

北五味子快繁体系的建立

陈丽静^{1*}, 齐欣¹, 王玉坤¹, 张丽¹, 马慧¹, 郭志富¹, 宋宇宁^{2*}

1. 沈阳农业大学 辽宁省生物技术重点实验室, 辽宁 沈阳 110866

2. 辽宁省中药研究所, 辽宁 沈阳 110161

摘要: **目的** 探究一种北五味子快速繁殖的方法。**方法** 通过正交试验对北五味子的组织培养进行研究, 得出北五味子的快速繁殖的最适培养基。**结果** 在MS培养基上附加NAA 0.3 mg/L+ZT 0.1 mg/L+6-BA 1.5 mg/L时芽的增殖效果最好; 而附加NAA 0.2 mg/L时, 生根效果最佳。最适培养条件为温度25℃、光照强度为2 000 lx, 光周期12 h。**结论** 本研究所得最适培养基以及培养条件可用来提高北五味子产量及质量。

关键词: 北五味子; 快繁; 组织培养; 正交试验; 培养条件

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0575-04

Rapid propagation of *Schisandra chinensis*

CHEN Li-jing¹, QI Xin¹, WANG Yu-kun¹, ZHANG Li¹, MA Hui¹, GUO Zhi-fu¹, SONG Yu-ning²

1. Liaoning Key Laboratory of Bioscience and Technology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China

2. Liaoning Institute of Chinese Materia Medica, Shenyang 110161, China

Abstract: **Objective** To develop a rapid propagation of *Schisandra chinensis*. **Methods** The tissue culture of *S. chinensis* was studied by orthogonal test and the media for the rapid propagation of *S. chinensis* were optimized. **Results** When NAA 0.3, ZT 0.1, and 6-BA 1.5 mg/L were added in the MS, the best rate of bud proliferation was obtained, while the NAA 0.2 mg/L was added, the best rooting was got. The optimal cultural condition is that temperature is 25℃, light intensity 2 000 lx, and photoperiod 12 h. **Conclusion** The optimal media and cultural condition in the test could be used to improve the yield and output, as well as quality of *S. chinensis*.

Key words: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon; rapid propagation; tissue culture; orthogonal test; culture condition

北五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon 是木兰科五味子属的多年生落叶木质藤本植物。其果实入肺、肾经, 有敛肺、滋肾、止汗、生津、止泻、涩精之功效^[1]。药理研究发现, 北五味子具有良好的抗衰老、增强记忆力和保肝等功效, 为北五味子的现代开发利用奠定了良好的基础^[2-3]。北五味子不仅大量应用于中药生产, 也是化学药的生产原料, 同时也被大量应用到保健品的研究中, 其市场需求正在不断增加。近年来野生北五味子资源受到较严重的破坏, 对野生药材的产量和质量都造成不同程度的影响。为了扩大北五味子资源量, 建立北五味子快繁体系是一种简单快捷并能保持优良北五味子性状的方法, 为我国开发这一宝贵药用资源

开辟了一条新的途径。朱骏义等^[4]以北五味子的嫩茎段、叶片、叶柄、果柄为外植体, 在不同激素组合的培养基上诱导愈伤组织。陈雅君等^[5]曾以带腋芽的北五味子嫩茎, 诱导腋芽分化。本研究以北五味子为对象, 以规模化生产为目的, 系统地探讨不同灭菌时间、不同激素组合对芽诱导和增殖的影响, 选择出了最佳增殖、生根培养基, 旨在建立简便、有效、规模化生产北五味子苗的快繁技术。

1 材料和方法

1.1 材料及取样

1.1.1 北五味子优株的选择 无论野生北五味子还是人工栽培的北五味子其果实类型都具有差异, 表明物种进化处于不稳定多变异的分化过程中, 利

收稿日期: 2010-06-03

基金项目: 辽宁省自然科学基金博士启动基金资助项目(20081067); 辽宁省自然科学基金资助项目(20072124)

作者简介: 陈丽静(1971—), 女, 山东省海阳县人, 副教授, 博士, 研究方向为植物基因工程与细胞工程。

*通讯作者 陈丽静 E-mail: chenlijing1997@126.com

宋宇宁 E-mail: songyuning@163.com

用其果实类型的差异及不同特点,从发展高产优质北五味子生产的目的出发,多年来,通过不间断地选择培育,已初步筛选出性状较为稳定,内外在质量均符合药用的优良新品种。

1.1.2 取样 优良北五味子采自沈阳祝家镇五味子良种繁育基地,经辽宁中药研究所宋宇宁鉴定,所取材料为北五味子。于 5~6 月份选取自然生长健壮的优良北五味子的嫩茎段作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 材料预处理 将采回的嫩茎剪去叶片及叶柄,剪成约 5 cm 长的茎段,洗净,备用。

1.2.2 外植体的灭菌 将预处理过的外植体用 75%乙醇浸泡 30 s,然后用无菌水冲洗 1 次,再用 0.1% HgCl_2 溶液和 2% NaClO 溶液消毒,具体操作见表 1。取出后用无菌水冲洗 4~5 次,切成长度约 0.5 cm 的小段,每段至少有一个腋芽,然后接入培养基中。

表 1 不同消毒处理方法
Table 1 Different sterilization methods

编号	2% NaClO 处理时间/min	编号	0.1% HgCl_2 处理时间/min
1	12	6	4
2	14	7	6
3	16	8	8
4	18	9	10
5	20	10	12

1.2.3 不同基础培养基对北五味子生长的影响 对试管苗来说,本试验选用了 MS、1/2MS、N6、1/2N6 这 4 种基础培养基对北五味子进行茎段培养,从中选出最适合北五味子生长的基础培养基。

1.2.4 不同生长素质量浓度对北五味子茎段分化率的影响 为优化出北五味子最佳的增殖培养基,本试验采用最适的基本培养基,加入 3 种不同质量浓度的 NAA、ZT、6-BA,采用正交试验设计方案,因素水平见表 2。

1.2.5 组培苗生根的诱导 将经过芽诱导生长良好、植株健壮、株高 2~3 cm 的北五味子组培苗转

表 2 增殖培养基正交试验设计表 $\text{L}_9(3^4)$
Table 2 Enrichment medium orthogonal design $\text{L}_9(3^4)$

水平	因素		
	NAA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ZT/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-BA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.2	0.05	1.0
2	0.3	0.10	1.5
3	0.4	0.15	2.0

接入含有不同浓度配比 NAA 的 MS 培养基中,每种处理接种 30 株组培苗,每次处理重复 3 次,在温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,每天光照 12 h,光照强度 2 000 lx 的条件下,培养 4~5 周诱导生根,并统计生根率、根数和根长。

1.2.6 组培苗的移栽 以苗高 2.0~2.5 cm,根长 1.5~2.0 cm,每株根数为 3~5 条时的试管苗为试材,移栽前将培养苗置于室温条件下,在室外荫棚内炼苗 3~4 d,将封口膜揭开一半,再炼苗 4~5 d,以提高小苗的适应性。炼苗后揭开封口膜,取出组培苗,冲洗掉根部的培养基,再用 0.2%多菌灵液浸泡 10 s,然后用清水洗净,栽种于覆膜的花盆中,栽好后淋透水,置于有散射光的阴凉处,温度白天控制在 23~25 $^{\circ}\text{C}$,夜间 15~18 $^{\circ}\text{C}$ 。7 d 后开始结合浇水喷施营养液,以后每 4 天喷 1 次营养液。

2 结果与分析

2.1 不同预处理对外植体诱导的影响

不同的处理方法以及消毒时间的长短对北五味子原代培养的成功率非常重要。按照表 1 的处理方法对北五味子茎段进行处理,原代培养的污染率和成活率结果如表 3 所示。可知,0.1% HgCl_2 溶液的消毒效果比 2% NaClO 溶液消毒效果好,随着消毒时间的延长,污染率降低,当 0.1% HgCl_2 溶液消毒时间达到 12 min 时,污染率为 0%,当 0.1% HgCl_2 溶液消毒时间为 10 min 时,综合污染率和成活率效果最好,分别为 5%和 90%。

表 3 不同消毒方法对北五味子生长能力的影响
Table 3 Effect of various sterilization way on vitality of *S. chinensis*

编号	外植体数	污染率/%	成活率/%
1	20	100	0
2	20	85	5
3	20	65	25
4	20	40	50
5	20	20	70
6	20	90	5
7	20	45	35
8	20	20	70
9	20	5	90
10	20	0	75

2.2 不同基础培养基对北五味子生长的影响

不同基础培养基对北五味子壮苗生长的影响,见表 4。幼苗用 MS 培养基比用 N6 培养基培养效果好。以 MS 培养基为最好,A 级比率占 87.5%。

表 4 不同基础培养基对北五味子生长的影响 ($n=40$)

Table 4 Effect of different medium on vitality of *S. chinensis* ($n=40$)

培养基	A 级/%	B 级/%
MS	87.5	12.5
1/2 MS	80	20
N6	75	25
1/2N6	67.5	32.5

A 级为苗高 2 cm 以上, B 级为 2 cm 以下

Grade A of seeding height is over 2 cm, and grade B is below 2 cm

2.3 不同生长素质量浓度对北五味子茎段分化率的影响

由表 5 得到因素的主次顺序依次为 NAA、6-BA、ZT。由此得到各因素的最佳搭配为 $A_2B_2C_3$ 。由表 6 可知 $F_{NAA} > F_{0.05}$, 即 NAA 对结果影响显著; ZT、6-BA 对结果都有一定的影响。因此, NAA 为主要因素, 6-BA 和 ZT 为次要因素。由 6-BA 单因素的预试验可知当 6-BA 质量浓度超过 1.5 mg/L 后, 培养基对新芽茎节间距的影响却呈缩短的趋势, 同时叶片皱缩也很明显。所以采用 NAA 0.3 mg/L、ZT 0.10 mg/L、6-BA 1.5 mg/L 的组合。以此组合对北五味子茎段进行培养, 所得的茎段分化率为 90%, 分化率较高, 试管苗质量也很好。

2.4 不同 NAA 浓度对北五味子生根的影响

将从生苗接种于含不同 NAA 质量浓度的生根培养基中, 不同的 NAA 质量浓度诱导北五味子丛

表 5 北五味子茎段分化率测试结果

Table 5 Differentiation rate stem section for *S. chinensis*

序号	A	B	C	误差项	分化率/%
1	0.2	0.05	1.0	1	26.67
2	0.2	0.10	1.5	2	33.33
3	0.2	0.15	2.0	3	43.33
4	0.3	0.05	1.5	3	66.67
5	0.3	0.10	2.0	1	93.33
6	0.3	0.15	1.0	2	63.33
7	0.4	0.05	2.0	2	53.33
8	0.4	0.10	1.0	3	50.00
9	0.4	0.15	1.5	1	43.33
K_1	103.33	146.67	140.00	163.33	
K_2	223.33	176.66	143.33	149.99	
K_3	146.66	149.99	189.99	160.00	
k_1	34.44	48.89	46.67		
k_2	74.44	58.89	47.78		
k_3	48.89	50.00	63.33		
R	40.00	10.00	16.66	—	

生苗生根的能力明显不同。NAA 质量浓度小于或超过 0.2 mg/L 时, 生根率都有降低趋势, 当 NAA 为 0.2 mg/L 时, 生根率达 90 %, 且根生长均匀, 苗体健壮, 如表 7 所示, “+++” 健壮、“++” 一般、“+” 弱、“—” 不生根。因此选择激素 NAA 质量浓度为 0.2 mg/L 的培养基进行生根培养。

表 6 北五味子茎段分化率方差分析表

Table 6 Variance analysis of differentiation rate for *S. chinensis*

试验因素	离差平方和	自由度	均方	F 值
NAA	2 461.75	2	1 230.86	76.59
ZT	180.19	2	90.10	5.61
6-BA	520.80	2	260.40	16.21
误差	32.14	2	16.07	—
总和	3 194.88	8	—	—

$F_{0.05}(2,2)=19.0$, $F_{0.01}(2,2)=99.0$

表 7 不同质量浓度 NAA 对北五味子生根培养的影响

Table 7 Effect of different concentration of NAA on rooting of *S. chinensis*

NAA/ (mg·L ⁻¹)	生根率/ %	平均根数	平均根长/ cm	健壮度
0.05	0	0	0	—
0.1	32.0	1.3	0.25	+
0.2	90.0	4.2	2.70	+++
0.3	36.0	1.5	0.34	++
0.4	5.0	0.2	0.10	+

2.5 组培苗的移栽

按“1.2.6”项方法移栽。移栽基质采用水苔, 基质应较松散, 保证通气和透水性, 6 周后成活率为 82%。

3 讨论

朱俊义等^[6]用北五味子的嫩茎、叶片、叶柄、果柄作为外植体, 在不同培养基上进行愈伤组织诱导, 结果表明无论在哪种培养基上, 嫩茎段的诱导效果都最好, 愈伤组织诱导率最高可达 75%, 果柄次之, 叶柄再次之, 而叶片的效果最差。刘丽娟^[7]则建议在生产中以茎段为外植体来繁殖五味子, 诱导愈伤组织采用 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基, 长势好。

在综合考虑了各种因素的基础上, 选择用嫩茎段作为外植体。

正交试验激素质量浓度是在单因素的基础上选取效果较好的激素质量浓度进行正交试验, 前期试验研究进行了对 NAA 质量浓度的测试, 结果显示 NAA 质量浓度过高, 在切口处会产生大量的愈伤组织, 阻碍了芽的生长和分化, 不利于增殖培养。

对 ZT 质量浓度的测试显示,随着质量浓度的升高,试管苗的增殖率提高,当超过一定浓度后,增殖率开始下降。6-BA 质量浓度增加,诱导率呈升高趋势,增殖倍数也呈现升高趋势,但当 6-BA 质量浓度升高超过 1.5 mg/L 后,培养基对新芽茎节间距的影响却呈缩短的趋势,同时叶片皱缩也很明显。

北五味子在组培过程中生长速度较慢,寻找到一种能够提高北五味子生长速度的方法,将大大提高组织培养方法在北五味子繁殖中的应用。

参考文献

[1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.

- [2] 官艳丽, 曹 沛, 郁开北, 等. 北五味子化学成分的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 185-187.
- [3] 史 琳, 何晓霞, 潘 英, 等. 五味子藤茎化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1707-1710.
- [4] 朱俊义, 刘雪莲, 秦佳梅, 等. 北五味子组织培养中愈伤组织的诱导 [J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(6): 41-42.
- [5] 陈雅君, 吴秀菊, 关政华, 等. 药用植物北五味子的组织培养 [J]. 植物研究, 1999(3): 318-322.
- [6] 朱俊义, 刘雪莲, 刘立娟, 等. 诱导北五味子腋芽丛生分化培养基的筛选 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 580.
- [7] 刘丽娟. 植物生长调节剂对五味子愈伤组织诱导的影响 [J]. 通化师范学院学报, 2007, 28(4): 20-21.

关于推荐 2011 年中国药学会-石药集团青年药剂学奖的通知

中国药学会-石药集团青年药剂学奖是中国药学会与石药集团共同设立的青年药剂学奖,旨在奖励中国优秀青年药剂学工作者,致力于创新药物制剂研究。该奖项面向全国,从 2009 年起每年评选一次,每次奖励 6 名从事创新药物制剂研究的青年学者,奖励金额(含税)为每人 20 000 元人民币,同时颁发获奖证书。现将有关事宜通知如下。

一. 评奖条件

申请人需要具备以下条件:

1. 中国药学会会员; 2. 年龄 40 周岁以下(1971 年 1 月 1 日以后出生); 3. 遵纪守法,学风正派; 4. 从事药物制剂研究并取得优秀成绩。

二. 申报方式

1. 申请人直接向中国药学会申报;
2. 申请人通过中国药学会各专业委员会以及各省、市、自治区药学会向中国药学会申报。

三. 推荐材料

推荐书电子版请从中国药学会网站 www.cpa.org.cn 上“关于推荐 2011 年中国药学会-石药集团青年药剂学奖的通知”中下载。

四. 申报截止时间

2011 年 4 月 30 日,以邮戳为准。

五. 评审和颁奖

中国药学会组织评审,评审专家组由药剂学专家组成。2011 年颁奖时间和地点另行通知。有关事宜可从中国药学会网站(www.cpa.org.cn)查询。

六. 申报地点和联系人

地 址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1802 室; 邮 编: 100022

联系人: 孙文虹(010-58699280-819)、范玫杉(010-58699280-820)

E-mail: sunwenhong2002@163.com; yxfms@163.com

中国药学会