

朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导研究

王 晶, 李 静, 贾凌云, 曾文文, 刘蓬蓬, 路金才

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:以朝鲜淫羊藿幼叶、叶柄和茎尖为外植体,研究了朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导的适宜条件,以期为原料化育苗提供科学根据。结果表明:朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导最佳外植体为茎尖,接种于培养基 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 中,于 25℃ 黑暗条件下培养 1 周后转入光照强度 2 000 lx 条件下,愈伤组织诱导效果最佳。

关键词:朝鲜淫羊藿;愈伤组织;诱导

中图分类号:S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0106-03

朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)属小檗科淫羊藿属多年生草本植物,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效^[1]。主要分布在我国东北的辽宁、吉林两省。近年来发现其对抗衰老、抗肿瘤、心脑血管疾病等方面有显著疗效,受到国内外学者的高度重视。淫羊藿主要以无性繁殖为主,野外实生苗很少,有性繁殖能力弱,发芽周期长且发芽率低^[2],但随着国内外需求的不断增长,使野生资源已趋于濒危^[3]。近年来,人们利用组织培养、细胞培养技术批量生产天然产物已在很多植物上有相关研究,淫羊藿属的其它品种也有研究报道^[4-6],并取得了一些进展。但有关朝鲜淫羊藿的组织培养研究国内外均鲜见报道,该试验以朝鲜淫羊藿的嫩叶、叶柄、茎尖为外植体进行愈伤组织诱导,摸索出合适的培养条件,为其组织培养和工厂化育苗提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以沈阳药科大学药草园林下仿生栽培的朝鲜淫羊藿为试材。

1.2 试验方法

取朝鲜淫羊藿幼叶、叶柄、茎尖作为外植体,用蒸馏水清洗 3 遍,在超净工作台中 70% 酒精消毒 30 s,无菌水清洗 3 次,2% NaClO 灭菌 15 min,无菌水清洗 3~5 次。将经消毒的幼叶切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,叶柄和芽切成 0.5~1.0 cm 的小段接种于以 1/2MS 为基

本成分的培养基(pH 为 5.8),光照强度 2 000 lx,每日光照时间 12 h,培养温度(25±1)℃。观察外植体对愈伤组织诱导的影响,计算诱导率。诱导率=(有愈伤组织产生的接种材料数/接种材料的总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可以看出,3 种外植体愈伤组织诱导率大小依次为茎尖>幼叶>叶柄,其中茎尖的愈伤组织诱导率最高为 22.2%,显著高于幼叶(8.3%)和叶柄的诱导率(11.1%)。这与其它品种^[4-6]的淫羊藿诱导结果不一样,可能是由于地域原因造成。茎尖的愈伤组织诱导率最高,一般从切口处膨大成球形,产生淡黄色较湿润的愈伤组织,生长较快;幼叶诱导先是叶子逐渐蜷缩,然后中间拱起,叶片表面出现颗粒状的绿色愈伤组织,切口处为白色类似毛状的愈伤组织,生长较慢;叶柄大约 10 d 后两端开始膨大,呈哑铃形,产生淡绿色较湿润或者淡黄色较干燥的愈伤组织,生长开始快后变慢。4 月所采的外植体的愈伤组织的诱导明显易于 5 月所采,这可能与植物体的幼嫩程度有关。对于幼叶组织越嫩越容易诱导出愈伤组织,越靠近叶片中脉的组织,越容易诱导出愈伤组织。此外,还发现叶片褐化现象最严重,可能与叶片中含有酚类成分有关。在切割材料时,组织中酚类化合物在多酚氧化酶(PPO)作用下易被氧化产生棕褐色的醌类物质。

表 1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

外植体	外植体数	愈伤组织数	褐化数	诱导率/%
幼叶	72	6	60	8.3
叶柄	36	4	12	11.1
茎尖	36	8	12	22.2

2.2 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

以 1/2MS 为基本培养基,考察不同激素配比对朝鲜淫羊藿茎尖、幼叶、叶柄诱导的影响。表 2 表明,在外

第一作者简介:王晶(1977-),女,博士,讲师,现主要从事中药资源研究和开发工作。E-mail:wangjingyk@126.com.

责任作者:路金才(1971-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事中药资源研究和开发等工作。E-mail:jincailu@yahoo.com.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102755)。

收稿日期:2013-03-07

植物的培养基中发现形成的愈伤组织有 4 种类型(图 1):淡绿色颗粒状,干燥、致密(A);黄褐色颗粒状,湿润(B);淡黄色球状,湿润、疏松(C);淡黄色颗粒状,湿润、疏松(D)。朝鲜淫羊藿在诱导愈伤组织时,在 6-BA 含量较高的培养基中,幼叶的褐化会加重,故增加 2,4-D 的浓度或者降低 6-BA 的浓度可以减轻褐化现象。

表 2 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			愈伤组织质地		
2,4-D	6-BA	NAA	茎尖	幼叶	叶柄
1	0.5	0	淡黄色、湿润	褐化	褐化
1	0.25	0	无	无	无
2	0.5	0	无	褐化	黄色、湿润
2	0.25	0	淡褐色、疏松	淡绿色、颗粒状	浅黄色、有光泽
2	0.5	1	黄色、有光泽	褐化	黄色、湿润
2	0.25	1	黄色、颗粒状	乳黄色、颗粒状	褐色、颗粒状
3	0.5	1	淡黄色、致密	乳白色、疏松	无
3	0.25	1	淡黄色、疏松	乳白色、水煮样	无

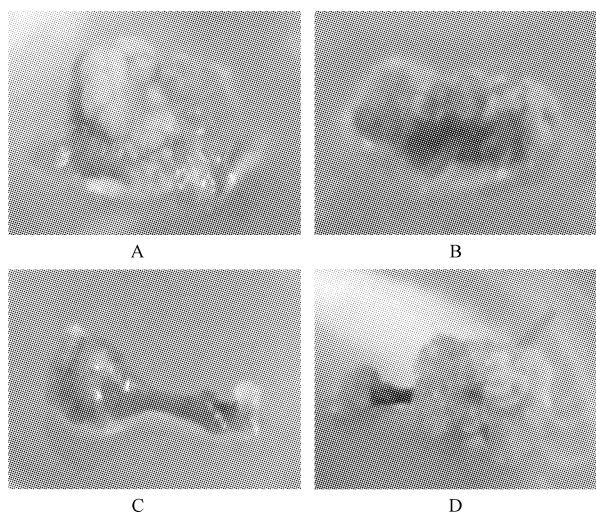


图 1 朝鲜淫羊藿不同外植体诱导的愈伤组织

注:A,B:幼叶;C:叶柄;D:茎尖。

2.3 不同培养温度对愈伤组织诱导的影响

由表 3 可看出,在不同温度条件下,朝鲜淫羊藿不同外植体愈伤组织诱导率呈现不同差异,高温会使愈伤组织的诱导率增加,但外植体的污染数和褐化数也会增加,低温却会导致愈伤组织生长缓慢。

表 3 不同培养温度对愈伤组织诱导的影响

外植体	温度/ $^{\circ}\text{C}$	接种数	愈伤组织数	褐化数	诱导率/%
嫩叶	21	24	2	8	8.3
	25	24	5	15	20.8
叶柄	21	24	3	12	12.5
	25	24	4	15	16.6
茎尖	21	24	6	8	25.0
	25	24	7	10	29.2

2.4 不同光照条件对愈伤组织诱导的影响

从表 4 可看出,在光照和黑暗条件下朝鲜淫羊藿幼叶愈伤组织诱导率也存在差异。朝鲜淫羊藿嫩叶在黑

暗条件下比光照 2 000 lx 下产生的诱导愈伤组织多,盛茂银等^[6]指出,随着光照时间和光照强度的增加,淫羊藿外植体生长易受到抑制,不同程度褐化率和死亡率也不断增加。因此,朝鲜淫羊藿的愈伤组织诱导适合于黑暗或是光照较弱的条件,光照太强、光照时间过长均不利于朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导。结合试验结果发现在接种后将朝鲜淫羊藿进行 1 周的暗培养,再放于低光照下培养,可降低其褐化率,并保证得到较好的愈伤组织。

表 4 不同光照条件对愈伤组织诱导的影响

外植体	接种数	愈伤组织数	褐化数	诱导率/%
黑暗	20	5	5	25
光照 2 000 lx	20	2	8	10
黑暗 1 周转入光照	20	8	4	40

3 讨论与结论

在朝鲜淫羊藿组织培养中,愈伤组织诱导主要受外植体、培养基和植物激素等因素的控制,其中植物激素是关键的制约因素之一。较高浓度的生长素和低浓度的细胞分裂素有利于愈伤组织诱导,二者配合应用时能更好的诱导愈伤组织。2,4-D、6-BA 和 NAA 3 种激素对朝鲜淫羊藿愈伤组织的诱导均有显著影响,当激素组合为 1/2MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 时叶柄能诱导出愈伤组织,当激素组合为 1/2MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.25 mg/L 时嫩叶能诱导出愈伤组织,当激素组合为 1/2MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 时茎尖能诱导出愈伤组织,这种差异的产生,可能是不同外植体所含的植物激素及生理状态不同所致^[6]。

通过考察不同外植体、激素配比、培养温度和光照条件对朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导的影响,产生的愈伤组织的形态显示,朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导最佳外植体为茎尖,接种于培养基 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 中,于(25+1) $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下培养 1 周后转入光照强度 2 000 lx 条件下,愈伤组织诱导效果最好,黑暗或黑暗与光照交替方法有利于诱导愈伤组织。

参考文献

- [1] 《中华人民共和国药典》2010 版[S]. 1 部. 2010:306-308.
- [2] 张著林,储蓉,孙超. 粗毛淫羊藿种子繁殖试验初报[J]. 种子, 2007, 26(3):102-103.
- [3] 郭玉蓉,张华峰,杨晓华,等. 药用植物淫羊藿资源可持续利用现状与展望[J]. 植物学报, 2009, 44(3):363-370.
- [4] 罗莉,李燕,杨瑞武,等. 柔毛淫羊藿愈伤组织诱导及其总黄酮含量测定[C]. 第九届全国药用植物及植物药学术研讨会, 2010.
- [5] 盛茂银,杨政富,林菊,等. 粗毛淫羊藿幼叶愈伤组织的生产[J]. 种子, 2005, 24(9):22-24.
- [6] 韩素菊,黎云祥,胥晓,等. 箭叶淫羊藿胚性愈伤组织诱导及其黄酮类化合物的总含量测定[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23):2551-2553.

波叶红果树叶片愈伤组织诱导研究

邢小明, 林夏珍, 王旭艳, 李琳, 阮颖

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300)

摘 要:以波叶红果树无菌苗叶片为外植体,研究了生长素(NAA、2,4-D)、细胞分裂素(6-BA)以及不同植物激素组合对波叶红果树愈伤组织诱导和生长的影响。结果表明:以6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L激素组合愈伤组织诱导效果最佳,诱导率高达95.00%,生长旺盛。

关键词:波叶红果树;叶片;愈伤组织诱导

中图分类号:S 336;S 686 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0108-03

波叶红果树(*Stranvaesia davidiana* var. *undulate*)属蔷薇科红果树属(*Stranvaesia*)常绿小乔木,野生分布于浙江、江西、湖北、湖南、广西、四川、贵州、云南、陕西等地,在浙江主要分布于淳安、遂昌、龙泉、庆元、云和、景宁、泰顺等海拔1 300~1 900 m的山地^[1]。波叶红果树初夏花繁色白,秋末红果累累,经冬不凋,是珍贵的观果花木,株高30~80 cm,常披散伏地,耐修剪,少病虫害,是应用于园林地被植物的极佳品种之一,在园林应用上具有广阔的发展前景。波叶红果树多采用种子繁殖、扦插嫁接,但繁殖系数较低,远远不能满足市场需求,组织培养快繁是提高波叶红果树繁殖系数的有效手段。白伟琴^[2]以波叶红果树无菌苗的带腋芽茎段为外植体进行离体培养研究,结果表明,在培养基MS+TDZ 0.20 mg/L上增殖效果最佳,增殖系数达6.68,但植株

生长势弱,不利于驯化移栽;在MS+6-BA 1.0 mg/L植株生长势较好,但增殖系数仅为3.94,不能满足工厂化、规模化生产。国内对波叶红果树愈伤组织诱导的研究尚鲜见报道。现以波叶红果树叶片为外植体,研究了波叶红果树愈伤组织诱导的最佳诱导条件,以期提供波叶红果树快繁的最佳途径及愈伤组织的增殖分化培养奠定理论与技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为生长30 d的波叶红果树组培苗。将波叶红果树叶片在超净工作台内剪成0.5 cm×0.5 cm的小块,接种在不同激素浓度与激素组合的MS培养基中。在蔗糖30 g/L,琼脂7 g/L,pH 5.8,温度25℃,暗培养(无光照)条件下培养。

1.2 试验方法

1.2.1 单激素对愈伤组织诱导的影响 以MS为基本培养基,单独添加2,4-D、NAA、6-BA,浓度均为0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/L。每处理接外植体数20个,3次重复,25 d后统计其诱导率、褐化率。

第一作者简介:邢小明(1987-),女,硕士,研究方向为园林植物栽培与管理。E-mail: xingxiaoming5719@126.com.

责任作者:林夏珍(1965-),女,博士,教授,现主要从事园林植物栽培与应用研究工作。E-mail: linxz100@souhu.com.

收稿日期:2013-01-25

Study on the Callus Induction from *Epimedium koreanum* Nakai

WANG Jing, LI Jing, JIA Ling-yun, ZENG Wen-wen, LIU Peng-peng, LU Jin-cai

(School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016)

Abstract: Taking the young leaf, stem apex and petiolesuitable of *Epimedium koreanum* Nakai as explants, the condition of its callus induction was studied, in order to provide scientific basis for large scale production of tissue culture. The results showed that the stem apex was the best production material of tissue culture. The optimum medium for callus induction was MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L. In the temperature of 25℃, the induction effect was good under the cultured conditions of dark, and taken out, then cultured in the light intensity 2 000 lx.

Key words: *Epimedium koreanum* Nakai; callus; induction