

华中五味子的愈伤组织诱导

吴玲娜, 谢碧霞, 邓白罗, 刘 伟, 李永欣, 李俊彬

(中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 为建立完善的华中五味子组培快繁体系, 以嫩叶为外植体, 探讨了不同因素对华中五味子组织培养中愈伤组织诱导的影响。结果表明: 75% 酒精浸泡 10 s 和 0.1% 升汞消毒 4 min 组合的灭菌效果较好; 最适培养基为 MS 培养基, 附加 2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L、6-BA 1.0 mg/L 时, 诱导愈伤组织的效果较好, 诱导率高达 96.7%, 且愈伤组织呈淡绿色, 质地致密, 生长旺盛。

关键词: 华中五味子; 组织培养; 嫩叶; 愈伤组织; 外植体

中图分类号: S567.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-8981(2007)04-0050-03

Callus Induction in *Schisandra sphenanthera* Rehd. Et Wils.

WU Ling-na, XIE Bi-xia, DENG Bai-luo, LIU Wei, LI Yong-xin, LI Jun-bin

(Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: In order to improve techniques of tissue culture in *Schisandra sphenanthera* Rehd. Et Wils., effects of different factors on callus induction were researched, taken tender leaves as explants. The results showed that it was the optimum disinfection method to immerse materials in 75% ethanol for 10 seconds and 0.1% mercuric chloride for 4 minutes; MS was the optimum media, supplemented with 2,4-D 0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L and 6-BA 1.0 mg/L, in which the induction rate was up to 96.7%, and callus were light green, dense texture, vigorous.

Key words: *Schisandra sphenanthera* Rehd. Et Wils.; tissue culture; tender leaf; callus; explants

华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. Et Wils. 为五味子科五味子属藤本植物, 在我国为一广布种, 因具甘、酸、辛、苦、咸五味而得名。华中五味子常以果实和种子入药, 用于治疗肺虚喘咳、津亏口渴、自汗盗汗、失眠多梦等, 临床主要用于治疗慢性肝炎, 是常用中药之一^[1~3]。由于森林的减少, 适宜环境被破坏, 五味子的野生贮量急剧减少, 虽然人工栽培能解决五味子的供需矛盾, 但人工栽培占地面积大、繁殖系数小、育苗周期长, 还受季节与气候限制, 而组织培养的方法具有不污染环境, 可节省土地, 降低成本, 缩短生产周期等不受自然条件限制的优点^[4,5]。陈雅君^[6]、周鑫等^[7]曾以带腋芽的北五味子嫩茎, 诱导腋芽分化, 并进一步获得完整植株。本试验中探讨了外植体消毒时间、基本培养基、不同激素配比等因素对华中五味子嫩叶诱导愈伤组织的影响, 以为建立完善的华中五味子组培快繁体系提供科学依据, 为优良品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试材料为盆栽的华中五味子, 取当年生无病虫害、刚抽生的嫩叶进行离体培养试验。

收稿日期: 2007-06-15

基金项目: 教育部博士点基金项目“五味子科植物种仁加工特性与木脂素提取率变化规律的研究”(项目编号: 20050538004); 校青年基金项目“南五味子组织培养及次生代谢物研究”(项目编号: 06047B)。

作者简介: 吴玲娜(1982-), 女, 广东梅州人。硕士研究生, 主要从事森林培育方面的研究。

1.2 方 法

愈伤组织诱导的启动培养基为 MS+2,4-D 0.2 mg/L +NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,附加蔗糖 30 g/L和琼脂8 g/L,调 pH 值至 5.8,在高压灭菌锅中 121 ℃下灭菌 20 min。培养温度(25±2) ℃,光照强度 1 500~2 000 lx,每天光照 12 h。

1.2.1 不同消毒处理对外植体消毒效果的影响

将采来的嫩叶用毛刷蘸饱和洗衣粉水清洗,然后用流水冲洗 1~2 h。在超净工作台上用 75%酒精浸泡 10 s,再用无菌水冲洗 3 次,洗净残留的酒精^[8],用 2%的 NaClO 或 0.1%的 HgCl₂ 分别浸泡(见表 1),浸泡期间不时摇晃,

使外植体与消毒剂充分接触。经上述处理后,无菌水洗 7~8 次,无菌滤纸吸干外植体表面的水分,将材料切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种到启动培养基上。每处理各接种 30 瓶,试验重复 3 次,14 d 后统计成活率。

1.2.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

MS、B₅、WPM 3 种培养基均附加 2,4-D 0.2 mg/L、NAA 0.05 mg/L、6-BA 0.5 mg/L,培养基中蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L。材料处理方法同 1.2.1,消毒处理选用 1.2.1 中最佳处理方法。每处理各接种 30 瓶,试验重复 3 次,培养 35 d 后观察结果。

1.2.3 不同激素处理对愈伤组织诱导的影响

诱导培养基为 MS 培养基,附加单种激素 2,4-D、NAA 或 6-BA。根据单种激素处理诱导试验结果,进一步试验 MS 培养基附加 2,4-D、NAA 与 6-BA 不同组合对华中五味子愈伤组织的诱导效果(见表 2)。材料处理方法同 1.2.1,消毒处理选用 1.2.1 中最佳处理方法。每处理各接种 30 瓶,试验重复 3 次,30 d 后分别统计褐变数、出愈数和诱导率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对外植体消毒效果的影响

在进行外植体表面的消毒时,消毒剂强度越强,消毒处理时间越长,一般污染率会越低,但外植体的杀死率会升高。一般在接种后 3~10 d 内即可发现真菌污染和细菌污染。结果表明:在 2 组消毒处理中,用 2%NaClO 溶液消毒污染率均较高,其中消毒 10 min 的污染率最高,为 99.9%;以 0.1%HgCl₂ 消毒 4 min 效果较好,污染率为 21.8%。

2.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

基本培养基是进行植物组织培养的重要基质,由于各种植物的遗传背景、生物学特征不同,对营养成分的需求也不同,选择合适的培养基对于组织培养成败至关重要^[8]。试验结果表明,在 WPM 培养基上外植体的出愈数量少,褐化现象较严重,诱导率仅为 16.4%,因此 WPM 不适合作为华中五味子组培的基本培养基。在 B₅ 培养基上,外植体诱导率为 55.7%,生长状态较好,褐变较轻,愈伤组织结构较致密,生长较旺盛。培养效果最佳的是 MS 培养基,诱导率达到了 70.9%,褐变轻,愈伤组织大都呈淡绿色,结构致密,生长旺盛(见图 1)。因此,MS 培养基为华中五味子组培的适宜培养基。

2.3 不同激素处理对华中五味子愈伤组织诱导的影响

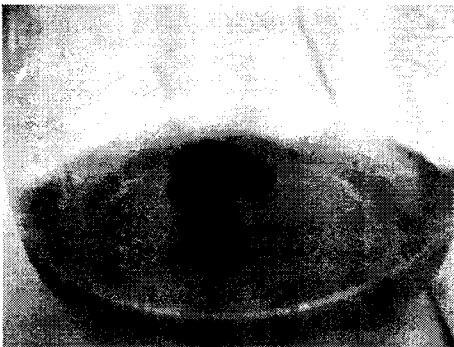
接种后外植体的褐变,极大地影响了愈伤组织的诱导。表 3 为培养 30 d 后不同激素处理对华中五味子愈

表 1 不同消毒处理

编号	消毒处理	编号	消毒处理
1	2%NaClO(10 min)	4	0.1%HgCl ₂ (4.0 min)
2	2%NaClO(15 min)	5	0.1%HgCl ₂ (4.5 min)
3	2%NaClO(20 min)	6	0.1%HgCl ₂ (5.0 min)

表 2 不同激素处理

编号	培养基	2,4-D 质量浓度 /(mg·L ⁻¹)	NAA 质量浓度 /(mg·L ⁻¹)	6-BA 质量浓度 /(mg·L ⁻¹)
7	MS	0	0	0.5
8	MS	0	0	2.0
9	MS	0	0	1.0
10	MS	0	0.1	0
11	MS	0	0.5	0
12	MS	0	1.0	0
13	MS	0.1	0	0
14	MS	0.5	0	0
15	MS	1.0	0	0
16	MS	0.1	0.1	1.0
17	MS	0.5	0.1	1.0
18	MS	1.0	0.1	1.0



伤组织诱导的影响结果。附加单种激素的处理在接种后第 2 天,部分外植体周围出现“水圈”现象;8 d 后,少量外植体开始褐变。培养 25 d 后,附加 6-BA 的外植体 90.8% 发生褐变;培养 30 d 后,全部褐变。附加 NAA 的外植体褐变率均超过 40.5%,最高的达 63.3%。而附加 2,4-D 的褐变率只有 23.8%。从诱导情况来看,附加 6-BA 的处理始终未能诱导形成愈伤组织;附加 NAA 的处理在接种后 20 d 左右开始诱导出愈伤组织,但诱导速度慢且出愈数量少,30 d 左右出现白色愈伤组织;附加 2,4-D 的处理在接种后 20 d 开始出现愈伤组织,颜色为白色或淡绿色,生长快,数量多。由试验结果可以看出,添加 NAA 或 2,4-D 2 种激素有利于诱导华中五味子愈伤组织的形成;添加 3 种激素的处理诱导率明显高于添加单种激素的处理。当 2,4-D 质量浓度为 1.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率较低,而且大部分呈白色,当 2,4-D 质量浓度为 0.1 mg/L 或 0.5 mg/L 时,愈伤组织诱导率明显提高,而且几乎都呈淡绿色或绿色。所以,嫩叶诱导效果较好的是 17 号处理,即 MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,诱导率高达 96.7%。而且愈伤组织呈淡绿色,质地致密,生长旺盛。

3 小 结

(1)组织培养中进行外植体表面消毒的一个基本原则是,既要杀死植物材料表面的微生物,又要尽可能不杀死植物材料。所以,消毒时采用的消毒剂种类、浓度和处理时间等,必须根据植物材料的生长环境及对消毒剂的敏感性来确定^[9,10]。在本研究中发现,对于华中五味子嫩叶,75%酒精浸泡 10 s 后,用 0.1%升汞浸泡 4 min 的消毒效果较好。

(2)在 MS、B₅、WPM 3 种诱导培养基中,MS 培养基上的愈伤组织结构致密,生长旺盛,诱导率高达 70.9%。因此,华中五味子嫩叶诱导愈伤组织的适宜培养基是 MS 培养基。

(3)将外植体接种在附加不同种类和质量浓度激素的 MS 培养基上,附加 2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 时,诱导愈伤组织的效果较好,诱导率高达 96.7%,褐变较轻,愈伤组织生长状态良好。

参考文献:

[1] 周庆华,范卓文,杨莲荣.五味子提取物超临界 CO₂ 萃取工艺的研究[J]. 制剂工艺,2003,31(3):44-45.
[2] 雷发斌.五味子的栽培与利用[J]. 经济林研究,2002,20(4):53-54.
[3] 王 森,张建国.五味子的研究概况及其开发前景[J]. 经济林研究,2003,21(4):126-127.
[4] 梁称福.植物组织培养研究进展与应用概况[J]. 经济林研究,2005,23(4):99-105.
[5] 彭信海,宾秋实.植物组织培养在林木育种中的应用[J]. 经济林研究,1998,16(2):54-55.
[6] 陈雅君,吴秀菊.药用植物北五味子的组织培养[J]. 植物研究,1999,19(3):318-322.
[7] 周 鑫.五味子的组织培养[J]. 中国林副特产,2001,(4):6-7.
[8] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986:456-465.
[9] 郑成木,刘进平.热带亚热带植物微繁殖[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2001:48-106.
[10] 刘进平.胡椒组织培养中污染问题的研究[J]. 热带农业科学.2003,(6):6-10.

表 3 不同激素处理对华中五味子愈伤组织诱导的影响[†]

编号	接种数 /个	褐变数 /个	出愈数 /个	诱导率 /%	生长势
7	30	23	0	0	—
8	30	26	0	0	—
9	30	20	0	0	—
10	30	19	8	26.7	+
11	30	13	11	36.7	++
12	30	16	6	20.0	+
13	30	10	15	50.0	++
14	30	5	11	36.7	+++
15	30	7	14	45.7	+++
16	30	4	24	80.0	++++
17	30	1	29	96.7	++++
18	30	9	17	56.0	++

[†] “—”不生长;“+”差;“++”一般;“+++”较好;“++++”旺盛。

[本文编校:闻 丽]