

人参杂种胚培养及体细胞无性系的建立

杜令阁 胡桂珍 杨振堂 李方元

(中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109)

李安生 邵启全 付志明

(中国科学院遗传研究所, 北京 100012)

IN VITRO CULTURE OF HYBRID EMBRYOS AND ESTABLISHMENT OF SOMATIC CLONES IN GINSENG

Du Ling-ge Hu Gui-zhen Yang Zhen-tang Li Fang-yuan

(Institute of Special Local Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin, 132109)

Li An-sheng Shao Qi-quan Fu Zhi-ming

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, 100012)

人参 (*Panax ginseng*) 和西洋参 (*P. quinquefolium*) 均为五加科人属的珍贵药用植物。人参主产我国长白山区。西洋参原产美国和加拿大, 近年我国引种成功, 栽种面积逐年增加。由于两参种子休眠期长, 生长缓慢, 生育周期长, 花期不遇, 生产管理技术复杂等诸因素的限制, 给育种工作带来相当大的困难。人参和西洋参的组织培养, 已取得一定进展^[1—8], 但未见人参杂种幼胚培养的报道。本文将人参杂种胚培养及体细胞无性系的建立之研究结果报道如下。

材料与方法

材料 为人参(♀) × 西洋参(♂) 和西洋参(♀) × 人参(♂) 的不同发育时期的杂种胚。

培养基 用MS等基本培养基, 根据试验要求, 附加不同种类和浓度的植物激素及不同浓度的蔗糖, 琼脂0.7%, pH5.8。在1.2kg/cm²压力下, 灭菌20分钟。

材料消毒 将授粉15天和授粉45天以后的杂种果肉洗去, 把种子浸入70%酒精中1分钟, 再放入0.1%升汞中消毒15至20分钟, 再用无菌水洗5次, 然后在超净工作台上, 吹干表面, 剥取胚珠或种仁, 接种于培养基上, 于25℃进行暗培养, 以诱导愈伤组织的形成或幼胚的萌发。当愈伤组织长到4mm左右时, 转到分化培养基上, 萌发的幼胚转移到成苗培养基上, 在24—27℃条件下, 每天用双管40W日光灯照射10小时, 进行光培养。

试验结果

(一) 愈伤组织的诱导

胚珠和种仁接种后，一般21天左右便可形成肉眼可见的乳白色或淡绿色质地较为紧密的愈伤组织（图1：1）（多数来源于胚乳），而60天左右，胚突破种皮而萌发。

1. 杂种胚发育时期 两年试验结果表明，培养于同类培养基中的不同发育时期的杂种胚，其愈伤组织的平均诱导率和胚的平均萌发率，有着显著的差异（表1）。

表1 人参不同发育时期的杂种胚的愈伤组织诱导和胚萌发的效果

年份	杂种胚	发育时期							
		授粉后15天种仁		授粉后26—27天种仁		授粉后54—57天种仁		授粉后62~89天种仁	
		愈伤组织%	胚萌发%	愈伤组织%	胚萌发%	愈伤组织%	胚萌发%	愈伤组织%	胚萌发%
1987	人参×西洋参	26	0	59	4	0	3.27	0.4	0.4
	西洋参×人参	12.1	0.03	19.6	2.25	—	—	0	0.99
1989	人参×西洋参	8.4	0	68.4	0.49	8*	2.6*	6.4*	0*
	西洋参×人参	3.3	0	16.9	0	6.37**	0**	0**	0**

注：*为授粉后45天的种仁；*为授粉后60天的种仁

从表1看出，人参×西洋参或西洋参×人参，均以授粉26—27天的种仁愈伤组织诱导率最高，随着发育时期的延长，愈伤组织的诱导率降低；各个发育时期的人参×西洋参种仁愈伤组织诱导率均高于西洋参×人参杂种的相同发育时期的诱导率；杂种胚本身的发育时期，对其愈伤组织的形成和胚的发育有很大的影响，胚的萌发以培养授粉后26—45天的种仁较为适宜，发育时间长于上述时期，胚很少萌发或不萌发。

2. 培养基 大量元素，用所试验的几种培养基^[9]的大量元素（表2），都能诱导种仁形

表2 大量元素对人参杂种种仁成愈和胚萌发的作用

大量元素	人参×西洋参，授粉后26天种仁			西洋参×人参，授粉后27天种仁		
	种类	接种数	成愈数 (%)	接种数	成愈数 (%)	
M S	20	18	90	16	5	31
N6	20	19*	95	16	2	12.5
R S	18	16	88.8	18	2	11
R1	20	19	95	18	10	55.5
NO	18	10	55.5	12	2	16.6

注：其中有2个胚萌发。培养基中的微量元素和铁盐同MS，有机成分同N6，均附加2, 4-D 0 μmol 、腺素2 μmol 、玉米素1.36 μmol 和CH500mg/l，蔗糖3%。

成愈伤组织，并且愈伤组织的长势都较好，差别不明显；说明种仁形成愈伤组织对大量元素无严格的要求。但从诱导率看，对人参×西洋参授粉26天的种仁成愈，以用N₆、RI、MS培养基中的大量元素较好，而对西洋参×人参授粉27天的种仁成愈，以用RI MS培养基中的大量元素为佳。对于胚的萌发，除人参×西洋参授粉26天的种仁，胚能在N₆大量元素培养基上有10%的萌发外，其余未见胚的萌发。

蔗糖浓度 试验结果表明（表3），3—6%的蔗糖，均可诱导种仁成愈，其中以

表3 蔗糖浓度对人参杂种种仁成愈的效果

蔗糖浓度	人参×西洋参，授粉后26天种仁			西洋参×人参，授粉后27天种仁		
	接种数	成愈数	(%)	接种数	成愈数	(%)
8%	8	3	37	27	4	14.8
6%	17	7	41.2	26	6	23
9%	15	0	0	37	0	0

注：培养基为MS+2,4-D9μmol

表4 生长素对人参杂种种仁成愈和胚萌发的影响

生长素及浓度 (μmol)	人参×西洋参，授粉后26天的种仁			
	接种数	成愈数	%	胚萌发%
2,4-D,2.3	12	12	100	0
2,4-D,4.5	10	7	70	0
2,4-D,6.8	16	11	68.8	0
IAA,11.4	12	6	50	0
IBA,9.8	16	11	68.8	0
NAA,10.7	14	8	21.4	0

洋参授粉54—57天的种仁形成愈伤组织，说明此发育时期的种仁不适于愈伤组织的诱导；而对于胚的萌发，虽然只有BA4.4μmol+GA14.4μmol的一种培养基，但胚的萌发率很高，为20.8%，说明培养此发育时期的种仁，有利于胚的萌发。

表5 激素对人参杂种种仁成愈和胚萌发的作用

激素(μmol)	人参×西洋参								西洋参×人参					
	授粉后26天种仁				授粉后54—57天种仁				授粉后27天种仁					
	接种数	成愈数	%	胚萌发数	接种数	成愈数	%	胚萌发数	接种数	成愈数	%	胚萌发数		
BA4.4	32	15	46.9	4	12.5	16	0	0	0	29	8	27.6	2	6.9
BA4.4+GA14.4	14	9	64.3	0	0	24	0	0	5	20.8	32	4	12.5	0
BA4.4+GA14.4+NAA2.7	20	12	60	8	15	21	0	0	0	21	3	14.3	1	4.8
BA4.4+NAA2.7	19	13	68.4	2	10.6	21	0	0	0	27	10	37	2	7.4

注：基本培养基为MS。

(二) 植株再生及无性系的建立

将萌发的胚，转接到附加IAA17μmol+KT9.3μmol+GA28.9μmol+LH1000mg/l+蔗糖2%的改良怀特培养基和附加BA2.2μmol+GA14.4μmol的MS及附加IBA2.5μmol+KT9.3μmol+GA5.8μmol+蔗糖3%的改良MS培养基上。培养一个月后，改良怀特培养

6%的蔗糖为好，诱导率分别为41.2%和23%。9%的蔗糖未能诱导成愈。蔗糖对胚的萌发没有什么影响。

植物激素 试验是在MS+腺素2μmol+玉米素1.36μmol+CH500mg/l+蔗糖3%的基础上结果表明（表4），所试验的生长素及其不同浓度，均未能诱导种胚萌发，而对愈伤组织的诱导却起着不同的作用，以2,4-D为好。其中2,4-D2.3μmol诱导率达100%。

激素的不同组合也有不同的作用，其结果见表5。

从表5看出，所试浓度的激素，单一或组合附加于MS培养基中，均能诱导人参×西洋参授粉26天的种仁和西洋参×人参授粉27天的种仁形成愈伤组织，并且都以附加BA4.4μmol+NAA2.7μmol的培养基诱导率高，其它四种培养基均能诱导胚的萌发。激素单一或组合，均未能诱导人参×西洋参授粉54—57天的种仁形成愈伤组织，说明此发育时期的种仁不适于愈伤组织的诱导；而对于胚的萌发，虽然只有BA4.4μmol+GA14.4μmol的一种培养基，但胚的萌发率很高，为20.8%，说明培养此发育时期的种仁，有利于胚的萌发。

基上的胚枯死；MS培养基上的胚发育，子叶膨大，变绿，分化出水浸状小苗；改良MS培养基上的胚发育，子叶膨大，变绿，未成苗。将上述两种培养基上发育的胚，再转到改良怀特培养基上，有的胚可发育成苗（图1：2），有的在发育的子叶上形成不定芽进而发育成苗，并于苗基部或基部的愈伤组织上形成不定芽（图1：3）。经分割，在改良怀特培养基上继代，每隔50天左右继代一次。经二年多的继代，仍保持良好的分化能力，从而建立起不断分化芽的体细胞无性系。胚萌发形成的植株，4个月左右可现蕾开花（图1：4）。

继代培养分化的不定芽发育成的试管苗，多数为“三花苗”、少数为“巴掌苗”（相当于二年生苗），“二甲子”（相当于三年生苗）等。继代培养分化的小苗，40%左右可现蕾、开花。分割的无根苗，转到生根培养基上，即可生根，长成完整植株，经移栽未成活。



图1

1.人参杂种种仁的愈伤组织；2.人参杂种胚的再生植株；3.人参杂种再生植株茎基愈伤组织分化的不定芽；4.人参杂种愈伤组织产生的各种类型的胚状体

对种仁形成的愈伤组织，经过了多种分化培养基培养和继代，人参×西洋参授粉26天的种仁愈伤组织，在附加IAA $17\mu\text{mol}$ +KT $9.3\mu\text{mol}$ +GA $28.9\mu\text{mol}$ +LH $1000\text{mg}/\text{l}$ +蔗糖 2% 的MS培养基上，每隔一个月左右继代一次，建立起体细胞无性系，现已二年多，仍保持愈伤组织的增殖能力，并可分化纤细的不正常的小苗。此愈伤组织转移到无激素的改良MS培养基上，可形成数量较多的各种类型的胚状体，有的形成胚状体团块。胚状体经多种培养基培养，未能得到正常的植株。

讨 论

人参的形态成熟的种子，胚极小、处于未分化的球形胚阶段，需经1年左右时间的沙藏

处理，胚才能达到形态和生理上的成熟，播种才能出苗。实生苗经三年时间的生长，才能开花结实。而授粉26—45天的未成熟的种仁，60天左右，种仁中的胚便可被诱导萌发，长成植株，有的可在4个月左右现蕾、开花。这一结果表明，人参杂种未成熟的种仁培养，对缩短人参育种年限，促进人参育种工作的发展，是有可能的。研究结果还将为在细胞水平上，研究胚胎的发生，抗性突变体筛选，人工种子的制备，提供丰富的试材。

试管苗移栽不易成活的主要原因，可能是由于人参的生长发育特性与其它作物不同，即幼苗一经长出，其地上部分的形态建成业已完成，生长点不再发育，新叶不再长出。试管苗也是如此，而且培养时间越长，地上部老化越严重，根原基或纤细小根从地上部分得到光合作用产物不多，不能正常和充分的生长发育，因此移栽不易成活。

试管苗的移栽及其变异的研究，正在进行中。

参 考 文 献

- [1] 王大川译，1980，愈伤组织学试验，(3) : 46。
- [2] 孙国栋等，1984，植物生理学通讯，(3) : 46。
- [3] 孙国栋等，1983，植物学通报，(1) : 43—44。
- [4] 朱蔚华等，1980，中草药，11 (10) : 471—472。
- [5] 桂耀林等，1987，植物学报，(2) : 223—224。
- [6] 杜令阁等，1987，中国科学 (1) : 35—41。
- [7] 苗淑侠等，1987，植物生理学通讯，(1) : 28。
- [8] 阎贤伟，1986，植物生理学通讯，(2) : 40。
- [9] 杨增海编著，1989，园艺植物组织培养，农业出版社，第351—356页。

(上接58页)

菊科植物组培得到再生苗的报道，几乎全部未用2,4-D。可以认为，2,4-D对于菊科植物的芽分化有阻碍作用。需更多的试验来证明我们提出的观点。

山莴苣芽起源于愈伤组织表面及形成过程与有些材料的结果相同^[1]。

细胞愈浮培养时，由于一种组织分泌物使培养基容易变黄褐，如不及时更换新鲜培养基可能对细胞生长不利。

参 考 文 献

- [1] 刘公社、王伏雄，1989，植物学报，31 (9) : 668—672。
- [2] 刘四清、蔡起贵，1990，植物学报，32 (1) : 19—25。
- [3] 徐廷玉等，1989，植物学通报，6 (4) : 232—235。
- [4] 韩阳、奚惕，1989，植物生理学通讯，(2) : 17—20。
- [5] Doerschug, M. R. and Miller, C. O., 1967: Amer. J. Bot., 54 (4) : 410—413.
- [6] Garland, P. and Stoltz L. P., 1980: Hortscience, 15 (6) : 739.
- [7] Koevary, K. et al, 1978: Hortscience, 13 (1) : 39—41.
- [8] Vasill, I. K. and Hildebrandt, A. C., 1966: Amer. J. Bot., 53 (9) : 860—868.
- [9] Webb, D. T. et al, 1984: Can. J. Bot., 62: 586.