

五味子愈伤组织培养及醇甲含量分析

刘铁冬, 许大为, 高宇, 庞颖, 朱磊, 吴妍

(东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以五味子叶片和茎段作为外植体进行愈伤组织的诱导,对愈伤组织诱导的影响因素、愈伤组织发育特征以及愈伤组织形成过程中五味子醇甲的积累情况进行研究。结果表明: B_5 培养基比MS培养基更利于愈伤组织的诱导。根据愈伤组织的发育状态特征可以将其分为4类,其中颜色微黄、质地疏松的C类愈伤组织中所积累的五味子醇甲含量最高。添加1.0 mg/L BA、0.2 mg/L NAA和0.1 mg/L KT的 B_5 培养基上较易诱导出C类愈伤组织,其五味子醇甲含量最高达到4.28 mg/g FW。该研究的初步结果对通过愈伤组织悬浮培养生产五味子素的进一步研究奠定了重要基础。

关键词:五味子;愈伤组织;形态特征;五味子醇甲

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0191-03

五味子(*Schisandrae chinensis*)是我国重要的珍贵药材,其果皮及成熟种皮富含木脂素,包括五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲和五味子酯乙等,其中五味子甲素对心血管系统、中枢神经系统、消化系统、呼吸系统的疾病治疗均有良好的效果^[1]。药理试验表

明,五味子能够调节中枢神经系统的兴奋和抑制过程,能够促进肌体代谢、调节胃液和胆汁分泌,对肝炎恢复期患者转氨酶的降低有着明显的功效。五味子作为中成药工业的原料,具有重要的经济价值^[2-3]。近十年来,对五味子的不合理开发使得野生五味子遭到了严重破坏,其产量和质量逐年下降;加之林业资源的开发、毁林开荒等因素,野生五味子的生境遭到了严重的破坏,资源日益枯竭。野生五味子资源的日渐匮乏及其生态系统的破坏,不仅使其经济利用遭到严重阻碍,而且引发了一系列的环境问题。由此,合理、有效开发

第一作者简介:刘铁冬(1978-),男,博士,讲师,研究方向为园林资源与遥感应用。E-mail:tiedongliu@163.com;88298380@qq.com。

基金项目:黑龙江省教育厅指导资助项目(12513028)。

收稿日期:2011-07-05

刺80~100个孔,深1.5 cm。

4 菌袋越夏

越夏宜选用通风、凉爽的场所,高海拔地区在阴坡的室内或室外荫棚中越夏,低海拔地区可在窑洞、果库,或在河滩林下越夏,越夏期间要及时作好降温工作,同时要严防菌袋失水过干。室外越夏的应采用2层或3层荫棚,四周遮阳,遮阳网密度应在80%以上,菌袋在棚上架中相距10 cm排放。窑洞、果库越夏的菌袋不能放置过深,一般应在18 m以内,菌袋“井”字形堆放,高不超过3~4层,层间用玉米秆相隔,以利通风散热,不得起大堆,越夏期间不宜翻动菌袋。

5 出菇管理

进入10月份,香菇菌袋就可进棚催蕾。催蕾前要浸水,使菌袋含水量达到55%~60%。催蕾一般在菇棚内进行,菇棚结构为长8 m,宽2.5 m,高2.2 m,中间走道宽70 cm,两侧层架宽90 cm,每架5层,层间距30 cm,建棚同时砌好回龙式增温火道。出菇后及时割膜、控温保湿、拉大温差,进行出菇管理。根据当地条件,一般10月1日前后进棚出菇,10月5~20日出第

1茬菇,11月10日至12月1日前后出第2茬菇,翌年2月15日至3月5日出第3茬菇,3月10日至4月1日出第4茬菇。香菇长至八成熟采收,及时鲜销或机械烘干。如因进棚较晚,11月份之前仅出1茬菇,需12月份继续出菇的,应人工增温,并按三阶育花法培育花菇,用暗火增温方法,严格控制菇棚小气候,采取增光、加温、排湿和拉大温差等措施,培育优质花菇。此时气温低,菇棚无需遮阳,进行全光育花。

每茬菇采收后,先养菌后浸水催菇,为提高菌袋质量及产菇量,宜降低养菌温度,适当延长养菌时间。养菌温度18~22℃,暗光通风,时间12~15 d,至菌脚穴位发出的菌丝略见倒伏时为妥,然后浸水催蕾,进行第2茬菇管理。

6 废料利用

栽培香菇的废料晒干后可作为生产平菇、杏鲍菇的原料,栽培平菇的配方为香菇废料80%,麸皮15%,石膏2%,石灰3%,生物学转化率可达100%左右,栽培成本低,投入产出比可达1:9。栽培杏鲍菇的配方为香菇废料58%,玉米芯20%,麸皮18%,石膏2%,石灰2%,生物学转化率可达55%左右,投入产出比1:2.6。

五味子资源又能够确保其野生生境免遭生态破坏,成了亟待解决的问题。加强早期基础研究,积极探索五味子资源的合理利用途径,对保护五味子野生资源及其药用价值的持续开发十分必要。该试验对五味子愈伤组织诱导的影响因素、愈伤组织发育特征以及愈伤组织五味子醇甲积累之间的关系进行了研究,为植物次生代谢细胞工程开发五味子药用资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

五味子(*Schisandrae chinensis*)果实采自黑龙江省尚志市,干燥后保存。

1.2 试验方法

将果实浸泡 72 h 使果肉软化,去掉果肉取种子,流水洗净后,用 10% H_2O_2 灭菌 10 min,于超净台上以无菌水冲洗 3~5 次至净、备用。将种子以纵切,小心取下种胚,接种在不添加植物生长调节剂的 MS 培养基上。2 周后,将无菌苗茎段和叶片作为外植体进行愈伤组织诱导。愈伤组织诱导培养基,以 MS、 B_5 为基本培养基,添加激素为 BA(0.1、1.0 mg/L)、NAA(0.1、0.2 mg/L)和 KT(0.1、0.2 mg/L)的不同组合,

表 1 不同培养基上不同来源外植体的愈伤组织诱导情况

培养基种类	激素			茎段		叶片	
	6-BA	NAA	KT	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织平均干重/ $g \cdot cm^{-3}$	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织平均干重/ $g \cdot cm^{-3}$
MS	0.1	0.1	0.1	12.8±0.1	0.3±0.1	10.0±0.8	0.5±0.1
	0.1	0.1	0.2	13.6±0.2	0.5±0.1	16.7±0.9	0.6±0.1
	0.1	0.2	0.1	22.3±0.1	0.2±0.1	17.8±0.2	0.6±0.2
	0.1	0.2	0.2	25.3±0.3	0.3±0.1	18.8±0.6	0.8±0.3
	1.0	0.1	0.1	33.3±0.3	0.8±0.2	26.3±0.8	0.9±0.2
	1.0	0.1	0.2	28.3±0.3	1.2±0.2	23.3±0.2	1.2±0.3
	1.0	0.2	0.1	22.8±0.2	0.9±0.2	18.8±0.3	1.2±0.3
	1.0	0.2	0.2	18.3±0.3	0.6±0.1	16.8±0.3	1.3±0.3
B_5	0.1	0.1	0.1	6.6±0.3	0.3±0.1	3.6±0.2	0.2±0.1
	0.1	0.1	0.2	8.6±0.5	0.3±0.1	5.8±0.1	0.3±0.1
	0.1	0.2	0.1	18.1±0.3	0.3±0.1	6.8±0.1	0.5±0.1
	0.1	0.2	0.2	23.5±0.6	0.6±0.1	8.8±0.2	0.8±0.1
	1.0	0.1	0.1	33.5±0.9	0.6±0.1	10.0±0.8	0.8±0.1
	1.0	0.1	0.2	36.8±1.2	2.6±0.3	12.3±0.9	0.8±0.1
	1.0	0.2	0.1	80.6±1.8	3.8±0.2	18.3±0.2	1.5±0.1
	1.0	0.2	0.2	58.8±1.2	2.3±0.1	16.3±0.1	1.2±0.1

在表 1 培养基中,子叶和下胚轴产生的愈伤组织发育形态各异,主要可分为 4 种类型(表 2),其发育特征的差异不仅取决于培养基,也取决于外植体类型。

表 2 根据发育状态对五味子愈伤组织进行分类情况

愈伤组织类型	发育状态	愈伤组织来源
A	淡黄、疏松、水渍状	MS 培养基上的叶片
B	白色、毛状、疏松	MS 培养基上的茎段
C	黄色、疏松、颗粒状	B_5 培养基上的茎段
D	褐色、致密、颗粒状	B_5 培养基上的叶片

pH 5.8,琼脂浓度为 6.5 g/L。培养温度为 25℃,光照强度为 3 000 lx。当外植体在培养基中诱导 30 d 后,将诱导出的愈伤组织剥离下来测定五味子醇甲含量。

1.3 测定方法

五味子醇甲采用甲醇梯度萃取及回流法进行分离。采用紫外分光光度^[4]对不同来源的愈伤组织内五味子醇甲的积累情况进行测定分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织形成及发育形态特征

当外植体接种在诱导培养基上 1 周后,可见一些外植体在切口处膨大,开始形成愈伤组织。所有培养基上均有愈伤组织产生,但是不同的培养基和不同的激素组合所产生的诱导效果差异显著($P<0.05$)。由表 1 可以看出, B_5 培养基的诱导效果明显优于 MS 培养基。不同激素组合对形成的愈伤组织生长的影响和外植体来源密切相关,茎段的愈伤组织增生能力比叶片要强。在 $B_5+1.0$ mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L KT 的培养基上,愈伤组织诱导率达到 80.6%,其平均干重也达到 3.8 g/cm³。

2.2 愈伤组织五味子醇甲含量分析

从图 1 可看出,不同基本培养基中诱导出的愈伤组织积累五味子醇甲的能力差异显著。MS 和 B_5 培养基上均以茎段外植体产生的愈伤组织五味子醇甲含量较高,而 B_5 培养基上茎段外植体诱导的愈伤组织五味子醇甲含量最高。

从图 2 可看出,不同形态发育特征的愈伤组织积累五味子醇甲的能力各不相同,黄色、疏松、颗粒状的 C 型愈伤组织中,五味子醇甲含量显著高于其它类型的愈伤组织。

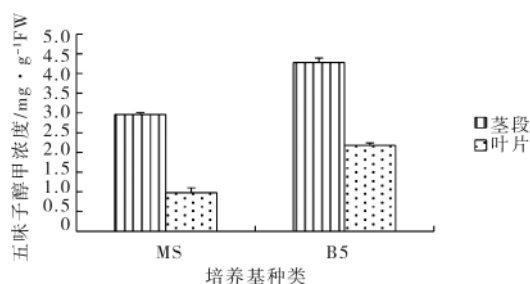


图1 不同培养基对五味子醇甲含量的影响

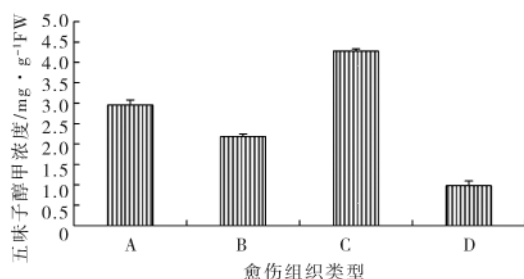


图2 不同类型愈伤组织内五味子醇甲积累情况

3 讨论与结论

愈伤组织诱导频率和形成的愈伤组织发育状态随着培养基及激素组合的不同而不同,并且与外植体的类型紧密相关,这是植物愈伤组织诱导中存在的普遍现象^[5]。五味子愈伤组织中五味子醇甲的积累受诱导培养基种类与激素组合以及外植体来源的影响。不同的激素浓度组合可以调节细胞的次生代谢而影响目的组分的合成。一般情况下低浓度生长素有利于次生物质的合成,高浓度生长素抑制次生代谢^[6]。在五味子愈伤组织形成过程中,较高浓度的BA和较低浓度的NAA以及低浓度KT的配合使用起到了很好的诱导效果,这与前人的研究结果有着一定的相似性。

在五味子的4种类型的愈伤组织中,因发育状态

的不同而具有不同的五味子醇甲合成能力,表明植物细胞次生物质合成受到细胞分化程度不同的调节。不同培养条件下,由于细胞分化水平的不同而表现出不同的发育特征必然与不同分化程度的细胞内代谢差异相关,有可能涉及到次生代谢途径,改变次生物质的合成。五味子不同状态愈伤组织积累五味子醇甲数量的不同,可能与愈伤组织细胞发育阶段不同而产生的代谢差异有关。

该研究结果初步证明,选择五味子无菌苗的茎段作为外植体,在配合使用BA、NAA和KT的B₅培养基上进行培养,能够产生黄色、疏松颗粒状的愈伤组织,为开展后续的细胞液体悬浮培养大规模诱导五味子醇甲的研究提供了必要条件。

参考文献

- [1] Hung T M, Na M K, Min B S, et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Effect of Lignans Isolated from *Schizandra chinensis*[J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(6): 685-690.
- [2] Ko K M, Lam B Y H. Schisandrin B protects against tert-butylhydroperoxide induced cerebral toxicity by enhancing glutathione antioxidant status in mouse brain[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002, 238: 181-186.
- [3] Chiu P Y, Leung H Y, Poon M K T, et al. Schisandrin B induced antioxidant response is partly mediated by cytochrome P-4502E1 catalyzed reaction in mouse liver[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 293: 87-92.
- [4] Khorassani H S M, Maghsoodlou M T, Ebrahimi A, et al. Kinetics and Mechanism of the Reactions Between Triphenylphosphine, Dialkyl Acetylenedicarboxylates and a NH-Acid, Pyrazole, by UV Spectrophotometry[J]. J Solution Chem, 2007, 36: 1117-1127.
- [5] Luo J P, Jian J F. Callus Induction and Plant Regeneration from Hypocotyls Explants of the Forage Legume *Astragalus adsur2* gens[J]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 567.
- [6] Banthorpe D V. Secondary Metabolism in Plant Tissue Culture: Scope and Limitations[J]. Nat Prod Rep, 1994, 11: 303.

(该文作者还有胡远东、龚文峰,单位同第一作者。)

Analysis of Schizandrol A in *Schisandra chinensis* Callus

LIU Tie-dong, XU Da-wei, GAO Yu, PANG Ying, ZHU Lei, WU Yan, HU Yuan-dong, GONG Wen-feng
(College of Landscape, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Stems and leaf segments of *Schisandra chinensis* were used as explants for callus induction, and the influencing factors, developed characteristics and the accumulation of Schizandrol A for callus induction were studied. The results showed that B₅ medium was effective than MS medium for callus induction. According to the developmentally morphological characters, the formed callus could be classified into four types. C type callus with yellow in color and friability in texture showed the highest accumulation of Schizandrol A. B₅ medium supplemented with 1.0 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA and 0.1 mg/L KT were effective to induced C-type callus. Schizandrol A concentration was up to 4.28 mg/g FW in C-type callus. This results was important for further study on large-scale production of schizandrol A by liquid suspension culture of *Schisandra chinensis*.

Key words: *Schisandra chinensis*; callus; morphological character; schizandrol A