

# 刺五加形态发生方式的研究

李 香 竹<sup>1</sup>, 李 仙<sup>2</sup>, 孙 春 玉<sup>1</sup>, 张 美 萍<sup>1</sup>, 蒋 世 翠<sup>1</sup>, 王 义<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 生命科学院, 吉林 长春 130118; 2. 哈尔滨工业大学(威海)分校, 山东 威海 264209)

**摘 要:**以刺五加愈伤组织为试材,研究了器官发生途径和体细胞胚胎发生途径获得再生植株的发生机制。结果表明:移栽成活率分别达到47%和86%;刺五加不定芽诱导最适培养基组成为:MS+NAA 0.2 mg/L+BA 3.0 mg/L;体胚诱导的最适培养基组成为:MS+蔗糖 20 g/L+葡萄糖 20 g/L;细胞学观察发现刺五加不定芽大多发生在愈伤组织表面;刺五加体胚发生与合子胚发育过程相似,发生途径为单细胞起源、内部发生。

**关键词:**刺五加;器官发生;体细胞胚胎发生

**中图分类号:**S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2102)12-0120-05

刺五加(*Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim) Harms)为五加科五加属的一种落叶灌木,其根、茎、叶均可入药,是我国医药珍品<sup>[1]</sup>。刺五加本身结实的植丛少,种子产量低、质量差,生长周期较长,加之近年来以刺五加为原料开发出的产品日益受到大家的青睐<sup>[2-4]</sup>,而传统的原料获取方法又是以消耗大量野生植物资源为代价,致使刺五加野生资源消耗与日俱增。早在1992年出版的《中国植物红皮书-稀有濒危植物》中已将刺五加列为濒危物种。近年来相关刺五加的研究多集中于化学成分和药理功能等方面的研究<sup>[5-6]</sup>,而对其器官发生和体胚发生过程缺乏系统研究。现通过对刺五加形态发生方式的探讨,阐明刺五加形态发生机制,以期对刺五加繁殖、遗传转化体系的建立、种质资源创新奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

刺五加愈伤组织(吉林农业大学细胞工程实验室提供);基本培养基:MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.0 g/L;生根培养基:1/2MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.0 g/L;胚性愈伤组织诱导培养基:MS+2,4-D 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.0 g/L;体胚诱导基本培养基:MS+蔗糖 20 g/L+葡萄糖 20 g/L+琼脂

6.0 g/L。

### 1.2 试验方法

1.2.1 刺五加器官发生途径获得再生苗 愈伤组织接种到含有不同浓度 NAA(0.2、0.5、1.0 mg/L)和 BA(2.0、3.0 mg/L)配比的基本培养基上诱导不定芽。

1.2.2 刺五加体胚发生途径获得再生苗 将愈伤组织接种到胚性愈伤组织诱导培养基上诱导胚性愈伤组织。分别将诱导出的胚性愈伤组织接种到含有不同浓度 2,4-D(1.0、2.0、3.0 mg/L),BA(0.5、1.0、1.5 mg/L),NAA(1.0、2.0、3.0 mg/L)配比的体胚诱导基本培养基上,考察不同激素对体胚诱导的影响。23℃,1 000 lx,14 h光照培养。固体培养每28 d继代1次,液体培养120 r/min,每7 d继代1次。选出生长状态基本一致的成熟胚,每16个接种到装有25 mL MS培养基的培养皿中,23℃、2 000 lx、14 h光照条件下培养,每7 d观察1次培养物的生长状态。

1.2.3 定植移栽 定植前先练苗,打开封口膜,倒入10 mL无菌水以防止再生苗缺水死亡。练苗4 d左右,将苗上粘连的培养基洗净后移栽到蛭石:腐殖土:土壤=1:1:1(V:V:V)的基质中。7 d后,喷洒1/2MS液体培养基,室温条件下培养。逐渐稀释培养基的浓度,直至不再喷洒培养基,完成移栽。

1.2.4 细胞学观察 每7 d借助 COIC XDS-B1 倒置显微镜对固体培养物和液体培养物进行观察,29 d时随机抽取3瓶,取单位重量(g)的培养物,检测各类型体胚数和总体胚数并用 SONY DSC-HX1 进行拍照记录。将选定的培养物用 FAA 固定,经过脱水,浸蜡,埋蜡,修块,切片(厚度为10 μm),粘片,脱蜡,爱氏苏木精染色,脱水,透明后制成石蜡切片。

**第一作者简介:**李香竹(1986-),女,在读硕士,研究方向为营养源(健康源)植物资源。E-mail:362745222@qq.com。

**责任作者:**王义(1964-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为药用植物生物技术与种植资源创新。E-mail:wanglaoshi2007@tom.com。

**基金项目:**吉林省科技厅资助项目(20080715)。

**收稿日期:**2012-03-27

1.3 数据分析

采用 DPS 和 SPSS17.0 对所得数据进行分析处理。不定芽诱导率=形成不定芽块数/接种愈伤组织总数×100%。体胚诱导率=产生体细胞胚的块数/接种的胚性愈伤组织总数×100%。体胚萌发率=形成体胚苗的个数/接种的体胚总数×100%。移栽成活率=移栽成活的植株数/移栽植株总数×100%。

2 结果与分析

2.1 器官发生途径形成再生植株

将愈伤组织接种到诱导培养基上培养,30 d 后,愈伤组织表面形成不定芽(图 1)。NAA、BA 组合对不定芽的诱导效果见表 1。其中 NAA 为 0.2 mg/L 时,不定芽诱导率高,各为 45%和 55%。从不定芽生长情况看,NAA 浓度为 0.2 mg/L、BA 浓度为 3.0 mg/L 时,愈伤组织再分化形成大量不定芽,生长速度也最快。应用 DPS 软件对表 1 中的试验数据进行二元多项式回归分析,对诱导率影响的  $P<0.01$ ,对不定芽分化能力影响的  $P<0.05$  说明 NAA 与 BA 组合对不定芽诱导的影响在 0.01 水平表现极显著;对不定芽分化能力的影响在 0.05 水平显著。因此,刺五加不定芽诱导培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L+BA 3.0 mg/L。将诱导出的不定芽接种到生根培养基上诱导生根(图 2)以获得再生植株,生根率为 60%。当再生苗株高大约 5 cm 时进行定植移栽,移栽成活率为 47%。

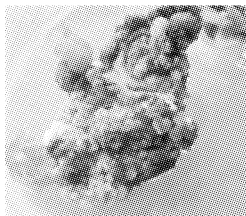


图 1 叶片愈伤组织分化形成不定芽



图 2 诱导生根

Fig.1 Callus of blade differentiated to adventitious bud Fig.2 Induction radicate

表 1 NAA、BA 组合对不定芽的诱导效果

Table 1 Effects of combination of NAA and BA on adventitious bud induction

NAA /mg · L <sup>-1</sup>	BA /mg · L <sup>-1</sup>	诱导率 Induction / %	不定芽分化能力 Adventitious bud differentiation
0.2	2.0	55	+++
0.5	2.0	30	++
1.0	2.0	15	+
0.2	3.0	45	++++
0.5	3.0	30	++
1.0	3.0	20	+

注:“+”表示分化能力,“+”越多分化能力越强。

Note:“+”indicate differentiation,the more “+”the better.

2.2 体胚发生途径获得再生植株

2.2.1 体细胞胚胎的诱导 将不同种类,不同浓度的激

素进行配比,设计了 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验。由表 2 可知,将胚性愈伤接到含有不同激素浓度配比的培养基上,一段时间后在胚性愈伤组织上有淡黄色颗粒状物质生成,即体细胞胚。28 d 时统计体胚的诱导率。对正交实验结果进行极差分析,R 值越大说明该因素的影响作用越大。由分析结果可以看出 R<sub>2,4-D</sub>>R<sub>NAA</sub>>R<sub>BA</sub>,说明 3 种激素对体胚诱导影响的大小为 2,4-D>NAA>BA。在体胚诱导过程中,培养基中 2,4-D 和 NAA 的浓度为提高体胚诱导率的关键。将结果进一步进行方差分析,方差分析结果如表 3,2,4-D 对体胚诱导的影响极显著( $P<0.01$ ),NAA 对体胚诱导的影响达到显著水平( $P<0.05$ )。多重比较结果可以看出,处理组 1 与其它处理组相比具有极显著差异。当 2,4-D、BA、NAA 浓度分别为 1.0、0.5、1.0 mg/L 为最优组合,诱导率最高为 41.67%。说明刺五加体细胞胚胎发生主要受 2,4-D 和 NAA 的影响并随着 2,4-D 和 NAA 浓度的升高而降低,高浓度 2,4-D、NAA 会抑制体胚的发生。诱导体胚发生和成熟通常采用固体培养方式,然而该试验体系中采用固体培养方式尽管通过改善培养基配方能够在一定程度上促进刺五加体细胞胚胎的发生,但总体上看诱导率不高,同步性差。其中球形胚,心形胚,鱼雷形胚,子叶形胚和畸形胚分别占总胚数的 38.03%、12.7%、20.88%、19.86%、16.98%(表 4)。为了使胚性愈伤组织在细胞分

表 2 正交设计与实验结果

Table 2 Orthogonal solution with the experimental result

处理 Treatment	2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	BA /mg · L <sup>-1</sup>	NAA /mg · L <sup>-1</sup>	诱导率 Induction / %
1	1.0	0.5	1.0	41.67aA
2	1.0	1.0	2.0	38.33aAB
3	1.0	1.5	3.0	31.67bB
4	2.0	0.5	2.0	23.30cC
5	2.0	1.0	3.0	15.00dDE
6	2.0	1.5	1.0	21.67cCD
7	3.0	0.5	3.0	8.33dE
8	3.0	0.5	3.0	11.67dE
9	3.0	1.5	2.0	13.30dE
K <sub>1</sub>	37.223	24.433	25.003	
K <sub>2</sub>	19.990	21.667	24.977	
K <sub>3</sub>	11.100	22.213	18.333	
R	26.123	2.766	6.670	

注:在同一行,大写字母代表统计检验 1% 水平差异显著,小写字母代表统计检验 5% 水平差异显著。

Note:In the same line, capital letters stand for significance of 1%, lowercase letters stand for significance of 5%.

表 3 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验方差分析结果

Table 3 Results of the analysis of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) variance

方差来源 Source	SS	df	MS	F	显著性 Significance level
2,4-D	1 058.4484	2	529.2242	572.664	**
BA	12.8817	2	6.4408	6.9695	
NAA	88.6235	2	44.3117	47.9489	*
误差 Error	1.8483	2	0.92414		
总和 Total	1 161.8019	8			

化和获得营养上获得最大的一致性,设计了液体悬浮培养方式。在悬浮培养的第5天观察到有少量球形胚的发生,到第17天时开始大量产生体胚,大部为球形胚,也有少量的心形胚和鱼雷形胚,没有子叶形胚。由表4可知,直到第29天时,大部分体胚处于球形胚阶段,球形胚占总胚数的65.58%。液体悬浮培养产生体胚的数量远

远多于固体培养。对所得数据进行t检验的结果如表5,球形胚的t-value t值为-53.000;自由度为2;双尾t检验的显著性概率为0.0000,即小于0.0001。可以得出结论,由于 $P=0.000$ ,小于0.01。说明液体培养与固体培养相比对于球形胚的形成具有显著的促进作用。

表4 不同培养方式对刺五加体胚发生的影响

Table 4 Effect of different culture methods on somatic embryogenesis

培养方式	总胚数	球形胚	心形胚	鱼雷形胚	子叶形胚	畸形胚
Training method	Total embryos/n	Globular embryos/n	Heart-shaped embryos/n	Torpedo-shaped embryos/n	Cotyledon-shaped embryos/n	Abnormal embryo/n
固体培养	66.3±6.6583	22.3±1.1547	8.0±1.0000	12.3±2.5166	11.7±0.5774	10.0±1.7321
液体培养	88.3±3.0551	57.7±1.1547	8.7±1.1547	9.0±2.0000	7.3±1.5275	5.7±1.5275

注:表中各值为每克鲜重培养物中各时期体胚的平均数。3次重复检测。

Note: The values represent the average number of each type of somatic embryos per gram fresh embryonic calli, there were 3 replicate.

表5 T值检验分析结果

Table 5 Results of the T-value texts and analysis

数据来源	Std D	Std E	df	t	sig
Source					
总胚	5.00000	2.88675	2	-7.621	0.017
Total embryo					
球形胚	1.15470	0.66667	2	-53.000	0.000
Globular embryo					
心形胚	0.57735	0.33333	2	-2.000	0.184
Heart-shaped embryo					
鱼雷形胚	3.78594	2.18581	2	1.525	0.267
Torpedo-shaped embryo					
子叶形胚	1.15470	0.66667	2	6.500	0.023
Cotyledon-shaped embryo					
畸形胚	2.51661	1.45297	2	2.982	0.096
Abnormal embryo					

2.2.2 体胚苗的获得 如图3-A所示,生长状态基本一致的成熟胚在接种到无激素的MS培养基上后逐渐发育,培养到第14天时叶片颜色加深,并长出根状物(图3-B)。28d时长成株高3cm,掌状复叶互生、小叶3片、叶上表面有细小绒毛,茎纤细,1条主根的幼苗(图3-C)。体胚萌发率为93%。3个月后长成株高5cm,叶片深绿、肥厚、表面光滑、有蜡质感;茎粗壮;根系发达(图3-D,G),可移栽(图3-E),移栽成活率为86%。在成熟胚向完整植株的发育过程中有畸形苗形成(图3-F),有些畸形苗在后期的生长发育过程中仍能继续存活并长成完整植株。试验中有部分体胚苗直接生成体细胞胚(图3-H)。由此可知,刺五加体胚的获得既有间接发生途径,也有直接发生途径。

### 2.3 细胞学观察

刺五加体细胞胚的形态发生与大多数双子叶植物相同,经历了与合子胚的形态发生相类似的阶段(图4),即球形胚、心形胚、鱼雷形胚、子叶胚,最终发育成完整植株。其中也有畸形胚的产生,如图4-E为含有5片子叶的畸形胚。位于愈伤组织内部将要发育成体胚的胚性细胞经过多次分裂,依次形成2细胞原胚(图5-A)、3细胞原胚(图5-B)、四细胞原胚(图6)和多细胞原胚(图5-A),并进一步发育成一个球形原胚(图5-D)。这说明

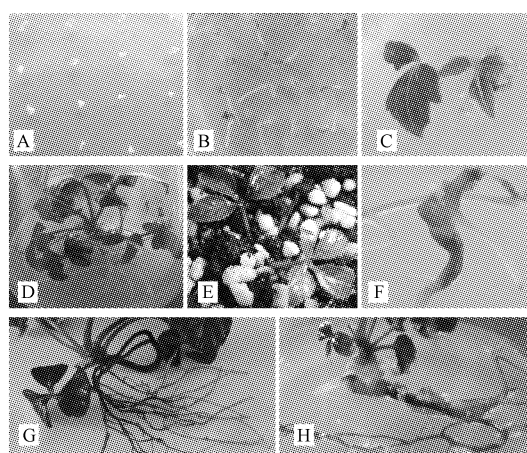


图3 刺五加体胚发生途径获得再生植株

注:A:生长状态一致的成熟胚;B:体胚萌发;C:28d的幼苗;D:3个月时期的植株;E:移栽苗;F:畸形苗;G:3个月时期的植株所长的根;H:直接发生途径形成体胚。

Fig. 3 Somatic embryo germination and plant establishment of *Acanthopanax senticosus*

Note: A: Mature embryos in the same growth state; B: Germination of somatic embryos; C: 28 d seedling; D: Three months old plant; E: Transplanting plant; F: Abnormal seedlings; G: Three months old plant's roots; H: Obtain somatic embryos by pathway of occur directly.

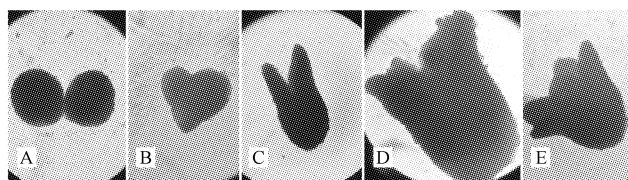


图4 刺五加处于不同发育时期的体细胞胚

注:A:球形胚,10×10;B:心形胚,10×10;C:鱼雷形胚,10×10;D:子叶胚,10×10;E:畸形胚,10×10。

Fig. 4 Somatic embryos at different developmental stages in the cultures of *Acanthopanax senticosus*

Note: A: Globular embryo, 10×10; B: heart-shaped embryo, 10×10; C: torpedo-shaped embryo, 10×10; D: Cotyledonary embryo, 10×10; E: Abnormal embryo, 10×10.



刺五加体胚发生为愈伤组织内部,单细胞起源。非胚性细胞大而不规则,排列松散,看不到明显的细胞核,细胞高度液泡化,染色浅(图 5-C)。胚性细胞能看到明显的

细胞核,细胞体积小,细胞排列紧密。从图 5-D、E、F 上能容易观察到体细胞胚与周围细胞的明显界限。刺五加不定芽大多发生在愈伤组织表面(图 7)。

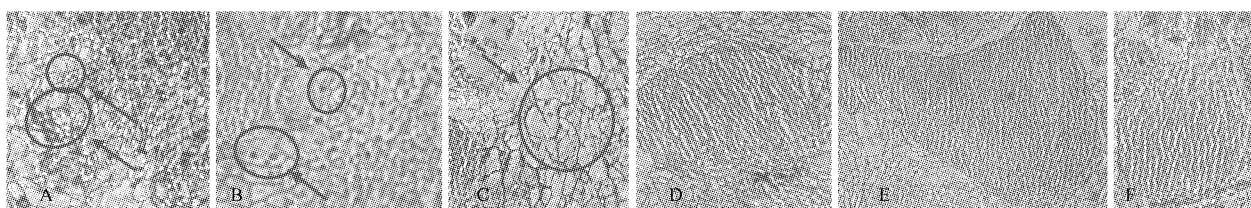


图 5 刺五加体细胞胚胎发生组织学观察

注:A:二细胞原胚和多细胞原胚(箭头所指), $10\times 40$ ;B:单细胞原胚和三细胞原胚(箭头所指), $10\times 40$ ;C:非胚性愈伤组织(箭头所指), $10\times 40$ ;D:球形胚, $10\times 10$ ;E:心形胚, $10\times 10$ ;F:鱼雷形胚, $10\times 10$ 。

Fig. 5 Histological observation on somatic embryogenesis of *Acanthopanax senticosus*

Note: A: Two-celled stage and multicellular proembryo (arrow heads),  $10\times 40$ ; B: Single cell and three-celled stage proembryo (arrow heads),  $10\times 40$ ; C: Non-embryonic calli (arrow heads),  $10\times 40$ ; D: Globular embryo,  $10\times 10$ ; E: heart-shaped embryo,  $10\times 10$ ; F: torpedo-shaped embryo,  $10\times 10$ .

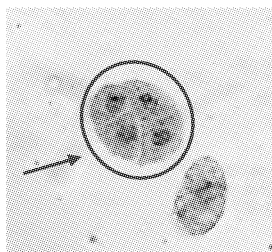


图 6 四细胞原胚, $10\times 10$

Fig. 6 Four-celled stage proembryo (arrow heads),  $10\times 10$

### 3 讨论与结论

#### 3.1 影响体胚诱导的因素

植物激素是调控体胚发生的重要物质,许多研究表明在体胚细胞分化过程中,外源激素的诱导可能引起体内激素水平的变化,继而启动一系列的信号转导和基因表达,以利于体胚的发生。多数学者使用 2,4-D 在不同的植物中诱导出了体细胞胚,据统计,57.7%的植物体细胞胚诱导阶段均使用 2,4-D<sup>[7]</sup>。在该试验中 2,4-D 的作用具有阶段性,在诱导胚性愈伤阶段起促进作用,而在胚状体发生、发育阶段则起抑制作用。培养植物体细胞胚的方式有液体悬浮培养、固体培养和固液交替培养 3 种。不同培养对体细胞胚的发生具有明显影响。曹景林等<sup>[8]</sup>研究表明,棉花胚性愈伤用液体-固体交替培养体系获得的体细胞胚数量分别是单纯悬浮培养和固体培养的 16.5 倍和 4 倍。在该试验中也发现悬浮培养有利于体胚的诱导,但不利于心形胚向子叶形胚的过度。在体胚诱导过程中有畸形胚产生,分析其原因可能是:刺五加体胚发生高度不同步化,处于各时期的体胚对养分摄取的能力不同,造成部分体胚在某一时期因养分供给不足而产生畸变;体胚间存在竞争关系,为抑制周围体胚正常生长发育而释放某种物质导致畸形胚的生成;体胚与合子胚相比,因为其外部没有种皮和胚乳的包被而对外界环境更为敏感,因接受到外界环境的某种刺激而

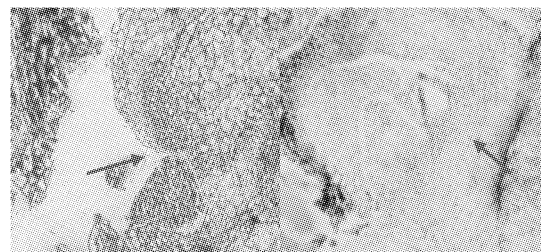


图 7 芽的形成, $10\times 10$

Fig. 7 Formation of bud,  $10\times 10$

产生畸变。具体原因还有待进一步深入研究。

#### 3.2 刺五加再生植株的获得

刺五加传统的种子繁殖要将当年的种子与河沙按 1:3 的比例、15% 的湿度、4℃ 层积 3 个月,从种子萌发到开花结果生成新的种子需要 4~5 a 的时间,并且萌发率低。该试验通过器官发生途径和体胚发生途径均获得了再生植株。通过体胚发生途径获得的再生苗与器官发生途径相比植株完整、根系发达、繁殖速度快,发生量大,成苗率和移栽成活率高,大大缩短了刺五加的繁殖时间。体胚发生途径进行快速繁殖与以刺五加腋芽为外植体进行组培快繁<sup>[9]</sup>相比具有生根容易,不需添加任何激素,且成苗率高等优点。为利用植物生物反应器大量生产体胚,制备人工种子和刺五加的资源开发提供大量的原材料。在体胚发育过程中产生的畸形胚进一步生长可发育成异常苗,对刺五加种质资源创新具有重要意义。在细胞学观察中可以看出刺五加体胚与合子胚发生过程极为相似。可为五加科植物胚胎发生模式的研究提供新的材料。

#### 3.3 关于刺五加体胚的起源与发生部位

关于胚状体起源一直有 2 种观点,大部分学者认为体细胞胚起源于单个细胞,也有部分认为起源于胚性细胞团或胚性细胞复合体。江荣翠<sup>[10]</sup>在对滇楸体细胞胚胎发生及其机理的研究中发现,滇楸体胚发生存在内部

发生和外部发生 2 种方式,起源于单细胞。张存旭等<sup>[11]</sup>通过对栓皮栎体细胞胚胎发生的研究也揭示了栓皮栎体胚为单细胞起源。但也有研究表明体细胞胚胎的起源方式为多细胞或 2 种起源方式并存。如陈春玲等<sup>[12]</sup>在龙眼体细胞胚胎发生过程中观察到 2 种起源方式。胚状体起源部位因植物种类而异,既有内起源也有外起源。在该试验中仅观察到刺五加为愈伤组织内部发生,单细胞起源。

### 参考文献

- [1] 杨春澍. 药用植物学[M]. 上海:上海科学出版社,1997.
- [2] 梁永海. 刺五加发酵乳饮料的生产工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2):34-37.
- [3] 冯翠芹,李强,顾利文. 刺五加果汁保健饮料的研制[J]. 酿酒, 2005, 32(4):90.
- [4] 董庆武. 刺五加的栽培技术[J]. 人参研究, 2006(2):32-33.
- [5] 温筱煦,刘蔚,邓锡军,等. 刺五加提取物的总黄酮含量测定及其对血液流变学的影响[J]. 解放军医学学报, 2006, 22(3):197-199.
- [6] 张玥秀,吴兆华,高慧媛,等. 刺五加茎叶化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 22:110-112.
- [7] 冯大领,孟祥书,王艳辉,等. 植物生长调节剂在植物体细胞胚发生中的应用[J]. 核农学报, 2007, 21(3):256-260.
- [8] 曹景林,张献龙,金双侠,等. 棉花高效体细胞胚发生及同步控制培养体系研究[J]. 作物学报, 2008, 34(2):224-231.
- [9] 褚丽敏,孙周平. 刺五加组培快繁的研究[J]. 植物研究, 2009, 29(4):505-508.
- [10] 江荣翠. 滇楸体细胞胚胎发生及其机理研究[M]. 南京:南京林业大学, 2010(6):41-42.
- [11] 张存旭,姚增玉,赵忠,等. 栓皮栎体细胞胚胎发生的细胞组织学观察[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(1):33-38.
- [12] 陈春玲,赖钟雄. 龙眼胚性愈伤组织体胚发生同步化调控及组织细胞学观察[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(2):192-194.

## Study on the Morphogenesis Way of *Acanthopanax senticosus*

LI Xiang-zhu<sup>1</sup>, LI Xian<sup>2</sup>, SUN Chun-yu<sup>1</sup>, ZHANG Mei-ping<sup>1</sup>, JIANG Shi-cui<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

**Abstract:** Using *Acanthopanax senticosus* calli as materials, the regeneration plants through organogenesis and somatic embryogenesis were got. The results showed that the transplanting survival rate was 47% (organogenesis) and 86% (somatic embryogenesis), respectively. Best combination for adventitious bud was MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 3.0 mg/L BA; while for somatic embryogenesis, MS medium supplemented with 20 g/L sucrose, 20 g/L glucose without hormonal was better than others. Histological observation showed that buds mostly formed on the surface of the callus, and somatic embryogenesis was similar to the process of zygotic embryogenesis, and it could be induced from internal callus and originated single cell.

**Key words:** *Acanthopanax senticosus*; organogenesis; somatic embryogenesis