

# 龙芽櫟木体细胞胚状体发生及成苗的调控研究

李正楠<sup>1</sup>, 王 红<sup>1</sup>, 张爱军<sup>1</sup>, 胡益民<sup>2</sup>, 姬惜珠<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学 山区研究所, 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 2. 保定市园林局, 河北 保定 071001)

**摘 要:** 利用龙芽櫟木叶片、叶柄、嫩茎及根为试材, 研究了 2,4-D、6-BA、NAA、糖种类对胚性愈伤组织及胚状体的诱导、芽分化和成苗的影响。以 2,4-D 1.0 mg/L 确定诱导胚性愈伤组织及胚状体的最适外植体为嫩茎, 诱导的胚性愈伤组织及胚状体质量、数量均高于叶片、叶柄和根; 经直观分析、方差分析和多重比较, 结合对比试验, 结果表明: 6-BA 是龙芽櫟木芽分化及成苗的主要因素。以蔗糖 30 g/L 作碳源, 芽分化最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L; 成苗最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.04 mg/L, 芽分化率和成苗率达 88.02% 和 79.62%。

**关键词:** 龙芽櫟木; 胚状体; 芽分化; 成苗

中图分类号: S 792.119 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)08-0118-04

龙芽櫟木 *Aralia elata* (Miq) Seem 系五加科櫟木属落叶小乔木。别名刺嫩芽、刺龙芽。原产东北, 多分布于东北、河北山区。生长于林缘、山谷阴坡等处, 树皮灰

色, 密生坚刺。龙芽櫟木不仅能防风固沙, 美化环境, 且含有较高的人参营养素, 具有强身健体、调节神经、祛风除邪的功效<sup>[1]</sup>。其嫩芽是营养高、口感佳的山野菜。由于龙芽櫟木零星散生, 雌雄异株, 授粉机会较少, 天然繁殖率低, 限制了规模发展。随着山野菜销售价格提高, 利益驱使原产地人掠夺式采集, 造成野生资源濒临灭绝。利用组织培养技术对龙芽櫟木进行快速繁殖, 为其资源的保存、产业化工厂育苗奠定基础, 对龙芽櫟木新品种(例如无刺品种)的培育和改良有重要的作用。目前, 国内对龙芽櫟木的组织培养研究多集中于嫩茎和芽外植体不经愈伤组织阶段而直接培养成苗, 诱导胚性

第一作者简介: 李正楠(1964-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事农村与区域发展研究工作。

通讯作者: 姬惜珠(1956-), 女, 本科, 研究员, 现主要从事木本植物组织培养研究工作。E-mail: xuzhu555@126.com。

基金项目: 河北省科技厅科技攻关资助项目(00230108D)。

收稿日期: 2009-12-25

[4] Dubouzet J, Shinoda G K, Murata N. Interspecific hybridization of *Allium gigantum* Regel: production and early verification of putative hybrids[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 385-388.

[5] 李文生, 闫国华, 张晓明, 等. 樱桃种间杂交种胚培养及子叶植株再生[J]. *园艺学报*, 2004, 31(5): 690.

[6] 刘焕芳, 陈学森, 段成国. 甜樱桃与中国樱桃杂种胚抢救及杂种鉴定[J]. *园艺学报*, 2004, 31(3): 303-308.

[7] 赵艳华, 程和禾, 吴雅琴, 等. 早熟甜樱桃胚挽救研究[J]. *河北农业科*

学, 2008, 12(4): 69-72.

[8] 郭修武, 郭印山, 张海娥, 等. 接种时期和培养基对无核葡萄胚挽救的影响[J]. *园艺学报*, 2007, 34(2): 329-332.

[9] 贺佳玉, 李云, 姜金仲, 等. 植物胚败育机理及其离体培养挽救技术之研究进展[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(1): 141-146.

[10] 李桂荣, 王跃进, 唐冬梅, 等. 胚挽救无核葡萄新品种取样时期的研究[J]. *河北农业大学学报*, 2004, 27(5): 17-21.

## Embryo Culture and Proliferation of Interspecies Hybrids of Sweet Cherry

QIN Zhi-hua, SUN Yu-gang, YAN Gui-hong, WEI Guo-qin, LI Fang-dong

(Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000)

**Abstract:** The crossing fruits were used as explants in this paper to study the embryo culture of sweet cherry. The results indicated that the proper medium for embryo culture of sweet cherry was MS+BA 1 mg/L+IAA 1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L and for proliferation was MS+BA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L; The appropriate medium for roots induction was 1/2MS+IBA 0.4 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 6 g/L.

**Key words:** sweet cherry; embryo culture; proliferation; roots induction

愈伤组织进而分化胚状体培养成苗的再生方式报导尚少。该研究以叶片、叶柄、嫩茎及根为试材,通过胚性愈伤组织的诱导、分化,最终获得了再生植株。旨在为品种快繁、工厂化育苗、品种改良、优良品种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

叶片、叶柄于 2005 年 4 月自易县望龙实验站采集的嫩芽经无菌培养的植株上采集;嫩茎与根为 2006 年 4 月由望龙实验站采集,该试验在河北省山区研究所组织培养室完成。

1.2 试验方法

1.2.1 不同器官诱导胚性愈伤组织与胚状体试验 取经无菌培养大小基本一致的叶片,垂直主脉平行切 3 刀,叶边缘相连;叶柄切成长 0.5 cm,纵切;嫩茎与根经常规灭菌后切成 3~5 mm 的薄片接种于 MS 培养基,经 10 d 培养取无污染新鲜组织与上述叶片、叶柄组织分别接入 MS+2,4-D 1.0 mg/L 的培养基上,每瓶 3 个,每种组织接 30 瓶,25 d 后继代。继代 25 d 调查胚性愈伤鲜重,计算胚性愈伤组织诱导率及胚状体诱导率。

1.2.2 不同调节剂配比对芽分化及成苗的影响 以 MS 为基本培养基,采用  $L_9(3^4)$  正交试验,各试验因素水平见表 1。A、B、C 3 个因素分别为 6-BA、NAA、糖种类。2 种激素各设 3 个水平,糖种类为蔗糖、葡萄糖、果糖,均为 30 g/L。将胚性愈伤组织和胚状体诱导率高且生长状态好的培养物移入附加上述激素及糖不同配比的培养基中,每瓶接 3 块培养物,每处理 10 瓶,重复 2 次,40 d 调查分化率和成苗率,探求 6-BA、NAA、糖种类对芽分化及成苗的影响。

试验培养温度(24~26)℃,pH 5.8 光照强度1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

表 1 因素水平

水平	A	B	C
	6-BA/ mg · L <sup>-1</sup>	NAA/ mg · L <sup>-1</sup>	糖种类
1	0.05	0.02	蔗糖
2	1.00	0.04	葡萄糖
3	2.00	0.08	果糖

2 结果与分析

2.1 不同器官诱导胚性愈伤组织与胚状体试验

将龙芽櫟木叶片、叶柄、嫩茎和根分别接种于 MS+2,4-D 1.0 mg/L 培养基,均可不同程度的诱导出胚性愈伤组织,其中嫩茎诱导的愈伤组织数量多质量好,10 d 出现微小的黄白色颗粒状突起,30~40 d 胚性愈伤出现生长高峰,乳黄色菜花样,表面光滑鲜亮、疏松,在继代后期胚性愈伤颗粒纵向伸长,两侧生长速度加快,顶端出现 2 个裂片,部分呈喇叭状,肉眼清晰可见,用镊子轻碰即可与其他组织分离,获得根茎齐全的幼苗达 60%以上。15 d 叶柄两端膨大及根的形成层处均出现小颗粒,浅黄或白色,疏松或致密,继代后期在根的薄片上布满薄层致密的白色愈伤组织,没有明显的生长高峰,产生的愈伤组织大部分致密不易分化,胚性愈伤组织与诱导出的胚状体彼此之间连接紧密,不易分离,分化成少量胚状体。20 d 叶片切口处有微量肿胀,25 d 叶片部分拱起,皱卷,35 d 部分组织出现极少量愈伤,浅绿色、质脆、致密,没有明显的生长高峰,未分化出胚状体。以上 4 种外植体以嫩茎诱导胚性愈伤组织及胚状体最合适。

表 2 不同部位外植体诱导愈伤组织及胚状体试验结果比较

外植体	接种量 g (x±SD)	愈伤组织收获量/ g(x±SD)	愈伤组织诱导率/ %	胚状体诱导率/ %	生长状态
叶片	0.051±0.001	0.247±0.012	13.33	0.00	浅绿色、质脆、量少、无胚状体
叶柄	0.03±0.001	0.287±0.021	42.22	15.49	浅黄、疏松、少量胚状体
嫩茎	0.137±0.001	0.953±0.051	93.56	62.41	乳黄色、疏松、大量胚状体
根	0.148±0.001	0.330±0.042	86.67	8.09	白色、致密、极少量胚状体

表 3 不同调节剂比对芽分化及成苗的影响

编号	A (6 BA)	B (NAA)	C (糖种类)	分化率/ %			成苗率/ %		成苗率合计
				I	II	分化率合计/ %	I	II	/ %
1	1	1	1	72.24	74.91	147.15	51.00	64.36	115.36
2	1	2	2	63.9	59.90	123.80	47.22	48.92	96.14
3	1	3	3	50.00	54.36	104.36	37.12	31.90	69.02
4	2	1	2	83.73	89.65	173.38	68.75	74.84	143.59
5	2	2	3	72.47	73.00	145.47	69.35	68.52	137.87
6	2	3	1	82.25	84.20	166.45	76.16	74.03	150.19
7	3	1	3	37.17	37.22	74.39	33.04	41.00	74.04
8	3	2	1	58.03	64.01	122.04	36.17	45.22	81.39
9	3	3	2	39.12	47.09	86.21	20.65	16.33	36.98
分 T <sub>1</sub>	375.31	394.92	435.64	成 T <sub>1</sub>	280.52	332.99	346.94		
化 T <sub>2</sub>	485.30	391.31	383.39	苗 T <sub>2</sub>	431.65	315.40	276.71		
率 T <sub>3</sub>	282.64	357.02	324.22	率 T <sub>3</sub>	192.41	256.19	280.93		
R	33.78	6.32	18.57	R	39.87	12.80	11.71		

2.2 不同调节剂对比对芽分化及成苗的影响

正交试验结果表明,不同浓度的调节剂与糖种类对龙芽櫟木芽分化和成苗有显著影响。1~6号试验中,随着6-BA浓度的升高,分化率及成苗率明显上升,幼苗色泽新鲜,叶片大小适中,55%幼苗达2.5 cm左右;7~9号试验,6-BA浓度为2.0 mg/L时,分化率及成苗率明显降低,幼苗节间短,叶片小,质地脆。说明6-BA 2.0 mg/L不适于芽的分化;6-BA浓度相同时,随着NAA浓度的升高,分化率及成苗率下降。碳源为果糖的组合试验均比蔗糖和葡萄糖组合试验的分化率及成苗率低。

由表3分化率的R值分析可看出,调节剂与糖种类对分化率的影响从大至小依次为6-BA、糖种类、NAA;而对成苗率的影响大小依次为6-BA、NAA、糖种类,6-BA对两者的影响均最大,而NAA与糖种类对两者影响有差异。这可能是在分化过程中糖与细胞分裂素之间的相互作用促进了细胞的分化,而在成苗阶段需要较高的生长素才使得糖降为次要。由正交试验的直观分析可确定最优分化与成苗培养条件为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>,即应用MS培养基、6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.02 mg/L、蔗糖30 g/L。该试验中的最高分化和成苗组合分别为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, 173.38%; A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>, 150.19%。根据2个指标6-BA浓度相同,取NAA 0.02、0.04 mg/L用蔗糖30 g/L作对比试验,结果显示,NAA 0.02 mg/L处理分化率为88.02%,该试验平均数上升1.33%,分化幼苗状态与

A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>相同;NAA 0.04 mg/L成苗率为79.62%,该试验平均数上升4.53%,且幼苗色泽新鲜,叶片大小适中,达1.5~2.5 cm 幼苗60%。说明在分化阶段适宜培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L,成苗阶段只需将NAA调整为0.04 mg/L,碳源用蔗糖30 g/L。

方差分析结果见表4,A和C因素对分化率影响极显著,B因素对分化率影响显著,各因素的影响显著性依次为6-BA、糖种类、NAA;3个因素对成苗率影响均极显著,显著性大小依次为6-BA、NAA、糖种类;3个因素对分化率和成苗率的影响程度与正交试验结果一致。单位组间影响不显著。F检验说明各因子水平间存在差异,水平的改变对分化率和成苗率有显著的影响。应进行各因子水平处理平均数差异的多重比较,见表5。根据多重比较可知,分化率和成苗率,A因素3水平平均数间差异均极显著,根据平均值大小选2个水平为好。B因素3个水平间对分化率而言B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>对B<sub>3</sub>均影响显著,B<sub>1</sub>与B<sub>2</sub>不显著,根据平均值大小取B<sub>1</sub>水平为好。对成苗率而言,B因素3水平间B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>对B<sub>3</sub>均影响极显著,B<sub>1</sub>与B<sub>2</sub>不显著,2个水平可任选其一,或取平均值大的B<sub>1</sub>为好。C因素3个水平平均数间,分化率和成苗率C<sub>1</sub>水平的平均数对其它2个水平平均数影响均极显著,因此,取C<sub>1</sub>水平为好。综合上述分析,可确定试验最佳组合各因子值A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>或在成苗阶段为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,与对比试验结果一致。

表 4 芽分化率及成苗率方差分析

变异来源	df	萌芽率			成苗率			F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
		SS	MS	F	SS	MS	F		
A	2	3 430.93	1 715.47	108.23**	4 879.96	2 439.98	93.56**	4.10	7.56
B	2	145.85	72.93	4.6*	539.63	269.82	10.35**	4.10	7.56
C	2	1 035.87	517.94	32.68**	517.07	258.54	9.91**	4.10	7.56
单位组	1	35.93	35.93	2.27	36.58	36.58	1.40	4.96	10.04
误差	10	158.50	15.85		260.84	26.08			
总数	17	4 807.08			6 234.08				

表 5 各因素水平平均数多重比较(SSR)

因素	水平	分化率显著水平			水平	成苗率显著水平		
		平均值	0.05	0.01		平均值	0.05	0.01
A	A <sub>2</sub>	80.88	a	A	A <sub>2</sub>	71.94	a	A
	A <sub>1</sub>	62.55	b	B	A <sub>1</sub>	46.75	b	B
	A <sub>3</sub>	47.11	bc	BC	A <sub>3</sub>	32.07	bc	BC
B	B <sub>1</sub>	65.82	a	A	B <sub>1</sub>	55.50	a	A
	B <sub>2</sub>	65.22	a	A	B <sub>2</sub>	52.57	a	A
	B <sub>3</sub>	59.5	b	A	B <sub>3</sub>	42.70	b	B
C	C <sub>1</sub>	72.61	a	A	C <sub>1</sub>	57.82	a	A
	C <sub>2</sub>	63.90	b	B	C <sub>3</sub>	46.82	b	B
	C <sub>3</sub>	54.04	bc	BC	C <sub>2</sub>	45.79	b	B

3 讨论与结论

根据植物体细胞都携带着发育成完整植株的全部遗传信息的理论,植物任何器官都可以用作外植体,离体培养产生完整植株<sup>[3]</sup>。但不同器官的生理状态、激素水平有差异,各自特性的表达随之不同<sup>[3]</sup>。体细胞胚胎

发生的方式有2种,一种是从培养的器官、组织、细胞或原生质体直接分化成胚,另一种是外植体愈伤化以后由愈伤组织分化成胚,2种形式以后者常见<sup>[4]</sup>。该试验4种器官在相同激素条件下诱导愈伤组织和胚状体表现差异极大,嫩茎为最适外植体。胚状体分化中各个时期

同时存在,部分基部相连,彼此之间难分离。这种不同步的原因,可能一是愈伤组织内部的细胞状态和启动分裂时间不一致;二是胚状体的发生是反复进行的,新的胚胎发生有可能从原细胞群或从胚状体再次产生。待幼小子叶显现,用镊子轻碰即可脱离其他组织时,应该及时分离培养,获得完整植株。避免基部组织及根部交织一起影响分离。

激素是芽分化与成苗不可缺少的关键物质,达克东、吕晋惠研究认为,只有外源激素与内源激素达成某种平衡才能启动外植体不定芽的发生<sup>[5]</sup>,培养基中添加的激素种类、浓度以及配对外植体的分化与成苗起主导作用<sup>[7]</sup>。该试验在 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.08 mg/L 时,分化与成苗明显下降,即高浓度激素抑制了幼苗的分化与生长,表现为幼苗簇状、节间短、颜色浓绿或浅绿、叶片质脆。激素不同浓度组合处理间,芽分化及成苗在色泽、质地、生长状态均有显著差异,BA 1.0 mg/L、NAA 0.02 ~ 0.04 mg/L 时芽分化与成苗为最佳激素配合。

糖在外植体生长发育中作为一种能源和结构物质,还维持培养基的渗透压,糖的种类和用量不仅影响培养物生长速度和生长量,而且影响其代谢水平和形态建成<sup>[8]</sup>。外植体对糖的感知是多重性的,可能同时适应不同的糖种类,或糖与激素的配合,该试验采用 3 种糖做能源材料,配合不同种类和浓度的激素,以蔗糖 30 g/L 获得较高质量的幼苗。组培研究中能源种类是一个不可忽视的问题,在培养基高压灭菌过程中,蔗糖水解为葡萄糖和果糖,这可能正好满足了外植体发育的能源需

要,而添加单一葡萄糖或果糖的处理可能未达到其生理需求。关于糖用量与调节剂的配合、糖在外植体诱导分化过程中的作用机理有待今后的试验予以说明。

总之,该研究表明 4 种不同器官在 MS+2,4-D 1.0 g/L 条件下,嫩茎诱导的胚性愈伤组织及胚状体在数量、质量上优于叶片、叶柄及根,胚性愈伤组织诱导率 93.56%;胚状体诱导率 62.41%,为最适外植体。不同浓度的激素、糖种类对芽分化与成苗影响差异极大,芽分化阶段培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L,成苗阶段培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.04 mg/L,能源为蔗糖 30 g/L。对于参差不齐,交织一起不易分离的幼苗,为便于管理,可切断复壮后再生根。

### 参考文献

- [1] 葛惠贤,张万国.珍贵野生蔬菜的开发利用[M].北京:中国农业出版社,1995:170-178.
- [2] 陈正华.木本植物组织培养及应用[M].北京:高等教育出版社,1986:24-509.
- [3] 夏镇澳.植物组织培养及其在生物技术上的应用[M].北京:科学出版社,1983:233-244.
- [4] 李登科,杜学海.六月鲜枣愈伤组织诱导及胚状体发生[J].果树学报,2004,21(5):414-418.
- [5] 达克东,张松等.丽格海棠叶片培养胚状体发生和植株再生[J].园艺学报,2001,28(2):180-181.
- [6] 吕晋惠,吴月亮,等.菊花叶片不定芽再生体系的研究[J].北京林业大学学报,2005,27(4):97-100.
- [7] 周伟香,龚宁.植物生长调节剂对花叶开唇兰原球茎增殖和分化的影响[J].亚热带植物科学,2007,36(1):17-19.
- [8] 丁世萍,严菊强.糖类在植物组织培养中的效应[J].植物学通报,1998,15(6):42-46.

## Research on Somatic Embryogenesis and Seedling Formation Regulation of *Aralia elata* (Miq) Seem

LI Zheng-nan<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, ZHANG Ai-jun<sup>1</sup>, HU Yi-min<sup>2</sup>, JI Xi-zhu<sup>1</sup>

(1. Mountainous Areas Research Institute, Agricultural University of Hebei, State Research Center for Agri-Engineering Technology in Northern Mountainous Region, Baoding, Hebei 71001; 2. Park Bureau of Baoding, Baoding, Hebei 071001)

**Abstract:** The effects of different kinds of growth regulators and sugar on induction of the callus and somatic embryogenesis, bud differentiation and seedling formation were studied using leaf blade, petiole, tender shoot and root of *Aralia elata* (Miq) Seem. Using 2,4-D 1.0 mg/L as the growth regulator, it showed that the tender shoot was the optimum explants for the callus and somatic induction. The 6-BA was the main factor in bud differentiation and seedling formation. Using Sucrose 30 g/L as the carbon sources, the optimum medium for bud differentiation was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L, while for seedling formation it was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.04 mg/L. The bud differentiate rate was 88.02% and seedling formation rate is 79.62%.

**Key words:** *Aralia elata* (Miq) Seem; somatic; bud differentiation; seedling formation