

药用植物刺五加组织培养及快速繁殖的研究

韩宏义, 郑 静, 白 鹏

(丹东市农业科学院生物技术研究中心, 辽宁 丹东 118109)

摘 要: 选用刺五加的茎尖为外植体材料, 采用正交试验方法研究了激素对刺五加愈伤组织分化、继代培养、不定芽发生及生根的影响。试验结果表明, 刺五加的最佳初分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.8 mg/L+NAA 0.10~0.15 mg/L, 继代芽分化培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1 mg/L+IBA 0.8 mg/L, 生根培养基为 1/2MS+IBA 0.4 mg/L

关键词: 刺五加; 组织培养; 正交试验; 激素; 继代培养

中图分类号: S567.1*90.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4942(2008)02-0018-03

Tissue Culture and Rapid Breeding of *Acanthopanax senticosus*

HAN Hong-yi, ZHENG Jing, BAI Peng

(Biotechnology Research Center, Dandong Academy of Agricultural Sciences, Dandong 118109, China)

Abstract *Acanthopanax senticosus* buds were used as research materials. It was determined by the orthogonal test that callus differentiation, subculture, shoot and root induction of the *Acanthopanax senticosus* were influenced by different hormone combinations of culture media. The results showed MS+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.8 mg/L+NAA 0.10~0.15 mg/L was the most favorable medium for differentiation of *Acanthopanax senticosus* tissue culture, MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1 mg/L+IBA 0.8 mg/L was the one for subculture of regeneration bud, and 1/2MS+IBA 0.4 mg/L was the one for root induction.

Key words *Acanthopanax senticosus*; Tissue culture; Orthogonal test; Hormone; Subculture

刺五加 [*Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim. /Farms)], 属五加科植物。春季嫩茎叶可作优质山野菜食用; 根、茎、叶、果实均可入药。近年来新的研究表明, 刺五加能有效地抗肿瘤、抗疲劳、抗衰老, 提高免疫力, 并对心血管有很好的保护作用, 是十分珍贵的药物资源。就目前临床供药而言, 主要从刺五加根和茎中提取。资源消耗与日俱增, 已使刺五加植物濒临灭绝的危险。为实现其持续利用, 建立组织培养技术能在短期内繁殖大量苗木, 对保护这一珍惜植物物种和合理开发利用这一药物资源具有重要的现实意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选取野生刺五加当年形成的越冬枝条, 室内培养至刚刚萌发, 用解剖刀切下芽, 然后将外植体

用自来水冲洗 30 min, 在超净工作台上用 1% 洁尔灭表面灭菌 15 min, 再用 0.1% 升汞浸泡 15 min, 无菌水冲洗 5 次后, 切下解剖芽接种。

1.2 试验方法

分别采用正交试验方法测定不同浓度比例的激素对外植体愈伤组织诱导、继代芽分化和芽生根的影响。本试验中的基本培养基为 MS。附加蔗糖浓度为 3%, 琼脂浓度为 0.6%, pH5.8, 培养温度为 25℃, 光照度 1 500~2 000 lx, 光照 12 h/d。

1.2.1 愈伤组织诱导分化培养基的筛选 在植物组织培养中, 培养基是否合适, 植物激素的配比是至关重要的。用正交试验对筛选出的植物激素浓度进行优化, 选用正交表 $L_9(3^4)$, 因素-水平设计如表 1。

表 1 不同浓度与比例的激素对外植体分化影响的设计

水 平	因 素		
	A 6-BA(mg/L)	B KT(mg/L)	C NAA(mg/L)
1	0.5	0.4	0.05
2	1.0	0.8	0.10
3	1.5	1.2	0.15
4	2.0	1.6	0.20

1.2.2 继代培养基的筛选

表 2 不同浓度与比例的激素对继代芽分化影响的设计

水 平	因 素		
	A 6-BA(mg/L)	B IAA(mg/L)	C IBA(mg/L)
1	0.50	0.25	0.2
2	0.75	0.50	0.4
3	1.00	1.00	0.8
4	1.25	1.50	1.6

1.2.3 生根培养基的筛选 植物的生根多数都是用生长素单独完成的,IBA 有较好的生根作用。本试验采用 0~1.6 mg/L 的 IBA 进行生根试验。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导分化培养基的筛选

将无菌外植体,放入按正交试验所设计的不问浓度与比例的激素诱导培养基上,每组外植体个数为 30 个。7~10 天后芽开始萌动生长,15 天左右芽基部有黄色瘤状愈伤组织出现,45 天后将诱导出的颗粒状愈伤组织与外植体分开。试验结果见表 3。

从表 3 极差 R 分析表明,三因素影响诱导率的主次关系依次是 6-BA 浓度 > KT 浓度 > NAA 浓度。为了进一步判断试验误差与试验条件是否影响试验结果,将正交试验数据进行方差分析,找出这些因素中起主导作用的变异来源,结果表明,6-BA 浓度 $F = 21.88446 > F_{0.01}(3,7) = 8.35$,差异极显著;KT 浓度 $F = 7.51719 > F_{0.05}(3,7) = 4.35$,差异显著,即激素 6-BA 和 KT 是影响愈伤组织分化的主要因素。而 NAA 的 $F = 0.59656 < F_{0.05}(3,7) = 4.35$,差异不显著,表明 NAA 不是影响的主要因素。这样可以从试验结果(表 3)的平均值大小确立最佳提取条件为 $A_4B_2C_2$,即最佳培养条件:6-BA 浓度为 2mg/L,

KT 浓度为 0.8 mg/L,NAA 浓度为 0.1 mg/L。因方差分析 NAA 浓度间差异不显著,用 0.15 mg/L 浓度也可,即本试验中愈伤组织诱导分化率最高的组合 $A_4B_2C_3$,诱导率高达 96.67%。

表 3 愈伤组织诱导分化培养基正交试验结果

试验号	A	B	C	外植体初 分化数(个)	诱导率 (%)
1	1	1	1	10	33.34
2	1	2	2	14	46.67
3	1	3	3	16	26.67
4	1	4	4	10	33.34
5	2	1	2	13	43.33
6	2	2	1	24	60.00
7	2	3	4	18	53.33
8	2	4	3	14	46.67
9	3	1	3	19	63.33
10	3	2	4	21	70.00
11	3	3	1	20	60.00
12	3	4	2	18	76.67
13	4	1	4	24	80.00
14	4	2	3	29	96.67
15	4	3	2	25	83.30
16	4	4	1	21	70.00
T_1	140.02	220.00	223.34	T = 943.32	
T_2	203.33	273.34	249.97		
T_3	270.00	223.30	233.34		
T_4	329.97	226.68	236.67		
\bar{X}_1	35.0050	55.0000	55.8350		
\bar{X}_2	50.8325	68.3350	62.4925		
\bar{X}_3	67.5000	55.8250	58.3350		
\bar{X}_4	82.4925	56.6700	59.1675		
R	47.4875	13.3350	6.6575		

2.2 继代芽分化培养基的筛选

将外植体分化芽 30 个,分别接到继代培养基中,使其达到较高的芽增殖数和有效芽数,20 天后分化出丛生芽,结果见表 4。

从表 4 极差 R 分析表明,三因素影响诱导率的主次关系依次是 IBA 浓度 > IAA 浓度 > 6-BA 浓度。方差分析结果表明,IAA 浓度的 $F = 5.82678 > F_{0.05}(3,7) = 4.35$,差异显著;IBA 浓度的 $F = 10.77307 > F_{0.01}(3,7) = 8.35$,差异极显著,表明 IAA 和 IBA 是影响继代芽分化的主要因素。而 6-BA 浓度的 $F = 0.25667 < F_{0.05}(3,7) = 4.35$,差异不显著,表明激素 6-BA 不是影响继代芽分化的主要因素。这样可以从试验结果(表 4)确立最佳提取条件为 $A_1B_3C_2$,即最佳培养条件:6-BA 浓度为 0.5 mg/L,IAA 浓度为 1mg/L,IBA 浓度为 0.4 mg/L。因方差分析 IBA 浓度间

差异不显著,用0.8 mg/L也可。即本试验中继代芽分化率最高的组合 A₁B₃C₃,分化率高达83.33%。

表4 继代芽分化培养基正交试验结果

试验号	A	B	C	再分化芽数(个)	分化率(%)
1	1	1	1	6	20.00
2	1	2	2	23	76.67
3	1	3	3	25	83.33
4	1	4	4	10	33.33
5	2	1	2	19	63.33
6	2	2	1	13	43.33
7	2	3	4	12	40.00
8	2	4	3	13	43.33
9	3	1	3	17	56.67
10	3	2	4	7	23.33
11	3	3	1	20	66.67
12	3	4	2	17	56.67
13	4	1	4	9	30.00
14	4	2	3	19	63.33
15	4	3	2	24	80.00
16	4	4	1	5	16.67
T ₁	213.33	170.00	146.67	T = 796.66	
T ₂	189.99	206.66	276.67		
T ₃	203.34	270.00	246.66		
T ₄	190.00	150.00	126.66		
\bar{X}_1	53.3325	42.5000	36.6675		
\bar{X}_2	47.4975	51.6650	69.1675		
\bar{X}_3	50.8350	67.5000	61.6650		
\bar{X}_4	47.5000	37.5000	31.6650		
R	5.8350	30.0000	37.5025		

2.3 生根培养基的筛选

选用1/2MS,将株高适中、健壮的继代单芽30株,分别插入不同IBA浓度的生根培养基中,试验结果见表5。

从表5可以看出,刺五加生根率与IBA浓度在一定范围内呈正相关,IBA浓度为0~0.4 mg/L时,刺五加的生根率随浓度的增加而增加,当IBA浓度为0.4 mg/L时,表现为萌动时间短,根数多,生根率高。IBA浓度超过0.4 mg/L,生根率开始下降、苗长势差。由此可见,IBA的浓

度对刺五加生根率和苗的长势有一定影响。

表5 不同浓度与比例的激素对生根的影响

IBA (mg/L)	生根萌动时间(d)	生根数(条)	生根率(%)	生根状况
0	50	2	6.67	根细长、不发达
0.2	35	8	26.67	根不发达,一些苗基部出现愈伤
0.4	28	18	60.00	根系发达,也出现愈伤
0.8	30	14	46.67	苗弱,出现黄化
1.6	45	4	13.34	苗弱,出现黄化,部分枯死

3 小结

外植体最好取材室内培养的嫩芽,这样更有利于消毒时间的控制。

试验结果表明,培养基中激素配比对刺五加愈伤组织的分化和诱导生根有很大的影响。刺五加愈伤组织诱导培养基MS+6-BA 2 mg/L+KT 0.8 mg/L+NAA 0.15 mg/L,与正交表计算得出的最佳组合A₄B₂C₂基本一致,诱导率为96.67%;MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1 mg/L+IBA 0.8 mg/L培养基对刺五加继代芽分化有明显的促进作用,平均有效芽达76.67%,达到继代壮苗同步,既可实现高增殖率,又能保证分化出的芽粗壮,正常生长,与正交表计算得出的最佳组合A₁B₃C₂基本一致。促进刺五加继代芽生根比较有效的培养基是1/2MS+IBA 0.4 mg/L,生根率达到60%。

参 考 文 献:

- [1] 张健夫. 刺五加的组织培养及快速繁殖的研究[J]. 长春大学学报,2004,14(4):73-75.
- [2] 梁建萍. 刺五加叶片组织培养研究[J]. 山西农业大学学报,2005,25(4):340-341.
- [3] 邢朝斌,陈正恒,曹 蕾,等. 刺五加组织培养与细胞工程进展[J]. 中草药,2005,36(12):1896-1899.
- [4] 贝丽霞. 药用植物刺五加组织培养关键技术的研究[J]. 中国农学通报,2005,21(6):91-93.