 又称刺参, 五加科 (Araliaceae) 多年生落叶灌木, 其干燥根和茎均可入药, 是一种用途广泛的中药材。近些年来, 医药科研工作者对其成分及药理进行了大量的试验和研究, 其结果表明, 根、茎入药有类似于人参的作用, 可用于治疗神经衰弱、低血压和风湿性关节炎等症^[1]。白求恩医科大学基础医学院、第一临床学院对东北刺人参茎挥发油成分及其抗皮肤癣菌作用进行了活性研究, 得出了其抑杀皮肤癣菌活性显著的结论^[2]。另外, 吉林铁路中心医院和吉林省康复医院对东北刺人参抗衰老作用进行了实验并得到了验证^[3]。东北刺人参扦插成活率很低, 种子萌发率亦很低, 靠常规繁殖非常困难^[4-6], 因此, 药用的东北刺人参来源于自然采掘, 使得自然资源遭到严重破坏, 该物种已处于濒危状态, 被列为国家二级保

护植物, 吉林省一级保护植物^[7-8], 所以, 利用组织培养来快速繁殖东北刺人参是对其资源进行保护的有效途径之一^[9-11]。金英善等曾对东北刺人参愈伤组织的诱导进行过研究^[12], 但未见再生植株产生的报道, 其他有关东北刺人参组织培养技术方面的系统性研究也尚未见报道。本文应用均匀设计对东北刺人参愈伤组织诱导、芽苗分化及生根培养基进行了筛选, 并得到了最佳的组织培养条件, 对该物种的开发和利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

长白山自然保护区内东北刺人参新发嫩叶片, 顶芽萌发时即采(带叶柄)。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 培养基均以 N_6 、MS 作基本培养

收稿日期: 2007-09-15

基金项目: 国家科技部“国家科技攻关计划引导项目”资助项目(2005BA741C)

作者简介: 顾地周(1973—), 男, 吉林通化人, 讲师, 主要从事长白山区珍稀濒危和珍稀濒危药用植物研究. E-mail: gudizhou@163.com

* 致谢: 在研究过程中, 得到中国农业大学观赏园艺与园林系刘青林博士的大力支持和帮助, 谨此致谢!

基,附加蔗糖分别为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (生根培养为 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),琼脂 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 值 5.5,附加相关植物生长调节物质,温度控制在 $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$,光照强度 800 lx ,光照周期 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.2 外植体处理 将东北刺人參嫩叶(带少量叶柄)剪下,在超净工作台上用 70% 酒精中涮洗 10 s,用 0.1% 升汞溶液浸泡 3 min,无菌水冲洗 8 次,用无菌滤纸将外植体表面的水分吸干^[13],切除受杀菌消毒剂损害的组织后备用。

1.2.3 愈伤组织诱导 N_6 为基本培养基,将整叶作为外植体正面朝上接种到附加不同浓度的 6-BA 和 2,4-D 的培养基上进行愈伤组织诱导培养,为防止切口基部褐化加入维 C $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,根据各处理诱导已产生愈伤组织的外植体数和接种的外植体总数比值(即愈伤组织诱导率)来筛选最合适愈伤组织诱导培养基。

1.2.4 芽苗分化 愈伤组织继代到一定数量后,将愈伤组织接种到以 N_6 作基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、NAA 及维 C $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上。根据每个处理分化芽苗的愈伤组织块数与该处理接种的愈伤组织总块数的比值(即芽苗分化率)来筛选最合适的芽苗分化培养基。

1.2.5 生根培养 以 1/4MS 作基本培养基,附加不同浓度的 IBA 和 NAA。根据每个处理已经生根的芽苗与该处理无根苗总数的比值(即生根率)来筛选最合适的生根培养基。

1.2.6 数据处理 数据分析与处理采用均匀设计(Uniform Design)软件。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对东北刺人參诱导愈伤组织的影响

以 N_6 为基本培养基,每个处理接种外植体数为 30 个,由预试验获得 6-BA 和 2,4-D 浓度范围分别为 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用均匀设计法,选用 $U_5(5^4)$ 均匀表(见表 1),考察了细胞分裂素 6-BA 和生长素 2,4-D 浓度交叉对比对诱导率的影响。在表和方程中, X_1 为 6-BA 浓度, X_2 为 2,4-D 浓度, Y 为诱导率,结果见表 2。

数据经均匀设计软件处理,得回归方程 $Y = 22.6 + 110X_1 + 107X_2$,样本容量 $N = 5$,显著性水平 $\alpha = 0.01$,检验值 $F_t = 110.4$,临界值 $F_{(0.01,2,2)} = 99.00$,相关系数 $R = 0.9955$,剩余标准差 $s = 2.63$,

$F_t > F_{(0.01,2,2)}$,回归方程显著。偏回归系数绝对值分别为: $B_1 = 0.887 > B_2 = 0.228$,可见因素主次顺序为: $X_1 > X_2$ 是正确的,通过方程可知: X_1 和 X_2 对 Y 值影响显著,与 Y 呈正相关,因此,通过优化后,求得实验范围内的最佳条件为: $X_1 = 0.5, X_2 = 0.2$,将其代入方程,求得 $Y = 99$,按公式 $Y = y \pm u_\alpha \cdot s$,当 $\alpha = 0.01$ 时, $u_\alpha = 2.5758$,计算优化值区间估计为 $Y = 99 \pm 2.5758 \times 2.63$,即 $92.23\% \sim 105.77\%$ 。用实验得到的优化值 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D}$ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行试验,培养 20 d 所有外植体均产生愈伤组织且质量非常好(图 1a),即诱导率为 100%,在估计区间范围内,且比所有实验 Y 值都大。因此,东北刺人參叶片诱导愈伤组织的最佳培养基为: $N_6 + 6\text{-BA}$ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D}$ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 $U_5(5^2)$ 因素及水平设计

水平	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	X_1	X_2
1	0.10	0.10
2	0.20	0.15
3	0.30	0.20
4	0.40	0.10
5	0.50	0.15

表 2 $U_5(5^2)$ 均匀设计实验安排及结果

处理号	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		Y/%
	X_1	X_2	
1	0.10	0.15	49.9
2	0.20	0.10	53.8
3	0.30	0.10	59.0
4	0.40	0.20	89.2
5	0.50	0.15	92.0

2.2 不同培养基对东北刺人參芽苗分化的影响

以 N_6 为基本培养基,每个处理接种愈伤组织块数为 30 块,由预试验获得 6-BA 和 NAA 浓度范围分别为 $0.5 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用均匀设计法,选用 $U_{10}(10^8)$ 均匀表(见表 3),考察了 6-BA 和 NAA 浓度交叉对比对芽苗分化率的影响。在表和方程中, X_1 为 6-BA 浓度, X_2 为 NAA 浓度, Y 为芽苗分化率,结果见表 4。

数据经均匀设计软件处理,得回归方程 $Y = 50.2 + 11.5X_1 - 25.4X_2$,样本容量 $N = 10$,显著性水平 $\alpha = 0.05$,检验值 $F_t = 65.27$,临界值 $F_{(0.05,2,7)} = 4.737$,相关系数 $R = 0.9742$,剩余标准差 $s = 4.54$, $F_t > F_{(0.05,2,7)}$,回归方程显著。偏回归系数绝对值分别为: $B_1 = 0.983 > B_2 = 0.213$,可见因素主次顺序

为: $X_1 > X_2$ 是正确的,通过方程可知: X_1 和 X_2 对 Y 值影响显著,与 Y 呈正相关,由表 4 可见, $X_1 = 5$ 时,分化率变低,说明发生明显的抑制作用,因此,通过优化后,求得实验范围内的最佳条件为: $X_1 = 4.5$, $X_2 = 0.1$,将其代入方程,求得 $y = 99.41$,按公式 $Y = y \pm u_\alpha \cdot s$,当 $\alpha = 0.05$ 时, $u_\alpha = 1.9600$,计算优化值区间估计为 $Y = 99.41 \pm 1.9600 \times 4.54$,即 $90.51 \sim 108.31$ 。用实验得到的优化值 6-BA $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行试验,愈伤组织培养 35 d 产生芽锥(图 1b),分化率为 97.6%,在估计区间范围内,且比所有实验 Y 值都大。因此,东北刺人参愈伤组织芽苗分化的最佳培养基为: $N_6 + 6\text{-BA } 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表3 $U_{10}(10^2)$ 因素及水平设计

水平	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	X_1	X_2
1	0.50	0.10
2	1.00	0.20
3	1.50	0.30
4	2.00	0.40
5	2.50	0.50
6	3.00	0.10
7	3.50	0.20
8	4.00	0.30
9	4.50	0.40
10	5.00	0.50

表4 $U_{10}(10^2)$ 均匀设计实验安排及结果

处理号	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		$Y/\%$
	X_1	X_2	
1	0.50	0.20	49.2
2	1.00	0.30	53.8
3	1.50	0.50	50.0
4	2.00	0.10	73.0
5	2.50	0.20	75.0
6	3.00	0.40	83.0
7	3.50	0.50	79.0
8	4.00	0.10	90.0
9	4.50	0.30	96.5
10	5.00	0.40	93.0

2.3 不同培养基对东北刺人参组培苗生根的影响

以 1/4MS 为基本培养基,每个处理接种无根芽苗数为 30 株,由预试验获得 IBA 和 NAA 浓度范围均为 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用均匀设计法,选用 $U_5(5^4)$ 均匀表(见表 5),考察了生长素 IBA 和 NAA 浓度交叉对比对生根率的影响。在表和方程中, X_1 为 IBA 浓度, X_2 为 NAA 浓度, Y 为生根率,结果见表 6。

数据经均匀设计软件处理,得回归方程 $Y = 113 - 33.3 X_1 - 67.3 X_2$,样本容量 $N = 5$,显著性水平 $\alpha = 0.05$,检验值 $F_t = 32.78$,临界值 $F_{(0.05,2,2)} = 19.00$, $F_t > F_{(0.05,2,2)}$,相关系数 $R = 0.9316$,剩余标准差 $s = 3.47$,回归方程显著。偏回归系数绝对值分别为: $B_1 = 0.370 < B_2 = 0.747$,可见因素主次顺序为: $X_1 < X_2$ 是正确的,因两个因素数值上下限和各梯度值相同,交换主次后的结果也相同,又通过方程可知: X_1 和 X_2 对 Y 值影响显著,都与 Y 呈负相关,因此,通过优化后,求得实验范围内的最佳条件为: $X_1 = 0.1$, $X_2 = 0.1$,将其代入方程,求得 $y = 102.94$,按公式 $Y = y \pm u_\alpha \cdot s$,当 $\alpha = 0.05$ 时, $u_\alpha = 1.9600$,计算优化值区间估计为 $Y = 102.94 \pm 1.9600 \times 3.47$,即 $96.14 \sim 109.74$ 。用实验得到的优化值 IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行试验,无根苗培养 25 d 在基部发出根并逐渐伸长,形态、发育均正常(图 1c,d),生根率为 99.3%,在估计区间范围内,且比所有实验 Y 值都大。因此,东北刺人参组培苗生根的最佳培养基为:1/4MS + IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表5 $U_5(5^2)$ 因素及水平设计

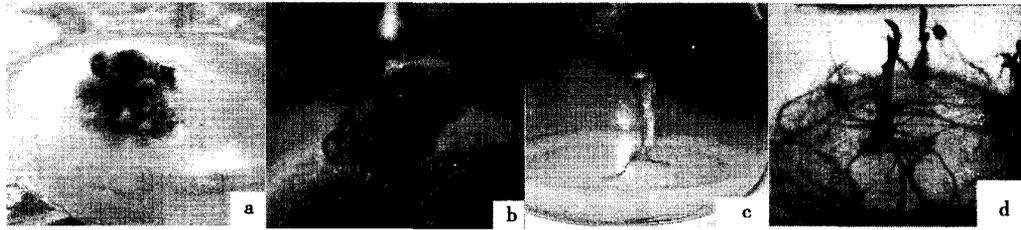
水平	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	X_1	X_2
1	0.10	0.10
2	0.20	0.20
3	0.30	0.30
4	0.40	0.40
5	0.50	0.50

表6 $U_5(5^2)$ 均匀设计实验安排及结果

处理号	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		$Y/\%$
	X_1	X_2	
1	0.10	0.20	95.0
2	0.20	0.40	80.0
3	0.30	0.10	94.5
4	0.40	0.30	83.0
5	0.50	0.50	60.0

3 讨论

试验结果可以证明,本研究对东北刺人参新生嫩叶愈伤组织的诱导以 N_6 为基本培养基,筛选出合适的 6-BA 和 2,4-D 的浓度配比,诱导产生具有分化芽苗能力的愈伤组织,与金英善对东北刺人参愈伤组织的诱导在配方和方法上存在异同,可能是外植



a. 愈伤组织诱导; b. 愈伤组织分化; c. 生根培养; d. 生根培养(保存后)

图1 东北刺人参组织培养各阶段的培养物形态

体、选材时间和基本培养基、激素类别等有差异; 芽苗分化培养增加细胞分裂素和生长素的比值, 不仅有利于分化而且缩短了分化时间; 在生根培养基中采取同时加入两种低浓度生长素的方法大大提高了组培苗的生根率。同时, 应用均匀设计法大大缩短了培养基配方的摸索过程。达到了预期效果。为东北刺人参引种、驯化及其工厂化育苗提供依据。

参考文献:

- [1] 张俊兰, 赵占英, 王殿芝. 长白山五加科药用植物[J]. 北方园艺, 1996(6): 46
- [2] 张宏桂, 刘松艳, 付爱华. 野生东北刺人参茎挥发油成分及其抗皮肤癣菌作用[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(6): 369-371
- [3] 傅颖新, 马正俐, 马之骏. 长白山刺人参抗衰老实验[J]. 中国医院药学杂志, 1995, 15(3): 122-124
- [4] 刘继生, 张鹏, 张美淑. 刺人参种子繁殖技术研究[J]. 特产研究, 2001(1): 27-29
- [5] 刘继生, 张鹏, 孙静刚. 外源赤霉素对东北刺人参种子萌发的影响[J]. 林业科技, 2005, 30(2): 45-47
- [6] 张鹏, 刘继生, 潘宜才, 等. 东北刺人参人工扩繁研究技术现状[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1): 65-68
- [7] 贺善安. 中国珍稀植物[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 38
- [8] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录(第一卷)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 304-464
- [9] 朴炫春, 廉美兰, 刘继生, 等. 东北刺人参组培快繁的可行性研究[J]. 延边大学农学报, 2006, 28(1): 10-13
- [10] Moon H K, Kim J A, Park S Y, et al. Somatic embryogenesis and plantlet formation from a rare and endangered tree species, *Oplopanax elatus*[J]. [Monograph] Dongguk University, Seoul, Republic of Korea, 2006, 49(4): 320-325
- [11] Cho H J, Yang W Y, Yun D W, et al. Somatic embryogenesis from inflorescences derived callus of *Oplopanax elatus* Nakai. [J]. Research Reports of the Rural Development Administration, Biotechnology, 1991, 33(3): 1-6
- [12] 金英善, 曹后男, 刘继生, 等. 东北刺人参愈伤组织的诱导[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1): 16-19
- [13] 顾地周, 何晓燕, 朱俊义, 等. 细叶杜香的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 898