

# 麦草畏、水杨酸对西洋参成熟种胚体细胞胚发生的影响

刘 政, 杨 国 鹏, 曹 小 勇, 秦 公 伟, 胡 选 萍

(陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

**摘 要:**以西洋参成熟种胚为试材,以不加激素和添加 0.5 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基为对照,研究了不同浓度(0.05~2.00 mg/L)麦草畏、水杨酸对西洋参体胚发生的影响。结果表明:未添加激素的空白培养基没有愈伤和体胚发生;在附加 2,4-D 的培养基中愈伤和体胚发生率为 100%;5 个浓度的麦草畏和水杨酸均能诱导出体胚,其中 1.00 mg/L 麦草畏的效果最佳,体胚发生率为 56.60%,水杨酸处理下体胚发生率最高为 7.50%;在各种浓度的水杨酸中种胚生长量比对照小且褐化严重。说明麦草畏、水杨酸均可诱导西洋参成熟种胚体细胞胚发生,诱导能力 2,4-D>麦草畏>水杨酸;水杨酸对种胚生长有抑制作用。

**关键词:**西洋参;成熟种胚;麦草畏;水杨酸;体胚发生

**中图分类号:**S 567.5<sup>+</sup>3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0099-04

西洋参(*Panax quinquefolium*)属五加科人参属多年生草本植物,又名花旗参、美国参,原产于美国和加拿大。西洋参生长缓慢,对生长环境要求严格,栽培技术复杂,存在种胚后熟现象,在自然状态下需要长达 20~22 个月才能打破休眠<sup>[1]</sup>。到目前为止人们在西洋参的组织培养及体细胞胚胎发生方面已经做了较为深入和系统的研究,但至今尚未确立稳定的西洋参快速繁殖体系<sup>[2]</sup>。如果与常规育种方法相结合,通过离体培养技术,建立体细胞胚胎发生的无性繁殖系,就可以缩短育

种年限,加快育种进程<sup>[3]</sup>。

麦草畏(dicamba)是一种除草剂,其结构和作用类似于 2,4-D,在提高愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率方面具有一定作用<sup>[4]</sup>。WANG<sup>[5]</sup>以西洋参根,TIRAJOH 等<sup>[6]</sup>以西洋参根、叶和上胚轴为外植体研究了麦草畏在诱导愈伤和体胚上的作用。水杨酸(salicylic acid,SA)是一类由植物产生的酚类物<sup>[7]</sup>,是植物体内普遍存在的内源信号分子之一,已被确认是一种植物激素<sup>[8]</sup>。大量研究发现,外源水杨酸能影响植物多种生理过程,如蒸腾作用、气孔关闭、种子萌发、果实成熟、开花、植物产热、植物抗病等<sup>[9-12]</sup>。HAMIDOU 等<sup>[13]</sup>,BEHZAD 等<sup>[14]</sup>对水杨酸在诱导愈伤和体胚方面做了一些研究。麦草畏和水杨酸能否诱导西洋参成熟种胚体胚发生尚鲜见报道。现利用添加不同浓度麦草畏和水杨酸的 MS 培养基对西洋参成熟种胚进行离体培养,观察愈伤组织及胚状体的发生,了解麦草畏和水杨酸的作用,为西洋

**第一作者简介:**刘政(1986-),男,河南确山人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:690008831@qq.com.

**责任作者:**曹小勇(1964-),男,硕士,教授,现主要从事植物资源保护与功能成分等研究工作。E-mail:caoxiyong@163.com.

**基金项目:**陕西省重点实验室科研资助项目(13JS020);陕西省重点学科专项建设经费资助项目。

**收稿日期:**2015-07-24

adventitious buds. The induction frequency of adventitious buds would be highest when the media were added with concentration of 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA for the cultivars of three *Brassica oleracea* var. *acephala* and so-called optimal medium for the three cultivars. According to the order from high to low, the ranking of frequencies of adventitious bud induction for three cultivars was 'Hong'ou', 'Bai'ou' and 'Zhouyehongxin'. Cultivar 'Hong'ou', therefore, was considered to be the suitable explant for the genetic transformation. The minimum inhibitory concentration of bialaphos-sodium and spectinomycin in induction medium for 'Hong'ou' cultivar was 4 mg/L and 50 mg/L separately. These results provided technical support for chloroplast transformation of *Brassica oleracea* var. *acephala* to implement genetic improvement.

**Keywords:** *Brassica oleracea* var. *acephala*; adventitious bud induction; chloroplast transformation; selection; high frequency regeneration

参快繁和植物组织培养积累相关资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试所用西洋参种子采购于陕西省留坝县西洋参标准化示范区,经1年沙藏处理,种子已裂口,胚率85%~95%(图1)。

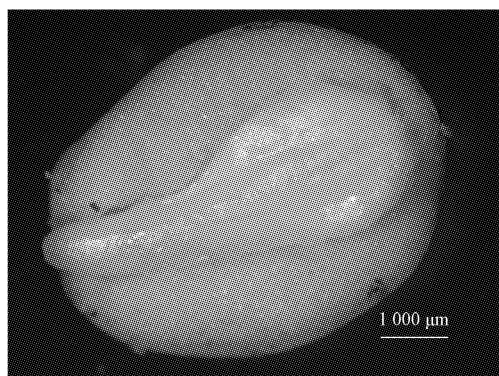


图1 西洋参成熟种胚解剖图

Fig. 1 American ginseng mature embryo anatomy

### 1.2 试验方法

挑选籽粒饱满且已裂口的种子,剥去种皮,流水冲洗2 h,转入超净工作台中,用75%酒精处理30 s,0.1%升汞浸泡消毒10 min,无菌水漂洗5次后,快速分装到无菌培养皿中,剥出种胚,分别接种到含不同浓度(0.05~2.00 mg/L)的麦草畏、水杨酸的MS培养基中,与不加激素和添加0.5 mg/L 2,4-D的MS培养基作对照,培养

表2 不同浓度麦草畏的效果

Table 2 The effect of different concentrations of dicamba

培养基编号 Medium number	接种外植体数 Inoculation of explants/个	愈伤组织块数 Callus blocks/个	愈伤组织发生率 Callus incidence/%	胚状体数 Number of embryoids/个	胚状体发生率 Embryoid incidence/%
1	30	0	0	0	0
2	28	2	7.14	5	17.86
3	21	2	9.50	5	23.81
4	39	24	61.54	16	41.03
5	53	50	94.34	30	56.60
6	32	29	90.63	18	56.25
12	37	37	100.00	37	100.00

### 2.2 不同浓度水杨酸对成熟种胚培养效果

种胚在水杨酸中培养20 d时与2,4-D相比除未出愈外,没有太大差异,之后种胚出现生长停滞现象,随着时间推移子叶最先褐变并失去活力(图3)。这一现象随水杨酸浓度升高而明显,说明水杨酸对种胚的生长起到了抑制作用,且这一作用是逐渐发挥出来和持久的;在最低浓度的水杨酸中,种胚也表现出相同的趋势,说明种胚对水杨酸比较敏感。同时发现在个别种胚的子叶和胚根上有体胚直接发生,且体胚发生也具有单个点状和呈团簇状2种情况(图4)。这种情况在培养20 d后才逐渐发生,且出胚量很少,说明不是水杨酸直接作用的

表1 培养基配方

Table 1 Formula of medium mg/L

培养基编号 Medium number	培养基成分 Medium component	培养基编号 Medium number	培养基成分 Medium component
1	MS	7	MS+水杨酸 0.05
2	MS+麦草畏 0.05	8	MS+水杨酸 0.10
3	MS+麦草畏 0.10	9	MS+水杨酸 0.50
4	MS+麦草畏 0.50	10	MS+水杨酸 1.00
5	MS+麦草畏 1.00	11	MS+水杨酸 2.00
6	MS+麦草畏 2.00	12	MS+2,4-D 0.50

基配方见表1,培养温度24~26℃,光培养16 h/d。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度麦草畏对成熟种胚培养效果

种胚接种后3 d便开始萌动,子叶展开膨大增厚,胚轴伸长增粗,7 d时子叶已变绿,10 d左右在子叶边缘和胚轴基部出现黄白色突起并进一步发育成愈伤组织;20 d时在1~3号培养基上尚未发生愈伤,其它培养基上愈伤均大量发生并有体胚发生;40 d时西洋参成熟种胚在2~6号培养基上均能产生胚性愈伤组织,并形成胚状体,培养效果见表2。体胚发生分为单个点状和成团簇状2种情况(图2)。

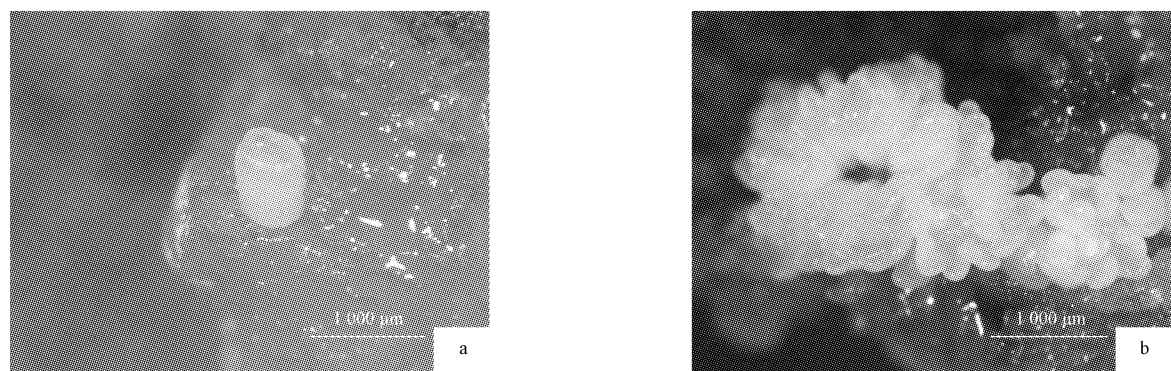
表2表明,未添加激素的空白培养基没有愈伤和体胚发生;在附加2,4-D的培养基中愈伤和体胚发生率为100%;麦草畏的适宜浓度为1.00 mg/L,胚状体发生率为56.60%,但诱导能力低于2,4-D,说明不同激素对体胚发生效果不同。不同浓度麦草畏对愈伤和体胚发生的作用显示,激素浓度对愈伤和体胚发生有一定影响。

结果,可能是水杨酸与种胚内某些物质复杂作用的结果。培养40 d后效果见表3。

由表3可知,水杨酸各浓度(0.05~2.00 mg/L)均能诱导出体胚,发生率为4.16%~7.50%,诱导率相差不大,但是远低于2,4-D。说明水杨酸浓度差异对体胚发生影响不大;不同激素在诱导体胚发生上有巨大差异。

综上所述,麦草畏、水杨酸可以诱导西洋参成熟种胚体胚发生,诱导能力2,4-D>麦草畏>水杨酸;水杨酸在所选浓度对种胚生长有抑制作用。





注:a.单个体胚;b.簇状体胚。  
Note:a. Single individual embryo;b. Clusters of somatic embryos.

图 2 麦草畏诱导的西洋参成熟种胚体胚发生

Fig. 2 Somatic embryogenesis in mature embryo of *P. quinquefolium* induced by dicamba



图 3 水杨酸培养西洋参成熟种胚

Fig. 3 Salicylic acid in culture of *P. quinquefolium* mature embryo

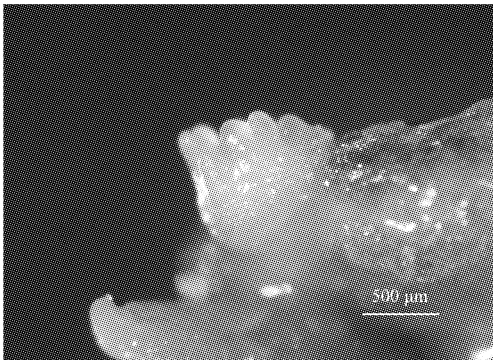


图 4 水杨酸诱导产生的胚状体

Fig. 4 Embryoid induced by salicylic acid

表 3 不同浓度水杨酸的效果

Table 3 The effect of different concentrations of salicylic acid

培养基编号 Medium number	接种外植体数 Inoculation of explants/个	愈伤组织块数 Callus blocks/个	愈伤组织发生率 Callus incidence/%	胚状体数 Number of embryos/个	胚状体发生率 Embryoid incidence/%
Ⅱ1	30	0	0	0	0
7	37	0	0	2	5.40
8	40	0	0	3	7.50
9	44	0	0	3	6.81
10	48	0	0	2	4.16
11	39	0	0	2	5.12
12	37	37	100.00	37	100.00

3 讨论

麦草畏在离体培养中应用较多。李海霞等<sup>[4]</sup>以不同品种玉米幼胚为材料,比较了 2,4-D 和麦草畏对诱导愈伤组织和继代的影响,结果表明麦草畏对不同品种玉米幼胚的愈伤诱导效果均优于 2,4-D。该试验却发现麦草畏在各浓度诱导愈伤与胚状体方面均劣于 2,4-D,这可能是由于试验材料的差异造成的。戚家华等<sup>[15]</sup>用小麦花药进行离体培养时,在添加 1.00 mg/L 麦草畏的培养基上,发现诱导愈伤和促使胚状体形成的能力较强。

TIRAJOH 等<sup>[6]</sup>以西洋参 3 种外植体(根、叶和上胚轴)研究附加不同生长调节物的 MS 培养基上体细胞胚胎的发生,发现根和上胚轴在麦草畏上的最佳诱导愈伤浓度为 9.00 μmol/L,愈伤组织继代到 9.00 μmol/L 麦草畏上后,根和上胚轴上体胚发生率为 15.6%和 2.0%。该试验发现麦草畏在浓度为 1.00 mg/L 时诱导体胚能力较强,与 TIRAJOH 等<sup>[6]</sup>和戚家华等<sup>[15]</sup>的研究相似。

水杨酸在离体培养中应用相对较少。徐亮胜等<sup>[16]</sup>以肉苁蓉愈伤组织为悬浮培养材料,刘太峰<sup>[17]</sup>以人参芽胞诱导的愈伤组织材料研究水杨酸对次级代谢产物的

影响时,发现水杨酸对培养物生长有抑制作用,该试验结果显示不同浓度水杨酸均抑制种胚生长,与他们的报道相似。CHARLES 等<sup>[18]</sup>发现水杨酸是乙烯生物合成的一种有效抑制剂,这可能是水杨酸抑制培养物生长的原因。HAMIDOU 等<sup>[13]</sup>在观赏植物姜花体胚发生研究中发现 20~150  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸均能诱导体胚发生;ROUSTAN 等<sup>[19]</sup>在胡萝卜愈伤组织悬浮培养中发现 50  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸能显著诱导体细胞胚胎发生。该试验各浓度水杨酸诱导体胚能力均较差,这可能是试验材料和方法不同造成的。HONG 等<sup>[20]</sup>以 2 个文心兰品种(Gower Ramsey, Sweet Sugar)的叶片为外植体在添加或没有 TDZ 的 1/2 MS 培养基上研究了水杨酸对体细胞胚胎直接发生的影响,发现外植体大量褐化,且水杨酸(1、5、10、15、20、50  $\mu\text{mol/L}$ )单独或与 TDZ (4.54  $\mu\text{mol/L}$ )组合阻碍、延迟体细胞胚胎发生,这与该试验结果相似。水杨酸在不同外植体材料上的诱导效果具有明显差异,因此对水杨酸在诱导体胚发生上的机理还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 汤飞宇. 西洋参组织培养研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 李海霞, 秦文娟, 汤继华, 等. 2,4-D 和麦草畏对玉米自交系愈伤组织诱导和继代的影响[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(3): 243-248.
- [5] WANG A S. Callus induction and plant regeneration of American ginseng [J]. Hort Science, 1990, 25: 571-572.
- [6] TIRAJOH A, KYUNG T S, PUNJA Z K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in American ginseng (*Panax quinquefolium*) [J]. In vitro Cell Dev Biol Plant, 1998, 34: 203-211.
- [7] 齐秀东. 水杨酸对植物的生理作用(综述)[J]. 河北科技师范学院学报, 2007, 21(1): 74-79.
- [8] 秦跟基, 杨琴, 陈佩度. 表-油菜素内酯对小麦花药培养效率的影响[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(4): 9-12.
- [9] 原永兵, 曹永巽. 水杨酸在植物体内的作用[J]. 植物学通报, 1994, 11(3): 1-9.
- [10] 梁玉生, 梁厚果. 水杨酸对陈化马铃薯切片乙烯产生的促进作用[J]. 植物学通报, 1998, 40(4): 11-16.
- [11] 李兆亮, 原永兵, 刘连成, 等. 水杨酸对黄瓜叶片抗氧化剂酶系的调节作用[J]. 植物学报, 1998(4): 356-361.
- [12] 李德红, 潘瑞焱. 水杨酸在植物体内的作用[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(2): 144-149.
- [13] HAMIDOU F S, KANNIAH R, ROWENA Y K. Somatic Embryogenesis in *Hedychium bousigonianum* [J]. Hort Science, 2009, 44(5): 1487-1490.
- [14] BEHZAD A, MEHRAN E S, JAIME A T. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 116(3): 343-351.
- [15] 戚家华, 王子霞, 海热古力, 等. 2-4-5-T-pCPAd-dicamba 三种激素对小麦花药培养的影响[J]. 新疆农业科学, 1991(3): 106-108.
- [16] 徐亮胜, 薛晓峰, 付春祥, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 402-406.
- [17] 刘太峰. 水杨酸对人参培养物的影响[J]. 吉林农业科技学院学报, 2008, 17(4): 3-4.
- [18] CHARLES A L, ROGER J R. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3): 833-837.
- [19] ROUSTAN J P, LANCHE A, FALLOT J. Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid[J]. Biologia Plantarum, 1990, 32(4): 273-276.
- [20] HONG P I, CHEN J T, CHANG W C. Effects of salicylic and acetylsalicylic acid on direct somatic embryogenesis in *oncidium* [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2008, 17(2): 149-153.

## Effect of Dicamba and Salicylic Acid on Somatic Embryogenesis of American Ginseng Mature Embryo (*Panax quinquefolium*)

LIU Zheng, YANG Guopeng, CAO Xiaoyong, QIN Gongwei, HU Xuanping

(Bioscience and Engineering College, Shaanxi University of Technology/Bioresources Key Laboratory of Shaanxi Province, Hanzhong, Shaanxi 723000)

**Abstract:** Taking mature seed embryo of American Ginseng (*Panax quinquefolium*) as materials, using MS basal medium and MS+0.5 mg/L 2,4-D as controls, the effect of dicamba and salicylic acid (0.05—2.00 mg/L) on somatic embryogenesis of American Ginseng mature embryo was researched. The results showed that on MS basal medium without any hormones there were no callogenesis and embryogenesis; on MS+0.5 mg/L 2,4-D, the percentage of both attained to 100%; medium with five concentration of dicamba and salicylic acid all could induce somatic embryogenesis, in which the effect of 1.00 mg/L dicamba was the best, embryogenesis rate reached 56.60%, and the highest of salicylic acid was 7.5%; in salicylic acid, the growth volume of embryo was smaller than that of controls. The experiment showed that dicamba and salicylic acid could induce somatic embryogenesis on mature seed embryo of American Ginseng, induction capacity was 2,4-D>dicamba>salicylic acid; salicylic acid showed inhibitory effect on embryo growth.

**Keywords:** American Ginseng; mature embryo; dicamba; salicylic acid; somatic embryogenesis