

# 五味子种子萌发与愈伤组织的诱导

张 华<sup>1,2</sup>, 李 姝 睿<sup>1</sup>, 龙 丽 坤<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033; 2 吉林农业大学 生物技术学院, 吉林 长春 130000)

**摘 要:**以五味子种子为外植体,研究了不同种类培养基、不同植物生长调节剂、蔗糖及水解酪蛋白对五味子种子萌发和愈伤组织诱导的影响。结果表明:以 GA 0.1 mg/L、蔗糖 20 g/L、琼脂 5.5 g/L 为基本培养基时,五味子的种子快速大量萌发,此时,五味子的胚轴诱导愈伤组织出愈率最高为 87%,完成愈伤组织的诱导需 35 d 左右。

**关键词:**五味子;组织培养;外植体;愈伤组织

**中图分类号:**S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0164-04

五味子为木兰科多年生左旋落叶木质藤本植物五味子(北五味子)[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]或华中五味子(南五味子)(*Schisandra sphenanthera* Rehd. Et Wils.)的成熟果实。主要分布于东北三省和长江流域<sup>[1]</sup>。五味子为药食两用,主治肺虚喘咳、津亏口渴、自汗盗汗、梦遗滑精、久泻久痢、失眠健忘、心悸怔忡。目前由于人为因素破坏的加剧,野生资源大幅度减少<sup>[2]</sup>,已远远不能满足中药材市场、制药和加工企业日益增长的需求<sup>[3]</sup>。而五味子的人工繁殖主要是以种子进行有性繁殖,但种子繁殖较困难且优良性状无法控制,有些甚至丢失。通过组织培养的方法具有不污染环境,可节省土地,降低成本,缩短生产周期等不受自然条件限制的优点。也可培育出具有优良性状的北五味子新品种。

该试验针对其培养基的各方面影响因素,找出较为合适的培养基配比。选取五味子各个部位器官诱导愈伤组织,为今后用愈伤组织分化茎叶体,使优良品系得到保留和繁育。进一步实现基因改良品种做准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用五味子种子由吉林农业大学生物技术实验

表 1 正交实验因素及水平

因素 Factor	1	2	3	4
A 培养基种类 Medium	MS	1/2MS	B <sub>5</sub>	1/2B <sub>5</sub>
B GA 浓度 Content of GA/mg · L <sup>-1</sup>	0	0.1	0.2	0.4
C 蔗糖浓度 Content of sugar/g · L <sup>-1</sup>	20	30	40	50
D 水解酪蛋白浓度 Content of casein hydrolysate/mg · L <sup>-1</sup>	0	1	2	4

**第一作者简介:**张华(1983-),女,硕士,助理研究员,现主要从事植物组织培养技术研究工作。

**责任作者:**龙丽坤(1976-),女,博士,副研究员,研究方向为植物学。

**基金项目:**吉林省农业科学院引进人才启动基金资助项目。

**收稿日期:**2012-09-17

室提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 种子预处理** 选取优质的北五味子种子<sup>[6]</sup>,用自来水冲洗,挑选颗粒饱满的种子,再用 50% 盐酸浸泡 5 min。然后将种子去皮后移至超净工作台上,先用 70% 的酒精浸泡 3~5 min,再用 0.1% 升汞浸泡 15~20 min,之后用无菌水冲洗 3~5 次,用无菌滤纸吸干水分。然后接种到培养基上培养<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 种子萌发条件的优化** A. 培养基中琼脂的含量:在培养基种类、蔗糖含量不变的条件下,每个培养瓶 6 个种子,每个处理 4 瓶,以 MS 培养基+15 g/L 蔗糖+琼脂 3.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 9.0 g/L<sup>[8]</sup>。B. 其它营养调节因子的优化:设置培养基种类、GA 浓度、蔗糖浓度、水解酪蛋白浓度 4 个因素<sup>[11-12]</sup>,每个因素设置 4 种水平,共有 16 种处理(表 1)。利用正交表<sup>[9-10]</sup>进行 4 因素 4 水平 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>)正交设计(表 2),每个培养皿 15 个种子,每个处理 5 个培养皿。

**1.2.3 愈伤组织的诱导** A. 不同外植体的差别:五味子无菌苗的胚根、胚芽、胚轴、子叶及灭菌的种子、叶片和茎段为外植体<sup>[13-14]</sup>,子叶以横向切成 1 mm 宽的小条,

胚根、胚芽、胚轴、种子、叶片和茎段切成 2~4 mm 长的小段,接到愈伤组织诱导培养基上,每种外植体处理 5 个。B. 培养基中 2,4-D 的浓度:在其它培养条件不变的情况下,每个培养瓶 6 个外植体,每个处理 5 个,作如下培养:MS 培养基+2,4-D 1.0、1.5、2.0、2.5 和 4.0 mg/L。光周期为 16 h,光照强度 1 000~2 000 lx,昼夜温度为

25℃/18℃,种子暗培养 10 d,光照 10 d;愈伤组织暗培养 15 d,光照 10 d<sup>[4-5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子萌发条件的优化

当培养基加入不同浓度的琼脂后,培养基的状态是不同的,对种子的萌发率影响也是不同的。琼脂浓度 3.0 g/L 时,培养基的状态是在玻璃皿内不能固定,呈流体状;浓度 5.0 g/L 时,培养基的状态基本固定;浓度 7.0 g/L 时,培养基的状态完全固定,弹性适中;浓度 9.0 g/L 时,培养基状态的弹性减少,比较坚硬。由图 1 可知,以琼脂浓度为 5.5 g/L 和 5.0 g/L 的培养基为最好,发芽率均为 22.5%,但 5.5 g/L 琼脂浓度的培养基种苗长势没有浓度为 5.5 g/L 时好。

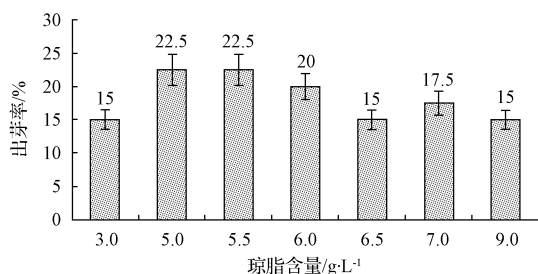


图 1 培养基中琼脂含量对种子萌发的影响

表 2 正交实验结果

设计	培养基种类(A)	GA 浓度(B)	蔗糖浓度(C)	水解酪蛋白浓度(D)	空白(E)	发芽率
Design	1	2	3	4	5	Germination rate/%
1	MS	0	20	0	1	6.67
2	MS	0.1	30	1	2	46.67
3	MS	0.2	40	2	3	26.67
4	MS	0.4	50	4	4	6.67
5	1/2MS	0	30	2	4	0.00
6	1/2MS	0.1	20	4	3	53.33
7	1/2MS	0.2	50	0	2	13.33
8	1/2MS	0.4	40	1	1	13.33
9	B <sub>6</sub>	0	40	4	2	0.00
10	B <sub>6</sub>	0.1	50	2	1	26.67
11	B <sub>6</sub>	0.2	20	1	4	66.67
12	B <sub>6</sub>	0.4	30	0	3	33.33
13	1/2B <sub>6</sub>	0	50	1	3	0.00
14	1/2B <sub>6</sub>	0.1	40	0	4	33.33
15	1/2B <sub>6</sub>	0.2	30	4	1	46.6
16	1/2B <sub>6</sub>	0.4	20	2	2	33.33
T <sub>1</sub>	0.8667	0.0667	1.6000	0.8667	0.9333	T=4.0667
T <sub>2</sub>	0.8000	1.6000	1.2667	1.2667	0.9333	S <sub>T</sub> =0.6508
T <sub>3</sub>	1.2667	1.5333	0.7333	0.8667	1.1333	
T <sub>4</sub>	1.1333	0.8667	0.4667	1.0667	1.0667	
极差 Range	0.4667	1.5333	1.1333	0.4000	0.2000	
S	0.0364	0.3831	0.1964	0.0275	0.0075	

利用正交表选用 4 因素 4 水平的 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)的设计,设置培养基种类、GA 浓度、蔗糖浓度、水解酪蛋白浓度 4 个因素,每个因素设置 4 种水平,共有 16 种处理。筛选最优培养基,试验结果表明,在 16 个处理中,以处理 11

的种子萌发率最高为 66.67%。经极差分析得出,在 4 个影响因素中,以 GA 的浓度影响效果最大,其次为蔗糖的浓度,之后为培养基种类的影响,最后为水解酪蛋白浓度的影响。GA 浓度的影响是极显著性,蔗糖含量的影响次之;而培养基的种类和水解酪蛋白浓度的影响都不是十分明显。正交实验设计和结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 3 正交实验方差分析

来源	平方和 S	自由度	均方和 MS	F 比	显著性
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F ratio	Significant differences
因素 A	0.0364	3	0.0121	4.8519	
因素 B	0.3831	3	0.1277	51.0741	
因素 C	0.1964	3	0.0655	26.1852	* *
因素 D	0.0275	3	0.0092	3.6667	*
误差 Error	0.0075	3	0.0025		
总和 Total	0.6508	15			

$F_{0.01}(3, 3)=29.5; F_{0.05}(3, 3)=9.12; F_{0.1}(3, 3)=5.39$

### 2.2 愈伤组织的诱导

以 MS 为基本培养基,当培养基加入不同浓度的 2,4-D 后,培养基的状态是不同的,对外植体的出愈率影响也是不同的。浓度 0.5 mg/L 时,愈伤组织的状态基本没有变化,褐化情况较多;浓度 1.0 mg/L 时,愈伤组织的状态是色透明,有水渍化现象,易松散;浓度 2.0 mg/L 时,愈伤组织的状态是淡绿色,质地致密,生长旺盛;浓度 4.0 mg/L 时,愈伤组织的状态是深绿色,质地较为坚硬。由图 2 可知,以 2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 为最好,出愈率为 63%;其次为 1.5 g/L,出愈率为 43%。将嫩茎段暗培养 20 d 后,观察结果,2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 时最优。但与其它常见植物的出愈率相比还有差距。

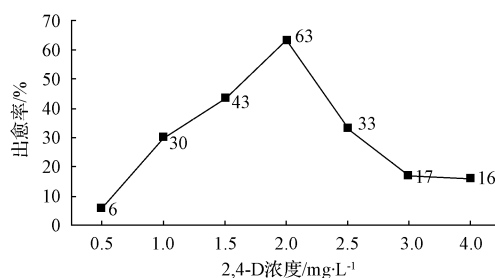


图 2 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

同种植物不同组织的外植体对愈伤组织的诱导有明显的差异。由图 3 可知,在以下 6 种外植体中,诱导效果最好的为胚轴,愈伤组织的状态非常饱满,呈嫩绿色,出愈率为 87%;之后的分别是胚芽和子叶,出愈率分别为 50%、39%,愈伤组织的状态也比较好,但又些有水渍化现象;再次分别为茎段和叶片,出愈率分别为 24%、10%,愈伤组织的状态较为坚硬,颜色也较深,选取的茎段和叶片也必须是幼嫩时期的,如果不是,出愈率就会几乎为 0;而胚根和种子的出愈率为 0,继代培养后没有

什么大的改变。选择合适的外植体对愈伤组织的培养是非常重要的,通过出愈的胚芽、胚轴、子叶与其它没有变化的部分相比,说明植株出生的幼嫩部分比其它成熟部分有更好的分化效果。研究表明,选用优化的培养条件,并以胚轴为外植体,从种子萌发到诱导愈伤组织最快为 35 d。

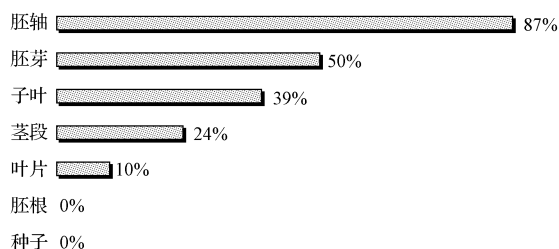


图 3 外植体种类对愈伤组织诱导的影响

### 3 讨论与结论

野生北五味子生长在长白山北坡,喜阴湿环境,观察培养基的状态,浓度为 5.0~7.0 g/L 与五味子的生长习性相似。将种子继代培养 20 d 后,观察表明 5.5 g/L 为最优,较为符合北五味子种子萌发的基质条件。种子萌发培养中,将种子去皮是由于种皮与种子之间可能存在共生菌<sup>[15-16]</sup>,经试验观察菌种类繁杂,包括霉菌、孢子菌等<sup>[17]</sup>。这也是五味子田间栽培出芽率不高的原因之一。观察不去种皮的种子,会有抑菌圈产生。五味子水煮液在体外对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌有抑制作用,五味子水煎液对多种皮肤癣菌有很好的抑菌效果。种子的抑菌圈现象还有待研究。接种 3 d 后,种皮裂开。4~5 d 后生根,根小,易断。15~20 d 后萌发成功。由正交实验可知,GA 0.1 mg/L、蔗糖 20 g/L 培养基为种子萌发最适合培养基。赤霉素浓度的影响远远超过其它因素,说明在种子萌发时期,赤霉素与其它植物生长调节物质交互影响很小。由最优培养基的成分可以看出,此培养基从生产材料成本上算也是经济实惠的。生产材料的成本核算往往被忽视,而现实中,市场经济竞争的关键就是价格的竞争,该试验中最佳培养基在成本核算上也更优于其它,使之更有推向实际大规模生产的价值优势。

2,4-D 的应用浓度比较广泛,在 30 mg/L 以下低浓度时可作为植物生长调节剂,用于防止番茄、棉、菠萝等落花落果及形成无子果实等。在 500 mg/L 以上高浓度时用于茎叶处理,可在麦、稻、玉米、甘蔗等作物田中防除藜、苋等阔叶杂草及萌芽期禾本科杂草<sup>[12]</sup>。将嫩茎段暗培养 20 d 后观察结果表明,2,4-D 2.0 mg/L 时,诱导效果最好。根据试验结果表明,胚根和种子不能产生愈伤组织,而在产生愈伤组织的胚芽、胚轴、子叶、叶片(嫩,第一真叶)和茎段(嫩)中,效果最好的是胚轴及子叶,最

快为 15 d。选择合适的外植体对愈伤组织的培养是非常重要的,通过出愈的胚芽、胚轴、子叶等与其它没有变化的部分相比,说明植株出生的幼嫩部分比其它成熟部分有更好的分化效果。叶片和茎段的出愈率较低也可能是这个原因。通过多年来研究实践证明,建立五味子组织培养高效再生体系不仅可行,而且无论产量质量均较野生高出许多。由于培养基的成分较多,用常规方法很难系统进行研究,并且工作量很大,效果不是很好。利用正交实验法筛选培养基配方,可大大减少试验次数,且效果不错。当然在应用正交实验时,要对各种效应事先有所估计,有时可能会有出入,所以有些正交实验中分析所得的最佳组合在实际供试组合中的表现并不一定是最好的,但仍可以找出较好的组合,因而有一定的应用价值。为此,无性繁殖北五味子是一个市场前景广阔、经济效益高、收益周期长的好项目。同时,五味子组织培养近年刚刚起步,尚未形成规模,产量极少,可开发空间较大,市场仍有上升空间,发展前景十分可观。

### 参考文献

- [1] 梁国经. 长白山区北五味子保护栽培技术的研究[J]. 中国林副特产, 1999(4): 4-6.
- [2] 卫云, 丁辰, 李义林. 药用植物栽培技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1985.
- [3] 王丽薇. 五味子的化学成分研究[J]. 中国现代应用药学, 2006, 23(5): 363-365.
- [4] 周鑫. 五味子的组织培养[J]. 中国林副特产, 2001(4): 6-7.
- [5] 陈雅君, 吴秀菊, 关政华. 药用植物北五味子的组织培养[J]. 植物研究, 1999, 19(3): 318-322.
- [6] 王炎, 赵敏, 愈加林. 北五味子种子休眠特性及内源抑制物质的研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(1): 10-12.
- [7] 谢从华, 柳俊. 植物细胞工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 7-8.
- [8] 郑光华, 史忠礼, 赵同芳, 等. 实用种子生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [9] 王万中. 实验的设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 1-2.
- [10] 茆诗松, 程依明. 概率论与数理统计教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 397-400.
- [11] 张林疆, 刘唯芬, 毕开顺. 五味子质量标准的研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2006, 6(3): 219.
- [12] Magnitskiy S, Pasian C, Bennett M, et al. Early control of seedling growth by treating seeds with growth regulators[J]. Department of Horticulture and Crop Science, 2001: 29-35.
- [13] 李成浩, 牛遇达, 刘桂丰. 胚乳和外源赤霉素对五味子种子发芽的影响[J]. 植物生理学通讯, 2006(8): 625-628.
- [14] Yang Z, Lin Q. Comparative morphology of the leaf epidermis in Schisandra (Schisandraceae) [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2005, 148: 39-56.
- [15] 张君, 王丕武, 武丽敏. 正交实验法在玉米组织培养中的应用[J]. 玉米科学, 2003, 11(1): 101-103.
- [16] 刘志春, 王小丽, 林鹏. 五味子等 29 种中草药的体外抑菌实验[J]. 赣南医学院学报, 2004, 24(5): 509-512.
- [17] 袁胜英. 正交实验法研究五味子的提取工艺[J]. 天津中医学院学报, 2001, 20(1): 45-46.

# 黑果枸杞高效种子育苗技术

苗 增 建

(西宁市蔬菜研究所, 青海 西宁 810016)

**摘 要:**以黑果枸杞种子为试材,研究了基质对其种子发芽及不同移栽方式对幼苗生长的影响。结果表明:应用育苗基质的种子发芽率、发芽势、移栽成活率等要好于土壤。出苗 90~120 d 后幼苗可进行大田定植,如不在此时定植的可在 2 个月进行分苗移栽,有利于幼苗生长,移栽到育苗基质中幼苗的生长情况要好于土壤中。

**关键词:**黑果枸杞;种子育苗;技术

**中图分类号:**S 793.9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)03-0167-02

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)属茄科枸杞属多年生灌木,是我国西北地区特有的多年生耐盐抗旱野生灌木,具有极高的药用、保健价值。是一种集经济效益和盐碱地改良等生态效益于一体的优势树种<sup>[1-2]</sup>。近年来,枸杞已经成为青海省柴达木地区的特色产业<sup>[3]</sup>。该研究对枸杞种子育苗基质及不同的苗期移栽方式进行研究,以期筛选出高效的育苗技术,为枸杞产业发展提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验用枸杞种子采摘于青海省德令哈市枸杞种植园。

### 1.2 试验方法

试验于 2012 年 2~8 月在西宁市蔬菜研究所生物

园区试验基地进行。采用随机区组设计方法,3 次重复,每处理 50 粒种子。种子于 2 月 14 日播种,播种前浸泡处理 24 h,将种子分别播种于育苗基质和田园土的育苗盘中,播种后保温保湿,常规管理<sup>[4]</sup>。幼苗于 5 月 1 日进行移栽,处理 1:幼苗继续在育苗盘中,不移栽;处理 2:幼苗移栽于 50 孔育苗盘中,盘中装育苗基质土;处理 3:幼苗移栽于营养钵中,营养钵盘中装育苗基质;处理 4:幼苗移栽于营养钵中,营养钵盘中装田园土;处理 5:幼苗直接移栽到大田中。

### 1.3 项目测定

1.3.1 发芽率测定 发芽率 =  $(n/N) \times 100\%$  (n:全部发芽种子数,N:供试种子数),发芽率于播种后第 15 天测定。

1.3.2 发芽势测定 发芽势 =  $(n/N) \times 100\%$  (n:种子发芽达到高峰时正常发芽种子数,N:供试种子数),发芽势于播种后第 7 天测定<sup>[5]</sup>。

1.3.3 移栽成活率测定 移栽成活率 =  $(n/N) \times 100\%$  (n:移栽后成活的幼苗数,N:移栽幼苗数),移栽成活率

**作者简介:**苗增建(1964-),男,青海西宁人,本科,副研究员,现主要从事植物保护等研究工作。

**收稿日期:**2012-12-14

## Seed Germination and Callus Induction of *Schisandra chinensis* (Turcz) Bail

ZHANG Hua<sup>1,2</sup>, LI Shu-rui<sup>1</sup>, LONG Li-kun<sup>1</sup>

(1. Institute of Agricultural Biotechnology Research, Jinlin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033; 2. Department of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130000)

**Abstract:** The effect of culture medium, plant growth regulator, sucrose and casein hydrolysate on the seeds germination and callus induction of *Schisandra* were studied. The results showed that the seeds of *Schisandra* had a high frequency regeneration when taking GA 0.1 mg/L, sucrose 20 g/L, agar 5.5 g/L as the basic medium. Callus induction of *Schisandra* hypocotyl had the highest rate (87%) than that of other explants. Completion of callus induction took about 35 days.

**Key words:** *Schisandra chinensis* (Turcz) Bail; tissue culture; explant; callus