

山茱萸的组织培养与植株再生^{*}

李 焘 王喆之

(陕西师范大学生命科学院教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室 陕西 西安 710062)

摘要 目的:建立山茱萸的组织培养及植株再生体系。方法:分别以山茱萸的叶片、花柄和花托为材料,进行山茱萸不同外植体的离体培养研究,筛选最佳培养基组成。结果:适宜山茱萸叶片愈伤组织诱导的培养基组合为1/2MS,附加BA 2.0mg/L、IBA 0.5~1.0mg/L;适宜山茱萸花柄、花托愈伤组织诱导的培养基组合为1/2MS,附加BA 1.0mg/L、2,4-D 0.5mg/L;在1/2MS附加BA 2.0mg/L、IBA 0.05mg/L的培养基上,可诱导不定芽的产生;1/2MS附加IBA 2.0mg/L的培养基有利于山茱萸试管苗生根。讨论:山茱萸的花托是进行组织培养的最适外植体,白色或翠绿色、结构致密的愈伤组织较易分化产生不定芽。

关键词:山茱萸;组织培养;植株再生

中图分类号:R282.2,S567 文献标识码:B

Tissue culture and plant regeneration of *Macrocarpium officinale*

LI Tao, WANG Zhe-zhi

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an 710062, Shaanxi, China)

ABSTRACT Objective: To establish a system of tissue culture and plant regeneration of *Macrocarpium officinale*. **Methods:** Different explants (leaf, floral shoot and floral receptacle) were cultured on different medium, and the best culture conditions were selected. **Results:** 1/2 MS, supplemented BA 2.0mg/L and IBA 0.5~1.0mg/L, is the favorable medium for leaf callus induction. And 1/2MS, supplemented BA 1.0mg/L and 2,4-D 0.5mg/L is the favorable medium for induction of callus of floral shoot and floral receptacle. When the callus were cultured on 1/2MS medium, supplemented with BA 2.0mg/L and IBA 0.05mg/L, the adventitious buds could formed. A lot of roots were obtained after the adventitious buds were cultured on 1/2MS, supplemented with IBA 2.0mg/L. **Conclusion:** Floral receptacle is the best explants. Hard, white or dark-green callus can produce adventitious buds.

Key words: *Macrocarpium officinale*; Tissue culture; Plant regeneration

山茱萸(*Macrocarpium officinale* (Sieb. et Zucc.) Nakai.)为山茱萸科山茱萸属的落叶乔木,分布于北温带、亚寒带的高山地区,在我国主产于陕西、河南、四川、浙江、安徽、山西、山东等省。其果肉称山萸肉、蜀枣、枣皮、魁实等;性微温,味酸涩,归肝肾经。主要含有甙类、有机酸类、鞣质类、糖类及肌醇、生物碱、维生素、氨基酸、矿物元素等成分。具有补肝益肾、固涩收敛、利尿壮阳等多种功能;现代药理研究表明,山茱萸具有抗菌消炎、降血糖、降血脂、抗休克、强心、抗癌、抗衰老,提高免疫力等作用^[1,2,3]。在我国山茱萸主要作为补益肝肾的中药,此外,在保健食品方面还被制成保健酒、保健饮料等^[4],因此,具有十分重要的临床应用价值和实用开发前景。

但是,目前山茱萸生产中普遍存在产量低、质量不稳定;病虫害严重;果实形状变异幅度大、品质差异显著等问题。同时山茱萸实生苗生长周期长,一般10年以上才能挂果,20~30年进入盛果期^[5]。这些问题的存在严重制约着山茱萸的大面积推广种植,造成了一部分传统中成药的药源短缺。选择山茱萸的优良单株,进行离体培养研究,可以在较短时间内获得大量的优质无毒试管苗,从而缩短山茱萸的育种年限;此外,还可以利用细胞培养,进行次生代谢产物的生产。本文拟以

山茱萸的叶片、花托、花柄等不同外植体为实验材料,研究山茱萸的组织培养技术,为建立和完善山茱萸组织培养及植株再生体系研究,以及山茱萸优良品种的筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验材料为山茱萸(*Macrocarpium officinale* (Sieb. et Zucc.) Nakai.)的叶片、花柄和花托,采自西安市植物园。

1.2 方法

分别选取山茱萸幼嫩叶片、花柄和花托作为外植体进行组织培养。先用洗涤剂洗去材料表面的浮尘,置于自来水下流水冲洗1~2h;无菌条件下,于超净台上用75%的乙醇浸泡30~60s后取出,用无菌水冲洗一次;然后放入0.1% HgCl₂溶液中处理8min,用无菌水冲洗5~6次。最后,用无菌滤纸将外植体表面的水吸干,分别将幼嫩叶片(0.5cm×0.5cm)、花柄(0.5~1.0cm)和花托接种在各种培养基上,观察并记录其生长状况。

1.3 培养条件

培养室温度为25±2℃,光照强度2000~3000 lx,每天光

• 基金项目:科技部科技攻关项目资助,项目编号2001BA701A35

作者简介:李焘(1976-),在读博士,主要从事植物生物技术方向的研究,Email: litao@snnu.edu.cn

(收稿日期:2006-07-21 接受日期:2006-08-28)

照 12~14h,基本培养基为 1/2MS,其中附加琼脂 6.5g/L,蔗糖 30g/L,灭菌后 pH 值约 5.8 左右。

2 结果与分析

2.1 叶片外植体诱导愈伤组织形成

将山茱萸幼嫩叶片接种到 1/2MS 分别附加 BA/IBA 和 KT/2,4-D 不同组合的培养基上进行愈伤组织的诱导。实验结果表明,BA/IBA 与 KT/2,4-D 组合均可不同程度地诱导愈伤组织形成,而 BA/IBA 组合更有利于叶片愈伤组织的形成,其愈伤组织诱导率普遍高于 KT/2,4-D 组合,最高可达 97.

8%。当 BA 的浓度达到 2.0~4.0mg/L,IBA 的浓度为 0.5~1.0mg/L 时,叶片愈伤组织诱导率达到 90% 以上,如组合 2、3、5。因此适宜山茱萸叶片愈伤组织形成的最适培养基组成为 1/2MS 附加 BA 2.0mg/L、IBA0.5~1.0mg/L。实验观察发现,所产生的愈伤组织中有的疏松易碎,呈灰白色,不易分化,这种愈伤组织在培养的过程中,如果继代不及时,培养的时间过长,则会变得愈加疏松易碎,进而转为灰褐色,直至死亡;但是如果培养条件适宜,继代及时,这种愈伤组织则会变得坚实紧密,颜色也逐渐转为翠绿色或白色。在培养的过程中还发现,有一些呈绿色或白色的愈伤组织在形成时结构坚实紧密,质地坚硬,不易褐化,可在分化培养基上诱导产生不定芽。

表 1 不同浓度 KT/2,4-D 和 BA/IBA 对叶片愈伤组织诱导率的影响
Tab 1 Effect of different combinations and concentration of hormones on the induction rate of callus

编号 No. of medium	BA/IBA (mg/L)	KT/2,4-D (mg/L)	接种外植体个数 No. of explant inoculated	形成愈伤组织块数 No. of callus formed		愈伤组织诱导率 Induction rate of callus (%)	
				BA/IBA	KT/2,4-D	BA/IBA	KT/2,4-D
1	0/0	0/0	45	0	0	0	0
2	2.0/0.5	2.0/0.5	45	42	38	96.0	71.1
3	4.0/1.0	4.0/1.0	45	41	37	91.1	82.2
4	0/0.5	0/0.5	45	24	9	53.3	20.0
5	2.0/1.0	2.0/1.0	45	44	30	97.8	66.7
6	4.0/0	4.0/0	45	35	0	77.8	0
7	0/1.0	0/1.0	45	15	12	33.3	26.7
8	2.0/0	2.0/0	45	21	0	46.7	0
9	4.0/0.5	4.0/0.5	45	13	19	28.9	42.2

注:接种后 25d 的统计结果;
Note: Data were recorded after 25 days of culture.

2.2 花柄、花托外植体诱导愈伤组织形成

分别以山茱萸的花柄和花托为外植体进行愈伤组织的诱导。实验结果表明,山茱萸的花柄、花托极易形成愈伤组织,在 1/2MS 附加 BA1.0mg/L、2,4-D0.5 mg/L 的培养基上,花托愈伤组织的诱导率达到 100%,花柄愈伤组织的诱导率为 96.2%。激素的配比及其组合影响愈伤组织的形成。单独附加 BA 或 2,4-D 时都不利于愈伤组织的形成,如组合 4、6、8;山茱萸花托、花柄外植体接种在不含任何外源激素的 1/2MS 培

养基上,将无法诱导愈伤组织的形成,如组合 1。实验观察表明,由山茱萸花托、花柄形成的愈伤组织呈现灰白色,结构较致密,与培养基接触的地方易发生褐化现象,但不影响愈伤组织的形成。经 2~3 次继代培养之后,这类愈伤组织可转变为翠绿色或白色愈伤组织,结构变得更加致密坚实,可在分化培养基上诱导产生少量不定芽。因此,适宜山茱萸花托、花柄愈伤组织形成的培养基组成为 1/2MS + BA1.0mg/L + 2,4-D0.5 mg/L。

表 2 不同浓度的 BA、2,4-D 对花柄和花托愈伤组织形成的影响
Tab 2 Effect of different concentration of BA and 2,4-D on callus formation Of floral receptacl and floral shoot in Macrocarpium officinale

培养基编号 No. of medium	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	接种外植体数 No. of explant inoculated		形成愈伤组织块数 No. of callus formed		愈伤组织诱导率 Induction rate of callus (%)	
			花柄	花托	花柄	花托	花柄	花托
			S	R	S	R	S	R
1	0	0	56	56	0	0	0	0
2	0.5	0.5	34	34	28	30	82.4	88.2
3	1.0	1.0	72	72	58	65	80.5	90.3
4	0	0.5	86	86	6	8	7.0	9.3
5	0.5	1.0	63	63	52	58	82.5	92.1
6	1.0	0	38	38	1	0	2.6	0
7	0	1.0	45	45	7	6	15.6	13.3
8	0.5	0	52	52	3	0	5.8	0
9	1.0	0.5	52	52	50	52	96.2	100

注:接种后 20d 的统计结果;S:花柄,R:花托
Note: Data were recorded after 20 days of culture; S: floral shoot, R: floral receptacle

2.3 不定芽诱导

将由叶片、花托、花柄诱导产生的愈伤组织转入 1/2MS,附加 BA1.0-2.0mg/L、IBA 0.01-0.05mg/L 的培养基中,连续继代培养 2 个月,可从愈伤组织上分化出不定芽,随着培养时间的延长,不定芽的数量有所增加。当 BA 浓度达到 2.0mg/L, IBA 浓度为 0.05mg/L 时,不定芽的形成率可以达到 54.8%,实

验结果见表 3。在山茱萸愈伤组织的继代培养过程中,不定芽的分化率相对较低,分化周期偏长;灰白色的愈伤组织经多次继代培养之后,可以转变为绿色或白色、结构致密的愈伤组织,最终可由其表面诱导产生不定芽。因此,适宜山茱萸不定芽分化的培养基为 1/2MS,附加 BA2.0mg/L、IBA0.05mg/L。

表 3 不同激素浓度对山茱萸叶片、花托、花柄愈伤组织不定芽诱导的影响

Tab 3 The effect of different concentration of hormones on the adventitious bud formation of callus induced from floral receptacle and shoot

BA 浓度 Concentration of BA(mg/L)	IBA 浓度 Concentration of IBA(mg/L)	接种愈伤组织块数 Nos. of calli inoculated	产生不定芽的愈伤组织块数 Nos. of calli	不定芽形成率 Formation rate of buds(%)
1.0	0	45	3	6.6
1.0	0.01	30	3	10.0
1.0	0.05	54	8	14.8
2.0	0	33	10	30.3
2.0	0.01	26	12	46.2
2.0	0.05	42	23	54.8

注:经 2 次继代培养的统计结果;

Note: Data were recorded after 2 generations of culture.

2.4 不定芽的增殖

不定芽可经多次继代增殖,每个芽每代新增 3~4 个丛生芽,但经多次继代后,分化率逐渐降低,为了促进壮芽和后期生根,经过筛选得到壮芽培养基为 1/2MS,附加 BA3.0mg/L、IBA 0.05mg/L。在壮芽培养基上进行继代,再生芽生长快且健壮。

在培养基中继续增殖并长大,形成试管苗。当不定芽长至 2.0cm 高时,将其从基部切下,转入 1/2MS,附加不同生根剂的培养基中,诱导其生根,以得到山茱萸的完整植株。实验结果表明,山茱萸试管苗生根较难。实验结果表明,适宜山茱萸生根的培养基为 1/2MS 附加 IBA2.0mg/L。经过 30d 左右的生根诱导,可由试管苗基部长出 4-5 条白色细长的根,每根长 3.0-4.0cm。在此生根培养基上诱导生成的根系较为健壮、发达,生根率达 20% 左右,可用于后期的驯化移栽。

2.5 山茱萸完整植株的获得

随着培养时间的延长,继代次数的增多,诱导出的不定芽

表 4 不同培养基组成对山茱萸试管苗生根率的影响

Tab 4 The effect of different combinations of medium on the rooting rate of test tube shoots in Macrocarpium officinale

培养基组成 Composition of medium	生根率 Rooting rate(%)	平均根长 Average length of root (cm)	平均根数 Average No. of roots	小芽生长及生根情况 The result of bud growth and rooting
1/2MS	0	-	-	小芽基部长出少量愈伤组织,不生根
1/2 MS+ 活性炭 1.0g/L	0	-	-	小芽基部无愈伤组织,不生根
1/2 MS+ 活性炭 3.0g/L	0	-	-	小芽基部无愈伤组织,不生根
1/2 MS+ PP ₃₃₃ 1.0g/L	0	-	-	小芽生长正常,不生根
1/2 MS+ PP ₃₃₃ 3.0g/L	0	-	-	小芽生长正常,不生根
1/2 MS+ IBA 1.0 mg/L	16.2	0.9	1.6	小芽基部有少量愈伤组织产生,根细,较长
1/2 MS+ IBA 2.0 mg/L	20.5	1.8	2.3	小芽基部基本无愈伤组织产生,根细、长

注:接种一个月后的统计结果;

Note: Data were recorded after one month of culture.

3 讨论

3.1 山茱萸不同外植体对愈伤组织诱导的影响

实验分别选择茎段、幼嫩叶片、花柄及花托作为外植体,通过比较发现,花柄和花托是较为适宜的培养材料,以花柄为

外植体诱导愈伤组织的形成,诱导率可达 90% 以上,而花托愈伤组织的诱导率可达 100%;同时愈伤组织形成的时间也相对较短,一般 12d 左右即可形成。而以山茱萸幼嫩叶片为外植体进行组织培养时,叶片极易褐化,同时愈伤组织形成时间较长,一般需要 20d 左右的时间,而愈伤组织的诱导率也低于花

柄和花托。此外,实验还以山茱萸的离体茎段作为组织培养的材料进行了不定芽的诱导,结果表明,不定芽的分化时间长,且污染率高;不定芽长势较弱,同时伴有超度含水态苗的形成,因此,以山茱萸茎段为外植体虽也可以诱导不定芽的分化,进而形成完整植株,但仍非理想的选择。

3.2 不同形态愈伤组织不定芽分化的差异

实验以幼嫩叶片、花柄和花托为外植体分别诱导形成了大量的愈伤组织。其中有的愈伤组织呈灰白色,结构松散,不易分化。在适宜的条件下经多次继代培养后,颜色转为白色或翠绿色,结构变得坚实而紧密,并在分化培养基上诱导出不定芽。但是在继代培养中,如果继代不及时或培养条件不适宜,则最终褐化死亡。薛庆善^[6,7,8]等的研究结果表明,诱导条件不同,愈伤组织的形态和物理性质也有一定的差异。在山茱萸的组织培养中,出现了不同质地、形态和颜色的愈伤组织,且其培养条件、生长速度和分化能力各不相同,白色或翠绿色、结构致密的愈伤组织易于诱导出不定芽,而松散灰白色的愈伤组织只有在转化成白色或翠绿色、结构致密的愈伤组织后才能分化,愈伤组织质地、形态特征与分化之间的关系尚待进一步研究。

3.3 山茱萸组培苗的生根

和绝大多数植物一样^[9,10],降低无机盐的浓度有利于山茱萸组培苗的生根。山茱萸组培苗对于常用生根剂的诱导均不敏感。1.0mg/L的IBA导致少量愈伤组织的产生,随着生长素浓度的升高,山茱萸组培苗基部形成愈伤组织的量逐渐减少,直至完全消失,而所形成根的数量和长度进一步增多和伸长,使得根的质量进一步提高。在试验中还发现,在黑暗条件下,幼苗生长不良,逐渐变黄,叶片脱落,最终死亡。光照条件下山茱萸组培苗的生根情况较好,在1/2MS附加IBA2.0mg/L

的培养基上,经过30d左右的培养,在山茱萸幼苗基部形成4-5条白而细长的根,每根长3.0-4.0cm,可用于后期的驯化移栽。

山茱萸的不同外植体在适宜的激素组合中可以经过愈伤组织诱导分化出不定芽,继而形成生长健壮、根系较为发达的再生植株,并可进行大量繁殖。这为山茱萸的快速繁殖提供了一种有效途径,并在品质改良以及大面积推广等方面具有重大意义。

参考文献

- [1] 楚晋,李林.山茱萸化学成分及其药理活性的研究[J].中国自然医学杂志,1999,1(1):46-48
- [2] 王浴铭,杨云,刘翠萍.山茱萸临床应用与药理作用[J].河南中医,1999,14(1):61-62
- [3] 赵世萍,付桂香.山茱萸化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,1997,28(3):187-188
- [4] 陈淑利.山茱萸的药理营养保健与开发前景[J].杭州科技,2002,1:35
- [5] 雷福成,史洪中.河南省山茱萸生产技术[J].河南科技,1995,1:11-12
- [6] 薛庆善.《体外培养的原理与技术》[M].科学技术出版社,2001
- [7] Greence, Philliparl. Plant regeneration from tissue cultures of maize, Crop Science [J]. 1975,15:417-418
- [8] 蔡起贵,郭忠琛,钱迎倩,等.玉米原生质体的植株再生[J].植物学报,1987,29:453-458
- [9] 陈敏艳,梁宗锁,王吉吉之,等.地黄组织培养及植株再生的研究[J].西北植物学报,2004,24(6):1083-1087
- [10] 曹建平,刘晓,郝建国,等.大叶秦艽的组织培养与植株再生[J].西北植物学报,2005,25(6):1101-1106
- [5] Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Raupach B, et al. A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the Mycobacterial proteome via internet[J]. Electrophoresis, 1999,20:2172-2180
- [6] Mark P, Molly. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients[J]. Anal biochem, 2000,280:1-10
- [7] Shaw MM, Riederer BM. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003,3(8):1408-1417
- [8] Marques MAM, Espinosa BJ, da Silveira EKX, et al. Continued proteomic analysis of Mycobacterium leprae subcellular fractions[J]. Proteomics, 2004,4:2942-2953
- [9] 乐军.异烟肼耐药和敏感结核分枝杆菌的比较蛋白质组织学研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(4):258-262
- [10] Sinha S, Arora S, Kosalai K, et al. Proteome analysis of the plasma membrane of Mycobacterium tuberculosis [J]. Comp funct genom, 2002,3:470-483
- [11] Cordwell SJ, Basaee DJ, Bjellqvist B, et al. Characterisation of basic proteins from Spiroplasma melliferum using novel immobilised pH gradients[J]. Electrophoresis, 1997,18(8):1393-1398
- [12] Wasinger VC, Bjellqvist B, Humphrey SI. Proteomic "contigs" of Ochrobactrum anthropi, application of extensive pH gradients [J]. Electrophoresis, 1997,18(8):1373-1383

(上接第10页)

对微生物蛋白质组学尤其是病原微生物蛋白质组学的研究将对包括结核在内的人类疾病的致病机理和防治起到关键性的作用。作为蛋白质组学的支撑性技术,双向电泳的分辨率和重复性决定了这一方法的应用范围。本研究从样品处理和电泳体系两方面进行优化,获得了比较理想的双向电泳图谱,可以为后续结核分枝杆菌菌体蛋白表达谱的建立、菌体蛋白的比较蛋白质组学分析提供方法学参考。

参考文献

- [1] Brooke LU, Stuart JC, Humphrey IS. Comparison of predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv[J]. Biochem bioph res co, 1998,253:70-79
- [2] Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, et al. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv and attenuated M. bovis BCG Copenhagen[J]. Electrophoresis, 2003,24:3405-3420
- [3] Bahk YY, Kim SA, Kim JS, et al. Antigens secreted from Mycobacterium tuberculosis: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker[J]. Proteomics, 2004,4:1-9
- [4] Roenkrands I, King A, Weldingh K, et al. Towards the proteome of Mycobacterium tuberculosis[J]. Electrophoresis, 2000,21:3740-3756