

刺五加组培苗的胚性愈伤组织诱导和植株再生¹⁾

韩 君 李成浩 牛遇达 赵 波

(东北林业大学, 哈尔滨, 150040)

摘 要 以悬浮培养刺五加体细胞胚发育而来的再生植株作为实验材料, 进行胚性愈伤组织的诱导。研究表明: 在添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的固体培养基中, 胚性愈伤组织诱导率高于不加任何植物生长调节物质的培养基的诱导率; 而且 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2, 4 - \text{D}$ 均适合于固体和液体培养基中胚性愈伤组织的增殖; 胚性愈伤组织转到不加植物激素的培养基后, 固体和液体培养基都能分化出大量体细胞胚, 而液体培养基中形成的体胚数量比固体培养基要高, 但是后期的植株再生率及土壤移栽成活率都是固体培养基高于液体培养基。

关键词 胚性愈伤组织; 体细胞胚; $2, 4 - \text{D}$; 赤霉素

分类号 Q949.763; S567.1

Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration from Intact in Vitro Plantlets of *Eleutherococcus senticosus* Maxim/Han Jun, Li Chenghao, Niu Yuda, Zhao Bo (College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China) // Journal of Northeast Forestry University. -2007, 35(4). -11~13

In vitro plantlet derived from somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* by suspension culture were used for induction of embryogenic callus. The induction frequency of embryogenic callus was higher in a medium containing $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ than in a medium without any plant growth regulators. In both solid and liquid media, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2, 4 - \text{D}$ supplement was suitable for embryogenic callus multiplication. Numerous somatic embryos were differentiated after embryogenic callus was transferred to the medium without plant growth regulators, and the number of somatic embryos in the liquid medium was higher than in the solid medium. However, the subsequent plantlet regeneration and the acclimation efficiency were better in the solid medium than in the liquid medium.

Key words Embryogenic callus; Somatic embryo; $2, 4 - \text{D}$; Gibberellic acid

刺五加 (*Eleutherococcus senticosus* Maxim) 为五加科多年生落叶灌木, 主要分布于我国的东北地区, 及俄罗斯远东、朝鲜和日本等国。多在海拔 $400 \sim 1600 \text{ m}$ 的针阔叶混交林下生长。刺五加是我国医药之珍品, 近年来以刺五加为原料生产的各种片剂、冲剂、针剂和刺五加参茶等产品, 都具有很高的经济价值。但由于长期过度的采伐, 野生资源已遭到严重破坏。为了保护野生资源和满足生产的需求, 国内外已开始了对刺五加进行人工栽培和新品种的培育研究。

植物体细胞胚发生是指单倍体或双倍体的体细胞在特定条件下, 未经性细胞融合而通过与合子胚发生类似的途径发育出新个体的形态发育过程^[1]。利用体细胞胚发生进行育苗, 不仅繁殖速度快、数量大、不受地区、季节和气候性灾害等自然条件限制的缺点, 而且体细胞胚还是由无性繁殖体系产生的, 可以固定杂种优势, 一旦获得优良基因型, 可以多年使用而无需三系配套等复杂的育种过程, 特别对于育种周期长的木本植物来说意义更大^[2]。自从 Gui 等人从合子胚诱导的体细胞胚中获得再生植株后^[3], 对刺五加体细胞胚发生和植株再生的研究就陆续有了很多报道, 大多以合子胚、叶片、叶柄和茎段作为外植体诱导体细胞胚或胚性愈伤组织^[3-7], 但还没有从完整植株直接诱导胚性愈伤组织和植株再生的论文发表。

本研究利用刺五加完整植株直接诱导胚性愈伤组织, 并研究了固体和液体2种培养基对体胚形成、植株再生和土壤

移栽的影响, 从而缩短了体胚形成时间, 提高了胚性愈伤组织诱导率, 从而为生产实践提供了方便可行的技术方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

刺五加体细胞胚在不加植物激素的 $1/3 \text{ MS}$ 液体培养基培养一段时期后, 转到不加植物激素的 $1/3 \text{ MS}$ 固体培养基中培养4周, 选择发育良好的再生植株作为本实验的胚性愈伤组织诱导材料(图1A)。实验中使用的液体培养基中, 添加质量浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖; 而固体培养基中另加 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胶立得。2种培养基的 pH 值均为 5.8 , 在 121°C 高压灭菌 15 min 后使用。2种培养基中所用激素 $2, 4 - \text{D}$ 采用高压灭菌, 而 GA_3 采用过滤灭菌。培养容器为 180 mL 塑料培养瓶(上海稼丰公司)。固体和液体培养基在光照强度 1600 lx 左右、日光照时间为 16 h 、温度为 $(23 \pm 2)^\circ \text{C}$ 的培养室里进行; 液体培养基每瓶 20 mL , 放在转速为 120 r/min 的摇床上培养, 2周继代1次; 固体培养基每瓶 20 mL , 4周继代1次。

1.2 试验方法

胚性愈伤组织的诱导: 将发育成的刺五加再生植株, 分别转到不加任何植物生长调节物质的 $1/3 \text{ MS}$ 固体培养基和添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的 $1/3 \text{ MS}$ 固体培养基中培养, 2个月后观察在以上2种不同培养基中胚性愈伤组织的发生率和质量增殖情况。

胚性愈伤组织的增殖: 经过胚性愈伤组织诱导2个月后, 分别转到 $1/3 \text{ MS}$ 固体和液体培养基中进行增殖培养。为调查培养基中添加的 $2, 4 - \text{D}$ 质量浓度对胚性愈伤组织增殖的影响, 培养基中分别加入 $0, 0.1, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $2, 4 - \text{D}$, 每个培养瓶中培养 150 mg 左右的胚性愈伤组织, 培养4周后调查鲜质量增殖情况。

1) 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2005]383)和国家自然科学基金(30671701)。

第一作者简介: 韩君, 女, 1982年6月生, 东北林业大学林学院, 硕士研究生。

通讯作者: 李成浩, 东北林业大学林学院, 副教授。

收稿日期: 2006年8月21日。

责任编辑: 潘 华。

体细胞胚的形成:将在2,4-D固体培养基中增值培养4周后的胚性愈伤组织,分别转到不加任何植物生长调节物质的1/3 MS固体和液体培养基中培养,每个培养瓶中培养100 mg左右的胚性愈伤组织,培养4周后比较2种培养基中产生的体细胞胚数。

植株再生和土壤移栽:将以上2种培养基中的体细胞胚,继代1次后转到不加任何植物生长调节物质的1/3 MS固体培养基中,4周后观察植株再生率;生根并出现3个以上叶片的再生植株用自来水洗去根部培养基,并移栽到装有草炭土的容器中,置于21℃左右的温室中培养,移栽2周内用塑料薄膜覆盖,每天浇水1次;4周后观察移栽成活率。

2 结果和分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导与增殖

在不添加任何植物生长调节物质的1/3 MS固体培养基,与添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的1/3 MS固体培养基中,培养2周后开始从部分刺五加再生植株根的周围出现许多半透明的乳白色胚性愈伤组织(图1A);培养8周后调查2种培养基中胚性愈伤组织的发生率,结果表明:添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的1/3 MS固体培养基中胚性愈伤组织诱导率比不加任何植物生长调节物质的1/3 MS固体培养基要高;添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的1/3 MS固体培养基中胚性愈伤组织的质量也比不加任何植物生长调节物质1/3 MS固体培养基的高(见表1)。用于实验的植株的形态上无太大的变化,培养结束后可以移栽成活。

表1 GA_3 处理对胚性愈伤组织诱导和增殖的影响

固体培养基	胚性愈伤组织诱导率/%	胚性愈伤组织质量/ $\text{mg} \cdot \text{株}^{-1}$
1/3 MS	20	153
1/3 MS + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$	65	345

在添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的固体培养基中,诱导的胚性愈伤组织转到添加不同质量浓度2,4-D的1/3 MS固液培养基中,培养4周后调查胚性愈伤组织的质量增加,结果表明:在固体培养基中不同质量浓度的2,4-D都能促进胚性愈伤组织的增殖,在添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的2,4-D培养基中胚性愈伤组织质量增加较多,但是与其他质量浓度相比没有显著差异(见表2),在不添加2,4-D的培养基中培养时,部分胚性愈伤组织转变为体细胞胚;液体培养基中不同质量浓度2,4-D的处理也能促进胚性愈伤组织的增殖,而且与固体培养基的结果一样。在添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D的培养基中胚性愈伤组织的质量增加最多(见表2);不添加2,4-D的培养基中部分胚性愈伤组织也分化成体细胞胚。

表2 固体和液体培养基中不同质量浓度的2,4-D对胚性愈伤组织鲜质量的影响

2,4-D 质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	培养前/ mg	培养4周后/ mg	
		固体	液体
0.1	150	621	510
0.5	150	636	488
1.0	150	662	613

2.2 体细胞胚的形成和植株再生

从2,4-D中诱导出的胚性愈伤组织,分别转到不加任何植物生长调节物质的1/3 MS固体、液体2种培养基中。固体培养基中的胚性细胞团培养8~9 d开始形成球形胚,液体培养基中的胚性细胞团培养5~6 d开始形成球形胚。胚性愈伤组织在2种培养基中培养4周后体细胞胚的形成个数,固体培养基里培养的要比液体培养甚少,但2种培养基中形

成的体胚都是无子叶的畸形胚,只有在不加激素的培养基中继代2次或转到添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 的培养基后,大部分体胚才能发芽(见表3和图1B和C)。

表3 不同培养方法对体胚形成、植株再生及土壤移栽的影响 %

培养方法	体细胞胚个数*	植株再生率	土壤移栽成活率
固体	860	78.2	81.2
液体	3 124	53.7	59.0

注: * 培养100 mg胚性愈伤组织产生的体细胞胚个数。

固体和液体培养基里发芽的体细胞胚,分别转到不加任何植物生长调节物质的1/3 MS固体培养基培养4周后,2种培养基里发芽的体细胞胚都能转换成完整植株,在固体培养基里,发芽的体细胞胚植株再生率比液体培养基高24.5%(图1D)。挑选生根并出现3个以上叶片的再生植株进行土壤移栽1个月 after 比较土壤移栽成活率的结果也表明,固体培养体细胞胚转换的植株比液体培养的高32.2%(见表3)。



图1 刺五加完整植株诱导胚性愈伤组织和植株再生

A. 胚性愈伤组织诱导; B. 固体培养基里发芽的体细胞胚; C. 液体培养基里发芽的体细胞胚; D. 再生植株

3 结论与讨论

自从在胡萝卜悬浮培养细胞中首次诱导成功体细胞胚以来^[8],已经从100多种被子植物的组织培养中观察到体细胞胚发生和植物再生^[9]。植物组织培养中常以根、茎、叶等营养器官或种子胚、体细胞胚等生殖器官为外植体来诱导胚性愈伤组织,而从完整植株直接诱导体细胞胚发生的报导极少^[9]。本研究首次利用刺五加完整植株诱导胚性愈伤组织并实现了植株再生,其原因可能是实验用的植株是通过体细胞胚发生途径得到的,植株的组织和细胞中还保留着潜在的胚发生能力^[10]。

对多数植物体细胞胚发生的研究中,通过胚性细胞悬浮培养获得的体细胞胚在成熟、发芽过程中经常出现次生胚发生现象^[11],在刺五加^[7]等植物中体细胞胚即使在不加激素的培养基里也能自发形成次生胚。虽然也能利用于体细胞胚大量生产和苗木快繁研究^[4,11],但通常认为次生胚发生是阻碍植株再生的不利因素^[11-12]。本研究中我们从体细胞胚发育形成的再生植株诱导胚性愈伤组织,成功避免了次生胚发生中可能出现的阻碍初生胚的发芽和植株再生的问题。Li和Choi等曾经从刺五加幼茎、叶柄和体细胞胚诱导胚性愈伤组织,可是胚性愈伤组织的形成率分别只有3.0%和5.6%^[4,7],而且是从外植体先诱导体细胞胚和愈伤组织后再次诱导胚性

愈伤组织,这个过程不仅时间长,而且诱导率也很低。利用本实验的方法从完整植株的胚性愈伤组织诱导率达到了65.0%,而且得到的胚性愈伤组织可以直接进行液体培养,极大的提高了培养效率。

总之,本研究中建立的体细胞胚发生和植株再生体系,可以利用于对体细胞胚进行突变处理或基因转化后得到的优良个体的快速繁殖,为生产实践提供了方便可行的技术方法。

参考文献

- [1] Feher A, Pasternak T P, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryonic state [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2003, 74: 201 - 228.
- [2] 施季森, 王晓燕. 现代生物技术与21世纪林业可持续发展[J]. *林业科技开发*, 2001, 15: 3 - 6.
- [3] Gui Y, Guo Z, Ke S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 9: 514 - 516.
- [4] Choi Y E, Kim J W, Yoon E S. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Ann of Bot*, 1999, 83: 309 - 314.
- [5] Choi Y E, Yang D C, Yoon E S. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of

germinating zygotic embryos [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1999, 58: 93 - 97.

- [6] Debasis C, Yu K W, Paek K Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 61 - 68.
- [7] Li C H, Yu C Y. Effect of genotype and explants on somatic embryogenesis and acclimatization of *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Medicinal Crop Sci*, 2002, 10: 217 - 221.
- [8] Steward F C, Mapes M O, Smlth J. Growth and organized development of cultured cells. 1. Growth and division of freely suspended cells [J]. *Am J Bot*, 1958, 45: 693 - 703.
- [9] 袁澍, 贾勇炯, 林宏辉. 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 5: 508 - 512.
- [10] Kim J C, Park Y C, Lee K W, et al. Multi - secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot - tip cultures of *Pimpinella brachycarpa* [J]. *Plant Tiss Cult*, 1996, 23: 189 - 194.
- [11] Lee K S, Lee J C, Soh W Y. Effect of ABA on secondary embryogenesis from somatic embryos induced from inflorescence culture of *Aralia cordata* Thund [J]. *Plant Biol*, 1998, 41: 187 - 192.
- [12] Durham R E, Parrott W A. Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium [J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11: 122 - 125.

(上接10页)22日控水第3天开始,随水分胁迫的加剧,对照苗木相对电导率一直在增加,也就是原生质膜透性一直在增加。但保水剂处理的苗木电导率变化却大不相同。因为爬山虎为抗旱物种,所以土壤水分含量很高对爬山虎的生长反而不利,保水剂处理开始时浇足水分,对爬山虎原生质膜造成破坏,所以8月22日相对电导率均大于对照,对照苗木在8月22日相对电导率为12.53%。随控水时间延长,保水剂各处理相对电导率反而下降,但却不是一直呈下降趋势,而是随控水时间延长呈周期性变化,而这种变化正好合乎保水剂—土壤—植物系统中水分变化的机理。所以爬山虎水势变化、叶水势与土壤含水量关系和相对电导率的变化都呈周期性,其机理也应该一致。

3 结论

目前大多数对保水剂的研究都局限在效果实验阶段,即用保水剂处理树木或农作物的苗木或种子,然后观察其生长效果,本研究重点从植物生长最重要的因素水分和对植物抗性反应最敏感的原生质膜透性出发,研究了保水剂对植物生理的影响和其抗旱节水机理机制。随水分胁迫的加剧,植物叶水势下降。但保水剂处理能明显延缓水势下降,其中小颗粒20g叶水势下降最为缓慢,也就是其保水效果最好;廊坊杨的水势变化规律与爬山虎的明显不同。廊坊杨叶水势随保水剂用量的增加下降越缓慢,叶水势与土壤含水率的变化趋势可用指数方程($y = ae^{bx}$, $b < 0$)来拟合;而爬山虎水势变化呈周期性变化,总趋势是随水分胁迫加剧,水势是下降的。其叶水势与土壤含水量关系非常符合4d移动平均趋势线,周期为4d,而与其它回归方程的相关性非常小,呈极不相关。对照叶水势虽土壤含水量变化趋势用直线方程($y = ax + b$, $a < 0$)拟合效果最好;土壤中加入保水剂后,改变了植物和土壤水分生理生态原始状态,使土壤水势随土壤水分胁迫的加剧降低得缓慢,减少了水分丧失,延长了有效水分供植物利用的时间,有力证明了保水剂不会产生水分倒吸,这也是多数人

所关心的问题;保水剂处理对廊坊杨电导率的影响总趋势都是随水分的胁迫升高的,只不过用保水剂处理的苗木相对电导率变化曲线升高的比对照平缓,说明苗木原生质膜都遭到不同程度的伤害,引起质膜透性的增加。而爬山虎电导率变化与叶水势变化规律保持一致,呈周期性变化。

爬山虎在与廊坊杨一样的处理条件下,水势和电导率随控水进程都呈周期性变化。但是否其它树种使用保水剂以后变化规律也与此2种植物保持一致,还有待于对多树种作更进一步研究。

参考文献

- [1] Kramer P T, Kozlowski T T. 木本植物生理学[M]. 王振儒,译. 北京:中国林业出版社,1985:285 - 290.
- [2] Kramer P T. Water relations of plants[M]. New York and London: Academic Press, 1983: 187 - 192.
- [3] 陈宝玉, 武鹏程, 张玉珍, 等. 保水剂的研究开发现状及应用展望[J]. *河北农业大学学报*, 2003, 26(增刊): 242 - 245.
- [4] 王九龄. 林业科技论文选[M]. 北京:中国林业出版社, 2002: 298 - 310.
- [5] 黄占斌, 夏春良. 农用保水剂作用原理研究与发展趋势分析[J]. *水土保持研究*, 2005, 12(5): 104 - 106.
- [6] Biesheuvel P M, Vanloon A P, Raangs R, et al. A prototype osmotic tensiometer with polymeric gel grains [J]. *European Journal of Soil Science*, 2000(51): 355 - 364.
- [7] Teskey R O, Hinckley T M. Moisture: Effect of water stress on tree. In: Hennesey T M et al eds trees physiology and Forest productivity[J]. Martinus Nijhoff publishers, 1986: 9 - 33.
- [8] 林位夫, 谢贵水, 杨礼富, 等. 红林农场橡胶林抗旱定植实验总结[J]. *热带农业科学*, 2005, 25(3): 1 - 3.
- [9] 李雪华, 姜德明, 阿拉木萨, 等. 不同措施对提高沙地造林成活率的研究[J]. *辽宁林业科技*, 2002(4): 1 - 4.
- [10] 张建国, 李吉跃, 沈国防. 树木耐旱特性及其机理研究[M]. 北京:中国林业出版社, 2000: 78 - 95.
- [11] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京:北京大学出版社, 1990: 99 - 101.
- [12] 李吉跃. 太行山区主要造林树种耐旱特性的研究(II)——一般水分生理生态特性[J]. *北京林业大学学报*, 1991, 13(增刊1): 10 - 24.