

东北刺人参组培快繁及种质保存技术¹⁾

朱俊义 夏广清 刘雪莲 顾地洲

(通化师范学院, 通化, 134002)

摘要 以东北刺人参带叶柄的叶片为外植体, 对愈伤组织诱导、增殖、分化、生根及种质保存的最适培养基进行了筛选。最适宜的愈伤组织诱导培养基为 $1/2B_5 + 6-BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.1 \text{ mg/L} + IBA 0.2 \text{ mg/L} + KT 0.1 \text{ mg/L} + V_c 50 \text{ mg/L}$; 愈伤组织增殖培养基为 $2/3 MS + 6-BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.5 \text{ mg/L} + V_c 100 \text{ mg/L}$; 愈伤组织再分化培养基为 $MS + 6-BA 1.0 \sim 2.0 \text{ mg/L} + NAA 0.05 \text{ mg/L} + V_c 100 \text{ mg/L}$; 生根培养基为 $1/5 MS + IBA 0.01 \text{ mg/L}$; 种质保存最适宜的培养基为 $1/10 MS$ (大量元素) + $1/3 MS$ (微量元素) + $1/2 MS$ (铁盐) + $1/4 MS$ (有机物质)。

关键词 东北刺人参; 愈伤组织; 种质保存

分类号 Q949.763.2

Rapid Propagation and in Vitro Preservation of *Oplopanax elatus*/Zhu Junyi, Xia Guangqing, Liu Xuelian, Gu Dizhou (Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, 134002, P. R. China)//Journal of Northeast Forestry University. -2007, 35(11). -9~10, 16

An experiment was conducted to select the optimum media for callus induction, multiplication, differentiation, rooting and germplasm preservation using the leaves with leafstalk of *Oplopanax elatus* Nakai as explants. Results show that the optimum medium for callus induction is $1/2B_5 + 6-BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.1 \text{ mg/L} + IBA 0.2 \text{ mg/L} + KT 0.1 \text{ mg/L} + V_c 50 \text{ mg/L}$; that for callus multiplication is $2/3MS + 6-BA 1.0 \text{ mg/L} + NAA 0.5 \text{ mg/L} + V_c 100 \text{ mg/L}$; that for callus differentiation is $MS + 6-BA 1.0 \sim 2.0 \text{ mg/L} + NAA 0.05 \text{ mg/L} + V_c 100 \text{ mg/L}$; that for rooting is $1/5MS + IBA 0.01 \text{ mg/L}$; and that for germplasm preservation is $1/10MS$ (macro element) + $1/3MS$ (trace element) + $1/2MS$ (iron salt) + $1/4MS$ (organic substance).

Key words *Oplopanax elatus* Nakai; Callus; Germplasm preservation

东北刺人参 (*Oplopanax elatus* Nakai) 为五加科刺人参属多年生落叶乔木, 其干燥根、根茎和茎均可入药, 是一种很有前途的中草药。近年来, 随着对东北刺人参不断的采掘, 自然资源遭到严重破坏, 已处于濒危状态, 为此, 东北刺人参被列入国家二级保护植物、吉林省一级保护植物^[1-3]。东北刺人参茎次生木质部导管分子穿孔板的演化过程重演了导管分子穿孔板的系统演化过程, 是研究导管分子穿孔板非常有意义的实验材料^[4-5]。东北刺人参扦插成活率很低, 种子萌发率亦很低, 靠常规繁殖非常困难^[6-8]。因此, 利用组织培养来快速繁殖东北刺人参是保护东北刺人参资源的有效途径之一。金英善对东北刺人参愈伤组织的诱导进行了研究^[9], 而其他有关东北刺人参组织培养和种质资源保存技术方面的研究尚未见报道。文中对东北刺人参愈伤组织的诱导、继代、分化、生根及种质保存的培养基进行了筛选, 以期得到最优的东北刺人参组织培养条件, 为其以后的研究提供理论依据。

1 材料与方法

材料: 长白山区东北刺人参带叶柄嫩叶。

外植体处理: 将东北刺人参嫩叶连同叶柄剪下, 流水冲洗 20 min 后, 用 20% 青霉素溶液浸泡 10 min。在超净工作台上用 70% 酒精浸泡材料 8~15 s, 用 0.1% 升汞溶液浸泡 5~8 min, 无菌水冲洗 4~6 次。用无菌滤纸将外植体表面的水分吸干, 然后将其接种到不同培养基中进行诱导 (图 1 中 a)。

培养条件: 本研究诱导培养基以 B_5 作基本培养基, 附加

蔗糖 (15 g/L)、琼脂 (6.5 g/L); pH5.5。继代、再分化、生根及种质保存培养基均以 MS 作基本培养基, 附加蔗糖 30 g/L (生根培养为 15 g/L)、琼脂 6.5 g/L, 温度控制在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度 800~1 200 lx, 光周期 8~10 h/d^[10-11]。

愈伤组织的诱导: 将外植体接种到附加不同激素配比的 B_5 ($1/2B_5$) 培养基上进行培养, 观察诱导情况。

愈伤组织的继代: 将活跃生长的愈伤组织进行继代, 接种到分别以 MS、 $1/2 MS$ 、 $2/3 MS$ 作基本培养基, 附加 6-BA (1.0 mg/L)、NAA (0.1、0.2、0.5 mg/L)、 V_c (100 mg/L) 的培养基上。筛选最合适的培养基及激素不同质量浓度配比。

愈伤组织的再分化: 继代到一定数量后, 将愈伤组织接种到以 MS 作基本培养基, 附加 (6-BA 1.0 mg/L)、NAA (0.50、0.10、0.05 mg/L) 及 V_c (100 mg/L) 的再分化培养基上。筛选最合适的再分化培养基及激素质量浓度配比。

生根培养: $1/3 MS$ 、 $1/5 MS$ 作基本培养基, 附加不同质量浓度的 IBA 和 NAA。筛选最合适的生根培养基。

种质保存: 将愈伤组织块接种到不同培养基上进行保存, 筛选最合适的种质保存培养基。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可以看出: 1 号培养基能诱导出大量的愈伤组织, 但生长一段时间后愈伤组织褐变, 这可能是由于高质量浓度无机盐促进代谢所导致的; 其他 4 种培养基由于采用 $1/2$ 剂量的 B_5 培养基作基本培养基, 同时添加 V_c 这种强还原剂, 明显减轻了褐变现象, 降低了培养基中无机盐的含量, 有使出愈率降低的趋势。适当提高生长素的质量浓度能促进愈伤组织的诱导, 适当的细胞分裂素/生长素比例可使愈伤组织生长良好; KT 对东北刺人参愈伤组织和球形愈伤组织的发生和生

1) 吉林省教育厅资助项目 (吉教科合字 2006 第 151 号)。

第一作者简介: 朱俊义, 男, 1966 年 5 月生, 通化师范学院, 教授。

收稿日期: 2007 年 5 月 4 日。

责任编辑: 李金荣。

长有很好的促进作用。因此,5 号培养基最适合东北刺人参 愈伤组织的诱导(图 1 中 b)。

表 1 不同培养基对东北刺人参愈伤组织诱导的影响

培养基 代号	培养基 类型	激素质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					外植 体数	出愈 率/%	愈伤组织生长情况
		6-BA	NAA	IBA	V_c	KT			
1	B ₅	0.5	0.1	0	0	0	40	96.3	愈伤组织开始生长较好,但培养一段时间后出现褐变现象发生
2	1/2B ₅	0.5	0.1	0	50	0	40	82.0	愈伤组织致密,颜色鲜绿色,培养 3 个月无任何变化
3	1/2B ₅	1.0	0.1	0	50	0	40	80.0	愈伤组织较粗糙,有少量类似球形胚产生
4	1/2B ₅	1.0	0.1	0.2	50	0	40	93.5	愈伤组织松散,颜色黄绿色,有球形胚产生,但球形胚生长瘦弱
5	1/2B ₅	1.0	0.1	0.2	50	0.1	40	95.0	愈伤组织松散,生长良好,有大量球形胚产生,且生长健壮

2.2 不同培养基对愈伤组织继代增殖的影响

由表 2 可以看出:降低无机盐质量浓度可防止愈伤组织褐变,但无机盐质量浓度过低,愈伤组织和球形愈伤组织的增

殖速度及生长速度减慢,增加生长素质量浓度可明显促进愈伤组织和球形愈伤组织增殖。4 号培养基最适合东北刺人参愈伤组织增殖培养(图 1 中 c)。

表 2 不同培养基对愈伤组织继代增殖的影响

培养基 代号	培养基 类型	激素质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			愈伤组织生长情况
		6-BA	NAA	V_c	
1	MS	1.0	0.1	100	愈伤组织增殖一段时间后褐变,球形胚生长速度较快,但球形胚发生形态变化
2	1/2MS	1.0	0.1	100	愈伤组织增殖速度慢
3	2/3MS	1.0	0.2	100	前期愈伤组织、球形胚增殖较快,但后期几乎不再增殖
4	2/3MS	1.0	0.5	100	愈伤组织和球形胚增殖率高,且生长良好

2.3 不同培养基对愈伤组织分化的影响

由表 3 可以看出:随 6-BA/NAA 比例的增大,愈伤组织的分化率也随之增大。NAA 质量浓度为 0.50 mg/L 时,愈伤组织生长良好,但分化率低;而质量浓度为 0.10 mg/L 时,愈伤组织的分化率提高,总芽数也有所提高;在 0.05 mg/L 时效果最好(图 1 中 d,e,f)。另外,当 NAA 质量浓度为 0.05 mg/L 时,测试 6-BA 不同质量浓度(1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L)下的愈伤组织分化率,结果发现,6-BA 质量浓度在 1.0~2.0 mg/L 时分化率呈上升趋势,超过 2.0 mg/L 以后,愈伤组织分化率反而降低。可见,细胞分裂素与生长素各自的质量浓度及二者的质量浓度比对愈伤组织的分化有很大的影响。

表 3 不同培养基对愈伤组织分化的影响

培养基 代号	培养基 类型	激素质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			接种愈伤 组织块数	分化 率/%	总芽 数
		6-BA	NAA	V_c			
1	MS	1.0	0.50	100	40	57	18
2	1/2MS	1.0	0.10	100	40	69	27
3	2/3MS	1.0	0.05	100	40	82	41

2.4 不同培养基对组培苗生根的影响

由表 4 可以看出:无机盐质量浓度降低有利于生根。在实验中发现,接种于 1、2 号培养基上的苗茎基部膨大,形成愈伤瘤,继续培养只有少数组培苗在愈伤瘤上生根,但这种根的

维管组织与茎的维管组织联接不好,经炼苗移栽后,愈伤组织及根从茎基部脱落,导致失败。3 号培养基上的幼苗茎基部在培养初期也见有膨大现象,但不形成瘤状物,在膨大处会产生根。这种基部膨大现象随着 IBA 质量浓度的降低而减轻。当 IBA 质量浓度为 0.01 mg/L 时,茎基部不再膨大,而根系直接从皮孔中穿出,且生根率和移栽成活率都较高。因此,5 号培养基有助于生根。

2.5 不同培养基对种质保存的影响

从表 5 可以看出:随着培养基各营养成分的减少,愈伤组织的生长逐渐变慢,铁盐的含量过低,会影响叶绿素的合成,使愈伤组织及芽苗失绿。用这种营养饥饿的方法长期保存种质,可在室温下进行,不需要冷冻,可降低成本。4 号培养基有助于东北刺人参愈伤组织的保存。

表 4 不同培养基对东北刺人参组培苗生根的影响

培养基 代号	基本培 养基	激素质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		接种 数	生根 率/%
		NAA	IBA		
1	1/3MS	0.10	0...	40	34
2	1/3MS	0.05	0	40	57
3	1/5MS	0	0.10	40	75
4	1/5MS	0	0.05	40	83
5	1/5MS	0	0.01	40	92

表 5 不同培养基对种质保存的影响

培养基代号	培养基类型	愈伤组织生长情况
1	1/10MS(大量元素)+MS(微量元素)+MS(铁盐)+1/2MS(有机物质)	1 个月后愈伤组织分化,前期分化及生长速度较快,后期变慢
2	1/10MS(大量元素)+1/2MS(微量元素)+1/2MS(铁盐)+1/3MS(有机物质)	3 个月后愈伤组织迅速生长
3	1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/3MS(铁盐)+1/4MS(有机物质)	8 个月后愈伤组织开始缓慢生长,但愈伤组织及再分化产生的芽明显失绿
4	1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/2MS(铁盐)+1/4MS(有机物质)	愈伤组织几乎不生长,形态和颜色未发生变化

3 结论

1/2 B₅ + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.2 mg/L + V_c 50 mg/L + KT 0.1 mg/L 对愈伤组织的诱导效果最好。生长素质量浓度增加可促进愈伤组织增殖,大量元素质量浓度降低可减轻褐变现象。2/3 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + V_c 100 mg/L 是愈伤继代最合适的培养基。细胞分裂素与生长素的质量浓度及二者的比对东北刺人参愈伤组织的

分化影响很大。MS + 6-BA 1.0~2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + V_c 100 mg/L 是东北刺人参愈伤组织再分化的良好培养基。NAA 和 IBA 都比较适合于生根,但 NAA 的作用比较强,能使茎的基部产生愈伤瘤,而 IBA 对东北刺人参诱导生根的效果较好,1/5MS + IBA 0.01 mg/L 较适合于生根。利用营养饥饿来保存东北刺人参种质是一种较好的方法,较适宜的培养基为 1/10 MS(大量元素)+1/3 MS(微量元素)+1/2 MS(铁盐)+1/4 MS(有机物质)。(下转 16 页)

的意义。液流密度的变化只能反映单位边材面积的液流速度,研究整树蒸腾耗水量还需进一步测定树木的边材面积。

参考文献

- [1] Johnson L P V. Sugar production by white and yellow birches. Canadian Journal of Forest Research, 1944, C22, 1-6.
- [2] 张金池, 黄夏银, 鲁小珍, 徐淮平原农田防护林带杨树树干液流研究[J]. 中国水土保持科学, 2004, 2(4): 21-25.
- [3] 张小由, 康尔酒, 张智慧, 等. 黑河下游天然胡杨树干液流特征的试验研究[J]. 冰川冻土, 2005, 27(5): 742-746.
- [4] 李海涛, 陈灵芝. 应用热脉冲技术对棘皮桦和五角枫树干液流的研究[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(1): 22-24.
- [5] 聂立水, 李吉跃. 应用 TDP 技术研究油松树干液流流速[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(6): 49-56.
- [6] 周国逸, 尹光彩, Morris J, 等. 华南桉树人工林树液流量及蒸散作用[J]. 植物学报, 2004, 46(2): 202-210.
- [7] Granier A. A new method for measure sap flow[J]. Annals of Forest Science, 1985, 42: 193-200.
- [8] Granier A. Evaluation of transpiration in a Douglas-fir stand by means of sap flow measurement[J]. Tree Physiology, 1987, 3: 309-320.
- [9] Linton M J, Sperry J S, Williams D G. Limits to water transport in *Juniperus osteosperma* and *Pinus edulis*: implications for drought tolerance and regulation of transpiration[J]. Functional Ecology, 1998, 12(6): 906-911.
- [10] 马履一, 王华田. 油松边材液流时空变化及其影响因素研究[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(3): 23-27.
- [11] 孙鹏森, 马履一, 王小平, 等. 油松树干液流的时空变异性研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(5): 1-6.
- [12] Wullschlegel S, Meinzer F C, Vertessy R A. A review of whole-plant water use studies in trees[J]. Tree Physiology, 1998, 18: 499-512.
- [13] Granier A, Loustau D. Measuring and modeling the transpiration of a maritime pine canopy from sap-flow data[J]. Agricultural And Forest Meteorology, 1994, 71: 61-81.
- [14] Lu P. A direct method for estimating the average sap flux density using a modified Granier measuring system[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1997, 24: 701-705.
- [15] 马玲, 赵平, 饶兴权, 等. 乔木蒸腾作用的主要测定方法[J]. 生态学杂志, 2005, 24(1): 88-96.
- [16] 孙慧珍, 周晓峰, 赵惠勋. 白桦树干液流的动态研究[J]. 生态学报, 2002, 22(9): 1387-1391.
- [17] 鲁小珍, 马尾松, 栓皮栎生长盛期树干液流的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 401-404.
- [18] 孙慧珍, 周晓峰, 康绍忠. 应用热技术研究树干液流进展. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1074-1078.
- [19] 孙慧珍. 东北东部山区主要树种树干液流动态及与环境因子关系[D]. 哈尔滨: 东北林业大学林学院, 2003.
- [20] 孙龙, 王传宽, 杨国亭, 等. 生长季红松树干液流密度的特征[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(1): 12-14.

(上接 10 页)

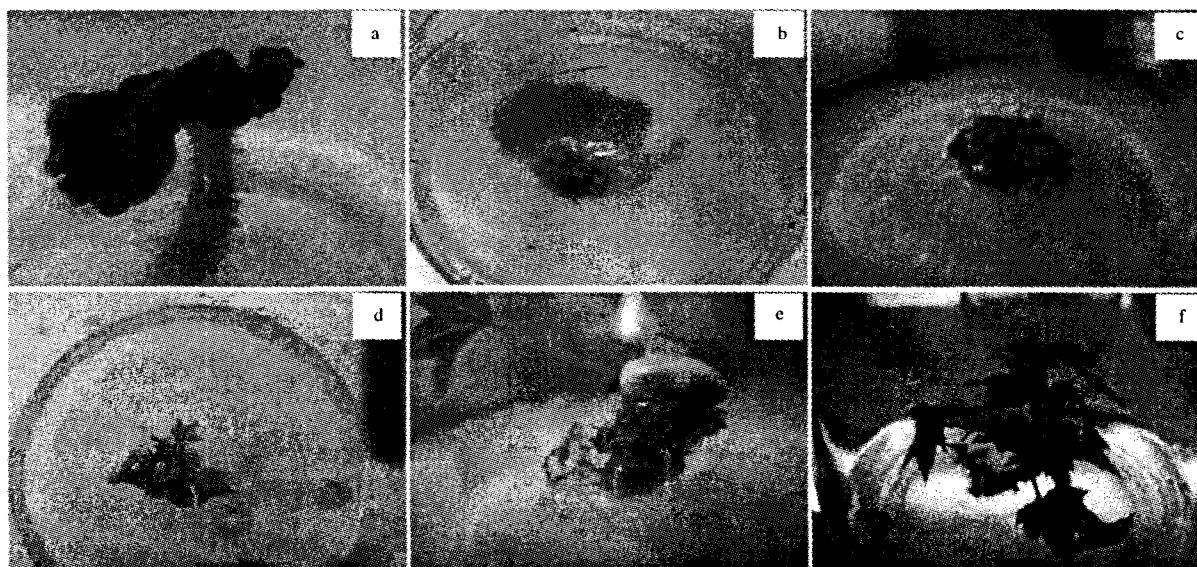


图1 以带叶片的叶柄作为外植体的东北刺人参组织培养过程

a. 东北刺人参带叶片的叶柄作为外植体在培养基上生长; b. 东北刺人参叶柄基部产生的愈伤组织; c. 在分化培养基上欲进行茎叶分化的愈伤组织; d, e. 愈伤组织分化成茎叶体; f. 愈伤组织分化成完整的植株体。

参考文献

- [1] 金英善, 玄永浩, 金允哲. 濒危植物东北刺人参的开发利用和保护[J]. 中国野生植物资源, 2002(6): 31.
- [2] 周繇. 长白山区东北刺人参的资源调查及其开发利用[J]. 特产研究, 2002, 24(3): 44-46.
- [3] 张鹏, 张羽, 沈海龙, 等. 东北刺人参研究进展[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 78-80.
- [4] 朱俊义, 周成武, 张常钟, 等. 东北刺人参 *Oplopanax elatus* 导管分子穿孔板的类型及演化[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(5): 437-439.
- [5] 朱俊义, 陆静梅, 刘杨, 等. 东北刺人参茎次生木质部结构植物学研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4): 776-780.
- [6] 刘继生, 张鹏, 张美淑. 东北刺人参种子繁殖技术研究[J]. 特产研究, 2001, 23(1): 27-29.
- [7] 张鹏, 刘继生, 潘宜才, 等. 东北刺人参人工扩繁技术研究现状[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1): 65-68.
- [8] 刘继生, 张鹏, 孙静刚. 外源赤霉素对东北刺人参种子萌发的影响[J]. 林业科技, 2005, 30(2): 45-47.
- [9] 金英善, 曹后男, 刘继生, 等. 东北刺人参愈伤组织的诱导[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1): 16-19.
- [10] 曹改义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2002.
- [11] 曹改义. 现代植物组织培养技术[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2003.