

雌雄栝楼的组织培养研究

郭晓亮, 王沫*, 舒少华

(华中农业大学药用植物研究所, 武汉 430070)

摘要: 对雌雄栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim) 分别进行组织培养的研究结果表明: 在雌雄栝楼组织培养过程中, 愈伤组织的诱导和分化适宜的培养基均存在性别差异。愈伤组织诱导的适宜培养基分别是, 雌性栝楼培养基为 MS + NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L; 雄性栝楼培养基为 MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 和 MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 1.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L。愈伤组织分化的适宜培养基分别是, 雌性栝楼培养基为 MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.4 mg/L + 6-BA 1.2 mg/L; 雄性栝楼培养基为 MS + NAA 0.3 mg/L + IBA 0.2 mg/L + 6-BA 0.8 mg/L; 雌雄栝楼无根苗生根的适宜培养基均为 MS + NAA 0.1 mg/L。

关键词: 栝楼; 组织培养; 性别

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0684-04

Tissue Culture of Male and Female *Trichosanthes kirilowii* Maxim

GUO Xiao-Liang, WANG Mo*, SHU Shao-Hua

(Medicinal Herb Institute of Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The results of tissue culture of male and female *Trichosanthes kirilowii* Maxim showed that there is difference of phytohormone concentration between male and female *T. kirilowii*. The suitable medium for the callus induction of female *T. kirilowii* is the medium MS + NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L. The suitable medium for the callus induction of male *T. kirilowii* is the medium MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L and MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 1.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L. The suitable medium for the callus differentiation of female *T. kirilowii* is the medium MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.4 mg/L + 6-BA 1.2 mg/L. The suitable medium for the callus differentiation to male *T. kirilowii* is the medium MS + NAA 0.3 mg/L + IBA 0.2 mg/L + 6-BA 0.8 mg/L. The suitable medium for rooting to male and female *T. kirilowii* free seedlings are both MS + NAA 0.1 mg/L.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* Maxim; Tissue culture; Gender

栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim), 属葫芦科 (Cucurbitaceae) 栝楼属 (*Trichosanthes*), 为多年生攀援植物。栝楼的种子营养丰富, 可以食用, 也可入药, 能化痰散结, 滑肠通便^[1]。栝楼根在中药中称天花粉, 天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 是其中的主要有效成分, 对早期和中期妊娠引产有效率达 90% 以上, 并对葡萄胎、死胎及宫外孕有独特疗效; 它能够抑制肿瘤的生长、病毒的增殖, 并具有调节免疫功能的活性, 在培养细胞系中对乙型肝炎、柯萨奇 B2、麻疹、乙型肝炎及 HIV 病毒的复制均有一定的抑制作用^[2]。

药用栝楼多为野生采集, 已经无法满足市场需要, 因此栝楼的人工栽培势在必行。栝楼是雌雄异

株植物, 雌性栝楼和雄性栝楼有不同的收获部位, 具有不同的药用和经济价值。因此在人工栽培中控制雌雄栝楼的植株比例十分必要。以收获天花粉为主的种植基地, 一般要求种植 90% 以上, 乃至 100% 的雄性栝楼; 而以收获果实或种子为主的种植基地, 雌雄栝楼的适宜比例一般为 10 : 1。生产上以种子引种或繁殖种苗, 成株后自然分化的雌雄株比例约为 3 : 7^[3], 这个比例对不同种植目的都不合适, 而依据种子或幼苗鉴别性别的技术目前暂未见报道, 那么, 针对已知性别的栝楼植株, 通过组织培养技术, 可以快速繁殖所需性别的栝楼种苗, 促进栝楼种植高效化。

关于栝楼的组织培养, 前人已有研究。廖华俊、

收稿日期: 2008-11-26, 修回日期: 2009-07-17。

作者简介: 郭晓亮 (1982 -), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药材资源; 王沫 (1956 -), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为昆虫毒理学、药用植物资源学。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: wangmo@mail.hzau.edu.cn)。

杨晓伶、曹孟德等分别对栝楼进行了组织培养研究,得到了再生植株^[3-6]。但将栝楼雌雄植株分别进行组织培养,研究其适宜培养基,还未见报道。本研究对栝楼雌雄植株分别进行组织培养,其结果具有较大的生产实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以已知性别的两年生栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim) 植株茎段为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 试材消毒、培养基及培养条件

分别取栝楼雌雄植株的茎段,在自来水下冲洗 30 min,切成 1~1.5 cm 长的小段,用 75% 酒精浸泡 100 s,无菌水冲洗 3 次,再浸入 0.1% 升汞中 15 min,期间不断振荡,取出外植体,无菌水冲洗 3 次后,用无菌滤纸蘸干多余水分,在无菌条件下切除茎段两端,留下中间 0.5 cm 长小段,进行培养。以 MS 为基本培养基,添加不同种类和浓度的激素、30 g/L 蔗糖、8 g/L 琼脂, pH 5.9,培养基采用湿热灭菌消毒方法消毒。培养温度为 (25 ± 2) °C,光暗周期为 10 h : 14 h,光照强度为 2500 lx。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基

将消毒好的雌雄栝楼外植体接种于以 MS 为基本培养基的不同培养基上,每种培养基接 10 瓶,每瓶接种 3 个外植体,筛选诱导培养基。具体设计见表 1。

表 1 栝楼愈伤组织诱导培养基所用激素及浓度设计
Table 1 Phytohormone used for inducing *Trichosanthes kirilowii* callus

编号 No.	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	6-BA (mg/L)
1	0.1	0.5	0.5
2	0.1	1.0	1.0
3	0.1	1.5	1.5
4	0.1	2.0	2.0
5	0.3	0.5	1.0
6	0.3	1.0	0.5
7	0.3	1.5	2.0
8	0.3	2.0	1.5
9	0.5	0.5	1.5
10	0.5	1.0	2.0
11	0.5	1.5	0.5
12	0.5	2.0	1.0
13	0.7	0.5	2.0
14	0.7	1.0	1.5
15	0.7	1.5	1.0
16	0.7	2.0	0.5

1.2.3 愈伤组织分化培养基

将直径大约为 1 cm 的雌雄栝楼愈伤组织转移到以 MS 为基本培养基的不同培养基上,每种培养基接 10 瓶,每瓶接种 3 个外植体,筛选分化培养基。具体设计见表 2。

1.2.4 生根培养基

选择 2.5 cm 以上的雌雄栝楼的无根苗,转接到不同培养基上,每种培养基接 10 瓶,每瓶接种 3 株无根苗,筛选生根培养基。具体设计见表 3。

表 2 栝楼愈伤组织分化培养基所用激素及浓度设计
Table 2 Phytohormone used for differentiating *T. kirilowii* callus

编号 No.	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	6-BA (mg/L)
1	0.1	0.2	0.6
2	0.1	0.4	1.2
3	0.1	0.6	1.8
4	0.3	0.2	1.8
5	0.3	0.4	0.6
6	0.3	0.6	1.2
7	0.5	0.2	1.2
8	0.5	0.4	1.8
9	0.5	0.6	0.6

表 3 栝楼无根苗生根培养基所用激素及浓度设计
Table 3 Phytohormone used for rooting *T. kirilowii* shoots

编号 No.	培养基 Medium	NAA (mg/L)
1	1/2MS	0.1
2	1/2MS	0.3
3	1/2MS	0.5
4	MS	0.1
5	MS	0.3
6	MS	0.5

2 结果与分析

2.1 不同培养基对雌雄栝楼愈伤组织的诱导效果

将消毒过的雌雄栝楼外植体接种于不同培养基上,观察对愈伤组织的诱导情况,以第 15 d 形成愈伤组织的外植体数与接种外植体总数计算愈伤率,结果见表 4。以接种第 7 d 是否产生愈伤组织观察出愈速度,雌雄外植体所适用培养基有较大差别,雌性外植体的第 7 d 出愈培养基只有第 9 号,雄性外植体的第 7 d 出愈培养基有第 1 号和第 2 号;观察接种第 15 d 诱导产生的总愈伤率发现,雌性外植体愈伤率达 100% 的最适培养基只有第 9 号,雄性外植体愈伤率达 100% 的最适培养基有第 1 号和第 2 号,与出愈速度相一致。而接种于其它培养基的栝楼外植体,无论性别,其愈伤率均只有 20% 左右,雄性外植体产

表4 雌雄栝楼外植体在不同诱导培养基上的愈伤组织诱导率

Table 4 The induction rates of *T. kirilowii* callus induction

编号 No.	雄性的诱导率(%) The induction rates of male	雌性的诱导率(%) The induction rates of female
1	100	20
2	100	13
3	20	13
4	0	27
5	42	0
6	0	20
7	23	0
8	23	17
9	27	100
10	31	10
11	0	23
12	57	7
13	0	0
14	0	0
15	17	32
16	7	0

生愈伤率相对较高的培养基只有第5号和第12号,分别为42%和57%,雌性外植体产生愈伤率相对较高的培养基只有第4号和第15号,分别为27%和32%,由此可以看出:在利用栝楼茎段诱导愈伤组织时,所用栝楼外植体的性别不同,对培养基的要求也相应不同,其中雌性栝楼适宜的诱导培养基为MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+6-BA 1.5 mg/L,而雄性栝楼适宜的诱导培养基为MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L和MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

2.2 不同培养基对雌雄栝楼愈伤组织的分化效果

将产生愈伤组织后的外植体移至不同的愈伤组织分化培养基上,15 d后统计无根苗的形成情况,结果见表5。雌性栝楼愈伤组织的分化,以2号培

表5 雌雄栝楼愈伤组织在不同分化培养基上的分化效果
Table 5 Effects of *T. kirilowii* callus differentiation

编号 No.	分化率(%) The differentiation rates		平均芽数(个) The mean bud number	
	雌性外植体 Female explants	雄性外植体 Male explants	雌性外植体 Female explants	雄性外植体 Male explants
1	64	63	16	8
2	83	47	17	13
3	71	52	14	11
4	61	78	13	14
5	67	51	11	15
6	54	57	18	12
7	62	42	16	9
8	49	47	14	11
9	57	52	14	13

养基上的最好,分化率达83%,每个外植体上的愈伤组织平均分化形成了17个芽;雄性栝楼愈伤组织的分化,以4号培养基上的最好,分化率达到78%,每个外植体上的愈伤组织平均分化形成了14个芽。

因此,雌性栝楼愈伤组织分化的适宜培养基为2号(MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.4 mg/L+6-BA 1.2 mg/L);雄性栝楼愈伤组织分化的适宜培养基为4号(MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.8 mg/L)。

2.3 不同生根培养基对雌雄栝楼无根苗的生根效果

栝楼愈伤组织在分化培养基上形成芽后继续培养一段时间,即会形成无根苗,为提高移栽成活率,必须让无根苗生根。将无根苗转入生根培养基培养15 d后,观察无根苗的生根情况,结果见表6。雌性栝楼外植体所形成的无根苗,在4号生根培养基上的生根率为73.3%,每个无根苗生根数平均1.45条,根长平均1.55 cm,而在其它生根培养基上的生根率则相对较低甚至没有生根;雄性栝楼外植体所形成的无根苗,在所有供试生根培养基上的生根率均不理想,只在4号培养基上的生根率相对较好,为46.7%,每个无根苗生根数平均1.00条,根长平均1.53 cm。综合分析,栝楼愈伤组织分化形成无根苗后,以MS+NAA 0.1 mg/L为相对适宜,最适生根培养基还有待进一步研究。

表6 不同生根培养基对雌雄栝楼无根苗的生根效果
Table 6 Rootage rates of *T. kirilowii* callus

编号 No.	生根率(%) Rootage rates		平均根数(条) The mean bud number		平均根长(cm) The mean bud number	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
1	13.3	6.7	1	1	1.75	1
2	6.7	0	1	0	1.45	0
3	0	0	0	0	0	0
4	73.3	43.7	1.45	1	1.55	1.53
5	30	13.3	1.1	1	1.39	1.57
6	0	0	0	0	0	0

3 讨论

已有的对雌雄异株植物的组织培养研究大多没有区分外植体的性别,未对雌雄两性分别进行组织培养研究,得到的适宜培养基配方均是不分性别的。杜希华等^[7]在研究银杏的组织培养时,曾发现雌雄两性外植体在诱导后的继代生长过程中形态上出现明显不同,雄叶诱导出的愈伤组织颜色鲜绿,褐化较慢,生长快;雌叶诱导出的愈伤组织相对则松软,颜

色较黄,易褐化,生长慢;说明银杏的雌雄两性外植体在组织培养中的表现是不同的。

本研究发现,栝楼的雌雄两性外植体在组织培养中的表现亦不相同,愈伤组织的诱导以及分化中所适宜的激素浓度有一定差异。分析引起这种现象的原因,可能与其基因型有关,雌雄两性外植体本身的内源激素水平有异,导致其对激素刺激信号的敏感程度不同,因为外源激素最终是通过内源激素水平的调整变化起作用的^[8,9]。栝楼的雌雄两性外植体适宜的生根培养基相同,均为 MS + NAA 0.1 mg/L,这与佟宏霞等的研究结果^[10]一致。高浓度的 NAA 虽然也可以生根,但容易使无根苗基部愈伤变粗,导致根部脱落^[11];本研究以 MS + NAA 0.1 mg/L 作为雌雄两性的生根率均未达到理想结果,最适生根培养基还有待进一步研究。

本研究结果提示,在对雌雄异株植物进行组织培养研究时,应该注意外植体的性别差异,对雌雄植株同时进行组织培养研究,以便找到适宜雌雄两性的最佳培养基与最适激素浓度。

参考文献:

[1] 郎进爆,张贤超,王珍儿. 栝楼的特性及其开发利用[J]. 上海

农业科技,2004(2): 91.

- [2] Byers V S, Levin A S, Waites L A, et al. A phase I / II study of trichosnathin treatment of HIV disease[J]. *AIDS*, 1990, 4: 1189 - 1196.
- [3] 杨晓令,金关荣,等. 栝楼的组培快繁技术研究[J]. 中药材, 2006, 29(11): 1129 - 1130.
- [4] 廖华俊,董玲. 栝楼组织培养及非试管苗快繁技术研究[J]. 中国瓜菜, 2006(3): 4 - 7.
- [5] 曹孟德,陈辉,王军健. 栝楼的快速繁殖及愈伤组织的诱导[J]. 生物技术, 1996, 6(4): 15 - 17.
- [6] 尹艺林,吴永超. 栝楼的组织培养研究[J]. 皖西学院学报, 2005, 21(4): 56 - 58.
- [7] 孙秀玲,郝岗平. 不同外植体和激素对银杏愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 山东师范大学学报, 2008(1): 129 - 133.
- [8] Dominigue L. Direct embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L. medicinal woody species [J]. *Plant Cell Report*, 1993 (12): 501 - 505.
- [9] Webb D T, Arias W, de Hostos E. Callus formation by *Ginkgo biloba* embryos on hormone-free media controlled by closures and media components[J]. *Phytomorph*, 1986, 36(1): 121 - 127.
- [10] 佟宏霞,李喜文,邢苗. 栝楼组织培养和植株再生研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(12): 721 - 722.
- [11] 郑树松,苑华毅,王莉江. 药用植物栝楼的组织培养及其表达蛋白的分析[J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 420 - 422.