

刺嫩芽快繁体系的建立

魏健, 刘旭彩, 孙振雷* (长春师范学院生命科学学院, 吉林长春 130032)

摘要 [目的] 研究刺嫩芽快速繁殖技术。[方法] 以刺嫩芽的叶片、叶柄和幼茎为外植体进行组织培养, 建立刺嫩芽快繁体系。[结果] 3种刺嫩芽外植体中, 叶片的愈伤组织诱导效果最好, 在4种不同激素浓度的MS培养基上均能诱导出愈伤组织; MS培养基中适当增加2,4-D和少量的6-BA, 可显著提高愈伤组织诱导率; 最适诱导培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L, 叶片诱导率高达36.7%; 最佳增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L; 最适分化培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L, 平均诱导分化率达85.0%; 琼脂加入量控制在7.5~8.0 g/L及适当降低6-BA的含量时, 可有效防止外植体玻璃化的产生。[结论] 该研究建立的刺嫩芽快繁体系, 试管苗驯化率可达85.0%, 具有一定的推广与应用价值。

关键词 刺嫩芽; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)08-03127-02

Establishment of Rapid Reproduction System in *Aralia elata* (Miq) Seem

WEI Jian et al (College of Life Science, Changchun Teachers University, Changchun, Jilin 130032)

Abstract [Objective] The aim was to study rapid reproduction technique in *Aralia elata* (Miq) Seem. [Method] With the leaf, leafstalk and tender stem as explants the tissue culture of *A. elata* was conducted to establish rapid reproduction system in *A. elata*. [Result] Among 3 kinds of *A. elata* explants, the leaf got best callus induction and could all induce calli on the MS mediums with different hormone concn. The MA medium adding 2,4-D and 6-BA properly could increase callus induction rate. The optimum induction medium was MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L with the leaf induction of 36.7%. The optimum multiplication medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L. The optimum difference medium was MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L with the mean difference rate of 85.0%. When the agar adding amount was controlled at 7.5~8.0 g/L and 6-BA content could decreased properly the explant vitrification could be controlled effectively. [Conclusion] The rapid reproduction system in *A. elata* set up by this study could obtain the 85.0% domestication of test tube seedlings, which had some value of popularization and application.

Key words *Aralia elata* (Miq) Seem; Tissue culture; Rapid reproduction

刺嫩芽 [*Aralia elata* (Miq) Seem], 又名刺老鸭、刺老芽、刺龙芽、龙牙楸木, 为五加科楸木属落叶灌木或小乔木。刺嫩芽主要分布在辽宁东部及南部山区、吉林东部及长白山区、黑龙江东部山区、河北东北部、山东青岛崂山等地; 朝鲜、俄罗斯西伯利亚地区及日本也有分布。刺嫩芽的食用、药用价值很高, 深受国内外消费者的青睐^[1]。由于野生资源严重不足, 供求矛盾日趋加剧, 保护和扩大刺嫩芽野生资源, 营造刺嫩芽经济林, 已被森工企业视为治危兴林、保生存求发展的骨干项目^[2-3]。而通过组织培养可快速繁殖大量组培苗木, 使刺嫩芽野生资源得到有效保护和科学利用。

1 材料与方法

1.1 供试材料 刺嫩芽采自通化山区。采用萌芽后10 d的刺嫩芽嫩叶片、叶柄和幼茎。

1.2 培养基 基本培养基为MS培养基, 附加的激素种类和浓度不同。1 000 ml MS培养基中加蔗糖30 g, 琼脂7.5~8.0 g, pH值调至5.8。1 L培养基中加入5 g活性炭防止褐变。

1.2.1 诱导培养基。 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L; MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L; MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L; MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L; MS。

1.2.2 继代培养基。 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L; MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L; MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L。

1.2.3 分化培养基。 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L; MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L; MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L; MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L; MS。

1.2.4 生根培养基。 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的诱导培养。

1.3.1.1 外植体的处理。 将供试外植体用自来水冲洗数分钟, 沥干后放在超净工作台上用浓度75%的酒精浸润约30 s (嫩叶片浸润10 s), 立即取出, 然后放入浓度0.1%的升汞溶液中浸泡7 min, 后用无菌水反复冲洗4~5次, 每次持续3~4 min。冲洗完后, 用无菌滤纸吸干外植体上的水, 将其切成2 mm左右的小方块或小段。

1.3.1.2 外植体接种。 将消毒好的外植体材料接种到直径10 cm、盛有40 ml培养基的罐头瓶中, 每瓶接种3片或3段。接种后, 放到25℃、黑暗条件下培养。每3 d观察1次, 并记录相关数据。

1.3.1.3 外植体及诱导培养基的选择。 在5种不同的诱导培养基上分别接种叶、叶柄和幼茎, 观察记载产生愈伤组织的数量。通过比较、分析, 筛选出最佳的诱导培养基。

1.3.2 防止玻璃化现象的研究。 对5种愈伤组织培养基分别接种观察, 每种培养基接种10瓶, 记录外植体发生玻璃化的频率及培养基中各组分的用量。

1.3.3 继代培养基的筛选。 将较好的愈伤组织块(疏松、淡黄白色、柔软)接种到不同激素浓度的培养基上继代培养, 观察愈伤组织的增殖量和质量, 筛选出最佳培养基。

1.3.4 诱导分化培养基的筛选。 将增殖后生活力强的愈伤组织块转移到5种不同的分化培养基上, 诱导芽的分化, 观察统计诱导率, 筛选出最佳诱导培养基。培养条件: 温度24~26℃, 光照时间12 h/d, 光照强度1 500 lx。

1.3.5 生根培养。 选出分化培养中2 cm左右、有1~2片叶的不定芽, 转移到生根培养基MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L上进行生根培养。培养条件: 温度25℃, 光照时间8 h/d, 光照强度1 500 lx。

1.3.6 试管幼苗驯化栽培。 将长4~6 cm、根系发达的幼苗从

作者简介 魏健(1980-), 男, 吉林松原人, 讲师, 从事植物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-11-20

培养基中取出,充分洗净附着在幼苗根部的培养基(注意不能伤到根系),然后用 400 mg/L 的 GA_3 浸泡幼苗根部 2 h,即可移栽到由灭菌的珍珠岩+落叶松腐殖土(1:1)组成的营养钵中。移栽前先用清水将基质浸透,然后用竹签挖小孔将根栽入,轻压并用水浇平,再用塑料袋覆盖营养钵以保持湿度在 80%~90%,最后将营养钵置于 25℃、光照时间 12 h/d、光照强度 1 500 lx 的条件下培养,每隔 3 d 浇 1 次 50 倍 MS 培养基营养液残液,7 d 后揭开塑料袋,放在室温中炼苗。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择 不同的外植体材料在不同培养基上的诱导率见表 1。由表 1 可以看出,叶片的诱导率最高,在 4 种不同激素浓度的培养基上均能诱导出愈伤组织;而叶柄及幼茎都没有产生愈伤组织。由此可以得出结论:在刺嫩芽组织培养中,叶片的诱导效果最好。

表 1 不同接种材料和培养基对愈伤组织诱导率的影响
Table 1 Effects of different inoculated materials and culture medium on the induction rate of callus

培养基 Culture medium	外植体 Explants	接种数 Inoculation number 片	愈伤组织数 Callus number 块	诱导率 Induction rate %
MS+6-BA 1.0 mg/L+	叶片 Leaf blade	30	7	23.3
2,4-D 0.5 mg/L	叶柄 Leaf stalk	9	0	0.0
	幼茎 Young stem	9	0	0.0
MS+6-BA 1.0 mg/L+	叶片 Leaf blade	30	9	30.0
2,4-D 1.0 mg/L	叶柄 Leaf stalk	9	0	0.0
	幼茎 Young stem	9	0	0.0
MS+6-BA 2.0 mg/L+	叶片 Leaf blade	30	11	36.7
2,4-D 1.0 mg/L	叶柄 Leaf stalk	9	0	0.0
	幼茎 Young stem	9	0	0.0
MS+6-BA 0.5 mg/L+	叶片 Leaf blade	30	4	13.3
2,4-D 1.5 mg/L	叶柄 Leaf stalk	9	0	0.0
	幼茎 Young stem	9	0	0.0
MS	叶片 Leaf blade	9	0	0.0
	叶柄 Leaf stalk	9	0	0.0
	幼茎 Young stem	9	0	0.0

2.2 诱导培养基的筛选 叶片接种后 7~9 d 就可出现微小的淡黄色皱缩突起,30 d 左右形成瘤状愈伤组织块,但不同浓度激素组合的诱导率有所不同,即在 MS 培养基中附加不同比例的 2,4-D 和 6-BA,对诱导率有很大的影响。MS 培养基中 2,4-D 含量在 1.0 mg/L 时,有利于愈伤组织的形成;2,4-D 含量达到 1.5 mg/L 时,诱导率呈下降趋势。如果在培养基中加入少量的 6-BA,诱导率显著提高。由表 1 可见,6-BA 和 2,4-D 的浓度分别为 2.0 和 1.0 mg/L 时,诱导效果最好,诱导率达 36.7%。故最佳的诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L。

2.3 外植体玻璃化的控制 在刺嫩芽的组织培养中,外植体易形成半透明的畸形隆起物,开始时颜色比较透明,后来渐渐地变成了淡褐色透明物,以致不能诱导形成愈伤组织,最后干枯而死,这就是玻璃化现象。玻璃化现象已成为组培快繁中提高繁殖率和增加培养过程稳定性的主要障碍,严重影响组培在生产上的应用。

通过试验和观察,可以从以下几个方面防止玻璃化的发生:①适当提高琼脂的浓度。在该试验中,5.0 g/L 琼脂比 7.5 g/L 琼脂玻璃化严重。琼脂过多,培养基中的营养物质被固定,很难被吸收利用;琼脂过少,培养基呈流动状态,也不利于外植体生长。该试验的琼脂最适用量为 7.5 g/L。②降低

细胞分裂素(6-BA)的浓度。试验对 5 种诱导培养基的接种情况进行比较发现,6-BA 含量低的诱导培养基发生玻璃化的频率要低。

2.4 愈伤组织的继代培养 在继代培养中,经 21~28 d 就可产生较多的愈伤组织块。该试验结果表明,3 种培养基都有增殖作用,但是增殖速率有所不同,愈伤组织的生长速率因 6-BA 浓度的不同而有所差异。从表 2 可以看出,在基础培养基中加入 1.0 mg/L 的 6-BA 和 1.5 mg/L 的 2,4-D 可以获得最好的增殖率,即最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L。

表 2 不同激素浓度对继代培养的影响
Table 2 Effects of different hormone concentration on subculture

培养基 Culture medium	愈伤组织状态 Callus status
MS+6-BA 0.5 mg/L+	瘤状体不大,小瘤数量增加了 20%,黄绿色
2,4-D 1.0 mg/L	Small tumour body and its number increased by 20%, yellow green
MS+6-BA 1.0 mg/L+	瘤状体大,数量增加了 1 倍,生活力强
2,4-D 1.5 mg/L	Big tumour body with doubled number, strong vital force
MS+6-BA 2.0 mg/L+	继代效果较差,瘤状体数量变化不大
2,4-D 0.5 mg/L	Relative low efficiency of subculture, little change of tumour number

2.5 芽的诱导分化培养 将外植体中形成的愈伤组织或继代培养得到的愈伤组织,转到分化培养基上诱导芽的分化,都能分化出不定芽。激素的浓度对芽的分化有很大的影响。由表 3 可知,在进行分化培养时,降低 2,4-D 的浓度对芽的诱导分化有明显的效果;如在降低 2,4-D 浓度的同时加入一定量的 6-BA 效果更好,没有加 2,4-D 的培养基中分化出来的芽比较瘦小,而且都比較短。5 种不同激素浓度的分化培养基中,以基础培养基中附加 2.0 mg/L 的 6-BA 和 0.5 mg/L 的 2,4-D 效果最好,即最佳分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L,平均诱导分化率达 85.0%。

表 3 不同激素浓度对芽生长的影响
Table 3 Effects of hormone concentration on bud growth

培养基 Culture medium	不定芽的生长情况 Growth status of adventitious bud
MS+6-BA 0.5 mg/L+	分化较慢,出现部分玻璃化苗
2,4-D 2.0 mg/L	Slow differentiation, appearance of some vitrification seedlings
MS+6-BA 1.0 mg/L+	分化较慢,少数芽长了根,芽比较瘦弱
2,4-D 1.5 mg/L	Relative slow differentiation, roots in some buds, relative sparseness bud
MS+6-BA 2.0 mg/L+	分化较快,但出现畸形苗
2,4-D 1.5 mg/L	Relative quick differentiation, appearance of emergent seedlings
MS+6-BA 2.0 mg/L+	分化最快,芽粗壮,生活力强
2,4-D 0.5 mg/L	The quickest differentiation, big buds, strong vital force

2.6 生根培养 不定芽接到生根培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 上,培养 21 d 左右,就可长出白色的根,多数主根上有 2~3 条侧根,待幼根长到比较粗壮时进行移栽。

3 小结与讨论

(1)刺嫩芽由于其自身特性不易进行离体培养,诱导产生的愈伤组织经常出现褐化、玻璃化等现象。该研究发现,通过调节培养基的激素配比,可以使刺嫩芽外植体诱导出可分化的愈伤组织。

(2)刺嫩芽组织培养时外植体有多种,而该试验主要以叶、叶柄及幼茎分别进行试验,结果表明,叶片的诱导效果

(下转第 3395 页)

是要建设好县一级的文化馆、图书馆、影剧院和娱乐中心等,构筑起广大农民和城镇居民共享的县城文化平台。二是要加快完成乡镇一级的文化站建设,使之成为基层的文化中心,为所属村庄的农民群众提供具有一定层次的文化资源。三是要加快村级文化设施建设如村民文化活动和体育场所等,并使这些场所真正活起来、用起来,从而全面提升农村公共文化设施水平。

4.5 要注意统筹城乡发展 山东省城乡经济发展存在着较大差距,据统计,2006年山东城镇居民人均可支配收入12 192元,农民人均纯收入仅4 368元,差距近3倍,绝对差距达7 834元^[1]。收入的巨大差距直接导致了农村的贫困和发展的迟缓,不利于农民向新型农民转变。只有实现城乡协调均衡发展,缩小城乡收入差距,才能从根本上促进农村的快速发展,增加农民收入,进而为培养新型农民创造必要的物质条件。为此,政府要加强农业投入,努力增加农民收入:一方面要加大财政转移和支付力度,加强农村基础设施建设;另一方面应大幅度提高对农村、农业和农民的财政支出,改善农村基础设施,发展教育、文化和卫生事业。2006年山东省统筹安排用于“三农”方面的财政性投入187.7亿元,比2005年增长25.8%,2007年省财政新增支出18亿元,用于免除农村义务教育阶段的学生杂费,该举措惠及760万农民家庭^[2],对农村发展、建设社会主义新农村、增加农民收入、缩小城乡差距、促进农民向新型农民转变有着十分重要的现实意义。

4.6 要协调东西部发展 山东省地区间发展不均衡,东部(以青岛、烟台、威海为代表)发展较快,收入高,西部(以菏泽、济宁、枣庄为代表)发展相对落后,人均收入低。如枣庄

2006年农民人均纯收入4 687元,而同年烟台农民人均纯收入6 072元,是枣庄农民的1.3倍,绝对差距为2 385元^[3]。收入差别直接影响着农民获得科技文化知识的动力和物质基础,更影响着山东省农民向新型农民的整体转变。要促进西部发展,使西部农民收入增长,增加西部建设投资是一个重要手段,在这方面山东省已经开始转变政府投资方向,着力于西部地区投资建设,至2006年,在西部贫困地区菏泽市累计开工建设项目达184个,完成投资多达84.3亿元^[4],这种投资转向对西部经济发展十分有利。同时,东部地区还在西部劳动力就业方面提供帮助,如2003年9月以来,山东省提出并实施了西部农村富余劳动力定点向东部转移的“西输东接”工程,由政府和劳动保障部门搭桥,使山东东西部地区之间建立起了密切的劳务协作关系。2005年山东省转移农村劳动力169万,其中70%以上通过“西输东接”工程实现了转移^[5]。这些举措对缩小省内东西部收入差距,特别是缩小农民间收入的差距意义重大。当然消除东西部差距不能一蹴而就,还需要继续采取多种措施,协调东西部发展,特别要促进西部农村的发展,使农民富裕起来,为实现向新型农民的转变创造条件。

参考文献

- [1] 山东省统计局.2005年山东统计年鉴[M].北京:中国统计出版社,2005.
- [2] 2007年山东省政府工作报告[N].大众日报,2007-02-16(4).
- [3] 国家统计局山东调查总队.2006年山东省国民经济和社会发展统计公报[EB/OL].(2007-05-01)[2007-09-14]http://www.jiaodong.net/news/system/2007/05/10/010014936_01.shtml.
- [4] 烟台市第十四届人民代表大会第六次会议.“2007烟台政府工作报告”与“2007枣庄政府工作报告”[EB/OL].(2007-05-01)[2007-09-14] <http://www.shandong.gov.cn>.
- [5] 倪永康.山东省“十一五”经济社会发展战略研究[M].济南:山东大学出版社,2005.

(上接第3128页)

最好,诱导率达36.7%。

(3)在进行诱导培养时,诱导率随着2,4-D浓度的增加而增加,但2,4-D浓度达1.5 mg/L时,诱导率呈下降趋势。适当增加2,4-D浓度的同时,加入少量的6-BA,诱导率可以显著提高,即MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L的诱导培养基诱导率较好。

(4)琼脂加入量控制在7.5~8.0 g/L时,可有效防止外殖

体玻璃化的产生。

(5)该试验结果表明,试管苗驯化率达85.0%,有一定的推广与应用价值。

参考文献

- [1] SAM S K, JUSK, YONG N X, et al. Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(7): 1059-1060.
- [2] 韩建军.龙牙糙木的组织培养[J].中国林副特产, 2001(4): 2.
- [3] 张美萍.几种经济植物的利用价值及开发前景[J].特种经济动植物, 2001, 4(9): 34-36.

GB/T 7714-2005

主要责任者或其他责任者

(1)个人著者采用姓在前名在后的著录形式。欧美著者的名可以用缩写字母,缩写名后省略缩写点。欧美著者的中译名可以只著录其姓;同性不同名的欧美著者,其中译名不仅要著录其姓,还需著录其名。用汉语拼音书写的中国著者姓名不得缩写。

示例1:李时珍 (原题:李时珍)

示例2:韦杰 (原题:伏尔特·韦杰)

示例3:昂温 PS (原题:P.S.昂温)

示例4:EINSTEIN A (原题:Albert Einstein)

(2)著作方式相同的责任者不超过3个时,全部照录。超过3个时,只著录前3个责任者,其后加“等”或与之相应的词。

(3)无责任者或者责任者情况不明的文献,“主要责任者”项应注明“佚名”或与之相应的词。凡采用顺序编码制排列的参考文献可省略此项,直接著录题名。

示例:Anon. 1981. Coffee drinking and cancer of the pancreas[J]. *Br Med J*, 283:628.

(4)凡是对文献负责的机关团体名称通常根据著录信息源著录。用拉丁文书写的机团体名称应由上至下分级著录。

示例1:中国科学院物理研究所

示例2:Stanford University. Department of Civil Engineering