

人参的组织培养及快繁体系的建立

安永辉, 郭昶, 孙振雷, 魏健 (长春师范学院成人教育学院, 吉林长春 130032)

摘要 [目的]建立人参的快繁体系。[方法]应用MS培养基添加激素培养法,对人参的茎尖、根尖和幼芽进行愈伤组织诱导,并进行芽分化、芽的继代增殖和生根培养。[结果]结果表明,对诱导芽分化较好的培养基是BA与NAA的组合,最佳培养基激素浓度是MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。愈伤组织诱导仅出现在MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L和MS+KT 0.2 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L的培养基中,但这两种培养基对芽没有诱导。以MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L的培养基,其继代培养效果较好。[结论]采用组织培养快速繁殖人参,可有效去除病毒,增加繁殖数,确保遗传性状的稳定。

关键词 人参;幼芽;愈伤组织;组织培养;快速繁殖

中图分类号 S567.5⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)27-11656-02

Tissue Culture and Establishment of Rapid Propagation System of Ginseng

AN Yong-hui et al (Adult Education College, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130032)

Abstract [Objective]The research aimed to establish rapid propagation system of Ginseng. [Method] The stem point, the root point and the bud of ginseng were carried on callus induction, and studying the bud differentiation, bud subculture proliferation and rooting culture with the MS culture medium added hormone. [Result]The results indicated that culture medium of having better inducing bud differentiation was a combination of medium BA and NAA, but the optimal concentration of culture medium was MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L. Callus induction only appeared in the MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L and MS+KT 0.2 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L of the culture medium, but they had no any action to induction of bud. The effect of subculture in MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L of the culture medium was better. [Conclusion] Using tissue culture rapid propagation of ginseng, which can effectively remove the virus, increase the number of propagation and ensure the stability of genetic traits.

Key words Ginseng; Bud; Callus induction; Tissue culture; Rapid propagation

人参系被子植物门双子叶植物纲离瓣花亚纲五加科,多年生草本,生长于密林,分布在黑龙江、吉林、辽宁和河北北部深山中。主根肥大,花期6~7月,果期7~9月,其根茎(人参芦)、根茎上的不定根(人参条)、细枝根与须根(人参须)、叶(人参叶)、花(人参花)和果实(人参子)均可入药。人参可分为野山参和园参两种。人参主要含10多种人参皂甙,以及人参快醇、 β -榄香烯、糖类、多种氨基酸和维生素等。

我国是人参的发源地,早在2000多年前,就发现并利用人参防治疾病。我国最早的药学典籍《神农本草经》称,人参“主补五脏,安精神,定魂魄,止惊悸,除邪气,明目,开心益智,久服轻身延年”。之后,在《明医别录》、《伤寒论》、《唐本草》以及《本草纲目》等医药书籍中都有详细的记述。我国科学工作者在人参栽培、加工、化学、药理及临床等方面也做了大量的研究工作。特别是对人参地上部分(茎、叶、花、果)的化学和药理机理做了广泛而深入地研究,为开发和利用人参地上部分奠定了科学基础。在人参药理研究方面,我国学者首先报告了人参多糖的生物活性,系统地研究了人参多糖和人参皂甙对免疫功能的影响。这些研究工作不但为人参的临床应用开辟了新的领域,而且也阐述了中医“扶正固本”理论做出了贡献。

1 材料与方法

1.1 材料 取原始材料的茎尖、根尖和叶芽切下,经杀菌处理后接种在培养基上,经过一段时间培养后形成愈伤组织,产生不定芽。该试验所选用的人参是长白山地区的鲜高丽参。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配比。有10种培养基配比,分别为:①0;②BA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L;③BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0

mg/L;④BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L;⑤BA 2.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L;⑥BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;⑦BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L;⑧KT 0.2 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L;⑨KT 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;⑩KT 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L。10种培养基中都添加了基础培养基。

1.2.2 外植体消毒。外植体消毒^[1]是指为了消毒病毒、保证组织培养顺利进行、获得无菌材料的方法,主要使用药剂表面消毒。使用的药剂种类、浓度和处理时间因不同材料对药剂的敏感性而异。通常要求消毒剂既要有良好的作用,又要易被蒸馏水冲洗干净或易自行分解,且不会损伤材料影响植株生长。组织培养常用的消毒剂有漂白粉(1%~10%的滤液)、次氯酸钠(0.5%~10.0%)、升汞(0.1%~10.0%)、酒精(75%)和双氧水(3%~10%)等。

取人参外植体的茎尖、根尖和叶芽,先用自来水流水冲洗2~3次,用滤纸吸干水分,然后将材料转入到高压消毒的烧杯中在超净工作台上先用75%酒精浸泡杀菌30s,去除酒精,用无菌水漂洗3~4次,迅速加入0.1%升汞液(可加入适量的吐温)浸泡杀菌8~10min,浸泡过程中经常摇动烧杯。倒掉升汞液,用无菌水冲洗4~5次,最后用无菌水浸泡备用。

1.2.3 愈伤组织诱导及芽分化。将外植体切成3~5mm见方的小块,接种到培养基中,每瓶接种3块,每处理1次外植体接种10~12瓶,光照下培养(每天12h,2000lx),培养温度(25±2)℃^[2]。

1.2.4 芽的继代增殖。采用MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基^[3],每瓶接种1个芽,25~30d后将诱导的丛生芽分离,将其中生长健壮、长势良好的人参小苗转接至生根培养基,其余的单芽再进行继代培养。

1.2.5 生根培养。将苗高2.5~3.5cm、具2~3片叶的单株转接到生根培养基1/2MS+KT 0.1 mg/L+BA 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L+活性炭^[4]中,在温度(25±2)℃,光照度2000

作者简介 安永辉(1971-),男,辽宁葫芦岛人,讲师,从事高等教育理论的教学和研究。

收稿日期 2008-08-22

lx,光照时间每天 12 h 的条件下进行培养。

1.2.6 继代培养。培养物经一段时间培养后,为防止细胞团的老化或培养基养分用完而造成营养不良及代谢物积累毒害等的影响,应及时将其转移至新鲜培养基,进行继代培养,以使培养物顺利的增殖、生长及分化,长成完整的植株。

表 1 不同激素组合对愈伤组织及芽分化诱导的影响

处理 Treatment	接种数//块 Inoculated number	污染数//块 Polluted number	出愈数//块 Callus number	芽分化数//块 Bud differentiated number	出愈率//% Callus rate	出芽//% Germination rate
①	30	6	0	10	0	33.3
②	30	9	0	14	0	46.7
③	30	4	12	0	40	0
④	30	6	0	9	0	30.0
⑤	30	6	0	15	0	50.0
⑥	30	6	0	18	0	60.0
⑦	30	5	0	15	0	50.0
⑧	30	4	21	3	70	10.0
⑨	30	8	0	14	0	46.7
⑩	30	6	0	10	0	33.3

由表 1 可知,对诱导芽分化较好的培养基是 BA 与 NAA 的组合(⑤⑥⑦),②号与⑨号培养基也有较好的出芽诱导率,其他培养基上的芽诱导率与对照相比差异不大。

2.2 芽的继代增殖培养 单芽接种到继代增殖培养基后第 8 天,即可见长出新的丛芽,15 d 时丛生芽平均个数为 5 个,28 d 时丛生芽平均个数增加到 7 个,继代增殖周期为 25~30 d,增殖倍数为 6~7 倍。

3 结论与讨论

一旦人参侵染病毒,代代相传,体内不断积累,严重影响植株的生育,而人参长期的营养繁殖使病毒危害严重。采用组织培养快速繁殖人参,可有效去除病毒,增加繁殖数,确保遗传性状的稳定。

该研究主要对人参的茎尖分生组织快速繁殖培养并对快速繁殖的影响因素进行了初步研究,选择茎尖、根尖、叶芽作为外植体,丛生芽的分化率高。试验结果表明,愈伤组织

2 结果与分析

2.1 不同的激素处理对人参愈伤组织诱导和芽分化的影响

试验中发现,两种培养基在诱导形成愈伤组织的时间上都较晚,③号培养基初见愈伤组织是在接种后第 25 天,⑧号培养基稍早但也是在接种后第 20 天。

诱导仅出现在 2,4-D 的③号和⑧号培养基中,但这两种培养基对芽的诱导率却很低甚至没有诱导,NAA 对诱导愈伤组织没有效果。培养基中以 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 继代培养效果较好。选择适宜的培养温度(25℃),延长光照时间,可以较好地促进组织培养中玻璃苗的生长。

参考文献

[1] 潘学峰,王安石,李海珠.利用从芽途径快速繁殖蝴蝶兰的研究[J].海南大学学报:自然科学版,2005(1):47-52.
[2] 郝云凤,李可伟,张培红,等.脱毒马铃薯快繁培养基的不同支持体[J].中国马铃薯,2005(1):42-43.
[3] 佚名.桉木纸浆材无性系选育及苗木快繁技术研究取得重大进展[J].湖南林业科技,2005,32(1):F002.
[4] 罗丽,陈金花.蝴蝶兰的快速繁殖研究[J].连云港师范高等专科学校学报,2005(4):93-94.
[5] 熊英.蒲包花种子组织培养的研究[J].安徽农业科学,2007,35(32):10346-10347.
[6] 莫昭展,梁海清,马华材,等.猫须草组织培养研究[J].安徽农业科学,2007,35(32):10348-10349.
[7] 薛寒青.生姜芽尖组织培养技术的研究[J].安徽农业科学,2007,35(34):11037-11038.

(上接第 11652 页)

统较强的可能性。为此,该研究进一步比较了野生型与突变体中活性氧清除系统的差别,证明了叶绿素 b 突变体叶片中活性氧清除系统能更加有效地清除光氧化等产生的活性氧,从而减轻强光对光合膜的伤害。因此,突变体较野生型 ROS 含量低是吸收光能较少与 ROS 清除酶共同作用的结果,也是突变体 PSII 具有较高稳定性,耐光抑制的重要原因。

参考文献

[1] NIYOGI K K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 333-359.
[2] ELSTNER E F. Oxygen activation and oxygen toxicity[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1982, 33: 73-96.
[3] SMIRNOFF N. Antioxidant systems and plant response to the environment[C]// SMIRNOFF N. Environment and plant metabolism: Flexibility and Acclimation

[M]. Oxford: Bios Sci Press, 1995: 217-243.
[4] 张荣铨,许晓明,戴新宾,等.叶绿素 b 含量低的水稻突变体的光合功能衰退及其与活性氧的关系[J].植物生理与分子生物学学报,2003,29(2):104-108.
[5] 林植芳,李双顺,林桂珠.衰老叶片和叶绿体中的累积与膜脂过氧化物的关系[J].植物生理学报,1988,14(1):16-22.
[6] 徐朗莱,叶茂炳.过氧化物酶活力连续记录测定法[J].南京农业大学学报,1989(12):82-83.
[7] 邹琦.植物生理生物实验指导[M].北京:中国农业出版社,1995.
[8] RAO M V, PALIYATH G, ORMROD D P. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 1996, 110: 125.
[9] WOODBURY W, SPENCER A K, STAHPMAN M A. An improved procedure for using ferricyanide for detecting catalase isozymes[J]. Anal Biochem, 1971, 44: 30-35.
[10] DAI X B, XU X M, LU W, et al. Photoinhibition characteristics of a low chlorophyll mutant of high yield rice[J]. Photosynthetica, 2003, 41(1): 57-60.