

濒危植物珠子参愈伤组织诱导因素分析

李利霞, 李婷婷, 朱虹, 孙长生, 刘雪兰, 赵厚涛

(贵阳药用植物园, 贵州 贵阳 550002)

摘要:以珠子参节、节间和越冬芽萌发后的叶、根为试材,研究了不同消毒方法、外植体、植物生长调节剂及培养条件等对珠子参愈伤组织诱导的影响,以期获得愈伤组织诱导的最佳方法。结果表明:最佳消毒方法是75%酒精消毒15 s后,越冬芽、节和节间分别加0.2%氯化汞消毒5、15、15 min;节间为愈伤组织诱导最适宜外植体;2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L对节间诱导愈伤组织效果最好,诱导率为96.67%;以MS为基础培养基添加浓度为5 g/L的琼脂较适宜愈伤组织的诱导;温度25℃、光周期24 h/d、光照强度6 200 lx的条件有利于愈伤组织的诱导。

关键词:珠子参;组织培养;愈伤组织

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0085-04

珠子参(*Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng)属五加科人参属植物,为1977年起历版《中华人民共和国药典》收录药材珠子参的基源植物之一。其根茎有较高的药用价值^[1],叶可作“参叶”使用,具有清热、消炎、镇静及镇痛等功效^[2]。现代研究表明珠子参的主要化学成分为多种皂苷类^[3];药理方面具有抗肿瘤^[4]、保护心脑血管系统^[5-6]、抗炎镇痛^[7]、抗疲劳等活性^[8]。

商品珠子参主要源自野生资源,但其野生资源已难以满足市场需求。此前对珠子参的研究主要集中在化学成分、药理活性和资源分布方面,对其组织培养方面的研究较少。现通过筛选不同的消毒方法、外植体、植物生长调节剂及培养条件等对珠子参愈伤组织诱导进行了详细的研究,以期获得优质的珠子参愈伤组织,为利用植物细胞培养技术生产次生代谢产物和建立高频率植株再生体系研究提供一定的技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试珠子参引自云南省丽江市三朵阁镇高山植物园。

第一作者简介:李利霞(1983-),女,硕士,助理研究员,现主要从事药用植物资源利用与种子种苗繁育和悬浮细胞培养等研究工作。E-mail:silktreedream@126.com.

基金项目:贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(ZY字[2012]3005号);贵阳市科技计划资助项目(2012HK-209-37)。

收稿日期:2015-07-27

1.2 试验方法

1.2.1 不同消毒方法的效果比较 将珠子参越冬芽、节(根茎珠状膨大部位)和节间(节与节之间细长的部分),用洗洁精浸泡15 min,清水冲洗干净。材料置于超净工作台上用75%酒精和0.2%氯化汞不同的组合处理后,无菌水冲洗5~6遍。将节间切割成1 cm长的小段,节削去表皮,切成小块,芽剥去芽被,接种到MS空白培养基,每个处理30个材料,温度(25±1)℃,暗培养10 d后统计污染率。

1.2.2 不同外植体和植物生长调节剂对珠子参愈伤组织诱导的影响 将空白培养后的节、节间及越冬芽萌发形成无菌苗的叶和须根分割后,接种到诱导愈伤组织的培养基上,每个处理重复30个外植体,温度(25±1)℃、光照强度约4 000 lx、光周期12 h/d,培养30 d统计诱导率。

表1 诱导愈伤组织培养基

Table 1 Callus inducing medium

处理 Treatment	基础培养基 Basic medium	浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹) 2,4-D KT
CK	MS	0 0
1	MS	1.0 0.1
2	MS	1.0 1.0
3	MS	2.0 0.1
4	MS	2.0 1.0
5	MS	3.0 0.1
6	MS	3.0 1.0
7	MS	1.0 0
8	MS	2.0 0
9	MS	3.0 0
10	MS	4.0 0
11	MS	5.0 0

1.2.3 不同培养条件对珠子参愈伤组织诱导的影响

选取空白培养 10 d 未污染的节间,转入植物生长调节剂为 2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L 的诱导培养基中,研究不同基础培养基、琼脂浓度和光照强度对愈伤组织诱导的影响。每个处理接种 21 瓶,温度(25±1)℃、光周期 12 h/d。将节间接入选出的培养基,置于不同温度和光周期的人工气候箱(光照强度约 2 500 lx)中培养,研究不同温度和光周期对珠子参愈伤组织诱导的影响。诱导率(%)=(形成愈伤组织的外植体数/(接种的外植体数-污染外植体数))×100,污染率(%)=(污染瓶数/接种瓶数)×100。

表 2 $L_9(3^3)$ 正交实验的因素与水平Table 2 Factor and level of orthogonal experiment $L_9(3^3)$

水平 Level	因素 Factor		
	A 培养基类型 Medium type	B 琼脂浓度 Agar concentration/(g·L ⁻¹)	C 光照强度 Light intensity/lx
1	MS	5	2 400
2	1/2MS	7	4 000
3	B5	9	6 200

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 和 SPSS 16.0 软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 不同的消毒方法的效果

由表 3 可知,0.2%氯化汞在珠子参外植体消毒过程中起主要作用,消毒时间越长,消毒效果越好;氯化汞消毒之前先用 75%酒精消毒 15 s 可以稍微改善消毒效果。3 种外植体均采自地下,带有大量泥沙,污染率比较高,节间由于表面比较光滑,较易消毒,污染率最低为 13.33%,而节的表面粗糙,消毒困难,污染率较高。越冬芽幼嫩为避免外植体死亡,应选择较短的消毒时间。综上所述,最佳消毒方法是 75%酒精消毒 15 s 后,越冬芽、节和节间分别加 0.2%氯化汞消毒 5、15、15 min。

表 3 不同消毒处理对外植体的影响

Table 3 Effect of different disinfection treatment on explants

外植体 Explant	消毒时间 Disinfection time		接种数 Inoculation number /个	污染率 Contamination rate /%
	75%酒精/s	0.2% HgCl ₂ /min		
越冬芽 Winter bud	0	5	30	40.00
	15	5	30	33.33
	0	5	30	73.33
节 Knob	0	10	30	36.67
	0	15	30	26.67
	15	5	30	70.00
	15	10	30	33.33
	15	15	30	23.33
	0	5	30	66.67
节间 Internode	0	10	30	26.67
	0	15	30	16.67
	15	5	30	50.00
	15	10	30	23.33
	15	15	30	13.33
	0	5	30	66.67

2.2 不同外植体和植物生长调节剂对珠子参愈伤组织诱导的影响

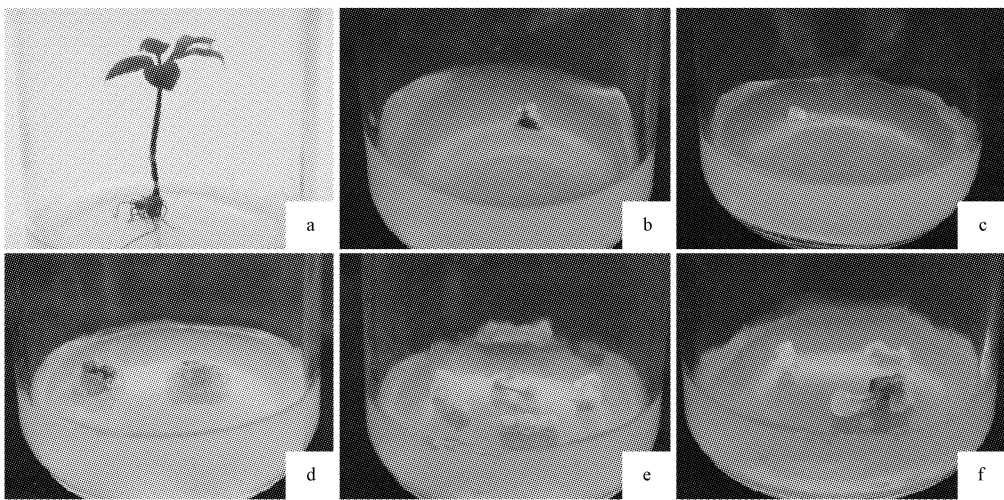
由表 4 可知,珠子参的不同外植体都不同程度的诱导出了愈伤组织,诱导率最高达到了 90%以上。不同外植体所需的植物生长调节剂的配比是不同的。因为节间诱导率最高,且全年都可取材,消毒方便,所以节间是珠子参愈伤组织诱导的最适宜外植体。

从表 4 还可以看出,2,4-D 在珠子参愈伤组织诱导过程中起了主要的作用,KT 起了辅助促进作用。外植体在没有添加 2,4-D 的培养基上会褐化死亡;在只添加 2,4-D 的培养基上也可以诱导出愈伤组织,只是诱导率稍低,愈伤组织长势稍差;在同时添加 2,4-D 和 KT 的培养基上,愈伤组织诱导效果最好。

表 4 不同外植体愈伤组织形成情况

Table 4 Different explants callus formation

外植体 Explant	处理 Treatment	接种数 Inoculation number/个	诱导率 Induction rate/%	愈伤组织描述 Callus description
叶片 Leaf	0	30	0.00	死亡
	1	30	76.67	块较小、松软、淡绿
	2	30	90.00	块较大、松软、淡绿
	3	30	83.33	块大、松软、淡绿
	4	30	76.67	块较大、松软、淡绿
	5	30	76.67	块较大、松软、淡绿
根 Root	6	30	86.67	块较小、松软、淡绿
	0	30	0.00	死亡
	1	30	60.00	块较大、松软、白色
	2	30	66.67	块较大、松软、白色
	3	30	66.67	块较大、松软、白色
	4	30	86.67	块较大、松软、白色
节间 Internode	5	30	90.00	块较大、松软、白色
	6	30	86.67	块较大、松软、白色
	0	30	0.00	死亡
	1	30	83.33	块较大、松软、黄白色
	2	30	80.00	块较大、松软、黄白色
	3	30	96.67	块大、松软、黄白色
节 Knob	4	30	80.00	块较大、松软、黄白色
	5	30	83.33	块较大、松软、黄白色
	6	30	90.00	块较大、松软、黄白色
	7	30	83.33	块较大、松软、黄白色
	8	30	90.00	块较大、松软、黄白色
	9	30	93.33	块较大、松软、黄白色
节间 Internode	0	30	0.00	死亡
	1	30	76.67	块较小、松软、黄白色
	2	30	83.33	块较小、松软、黄白色
	3	30	70.00	块较小、松软、黄白色
	4	30	66.67	块较小、松软、黄白色
	5	30	93.33	块较大、松软、黄白色
节 Knob	6	30	83.33	块较小、松软、黄白色
	7	30	90.00	块较大、质硬、黄白色
	8	30	73.33	块较大、松软、黄白色
	9	30	76.67	块较大、松软、黄白色
	10	30	83.33	块较大、松软、黄白色
	11	30	80.00	块较大、松软、黄白色



注:a.越冬芽萌发生成的珠子参无菌幼苗;b.叶片;c.根;d.节;e、f.节间。
Note:a. The overwintering buds germinated plants of *Panax japonicus* var. *major*; b. Leaf; c. Root; d. Knob; e, f. Internode.

图 1 珠子参不同外植体诱导出的愈伤组织

Fig. 1 Callus induced from different explants of *Panax japonicus* var. *major*

2.3 不同培养条件对珠子参愈伤组织诱导的影响

由表 5 可知,培养基类型、琼脂浓度和光照强度对珠子参愈伤组织诱导均有影响,但仅仅简单比较百分率不能准确确定影响珠子参愈伤组织诱导的各因素的主次顺序。表 6 结果表明,C 的极差最大,A 次之,B 最小。因此,参试的 3 个因素对珠子参愈伤组织诱导的主次关系为 C>A>B,即光照强度>培养基类型>琼脂浓度。分析 3 个因素各水平间差异的显著性,由表 7 可知,3 个因素的 F 值均小于 $F_{0.05}$,说明差异不显著,因三者的自由度相同,由 F 值确定其主次关系为 C>A>B。根据表 6 中各因素的平均值可以看出,培养基类型 A1 水平为最好,琼脂浓度 B1 水平为最好,光照强度 C3 水平为最好。所以 3 个因素的理论最佳组合是 A1B1C3,即MS+5 g/L 琼脂浓度+6 200 lx 光照强度。

表 5 珠子参诱导愈伤的 $L_9(3^3)$ 实验结果

Table 5 The results of callus induction of *Panax japonicus* var. *major* in orthogonal test $L_9(3^3)$

试验号 Test No.	因素 Factor			接种数 Inoculated number/个	出愈时间 Callus formation time/d	诱导率 Induction rate/%	综合表现 Comprehensive performance
	A	B	C				
1	1	1	1	21	6	80.00	++++
2	1	2	2	21	8	70.00	++++
3	1	3	3	21	11	85.00	++++
4	2	1	3	21	6	78.95	++++
5	2	2	1	21	6	66.67	++
6	2	3	2	21	9	66.67	++
7	3	1	2	21	9	70.59	++
8	3	2	3	21	9	78.95	+
9	3	3	1	21	7	38.46	+

注:“+”越多表示生长情况越好,下同。

Note:The more ‘+’ indicate the better of the growth situation, the same below.

表 6 珠子参愈伤组织诱导的直观分析

Table 6 Audio-visual analysis for callus induction rate of *Panax japonicus* var. *major*

因素和 Total of the factors	A	B	C	平均值 Average value	A	B	C
K1	235.00	229.54	185.13	x_1	78.33	76.51	61.71
K2	212.28	215.61	207.26	x_2	70.76	71.87	69.09
K3	188.00	190.13	242.89	x_3	62.67	63.38	80.96
R	47.00	39.41	57.77	R'	15.67	13.14	19.26

表 7 珠子参愈伤组织诱导率方差分析

Table 7 Variance analysis for callus induction rate of *Panax japonicus* var. *major*

因素 Factor	偏差平方和 Variance	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	$F_{0.05(2,2)}$
培养基类型 Medium type	368.305	2	1.234	19.00
琼脂浓度 Agar concentration	266.295	2	0.892	
灯管数 Fluorescent lamp number	566.369	2	1.898	
误差 Error	298.424	2		

由表 8 可知,30℃时节间出愈时间晚,只有个别可以产生愈伤组织,诱导率仅为 14.29%;20℃时诱导率较高,

表 8 不同温度、光周期对节间诱导愈伤组织的影响

Table 8 Effect of different temperature and photoperiod on callus induction of internode

处理 Treatment	温度 Temperature /℃	光周期 Photoperiod /(h·d ⁻¹)	出愈时间 Callus formation time/d	诱导率 Induction rate /%	综合表现 Comprehensive performance
1	20	0	14	90.48	++
2	20	12	15	85.71	++
3	20	24	15	95.24	+++
4	25	0	15	90.48	+++
5	25	12	15	85.71	++++
6	25	24	15	100.00	++++
7	30	0		0.00	
8	30	12		0.00	
9	30	24	24	14.29	+

但产生的愈伤组织的质量一般、生长缓慢,25℃时诱导率和愈伤组织质量俱佳,故珠子参愈伤组织诱导的最佳温度为25℃。光周期为24 h/d时,诱导率为100.00%,且诱导出的愈伤组织的质量最好。

3 讨论

珠子参是少数民族传统用药,疗效确切,近年来药理研究证明珠子参具有广泛的药理活性。目前,珠子参资源难以满足需求,开展组织培养研究是今后维持珠子参商品供应和进行深入研究的有效途径。

该研究以珠子参的叶、根、节和节间为外植体诱导愈伤组织,几种外植体都比较容易诱导出愈伤组织,节间取材消毒方便且诱导率最高达96.67%,所以节间更适合作为外植体诱导愈伤组织。外植体的获取方式对愈伤组织的诱导有很大影响。张昱^[9]以叶为外植体没有诱导出愈伤组织;柴瑞娟等^[10]以叶为外植体,诱导率也仅有6.7%;该试验以叶为外植体,诱导率达到了90%。该试验通过从越冬芽萌发生成的无菌植株上获取叶片,避免了消毒过程对叶片的损伤,且叶片幼嫩,所以叶片保持了较高的再生能力。该试验首次以根为外植体诱导出了愈伤组织,诱导率也达到了90%。

该试验结果表明,2,4-D在珠子参愈伤组织诱导过程中起了主要的作用,KT起了辅助促进作用。不同的外植体需要2,4-D和KT的浓度略有不同;柴瑞娟等^[10]使用的愈伤组织诱导培养基为MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L;张昱^[9]优选出的培养基为MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA

1.0 mg/L。可见2,4-D在珠子参愈伤组织诱导过程中是必不可少的,其它激素的不同可能与试验材料不同有关。

该试验对适合珠子参愈伤组织诱导的培养条件和培养基类型进行了比较详细的研究,结果表明,以MS为基础培养基添加浓度为5 g/L的琼脂,在温度为25℃、光周期为24 h/d、光照强度为6 200 lx的条件下培养有利于愈伤组织的诱导。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医学科技出版社,2010:254-255.
- [2] 宋小妹,冯改利,李渊源,等. HPLC法测定汉中参叶中人参皂苷Rd的含量[J]. 中国民族民间医药,2010(18):33-34.
- [3] 赵仁,赵毅,李东明,等. 珠子参研究进展[J]. 中国现代中药,2008,10(7):3-6.
- [4] 陈涛,陈茂华,胡月琴,等. 珠子参多糖抗肝癌作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(6):1329-1331.
- [5] 金家红,贺海波,石孟琼,等. 珠子参总皂苷对小鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 第三军医大学学报,2011,33(24):2631-2633.
- [6] 贺海波,石孟琼,罗涛,等. 珠子参总皂苷减弱炎症应答和对H₂O₂诱导新生大鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):50-54.
- [7] 贺海波,石孟琼,陈涛,等. 珠子参水提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2010,32(20):2224-2227.
- [8] 考玉萍,姜伟,宋小妹. 珠子参叶总皂苷抗疲劳抗应激作用的实验研究[J]. 陕西中医,2008,29(8):1092-1093.
- [9] 张昱. 珠子参细胞系功效成分研究:兼论EST-SSR分子标记和ITS测序研究[D]. 昆明:云南大学,2010.
- [10] 柴瑞娟,王玉良,努尔巴依·阿不都沙勒克,等. 激光对珠子参愈伤组织诱导影响的研究[J]. 激光生物学报,2008,17(6):739-742.

Different Factors on Callus Induction of *Panax japonicus* var. *major*

LI Lixia, LI Tingting, ZHU Hong, SUN Changsheng, LIU Xuelan, ZHAO Houtao
(Guiyang Medicinal Botanical Garden, Guiyang, Guizhou 550002)

Abstract: Taking knobs, internode and leaves, roots of winter buds of *Panax japonicus* var. *major* as experiment material, the effects of different disinfection method, explants, plant growth regulator and culture conditions on callus induction were studied to find the best method of callus induction. The results showed that the better disinfection treatment was 15 seconds with 75% C₂H₅OH, then 5 minutes with 0.2% HgCl₂ for winter bud, but 15 minutes for knobs and internode. The internode was the best explant for callus induction. The induction rate 96.67% was the highest with 2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L for internode. The MS medium with agar 5 g/L was suitable for induction of callus. Condition of the temperature 25℃, the photoperiod of 24 h/d and the light intensity of 6 200 lx was beneficial for callus induction.

Keywords: *Panax japonicus* var. *major*; tissue culture; callus