

西洋参体细胞胚成熟萌发研究

秦公伟^{1,2}, 曹小勇^{1,2}, 徐皓^{1,2}, 赵桦^{1,2}, 黄秋萍², 贺帆帆²

(1. 陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

摘要:以西洋参种胚诱导愈伤组织上的体细胞胚(胚状体)为试材, 采用离体培养方法, 研究胚状体自身发育阶段及用于成熟、萌发生长的培养基的组成因子对其成熟萌发的影响, 以期确定最佳的胚状体成熟培养基和萌发培养基。结果表明:发育阶段为鱼雷形的胚状体, 是进行成熟培养的最佳材料;胚状体成熟的最佳培养基是 0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC;在此培养基上胚状体生长变大, 子叶生长展开, 胚芽、胚根肉眼可见;成熟培养基中植物生长调节物质在活性炭作用下缓慢释放并作用于胚状体, 达到形成大量正常、健壮、同步胚状体的目的;胚状体萌发的最佳培养基是 0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃;在此培养基上胚状体萌发生长, 胚芽伸长真叶展开。

关键词:西洋参;种胚;胚状体

中图分类号:S 567.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0084-04

西洋参(*Panax quinquefolium* L.)是生长于北美原始森林之中的古老植物, 具有活化石之称, 是一种名贵的中药, 经济价值颇高^[1]。西洋参原产于北美洲, 1975 年以后, 我国陆续从美国引进西洋参种子, 分别在黑龙江、吉林、辽宁、北京、河北、山东、陕西等省及直辖市引种栽培, 其中在陕西秦巴山区普遍栽培, 成为全国三大种植基地之一^[1-3]。

西洋参自然条件下生长缓慢, 病虫害严重, 而良种选育、提纯复壮是亟待解决的问题之一^[4]。常规栽培育种方法已取得一些成绩, 而细胞工程技术为解决上述问题提供了一条捷径, 可以缩短育种年限, 加快育种进程^[5-6]。

前人已进行了种胚的愈伤组织诱导、体细胞胚形成的研究, 对于体细胞胚发生后的成熟萌发由于处于再生体系研究的下游因而少有报道^[3,5-10]。众所周知愈伤组织上的胚状体结构如同种子内的种胚, 考虑其大小、成熟度一致性, 对于获得整齐、强壮的再生植株非常关键;刘本叶等^[11]研究指出, 控制培养条件, 使愈伤组织上形成大量正常、健壮、同步的胚状体, 进而提高再生植株的频率, 是今后研究的重点;同时发现前人^[12-15]的萌发培养基还可以优化;故现在前人的研究基础上, 以西洋参愈伤组织上胚状体为试材, 研究胚状体发育阶段、成熟培养基和萌发培养基组成因素对胚状体成熟萌发的影

响, 以期胚状体能像种子内种胚一样同步成熟、同时萌发, 茁壮生长, 为西洋参植株再生体系优化, 及进一步生物技术育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

西洋参种子购自陕西省秦巴山区留坝县。以西洋参裂口种子种胚, 在愈伤组织和胚状体诱导培养基 MS+1.5 mg/L 2,4-D+5%蔗糖上, 诱导的愈伤组织分化的胚状体为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 胚状体的成熟培养基研究 选用无机盐含量高、微量元素全的 MS(蔗糖浓度 3%, 琼脂浓度 0.6%, pH 5.8)为基本培养基, 将其大量元素、微量元素、铁盐和有机物质均减半, 标记为 0.5M;在 0.5M 基础上进一步添加活性炭(AC)、植物生长调节物质激动素(KT)、6-卞氨基嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、赤霉素 3(GA₃), 具体培养基组成因子及浓度见表 1。

表 1 胚状体成熟培养基

Table 1 Somatic embryos maturing medium

培养基编号 Medium No.	激动素 KT /(mg·L ⁻¹)	6-卞氨基嘌呤 6-BA /(mg·L ⁻¹)	萘乙酸 NAA /(mg·L ⁻¹)	赤霉素 3 GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	活性炭 AC /%
M1	0.3	0	2	5	1
M2	0	0.4	2	5	1
M3	0	0.4	0	5	1
M4	0	0	2	5	1
M5	0	0	0	5	1
M6	0	0.5	2	5	1

1.2.2 胚状体萌发培养基研究 选用 0.5M 培养基(同 1.2.1)作为基本培养基, 在此基础上, 去除硝酸铵, 标记

第一作者简介:秦公伟(1980-), 男, 陕西渭南人, 博士研究生, 讲师, 现主要从事秦巴生物资源保护与产业化开发利用等研究工作。E-mail:slg357@snut.edu.cn.

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划资助项目(12JK0847);陕西理工学院专项科研基金资助项目(SLGKY12-09);陕西理工学院 2014 年大学生创新创业训练计划资助项目(UIRP14055)。

收稿日期:2015-07-24

为 0.5MA;根据试验要求添加不同种类和浓度的生长调节物质,各处理见表 2。

表 2 胚状体萌发培养基

培养基编号	6-苧氨基嘌呤	萘乙酸	赤霉素 3
Medium No.	6-BA	NAA	GA ₃
G1	0.4	2	5
G2	0	2	5
G3	0	0	5
G4	0	0	10

1.2.3 接种与培养 超净工作台内,无菌操作将培养瓶内愈伤组织整块置于铺有滤纸的无菌培养皿内,镊子夹取胚状体(连同部分愈伤组织一起),接种于表 1 胚状体成熟培养基中。每处理接 30 瓶,每瓶接 4 个以上胚状体。胚状体成熟后,转接于表 2 萌发培养基中。每处理接 30 瓶,每瓶接 1 个以上胚状体。组培室内培养,温度(25±2)℃,光照时间 12 h/d,胚状体成熟光照强度 2 000 lx,胚状体萌发光照强度 3 000 lx。

1.3 项目测定

培养定期观察,记录外植体性状特征变化;培养 40 d 后统计胚状体成熟数量,培养 30 d 后统计成熟胚状体萌发成苗数量。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 胚状体成熟的研究

从表 3 和图 1 可以看出,胚状体成熟的最佳培养基是 M2(0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC),胚状体生长变大,子叶生长展开,胚芽、胚根肉眼可见,胚芽绿色、胚根白色,效果较满意;成熟培养基 M1 与 M2 比较,前者子叶生长更大,后者胚芽更明显,且有 10%成熟胚状体萌发。分析原因应是细胞分裂素的种类和浓度及分子稳定性不同的结果,激动素被胚状体吸收后更强的促进子叶生长,而 6-BA 更强作用于胚芽甚至促进胚状体萌发。成熟培养基 M6 与 M2 比较,添加 0.5 mg/L 6-BA 导致胚状体下胚轴、胚根一定程度愈伤化;成熟培养基 M3、M4、M5 分别与 M2 比较,胚状体成熟率均不如 M2,且分别同时存在其它缺点,在此不赘述。

表 3 不同成熟培养基上胚状体的成熟

培养基编号	接种数量	成熟数量	成熟率
Medium No.	Inoculation quatity/个	Maturation quatity/个	Maturation rate/%
M1	126	102	81
M2	142	140	99
M3	126	81	64
M4	140	90	64
M5	132	97	73
M6	129	128	99



注:A.培养基 M1(0.5M+0.3 mg/L KT+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC);B.培养基 M2(0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC)。

Note: A. Medium M1(0.5M+0.3 mg/L KT+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC); B. Medium M2(0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC)。

图 1 胚状体在成熟培养基上成熟

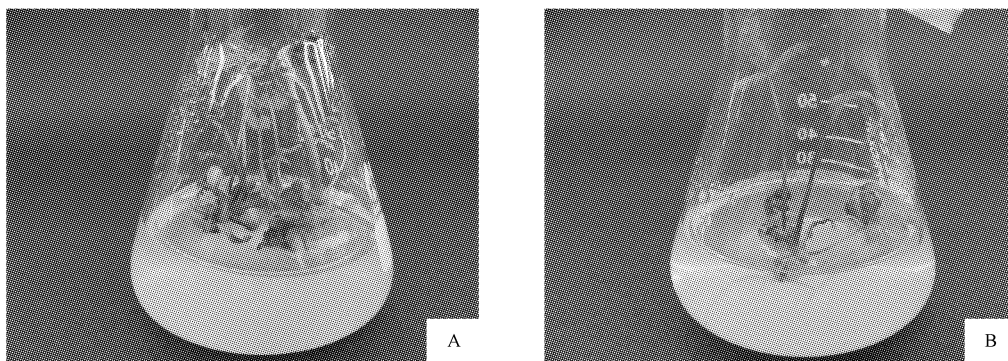
Fig. 1 Somatic embryos matured in a mature medium

2.2 再生植株的生长条件分析

从表 4 和图 2 可以看出,胚状体萌发的最佳培养基是 G1(0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃),胚芽伸长、真叶展开,培养效果比较满意。培养基 G1 和 G2 比较,前者茎叶生长更好(多个芽),苗粗壮,胚根生长不是很好,有一定程度愈伤,后者胚根生长好,茎叶生长弱。胚状体萌发形态上的差异,应是 G1、G2 细胞分裂素 0.4 mg/L 的 6-BA 有无造成的。培养基 G3、G4 和 G1 比较,苗弱,胚根生长一般。

表 4 不同萌发培养基上成熟胚状体的萌发

培养基编号	接种数量	萌发数量	萌发率
Medium No.	Inoculation quatity /个	Germination quatity /个	Germination rate /%
G1	42	42	100
G2	52	49	96
G3	48	46	96
G4	46	45	98



注:A. 培养基 G1(0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃);B. 培养基 G2(0.5MA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃)。

Note:A. Medium G1(0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃);B. Medium G2(0.5MA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃)。

图2 萌发培养基上胚状体萌发成苗

Fig. 2 Plantlets germinated from a somatic embryo in a germination medium

3 结论与讨论

胚状体成熟的最佳培养基是 0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1%AC。胚状体成熟培养基,激素在活性炭作用下缓慢释放并作用于胚状体,达到了形成大量正常、健壮、同步的胚状体的效果。用于胚状体成熟的培养基前人尚少见研究。

发育阶段为鱼雷形的胚状体,是转接进入下一步培养,即转接胚状体进入成熟培养基的最佳材料。在研究中发现,胚状体发育阶段,对于胚状体成熟萌发有着重要影响。愈伤组织上胚状体鱼雷形进行转接,7 d 后子叶开始生长变大,胚芽胚根明显生长。如果心形期就进行转接,会发现其发育仍是先发育形成鱼雷形胚状体,然后才像鱼雷形胚那样经历子叶形向成熟胚状体发育。同时值得注意的是,愈伤组织上胚状体发育到子叶形后将停止发育,要尽快转接,否则胚状体颜色变成米白色已呈衰老状态;这种胚状体转接,50%以上褐化死亡。研究中发现胚状体发育到鱼雷形,转接最合适;与西洋参果实成熟时采摘,种胚也处于鱼雷形胚中后期,然后改变环境(进行层积处理)进一步发育相一致^[16]。

胚状体萌发的最佳培养基是 G1(0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃),效果比较满意,但胚根生长不是很好,有一定程度愈伤。G1 胚根的生长还希望进一步提高;如何使胚状体的胚芽、胚根均得到很好的生长是需要进一步努力的。

胚状体萌发培养基相比胚状体成熟培养基,差别在于去除了大量元素中的硝酸铵和活性炭;去除硝酸铵,是考虑硝酸铵对生根不利^[6];在萌发培养基中,接种的均是成熟胚状体,需要快速萌发,必然需要去除活性炭作用。

如果将西洋参体细胞胚的无性繁殖系建立起来,进行细胞和组织水平上的抗病等突变体筛选,乃至抗性育

种就有可能实现^[5];该试验的研究工作旨在为西洋参体细胞胚无性繁殖系的建立提供参考。

参考文献

- [1] 崔德深,高镇生. 西洋参[M]. 北京:科学出版社,1984.
- [2] 陈福民,化文平,王喆之. 陕西留坝县西洋参规范化种植基地适宜性研究[J]. 陕西农业科学,2009(3):46-48.
- [3] 晋海军,秦公伟,刘艳丽,等. 2,4-D 对成熟与非成熟西洋参种胚体细胞胚发生的影响[J]. 北方园艺,2011(23):114-116.
- [4] 王启明. 加快陕西秦岭山区西洋参产业发展的思考与建议[J]. 人参研究,2008(3):45-46.
- [5] 杨振堂,胡桂珍. 西洋参离体胚培养及体细胞胚胎发生[J]. 特产研究,1995(2):16-18.
- [6] 汤飞宇,翟志席,郭玉海. 西洋参体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 中国农业科技导报,2004,6(5):23-26.
- [7] 桂耀林,郭仲琛,徐廷玉. 西洋参组织培养中的胚胎发生[J]. 植物学报,1987,29(2):223-224.
- [8] 姜国勇. 西洋参胚性愈伤组织诱导因素的研究[J]. 山东农业科学,1995(4):29-30.
- [9] 胡选萍,曹小勇,秦公伟,等. 西洋参不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):48-50.
- [10] 晋海军,秦公伟,刘艳丽,等. 不同生长素对西洋参成熟种胚及离体子叶体细胞胚发生影响研究[J]. 中药材,2012,35(1):15-17.
- [11] 刘本叶,张艳萍. 西洋参组织和细胞培养研究进展[J]. 中草药,1995,26(11):611-613.
- [12] 刘俊能. 西洋参种子诱导再生株研究[J]. 中药材,1996,19(10):487-489.
- [13] KIRN O T, KIM T S, IN D S, et al. Optimization of direct somatic embryo genesis from mature zygotic embryos of *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. Journal of Plant Biology, 2006, 49(5):348-352.
- [14] ZHOU S J, BROWN C W. High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants[J]. Plant Cell Rep, 2006, 25:166-173.
- [15] 秦公伟,张力,晋海军,等. 外源激素对不同后熟程度西洋参种子种胚成苗的影响[J]. 种子,2011,30(11):41-44.
- [16] 代晓蕾,李先恩,郭巧生. 西洋参果实及种子生长发育初步研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2272-2275.

绣线梅组织培养技术

袁柳祥¹, 李厚华¹, 付林江², 马凯恒³, 刘小微¹, 唐豆豆¹

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 六盘水师范学院, 贵州 六盘水 553000;

3. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以绣线梅(*Neillia thyrsiflora*)的茎尖或带腋芽的茎段为外植体, 采用组织培养技术, 研究了绣线梅快速繁殖体系。结果表明:芽诱导最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 诱导率为 90%; MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为最佳增殖培养基, 增殖系数达 7.5; 1/2MS+IBA 0.2 mg/L 为最佳生根培养基, 生根率 66.7%。

关键词:绣线梅; 组织培养; 茎段

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)24-0087-03

绣线梅(*Neillia thyrsiflora*)属蔷薇科(Rosaceae)绣线梅属(*Neillia*)落叶灌木, 高 2 m 左右, 幼枝绿色; 叶片卵形至卵状长圆形; 总状花序, 花瓣圆形或倒卵形, 粉红色或淡粉红色^[1], 具有良好的观赏价值。任学敏等^[2]对秦岭山地主要野生木本观赏植物资源进行评价时将绣

线梅列为具有开发利用价值的植物。

绣线梅在野外的分布比较聚集, 主要靠萌蘖繁殖, 采集的种子经过多种发芽试验, 发现发芽率极低, 种子繁殖能力差。而现代化建设步伐的迅速, 自然景区和通山公路的修筑, 在很大程度上会破坏绣线梅的生存环境, 绣线梅面临濒危境地的可能性也会越来越大, 因此开启对绣线梅的研究保护迫在眉睫。然而国内外对绣线梅属植物的研究鲜有报道, 仅见于蒙玉霞等^[3]对中华绣线梅扦插繁育技术的试验和 OH 等^[4-5]对绣线梅属植物中的 LEAFY 在其系统发育中作用的研究报道, 对于绣线梅的相关研究则几乎空白。现通过构建绣线梅组织培养体系, 以期解决绣线梅种子繁殖难的问题, 为今后其在园林绿化中的大量应用提供技术支持。

第一作者简介:袁柳祥(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为园林植物分子生物学。E-mail: 961004274@qq.com.

责任作者:李厚华(1973-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物基因工程和类黄酮次生代谢等研究工作。E-mail: lihoushua73@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201204308); 西北农林科技大学基本科研业务费资助项目(QN2013079)。

收稿日期:2015-07-24

Maturation and Germination of Somatic Embryos of *Panax quinquefolium* L.

QIN Gongwei^{1,2}, CAO Xiaoyong^{1,2}, XU Hao^{1,2}, ZHAO Hua^{1,2}, HUANG Qiuping², HE Fanfan²

(1. Bioresources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001; 2. School of Biological Science and Engineering University of Technology, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract: Taking *Panax quinquefolium* L. embryo tissue of somatic embryo callus (embryoid) as test materials, using the method of *in vitro* culture, the effect of somatic embryo form and composition of medium for its mature and germination were investigated, in order to determine the best grow mature embryoid culture medium and culture medium. The results showed that the torpedo of somatic embryos was the best form transferred for mature culture; the best mature medium 0.5M+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+1% AC, in which somatic embryos grew bigger, cotyledon expanded, germ and radicle grew visible to the naked eye; plant growth regulating substances under the effect of activated carbon released slow, purposed to form a large number of normal, robust, synchronous somatic embryo were achieved; the best germination medium was 0.5MA+0.4 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃, in which somatic embryos germinated, its plumule elongated and the leaf expanded.

Keywords: *Panax quinquefolium* L.; zygotic embryo; somatic embryos