

刺五加腋芽培养中抗褐化初探

孙周平*, 褚丽敏

沈阳农业大学园艺学院辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110161

摘要: 研究刺五加腋芽分化生长过程中褐化现象的结果表明, 以75%的酒精消毒40 s, 0.1%的升汞灭菌8 min能较好地抑制褐化现象; 1 000 mg·L⁻¹维生素C的抑制作用较为明显; WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基的褐化现象最轻; 15 mg·L⁻¹蔗糖、5 d暗处理和15 d转瓶一次都能在一定程度上抑制褐化。

关键词: 刺五加; 腋芽; 组织培养; 褐化

The Preliminary Study on Browning Control in Tissue Culture of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. Axillary Buds

SUN Zhou-Ping*, CHU Li-Min

Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: Using axillary bud explants, we studied the browning control in tissue culture of *Eleutherococcus senticosus*. The results showed that the browning could be obviously inhibited by the treatments with 75% alcohol 40 s and 0.1% HgCl₂ 8 min. The supplying of 1 000 mg·L⁻¹ vitamin C could prevent the browning. WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA in medium had little effects on the inhibition of browning. The treatments with 15 mg·L⁻¹ sugar, 5 d dark culture and 15 d transferring culture bottle could inhibit browning to some extent.

Key words: *Eleutherococcus senticosus*; axillary bud; tissue culture; browning

刺五加的商品名为五加参, 是我国医药珍品, 根、茎、叶均可入药。主要分布在我国黑龙江、吉林、辽宁、河北和山西等地, 在前苏联、朝鲜和日本也有分布。由于长期过量采掘, 严重地破坏了刺五加资源(祝宁等1998)。刺五加已列为濒危物种, 植物组织培养对于解决刺五加种苗的大量扩繁, 促进刺五加资源稳定和有效利用具有重要意义。因此, 近年来, 刺五加组织培养的研究得到了重视。目前, 以刺五加的叶片、茎尖和根为外植体进行的组织培养已有成功的报道(张喜春等1996; 张健夫2004; 贝丽霞等2005; 梁建萍2005)。刺五加作为木本植物, 其组织培养中褐化现象较为严重, 常导致组培苗褐化死亡。但目前还未见对此问题的系统研究与报道。为此, 本文以刺五加腋芽为外植体, 对其分化生长过程中的褐化现象进行研究, 以探讨控制褐化问题的有效途径, 建立高效的芽再生体系。

材料与方 法

选取野生刺五加(*Eleutherococcus senticosus*

Maxim.)当年形成的越冬枝条, 室内培养至刚刚萌发。

将萌发的枝条切取含腋芽的3~4 cm茎段, 在含0.02%洗洁精的自来水中摇动浸泡10 min, 自来水冲洗3~4 h, 然后转移到超净工作台上, 用镊子剥去包裹在外植体外部的芽鳞片, 取其生长点用75%的酒精和0.1%的升汞进行消毒。其消毒时间采用随机设计(表1)。无菌水冲洗5~6次后接种到WPM培养基中。经过表面灭菌处理的腋芽, 用不同浓度的维生素C浸泡30 min后, 转入WPM、MS、White 3种基本培养基中, 并加入不同浓度的6-BA (0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹)和NAA (0.05、0.1、0.15 mg·L⁻¹)进行无菌苗培养。采用L₉(3⁴)正交设计(表2), 每个处理20瓶, 每瓶1个外植体。

采用DPS软件进行数据处理。污染率(%)= 污染的外植体数 / 接种的外植体总数 × 100%; 褐化率

收稿 2008-07-14 修定 2008-11-03

资助 辽宁省“十一五”重大项目(2006215001)和辽宁省教育厅创新团队项目(2007T159)。

* E-mail: sunzp@syau.edu.cn; Tel: 024-88487231

(%)= 褐化的外植体数 / 接种的外植体总数 × 100%;
萌发率(%)= 萌发叶片的外植体数 / (接种的外植体
总数 - 污染的外植体数) × 100%。

结果与讨论

1 消毒时间对腋芽褐化的影响

由表1可以看出, 消毒时间太短, 则褐化较轻, 污染较重; 消毒时间过长, 则污染率降低, 但褐化率却明显升高。说明延长消毒时间可能对外植体产生毒害作用, 以致加深褐化程度。其适宜的消毒组合为: 75%的酒精浸泡40 s, 0.1%的升汞消毒8 min, 污染率和褐化率都相对较低。

表1 不同消毒剂和消毒时间的组合对腋芽褐化的影响

Table 1 Effects of different disinfectant and sterilizing time on axillary buds browning

消毒方法	外植体数 / 个	污染率 / %	褐化率 / %
酒精消毒 30 s, 升汞消毒 7 min	25	52	16
酒精消毒 30 s, 升汞消毒 8 min	25	32	20
酒精消毒 30 s, 升汞消毒 9 min	25	16	32
酒精消毒 40 s, 升汞消毒 7 min	25	12	20
酒精消毒 40 s, 升汞消毒 8 min	25	8	20
酒精消毒 40 s, 升汞消毒 9 min	25	8	48
酒精消毒 50 s, 升汞消毒 7 min	25	8	32
酒精消毒 50 s, 升汞消毒 8 min	25	4	52
酒精消毒 50 s, 升汞消毒 9 min	25	4	60

2 维生素 C 对腋芽褐化的影响

由表2可以看出, 随着维生素C浓度增加, 腋芽褐化率呈现先降低, 后升高的特点, 其中维生素C浓度为1000 mg·L⁻¹时的抗褐化效果最好, 褐化率仅为10%, 明显低于0和500 mg·L⁻¹维生素C处

表2 不同浓度维生素C对腋芽褐化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of vitamin C on the axillary buds browning

维生素C浓度 / mg·L ⁻¹	接种数 / 个	褐化率 / %
0	20	30
500	20	20
1000	20	10
1500	20	15

理, 说明1000 mg·L⁻¹维生素C是防止腋芽褐化的适宜浓度。

3 不同基本培养基和不同浓度生长调节物质对腋芽褐化的影响

表3为不同基本培养基和不同浓度生长调节物质对刺五加芽诱导的L₉(3⁴)正交试验结果。从表中可以看出, MS培养基褐化较重, WPM培养基褐化较轻, 其中以WPM+1.0 mg·L⁻¹6-BA+0.1 mg·L⁻¹NAA组合的培养基效果最好, 褐变得到一定控制, 茎尖生长也较好。原因可能在于无机盐浓度过高, 致使酚类物质大量产生, 引起细胞褐变, 因此, 降低盐浓度则可以减少酚类外溢, 从而减轻褐变(梅兴国等2001)。这种现象在黑松、苹果、桑树等的微繁中也有类似的报道(王明华等1995; 高国训1999; 高蓉和赵博光2001; 邱璐等2000)。

4 蔗糖对腋芽褐化的影响

从表4可见, 蔗糖浓度过高或者过低都会加大褐变, 而浓度为15 mg·L⁻¹时, 效果最好, 褐化率较低(8%)。

5 暗培养时间对腋芽褐化的影响

由图1可以看出, 随着暗培养时间的延长, 褐化率随之降低, 而萌发率先升高后降低。其中最适

表3 刺五加芽诱导的L₉(3⁴)正交试验结果

Table 3 The results of L₉(3⁴) orthogonal experiment of adventitious shoot induction in *E. senticosus*

处理	萌发率 / %	褐化率 / %	褐化程度及长势
WPM+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L ⁻¹ NAA	83.3	10	组培苗叶片周围出现局部的褐色点状现象, 植株颜色正常
WPM+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	90.0	10	个别组培苗基部有少量丝絮状物产生, 苗较粗壮, 叶大而浓绿
WPM+1.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.15 mg·L ⁻¹ NAA	70.0	20	出现浑浊絮状物, 苗矮小, 叶卷曲, 生长缓慢
MS+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	62.5	25	有丝状物产生, 茎尖、茎部变暗, 苗细弱, 叶色淡绿
MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.15 mg·L ⁻¹ NAA	60.0	40	茎基部有脓状物溢出, 逐渐溃烂, 生长迟缓, 随褐变加重而死亡
MS+1.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L ⁻¹ NAA	40.0	60	出现棕褐色絮状物, 培养基一半已变色, 植株开始变黑
White+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.15 mg·L ⁻¹ NAA	84.2	5	有较轻的浑浊表现, 叶片颜色较浅
White+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L ⁻¹ NAA	76.5	10	个别茎段出现褐色点状现象, 苗细弱, 叶色淡绿
White+1.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	70.0	15	出现浅灰色絮状物, 茎尖变色, 苗矮小, 叶卷曲

表4 不同浓度的蔗糖对腋芽褐化的影响

Table 4 Effects of different concentrations of sugar on the axillary buds browning

蔗糖浓度 /mg·L ⁻¹	接种数 / 个	褐化率 / %
10	20	15
15	20	10
20	20	20
25	20	30

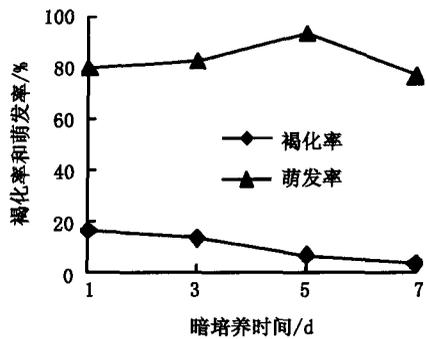


图1 不同时间的暗培养对腋芽褐化的影响

Fig.1 Effects of different dark periods on the axillary buds browning

适宜的暗培养时间为5 d, 萌发率可达93.3%, 褐化率降至6.7%。但长时间的暗培养会阻碍不定芽的产生。

6 转种周期对腋芽褐化的影响

从表5可知, 转接周期为15 d的褐化率要明显低于25和35 d的。其原因可能与腋芽伤口周围积累酚类物质的多少有关(晏本菊和李焕秀1998; 刘兰英2002)。可见, 合适的转种周期也是一种减轻褐变的方法。

表5 不同转种周期对腋芽褐化的影响

Table 5 Effects of different transferring culture periods on the axillary buds browning

转种周期/d	外植体数/个	褐化率 / %	再生芽长势
15	25	4	长势好, 芽色泽正常, 培养基无浑浊物产生
25	25	24	芽色泽暗淡, 培养基有丝状或浑浊物产生
35	25	40	生长缓慢, 芽色泽暗灰, 培养基较为浑浊

参考文献

- 贝丽霞, 陈祥梅, 赵海红(2005). 药用植物刺五加组织培养关键技术的研究. 中国农学通报, 21 (6): 91~93
- 高国训(1999). 植物组织培养中的褐变问题. 植物生理学通讯, 35 (6): 501~506
- 高蓉, 赵博光(2001). 防止黑松外植体及其愈伤组织褐变的方法. 南京林业大学学报(自然科学版), 25 (5): 75~77
- 梁建萍(2005). 刺五加叶片组织培养研究. 山西农业大学学报, (4): 340~341
- 刘兰英(2002). '薄壳香' 核桃组织培养中的褐变及防止措施研究. 园艺学报, 29 (2): 171~172
- 梅兴国, 董妍玲, 潘学武(2001). 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究. 天然产物研究与开发, 13 (4): 8~11
- 邱璐, 陈善娜, 夏跃明, 张光明(2000). 桑树组织培养中褐化问题的研究. 云南大学学报(自然科学版), 22 (1): 76~78
- 王明华, 李光晨, 李正应(1995). 芭蕾苹果微繁中抑制褐化的研究. 见: 中国科协第二届青年学术年会园艺学论文集. 北京: 北京农业大学出版社
- 晏本菊, 李焕秀(1998). 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系. 四川农业大学学报, 16 (3): 310~313
- 张健夫(2004). 刺五加的组织培养及快速繁殖的研究. 长春大学学报, 14 (4): 73~75
- 张喜春, 刘宏伟, 张弘, 张无弼(1996). 影响刺五加茎尖培养的因素. 东北林业大学学报, 24 (6): 107~110
- 祝宁, 卓丽环, 臧润国(1998). 刺五加(*Eleutherococcus senticosus*) 会成为濒危种吗? 生物多样性, 6 (4): 253~259