

刺五加组织培养研究进展

褚丽敏, 孙周平

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 综述了近年来刺五加组织培养的研究现状, 从外植体、培养基、植物激素和碳源方面, 总结了影响刺五加植株再生体系的主要因素, 提出了刺五加组织培养与植株再生过程中存在的问题与展望, 为刺五加植株再生体系的建立提供参考。

关键词: 刺五加; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S 759.82 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0138-03

刺五加 (*Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 主要生长于低山、丘陵阔叶林或针阔混交林的林下、林缘, 喜温暖、湿润气候, 耐寒。在我国东北、华北、陕西、四川及俄罗斯、朝鲜和日本均有分布^[1]。刺五加商品名为五加参, 是我国医药珍品, 其根、茎、叶均可入药^[2]。自 20 世纪 70 年代末以来, 我国大量采挖刺五加的根和根茎用于医药工业。由于刺五加在自然状态下结实的株丛少, 种子虫害较重、产量低、质量差、自然状态后熟时间长^[3]、休眠程度深等原因, 长期的过量采掘, 导致我国刺五加资源严重地破坏, 在一些地方, 相当长的时期内无法更新恢复, 甚至有些种群在较大的面积上急剧减少或消失^[4]。因此, 1992 年出版的《中国植物红皮书》已把刺五加定为渐危物种。对此, 多年来人们针对刺五加的种子与种苗繁育进行了大量研究, 但进展不大。目前多采用混湿沙变温处理方法处理种子, 但萌发率平均只有 12% 左右, 并且扦插成活率低、插穗来源少、管理程序繁琐。另一方面, 近年来对刺五加的组织培养研究表明^[5,7], 刺五加组织培养将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。为此, 现对刺五加的组织培养研究现状、存在问题进行总结, 并提出了今后的发展方向。

1 刺五加茎尖培养再生的途径

通常植物组织培养获得再生植株有两条途径: 一是器官发生途径, 是指离体植物组织(外植体)或细胞(悬

浮培养的细胞和原生质体)在组织培养的条件下形成不定芽、根和花芽等器官的过程。刺五加器官发生(不定芽)途径主要有两种方式: ①直接器官发生即从外植体上直接诱导出不定芽。②间接器官发生即从外植体上诱导愈伤组织, 再从愈伤组织中诱导出不定芽或不定根。直接从外植体上诱导产生不定芽是刺五加器官发生获得再生植株的主要途径。因为它有利于保持遗传性状的稳定。二是体细胞胚胎发生途径, 是指双或单倍体的体细胞在特定条件下, 未经性细胞融合而通过与合子胚胎发生类似的途径发育出新个体的形态发生过程。当条件适当时体细胞经过多次分裂先形成原胚, 继而再经过球形胚、心形胚、鱼雷形胚等不同发育阶段, 最后发育成具有明显胚轴和子叶的成熟体细胞胚。目前胚状体既可以在愈伤组织阶段形成也可以直接在外植体上形成。通过胚状体再生植株的优点是: 在一个培养物上所能分生的胚状体数往往比不定芽数多, 胚状体形成速度快, 结构完整。一旦形成, 一般都可直接萌发形成小植株, 因此成苗率较高。刺五加植株的这两种再生途径对于种苗的组培快繁都具有重要意义。

1.1 器官培养(茎尖培养)

在刺五加茎尖培养中, 外植体选用当年生幼嫩枝条和休眠枝条。张健夫选用刺五加休眠枝条通过茎尖培养成苗, 贝丽霞在刺五加休眠后取材培养, 结果其成活率均高于生长期和休眠前期。张喜春等报道刺五加茎尖培养最适宜的取材时间为春季萌芽前的 4~5 月份。

消毒方法因植物材料的种类和采集时期而异。一般材料取回后, 先用自来水冲洗干净, 然后移到超净工作台上, 用 70% 的酒精浸泡 30 s, 再用 0.1%~0.2% 的升汞消毒 8 min, 或者用 0.5% 次氯酸钠表面杀菌 15 min 后用无菌水冲洗 5~6 次。Fouad 等提出, 外植体采用 0.5% 次氯酸钠表面杀菌 15~20 min 比用 10% 次氯酸钠或 0.2% 升汞处理芽的成活率高^[8]。Hammerschlag 也认为使用 0.5% 次氯酸钠+0.01% 吐温浸泡 15~

第一作者简介: 褚丽敏(1983-), 女, 硕士, 主要从事植物组织培养的研究工作。E-mail: cdm198414@yahoo.cn.

通讯作者: 孙周平(1967-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 现主要从事植物组织培养和设施园艺栽培生理及植物生理生态方向研究工作。E-mail: zhouplingsun@yahoo.com.cn.

基金项目: 辽宁省“十一五”重大资助项目(2006215001); 辽宁省教育厅创新团队资助项目(2007T159)。

收稿日期: 2008-10-25

20 min, 100 mg/L 青链霉素处理 15 min 的消毒方法污染最轻^[9]。刘翠云等报道在组织培养时, 对较难灭菌的材料在第一次灭菌后可进行二次灭菌, 不但能降低污染率, 还可防止因灭菌时间过长造成的外植体褐化。张喜春等对刺五加茎尖培养做了初步的探索, 发现作为木本植物的刺五加其茎尖增殖系数要低于大多数的草本植物, 仅为 3~4 倍。MS 培养基对刺五加体细胞胚胎发生是一种适合的培养基, 但在添加 0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 时, White 培养基中茎尖的分化率(87.2%)要高于 MS 培养基(76.1%)。

1.2 胚状体的诱导

1990 年桂耀林等首次报道刺五加体细胞胚胎发生的研究, 之后对刺五加体胚发生和人工种子的包埋进行了大量研究。与其他植物相同, 刺五加体细胞胚胎发生是个十分复杂的过程, 其机制还不十分清楚。Choi 等^[10-11]和邢朝斌等^[12]分别用直接或间接经由愈伤组织的途径获得了刺五加体细胞胚胎。Choi 认为 MS 培养基是诱导刺五加体细胞胚胎发生的常用培养基, 但在未加任何激素的该种培养基中, 所有外植体均不能产生体胚。对此, 曹孜义等^[13]认为一般在含有丰富还原氮的培养基上加生长素, 尤其是 2,4-D 来诱导胚状体的发生, 然后转移到降低浓度或没有生长素的培养基上使其成熟、萌发和生长。在同属五加科的人参西洋参中诱导胚状体的方法也大致相同, 2,4-D 均在其中起到重要的作用。只是在人参西洋参中胚状体的诱导一般都要经过愈伤组织阶段, 而在刺五加中既可以经过愈伤组织阶段再分化出胚状体, 也可以不经过愈伤组织而在肿大的子叶及胚轴上直接分化出胚状体。胚状体产生条件的初步探索表明: 培养基的外源激素 2,4-D 与内源激素达到相对平衡是分化胚状体的必要条件, 而黑暗条件是诱导胚状体的主要条件。另外, 外植体的冷藏处理也可能有利于胚状体的形成。

2 影响刺五加植株再生的因素

2.1 外植体

刺五加的根、茎、叶、种胚都可诱导出愈伤组织, 但它们之间的诱导率有明显差异。Choi 等的研究表明层积处理后种子中的合子胚, 在 1/2MS 培养基中培养 2 周即可萌发, 当幼苗长到 2 cm 高时, 分别切取子叶、下胚轴、胚根作为外植体, 下胚轴产生体细胞胚胎的频率最高(75%), 是子叶(56%)的 1.34 倍、胚根(12%)的 6.25 倍。贝丽霞等的研究发现根、叶片和茎尖均能诱导出愈伤组织, 但以叶片愈伤组织分化能力较旺盛, 且再生芽分化系数可达 7.5。由于茎尖培养属于器官培养, 可以不经愈伤组织培养这一阶段, 大大地缩短了培养时间而且其遗传性状稳定、茎尖体积较小, 其生长点由数层鳞片包被, 感染机率较小, 容易消毒, 生长点部分无病毒

存在, 因此, 在刺五加组织培养中大都选择茎尖作为外植体。由此可见, 外植体类型对愈伤组织的分化能力有很大影响。

2.2 培养基

目前用于木本植物组培快繁的培养基主要有 MS、WPM、SH、CM、改良的 Nitsch 等基本培养基。1996 年张喜春等研究认为, White 培养基较适合于刺五加茎尖培养。张健夫研究发现, MS 培养基用于刺五加的组织培养及快速繁殖时能获得较高的诱导率和分化率, 且在 1/2MS 培养基中壮苗生根 1 个月左右即可移栽。梁建平^[14]采用 MS 培养基对刺五加叶片组织培养也获得成功。对此, 贝丽霞对 MS 培养基进行了改良, 以铵态氮和几种氨基酸作为氮源, 形成了改良培养基 BZ, 通过对 BZ、MS、N6、White 等 4 种培养基的刺五加茎尖、叶片和根系培养试验表明, 在刺五加组织培养中改良的 BZ 培养基对叶片组织培养效果最好。

2.3 植物生长调节剂

在刺五加组织培养中, 常用细胞分裂素是 6-BA 和 KT, 生长素为 2,4-D, NAA 和 IBA。张喜春等研究认为, 高浓度 BA 或 NAA 以及二者的高浓度组合对刺五加茎尖培养具有抑制作用。以 White 为基本培养基附加 BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的处理效果最好。而附加 GA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的处理苗木生长也较快, 但苗木比较细弱。张健夫发现刺五加始芽分化的 6-BA 浓度为 1.0 mg/L, 再附加 NAA 0.1 mg/L, 其诱导分化率可达 96.6%; MS+6-BA 0.5 mg/L+ZT 0.1 mg/L 培养基对刺五加继代芽分化有明显的促进作用, 分化率为 93.3%, 芽增殖倍数可达 4.8, 平均有效芽达 100%, 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。贝丽霞等研究发现, 以改良的 MS 培养基 BZ+NAA 3.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 培养刺五加的茎尖、叶片和根系, 其叶片愈伤组织的分化能力最强, 分化率达到 73.62%, 再生芽分化系数为 7.5。可见, 不同的外源激素配比对刺五加组织培养有很大的影响。

2.4 碳源

在植物组织培养中, 常在培养基中添加一些糖类作为碳源, 为细胞的呼吸代谢提供底物和能源。一般来说, 诱导愈伤组织增殖常用 3%蔗糖, 而提高丛生苗长势及生长速度, 以 4%蔗糖浓度较好。邢世岩^[15]认为对于已发生玻璃化的试管苗来说, 应适当提高培养基中蔗糖含量, 降低培养基中的渗透势, 可以降低玻璃化。多数研究表明对于木本植物 1.5%~2%蔗糖浓度最适合幼苗生根, 过高或过低均抑制生根^[16]。但也有人认为组培微环境适宜时生根培养基中可不加蔗糖, 但添加少量蔗糖可促进组培苗生长^[17]。对于刺五加组织培养中碳源

的研究还未见报道。

3 刺五加组织培养的问题与展望

刺五加作为木本植物,其组织培养方面的研究还存在许多问题,一是组培快繁体系不完善,如褐化问题严重、体细胞胚胎的个体差异大、茎尖来源少,组培苗根系发育不良且生根困难,移栽成活率低,以及遗传转化程序复杂等问题,还不能广泛应用于生产实践中。二是建立高效的木本植物器官发生再生植株体系难度较大,且对再生植株发生的变异,虽然越来越重视,但仍缺乏系统的研究。三是研究的不平衡发展。近十年来,学者们的研究主要集中在药理、药性、种群格局、生长状况以及生物量等方面,而对其再生体系的建立,遗传转化等研究很少。四是国内研究基础滞后。刺五加主要分布在我国东北、华北、俄罗斯的西伯利亚和朝鲜、韩国等地。但我国对其的研究仅有零星报道。与此形成鲜明对比的是韩国进行了大量研究工作,尤其应注意的是他们开展的刺五加毛状根培养,更为该国工业化生产刺五加药用成分奠定了基础。

随着人民生活水平的提高及保健意识的增强,刺五加的需求量会不断增加。因此,加强刺五加资源的开发和利用,其经济效益和社会效益是巨大的。目前,我国刺五加组织培养的研究还应加强以下几方面的工作:建立起高效、稳定的体细胞胚胎发生体系和再生体系,为刺五加的快速繁殖奠定基础;重视珍稀品种及引进品种的研究,加强种质资源的离体保存;加强愈伤组织与细胞分化研究,为遗传转化和药用成分的生物器生产奠定基础;系统地研究刺五加组织培养中的内在机制及其调控机制,从而为更好地利用植物细胞全能性,深入开展其它药用植物的研究提供理论依据和技术指导。

参考文献

[1] 祝宁,金永岩.阔叶红松林及其次生林下的刺五加种群[J].哈尔滨

滨:东北林业大学出版社,1994:614-622.

[2] 黑龙江省祖国医药研究所著.中国刺五加研究[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1981:5-12.

[3] 祝宁,王义弘.刺五加生殖生态学的研究(II).种子扩散、种子库及更新[J].东北林业大学学报,1992,20(5):12-17.

[4] 祝宁,卓丽环,臧润国.刺五加会成为濒危种吗[J].生物多样性,1998,6(4):253-259.

[5] 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.

[6] 张喜春,刘宏伟,张弘,等.影响刺五加茎尖培养的因索[J].东北林业大学学报,1996,24(6):107-110.

[7] 贝丽霞,陈祥梅,赵海红.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.

[8] Fouad M M, Gomaa A H, El Zahar M H A. Factors influencing in vitro establishment and multiplication stages of peach[J]. Acta Horticulturae, 1995, 409: 191-196.

[9] Hammerschlag F A. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro[J]. HortScience, 1982, 17(1): 85-86.

[10] Choi Y E, Kim J W, Yoon E S. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus* [J]. Ann of Bot, 1999, 83: 309-314.

[11] Choi Y E, Yang D C, Yoon E S. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of germinating zygotic embryos[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 58: 93-97.

[12] 邢朝斌,沈海龙,赵丽娜,等.刺五加的体细胞胚胎发生研究[J].中草药,2006,37(5):769-772.

[13] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科技出版社,1996:226-256.

[14] 梁建萍.刺五加叶片组织培养研究[J].山西农业大学学报,2005(4):340-341.

[15] 邢世岩.木本植物组织培养玻璃化的成因和控制[J].泰安林业科技,2000,17(2):11-14,37.

[16] 丁世萍,严菊强,季道藩.糖类在植物组织培养中的效应[J].植物学通报,1998,15(6):42-46.

[17] 周耀红,朱祝军,钱琼秋.草莓组培生根微环境对幼苗移栽后生理特性的影响[J].园艺学报,2003,30(4):460-462.

A Review on Study of Tissue Culture of *Acanthopanax Senticosus*

CHU Li-min, SUN Zhou-ping

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

Abstract: The study of tissue culture of *Acanthopanax senticosus* in recent years were reviewed in this paper, the diverse factors influenced *Acanthopanax senticosus* regeneration were summarized, including explants, medium, auxin, sucrose. Meanwhile, the problem and prospect for tissue culture and regeneration of *Acanthopanax senticosus* were discussed, which would provide a guidance for establishing of *Acanthopanax senticosus* regeneration system.

Key words: *Acanthopanax senticosus*; Tissue culture; Regeneration system