

## 极东锦鸡儿幼胚子叶的体细胞胚胎发生和植株再生

沈海龙, 翟晓杰, 杨玲\*

东北林业大学林学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨150040

**摘要:** 以极东锦鸡儿未成熟合子胚子叶为外植体进行其体细胞胚胎发生和植株再生研究。在添加不同BA与NAA或2,4-D, 外加500 mg·L<sup>-1</sup>水解酪蛋白、30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和8 g·L<sup>-1</sup>琼脂的MS培养基上诱导产生了体细胞胚。在5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+5 mg·L<sup>-1</sup> BA和5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1 mg·L<sup>-1</sup> BA处理中体胚诱导率分别为14%和10%; NAA处理每外植体上诱导出的体胚数量最多为4.3个, 而2,4-D为10.5个。体细胞胚经成熟培养后, 在添加0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA、20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和6 g·L<sup>-1</sup>琼脂的MS培养基上萌发率达到58.94%。萌发的体胚在MS培养基上长成正常小植株, 再生率为87%。经炼苗后的体胚苗移植到草炭土:蛭石:珍珠岩=5:4:1 (V/V/V)的栽培基质中, 可以正常生长, 移栽成活率为40%。

**关键词:** 极东锦鸡儿; 组织培养; 体细胞胚胎发生; 植株再生

## Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Caragana fruticosa* from Cotyledons of Its Young Zygotic Embryos

SHEN Hai-Long, ZHAI Xiao-Jie, YANG Ling\*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Somatic embryogenesis and plant regeneration was conducted by taking cotyledons of young zygotic embryos as explants. Somatic embryos were obtained on MS medium supplemented with 500 mg·L<sup>-1</sup> hydrolyzed casein, 30 g·L<sup>-1</sup> sugar, 8 g·L<sup>-1</sup> agar and different concentrations of BA and NAA or 2,4-D. The best combinations of plant growth regulators (PGRs) were 5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+5 mg·L<sup>-1</sup> BA and 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1 mg·L<sup>-1</sup> BA with a inductivity of 14% and 10% and maximum somatic embryos per explant of 4.5 and 10.5 respectively. The somatic embryos matured on MS medium without PGRs, germinated on MS supplemented with NAA 0.01 mg·L<sup>-1</sup>, sugar 20 g·L<sup>-1</sup>, agar 6 g·L<sup>-1</sup> at the germination rate of 58.94%. Germinated somatic embryos were able to transform plantlets on MS medium with a transformation rate of 87%. Acclimated plantlets grew normally with 40% transplanting survival rate in growing medium in composition of 50% peat moss, 40% vermiculite and 10% polite.

**Key words:** *Caragana fruticosa*; tissue culture; somatic embryogenesis; plant regeneration

豆科锦鸡儿属树种(*Caragana* spp.)根系强大, 有根瘤固氮, 耐沙埋, 耐寒, 耐干旱, 在防风固沙、恢复退化植被、绿化环境方面具有重要作用; 同时, 锦鸡儿可用于饲用、绿肥、蜜源、入药, 木质纤维丰富(贾丽和曲式曾 2001)。极东锦鸡儿为多年生落叶小灌木, 喜光、耐寒、耐干旱、耐瘠薄(周以良1986), 适宜于绿化观赏、蜜源和饲料植物, 荒山绿化和水土保持林营造等。极东锦鸡儿在我国主要分布于黑龙江省尚志市帽儿山山顶的岩石裸露处, 分布面积很小, 是黑龙江省特有种, 已处于灭绝边缘(周以良1986; 秦瑞明等1993)。开发极东锦鸡儿规模化繁殖技术, 不但可以有效扩大极东锦鸡儿资源数量, 而且可以增加东北地

区尤其是干旱、瘠薄、寒冷地带可利用树种资源, 生态和经济意义重大。

极东锦鸡儿用种子繁殖(周以良1986)。但是极东锦鸡儿不仅数量稀少, 可采种资源严重不足; 而且据我们在帽儿山顶连续几年的观察研究, 极东锦鸡儿育性很差, 种实害虫严重, 果荚内经常无种子或仅有1粒种子, 种子被害率很高。因此, 依靠种子繁殖进行资源扩繁很慢。体细胞胚胎发生技术可以为大规模植物生产提供一个便宜的无

收稿 2011-02-23 修定 2011-03-08

资助 东北林业大学学术名师专项基金。

\* 通讯作者(E-mail: yangling0824@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82191509)。

性繁殖方法;可以用于人工种子生产,在种质资源商业化繁殖方面有着广泛的应用前景(沈海龙2005)。因此,通过体细胞胚胎发生途径建立极东锦鸡儿微繁技术体系具有重要价值。目前,通过无菌苗茎段腋芽增殖途径在树锦鸡儿(*C. arborescens*) (王力华等2004)、柠条锦鸡儿(*C. korshinskii*) (王力华等2004;张强等2005;霍晓兰等2009)、中间锦鸡儿(*C. intermedia*) (王力华等2004;胡钠梅等2009),通过幼苗带腋芽茎段增殖途径在柠条锦鸡儿(牛西午等2004)和金雀花(*C. sinica*) (杨成丽等2007),通过种子上、下胚轴直接不定芽发生在柠条锦鸡儿、狭叶锦鸡儿和黄刺条(高玫和李天然1990),通过未成熟胚间接或直接不定芽发生在柠条锦鸡儿(郭连钢等2007),通过无菌苗子叶和下胚轴(宋俊双等2007)及水插萌条小叶(张尔荣和陈峰1990)间接不定芽发生在柠条锦鸡儿和树锦鸡儿等树种上均获得器官发生和植株再生。慈忠玲等(1998)通过柠条锦鸡儿愈伤组织诱导,观察到体细胞胚分化,并发育成试管苗,但并未获得体胚成苗。而关于极东锦鸡儿器官发生和体细胞胚胎发生的研究尚未见报道。本文报道极东锦鸡儿以幼胚子叶为外植体进行体细胞胚诱导和植株再生研究,从而建立其体细胞胚发生途径的植株再生技术。

## 材料与方 法

### 1 试验材料与接种方法

极东锦鸡儿[*Caragana fruticosa* (Pall.) Bess.]未成熟种子取自黑龙江省尚志市帽儿山山顶极东锦鸡儿天然小居群。于2010年7月中旬采集未成熟种荚,4℃冰箱中保存、备用。

将采集的种荚于流水下冲洗1 d,后在超净工作台上用70% (V/V)酒精浸泡30 s,2% (V/V) NaClO<sub>3</sub>消毒10 min,无菌水冲洗5次。在超净工作台上用无菌解剖刀切开种荚取出种子,在种子胚芽端切去胚芽并除掉种皮,切取幼胚(图1-A)的单片子叶接种到诱导培养基上(子叶内侧附于培养基上)。

### 2 诱导培养基中植物生长调节剂组合的筛选

以MS为基本培养基,添加500 mg·L<sup>-1</sup>酸水解酪蛋白(CH)、30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、2,4-D(1、2、5、10 mg·L<sup>-1</sup>)或NAA(1、2、5、10 mg·L<sup>-1</sup>)分别与6-BA(0、1、2、5 mg·L<sup>-1</sup>)组合、8 g·L<sup>-1</sup>琼脂,高压灭菌前调节培养基

pH为5.8。以不添加任何生长调节物质的MS培养基为对照,共33种处理,每个处理5次重复,每个重复10个外植体。于(24±2)℃的培养室内进行暗培养。

### 3 体细胞胚发生的细胞学观察

分别从初代培养第1天起,每隔5 d取少量培养物,用FAA固定液固定,常规石蜡切片法切成9~10 μm厚的切片后用爱氏苏木精片染,在OLYMPUS的BX51系统显微镜下观察愈伤组织的形成及体细胞胚的发生并照相。

### 4 体细胞胚的成熟、萌发与炼苗移栽

用于体细胞胚成熟的成熟培养基除不添加任何生长调节物质外,其余条件同诱导培养基;萌发培养基以MS为基本培养基,添加0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA、20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和6 g·L<sup>-1</sup>琼脂。高压灭菌前调节培养基pH为5.8。待胚萌发后,将同时萌发出根和茎芽的体胚小苗转移到新鲜MS培养基中,进一步完成形态发育,形成完整的体胚苗小植株。培养室温度为(24±2)℃,成熟和萌发培养为光培养,光照强度约为40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,每天16 h光照、8 h黑暗,培养室相对湿度为40%~70%。

在培养室内选株高4 cm以上、根系发达、叶片展开的体胚幼苗,敞开培养瓶口炼苗3~5 d,然后仔细将根系附着的培养基洗净,移植到草炭土:蛭石:珍珠岩=5:4:1 (V/V/V)的栽培基质上,浇透水(含水量60%~80%)并用塑料薄膜遮盖,每天定时补充水分,待老叶转为深绿,并有新叶萌出后逐渐掀去塑料薄膜。移栽30 d后统计体胚苗成活率,并将健壮体胚苗移栽到温室花盆中。温室温度为17~22℃,自然光光强,相对湿度30%~60%。

### 5 数据处理和分析

应用Excel 2003软件进行数据处理,应用SPSS软件对数据进行方差分析和多重比较,应用Sigma Plot 10.0软件对数据进行作图。表格和图中数据均为各重复处理的平均数±标准差。计算公式为:愈伤组织诱导率=产生愈伤组织的外植体个数/接种外植体总数×100%;体细胞胚诱导率=产生体细胞胚的外植体个数/接种外植体总数×100%;体细胞胚萌发率=胚根、茎芽均伸长的体胚个数/试验用体胚总数×100%;体胚苗再生率=发育成完整植株的体胚个数/试验用体胚总数×100%;体胚苗移栽成活率=移栽成活株数/移栽总株数×100%。

## 实验结果

### 1 体细胞胚发生及形态发育过程

接种到诱导培养基3 d后, 子叶外植体表面开始隆起; 7 d时外植体表面形成明显凸起, 并产生少量白色愈伤(图1-B); 培养13 d时, 外植体表面产生浅黄色、表面光滑、颗粒状愈伤组织(图1-C); 培养17 d时, 观察到间接发生的球形胚和心形胚的产生(图1-D、E); 体细胞胚发育经历鱼雷形阶段(图1-F), 培养28 d后, 出现子叶形体细胞胚(图1-G)。在体细胞胚诱导过程中除观察到发育正常的双子叶胚(图1-H)外, 还观察到单子叶(图1-I), 子叶合生(图1-J)和多子叶(图1-K)的畸形胚发生。

石蜡切片观察结果表明, 极东锦鸡儿体细胞胚胎发生方式为间接发生, 初代培养2周后, 子叶上、下表面均可产生愈伤组织。愈伤组织从颜色和状态上可以分为2种类型: (1)嫩黄疏松状, 表面粗糙但有光泽; (2)黄褐色紧实状, 表面呈颗粒状。这2种类型愈伤组织中, 前种愈伤组织可以产生体细胞胚, 为胚性愈伤组织, 第2种为非胚性愈伤组织。胚性愈伤组织细胞小, 壁厚, 胞质浓厚, 核大

(图2-A); 非胚性愈伤组织细胞大, 不规则形状, 核小, 偏向细胞一侧(图2-B)。体细胞胚可由胚性愈伤组织的表面或内部的单个细胞发育而来: 胚性细胞第1次分裂为不均等分裂, 形成二细胞原胚(图2-C), 二细胞原胚的顶细胞纵向分裂, 基细胞横向分裂, 形成四细胞原胚(图2-D), 随着细胞分裂的进行, 细胞数目不断增多, 形成多细胞原胚(图2-E), 其表面细胞和内部细胞经多次分裂后形成球形胚(图2-F)。球形胚进行纵向伸长, 两侧细胞分裂较快, 向外突出, 形成心形胚(图2-G)。接着2片子叶长大, 胚状体下方伸长, 内部有原形成层出现, 此时进入鱼雷胚期(图2-H)。此后子叶继续伸长, 出现苗端分生组织而成为子叶胚(图2-H)。子叶胚时期可见维管束呈明显的“Y”字形, 与母体组织相对独立, 表现明显的双极性(图2-H)。体细胞胚以胚柄状结构与外植体相连(图2-F~H), 在其整个发育过程中, 均有明显的胚柄。此外, 观察到了多子叶胚的细胞组成和分化(图2-I)。

### 2 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

#### 2.1 NAA及其与BA的组合对愈伤组织诱导的影响

在未添加任何调节剂的对照培养基中, 大部

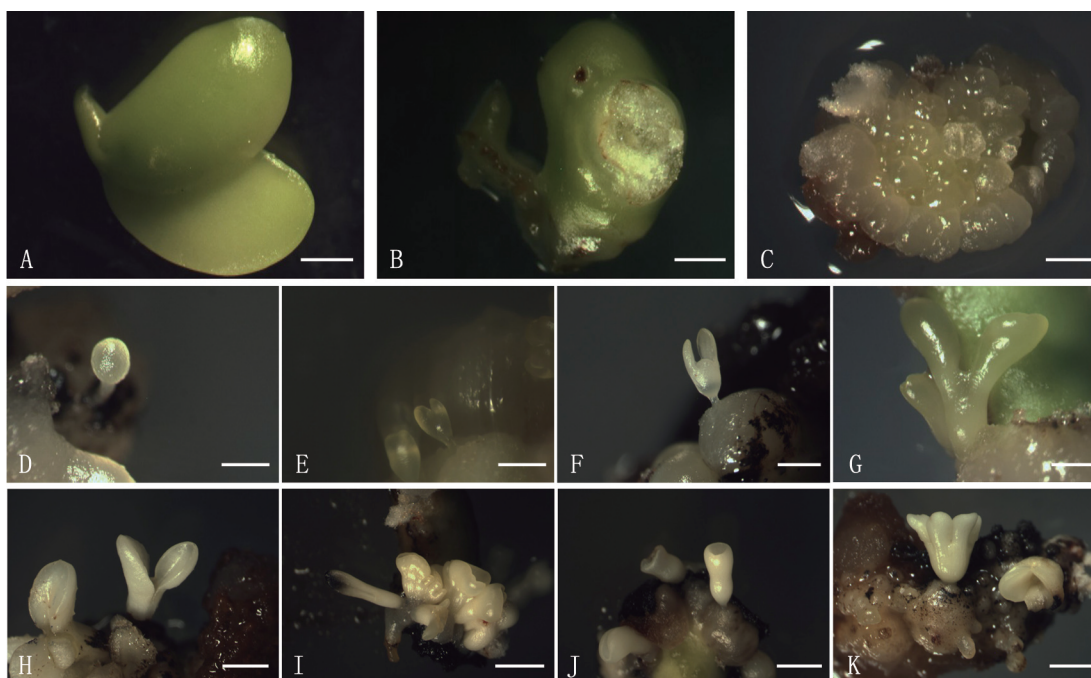


图1 极东锦鸡儿体细胞胚发生的形态观察

Fig.1 Morphological observation on somatic embryogenesis of *C. fruticosa*

A: 合子胚子叶; B: 培养7 d的子叶; C: 子叶外植体表面形成的愈伤组织; D: 球形胚; E: 心形胚; F: 鱼雷形胚; G: 子叶形胚; H: 双子叶胚; I: 单子叶胚; J: 环形子叶胚; K: 多子叶胚。图中标尺: A~C为1 mm; D为312.5  $\mu$ m; E为400  $\mu$ m; F、G为625  $\mu$ m; H为1 mm; I~K为1.25 mm。



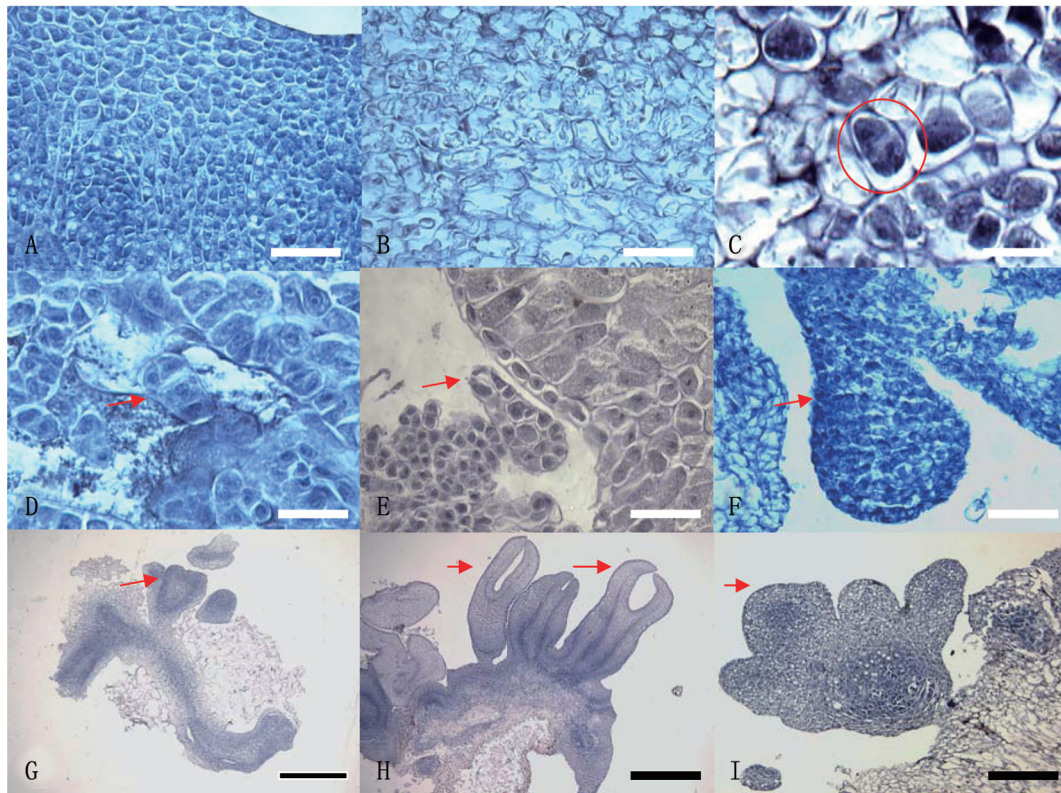


图2 极东锦鸡儿体细胞胚胎发生组织学观察

Fig.2 Histological observation on somatic embryogenesis of *C. fruticosa*

A: 胚性愈伤组织; B: 非胚性愈伤组织; C: 二细胞时期; D: 四细胞时期; E: 多细胞原胚; F: 球形胚; G: 心形胚; H: 鱼雷形胚(左)和子叶形胚(右); I: 多子叶胚。图中标尺: A、B、E、F为250 μm; C、D为125 μm; G为500 μm; H为2.5 mm; I为1 mm。

分外植体的切口处褐化,未产生愈伤组织,部分外植体上产生少量的白色愈伤组织(其在后期的培养过程中逐渐褐化,没有再分化能力)(图3-A);在添加NAA和BA组合的培养基中,当BA浓度相同时,愈伤组织诱导率随着NAA浓度的增加而增加;当NAA浓度相同时,愈伤组织诱导率随着BA浓度的升高则呈现先增加后减小的趋势;单独使用NAA时,愈伤诱导率随NAA浓度增加而增加,但并未达到显著水平( $P>0.05$ )(表1)。在 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA、 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA、 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA、 $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA处理中愈伤组织诱导率均达到100%,而 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA的诱导率最低(52%),这种差异达到了显著水平( $P<0.05$ )(表1)。

## 2.2 2,4-D及其与BA的组合对愈伤组织诱导的影响

在添加2,4-D和BA组合的培养基中,当BA浓度相同时,愈伤组织诱导率随着2,4-D浓度的增加呈现先增加后减小的趋势;当2,4-D浓度相同时,

愈伤组织诱导率随BA浓度的增加呈现先增加后减小的趋势(与NAA+BA组合的趋势相似);单独使用2,4-D时,在 $1.0\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,愈伤组织诱导率随2,4-D浓度升高而增加( $P>0.05$ ),但当2,4-D浓度增加为 $5.0$ 和 $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织诱导率反而减小(分别为52.5%和53.33%)( $P>0.05$ )(表2)。各处理中, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA和 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA处理的愈伤组织诱导率最高,均超过95%(表2)。

## 3 植物生长调节剂对体细胞胚诱导的影响

### 3.1 NAA及其与BA的组合对体细胞胚诱导的影响

单独使用NAA时,低浓度(小于 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) NAA不能诱导体细胞胚的产生,浓度增加为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可诱导产生体细胞胚(诱导率为2.5%);当NAA与BA组合时, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA体胚诱导率最高(14%), $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA和 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA组合次之(10%)(表1)。诱导4周后的体细胞胚在添加NAA的培养基中能够发育成

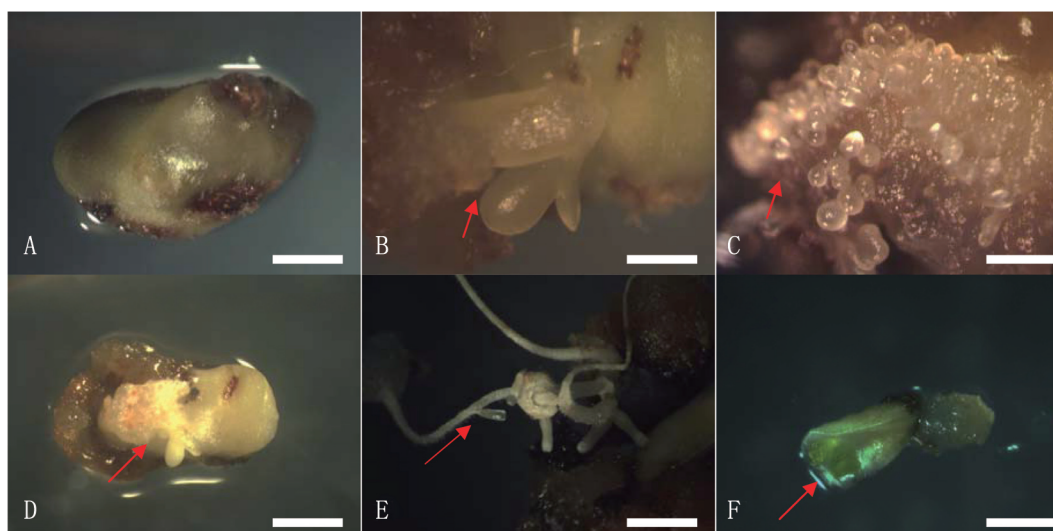


图3 不同培养基上极东锦鸡儿子叶外植体的发育状态及次生体细胞胚胎发生

Fig.3 Explant development and secondary somatic embryogenesis of *C. fruticosa* on different media

A: 对照(无激素)无体胚发生; B: 添加NAA的体胚; C: 添加2,4-D的体胚; D: 体细胞胚愈伤化; E: 发生于初生体胚根端的次生胚; F: 发生于初生体胚子叶端的次生胚。图中标尺: A为1 mm; B为500 μm; C为312.5 μm; D、E为1.25 mm; F为800 μm。

表1 不同浓度NAA与BA的组合对极东锦鸡儿愈伤组织诱导率、体胚诱导率和体胚数量的影响

Table 1 Effects of NAA and BA combinations on callus inductivity, somatic embryo inductivity and somatic embryo number of *C. fruticosa*

调节剂组合/mg·L <sup>-1</sup>	愈伤组织诱导率/%	体胚诱导率/%	每个外植体的体细胞胚数量/个
对照	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 1.0+BA 0	67.50 <sup>cd</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 1.0+BA 1.0	75.00 <sup>bc</sup>	10.00 <sup>a</sup>	1.8
NAA 1.0+BA 2.0	90.00 <sup>ab</sup>	2.00 <sup>bc</sup>	1.0
NAA 1.0+BA 5.0	52.00 <sup>d</sup>	6.00 <sup>b</sup>	2.0
NAA 2.0+BA 0	72.00 <sup>cd</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 2.0+BA 1.0	94.00 <sup>a</sup>	2.00 <sup>bc</sup>	1.0
NAA 2.0+BA 2.0	100.00 <sup>a</sup>	2.00 <sup>bc</sup>	2.0
NAA 2.0+BA 5.0	90.00 <sup>ab</sup>	4.00 <sup>b</sup>	1.5
NAA 5.0+BA 0	76.00 <sup>bc</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 5.0+BA 1.0	96.00 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 5.0+BA 2.0	100.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	3.5
NAA 5.0+BA 5.0	100.00 <sup>a</sup>	14.00 <sup>a</sup>	2.1
NAA 10.0+BA 0	76.11 <sup>bc</sup>	2.50 <sup>bc</sup>	1.0
NAA 10.0+BA 1.0	95.78 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 10.0+BA 2.0	96.00 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>	0
NAA 10.0+BA 5.0	100.00 <sup>a</sup>	7.50 <sup>ab</sup>	4.3

同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05); 各组合接种外植体数均为50个。表2同。

子叶形胚(图3-B)。各处理中, 10 mg·L<sup>-1</sup> NAA+5 mg·L<sup>-1</sup> BA获得体细胞胚数量最多(平均每个外植体

表2 不同浓度2,4-D与BA的组合对极东锦鸡儿愈伤组织诱导率、体胚诱导率和体胚数量的影响

Table 2 Effects of 2,4-D and BA combinations on callus inductivity, somatic embryo inductivity and somatic embryo number of *C. fruticosa*

调节剂组合/mg·L <sup>-1</sup>	愈伤组织诱导率/%	体胚诱导率/%	每个外植体的体细胞胚数量/个
对照	0 <sup>f</sup>	0 <sup>c</sup>	0
2,4-D 1.0+BA 0	64.00 <sup>de</sup>	4.00 <sup>abc</sup>	4.5
2,4-D 1.0+BA 1.0	64.72 <sup>de</sup>	5.00 <sup>abc</sup>	7.0
2,4-D 1.0+BA 2.0	70.00 <sup>cde</sup>	4.00 <sup>abc</sup>	3.5
2,4-D 1.0+BA 5.0	96.00 <sup>a</sup>	8.00 <sup>ab</sup>	4.0
2,4-D 2.0+BA 0	85.00 <sup>abcd</sup>	2.50 <sup>abc</sup>	1.0
2,4-D 2.0+BA 1.0	94.00 <sup>ab</sup>	0 <sup>c</sup>	0
2,4-D 2.0+BA 2.0	91.43 <sup>abc</sup>	0 <sup>c</sup>	0
2,4-D 2.0+BA 5.0	97.50 <sup>a</sup>	5.00 <sup>abc</sup>	5.7
2,4-D 5.0+BA 0	52.50 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0
2,4-D 5.0+BA 1.0	80.00 <sup>abcd</sup>	10.00 <sup>a</sup>	4.8
2,4-D 5.0+BA 2.0	72.50 <sup>bcde</sup>	2.50 <sup>abc</sup>	2.0
2,4-D 5.0+BA 5.0	70.00 <sup>abcd</sup>	5.00 <sup>abc</sup>	10.5
2,4-D 10.0+BA 0	53.33 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0
2,4-D 10.0+BA 1.0	67.50 <sup>cde</sup>	0 <sup>c</sup>	0
2,4-D 10.0+BA 2.0	94.00 <sup>ab</sup>	2.00 <sup>bc</sup>	4.0
2,4-D 10.0+BA 5.0	85.50 <sup>bcde</sup>	0 <sup>c</sup>	0

上4.3个)(表1)。

### 3.2 2,4-D及其与BA的组合对体细胞胚诱导的影响

单独使用2,4-D可以诱导体细胞胚发生, 但与NAA不同的是, 低浓度的2,4-D利于体胚的发生,



而高浓度则表现抑制效应。具体表现为在1~10 mg·L<sup>-1</sup>浓度范围内随着2,4-D浓度增加体细胞胚诱导率减小(表2); 当2,4-D与BA组合时, 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1 mg·L<sup>-1</sup> BA组合的体细胞胚诱导率最高(10%) (表2)。不同浓度2,4-D、NAA分别与BA组合处理获得的最高体胚诱导率之间无显著差异( $P>0.05$ )。在添加2,4-D的培养基中, 多数体细胞胚仍停滞在球形胚时期(图3-C), 只有在降低或者去掉2,4-D的成熟培养基上才能进一步发育。各处理中体细胞胚数量最多为10.5个(表2)。

### 3.3 体细胞胚的愈伤化及次生体细胞胚的产生

诱导出的体细胞胚若较长时间(大于60 d)不继代或未转移到成熟培养基中, 在两种生长素处理中均出现了愈伤化现象(图3-D)。部分体细胞胚

在诱导期间, 能够在未脱离外植体的情况下萌发出根, 并于萌发根的部位产生次生胚(图3-E、F)。

### 4 体胚的成熟和萌发培养

子叶形体细胞胚在不加生长调节剂的MS培养基上成熟培养15 d, 转移到新的MS+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA+6 g·L<sup>-1</sup>琼脂的萌发培养基上。2周后, 子叶形体细胞胚萌发, 子叶转绿, 胚根伸长(图4-A~C), 体细胞胚萌发率为58.94%。将萌发状态较好的植株在MS+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup>琼脂的培养基上进行成苗培养, 5周时可形成完整的再生植株(图4-D、E), 植株再生率为87%。正常萌发的小植株转移到草炭土:蛭石:珍珠岩=5:4:1 (V/V/V)的栽培基质中, 移栽成活率为40%, 移栽3个月后观察小植株生长健壮(图4-F)。

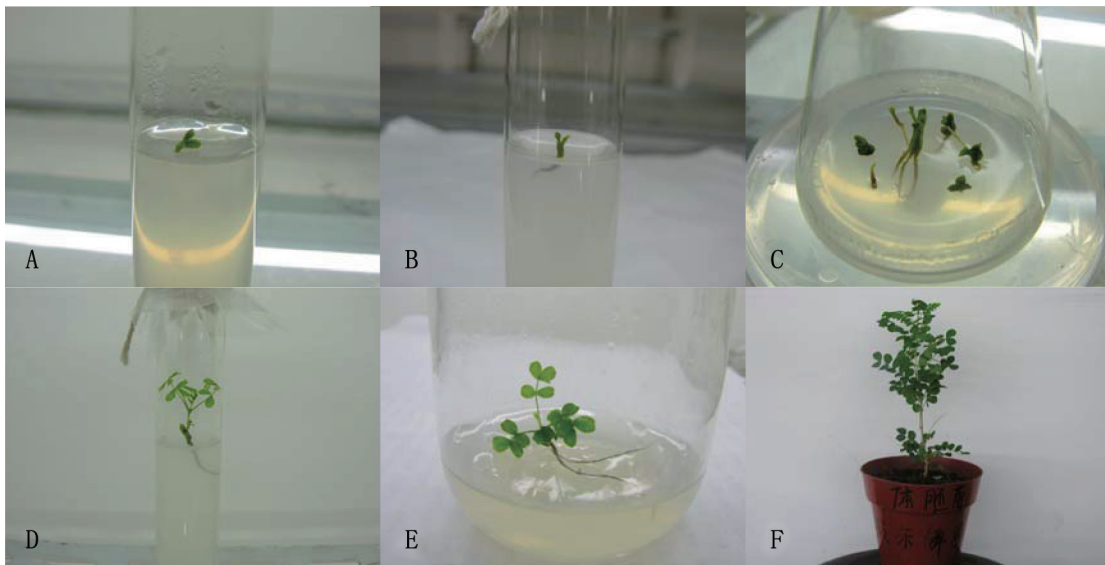


图4 极东锦鸡儿体细胞胚萌发成正常植株过程

Fig.4 Somatic embryo germination and plant establishment of *C. fruticosa*

A: 子叶胚见光转绿; B: 子叶胚萌发出胚根; C: 胚轴合生体胚萌发; D和E: 萌发正常体胚苗; F: 移栽驯化的体胚苗。

## 讨 论

本项研究建立了一套极东锦鸡儿体细胞胚胎发生和植株再生体系: 以子叶期幼嫩合子胚的子叶为外植体, 以MS为基本培养基, 添加5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 500 mg·L<sup>-1</sup>水解酪蛋白, 30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, 以8 g·L<sup>-1</sup>琼脂固化, 接种13 d诱导产生胚性愈伤组织, 17 d观察到间接发生的球形体细胞胚, 28 d后观察到子叶形体细胞胚; 子叶形体细胞胚在不

添加生长调节剂的MS培养基上成熟培养15 d后, 接种到添加20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 以6 g·L<sup>-1</sup>琼脂固化的MS培养基上, 2周后可以萌发; 萌发状态良好的体胚苗转接到无生长调节物质的含20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、以6 g·L<sup>-1</sup>琼脂固化的MS培养基上, 5周后可形成完整的再生小植株; 小植株转移到草炭土:蛭石:珍珠岩=5:4:1 (V/V/V)的栽培基质中, 3个月后可获得生长健壮的苗木。关于锦鸡儿属植物器官发生的研究很多(胡钠梅等2009; 霍晓兰等

2009; 郭连钢等2007; 宋俊双等2007; 杨成丽等2007; 张强等2005; 牛西午等2004; 王力华等2004; 高玫和李天然1990; 张尔荣和陈峰1990), 但关于体细胞胚胎发生的报道只有1例(慈忠玲等1998)。本项研究是锦鸡儿属第2例并且是更为系统的体细胞胚胎发生研究, 是极东锦鸡儿的首例体细胞胚胎发生研究。

研究发现, 极东锦鸡儿体细胞胚通过间接发生途径产生, 经历了球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚这4个典型发育时期, 最后发育成熟, 这与大多数植物体细胞胚胎发生的过程相同(沈海龙2005)。研究发现, 极东锦鸡儿体细胞胚间接发生是单细胞起源, 说明这套体胚发生体系在极东锦鸡儿遗传工程研究方面极具潜力, 因为单细胞起源的体细胞胚再生出的植物, 由于在基因组成上完全一致, 是基因转化的良好受体(Fernando等2001; 孔冬梅等2006)。

添加NAA或2,4-D的各处理均能获得较高的极东锦鸡儿愈伤组织诱导率, 但NAA相较于2,4-D能够在一定浓度范围内保持稳定的高愈伤组织诱导率, 即NAA比2,4-D更适合于极东锦鸡儿未成熟幼胚的愈伤组织诱导。在添加NAA的培养基中, 体细胞胚可直接发育到子叶期; 而在添加2,4-D的培养基中, 只有在降低2,4-D浓度或去掉2,4-D时, 诱导出的球形胚才能进一步发育; 添加2,4-D或NAA对极东锦鸡儿最高体细胞胚诱导率的影响无显著差异, 但添加2,4-D处理的较NAA处理获得的体细胞胚数量多。这与Arunyanart和Chaitrayagun(2005)对莲花(*Nelumbo nucifera*)、Rai等(2007)对番石榴(*Psidium guajava*)和周思君等(1989)对大豆进行体细胞胚胎发生研究时所获得的结论相似。诱导出的体细胞胚如果不及时从愈伤组织中挑选出来进行继代培养, 将会导致胚性培养物不可逆转的愈伤化, 这与前人的结论一致(陈芳等2010; 王义等2008)。在同一培养基内观察到在初生胚子叶表面和初生胚萌发根表面产生了次生胚, 与Murthy等(2008)的研究相似。

本研究建立了极东锦鸡儿的体胚发生和植株再生体系, 但体胚诱导率不高, 体胚发生数量不多, 可能在外植体取材时期、培养基及添加物质构成、培养环境等方面尚存在问题。今后需要进一

步对诱导体细胞胚的各种外植体材料和诱导条件进行研究, 以建立完善的极东锦鸡儿体细胞胚发生技术体系。

## 参考文献

- 陈芳, 陈少瑜, 吴涛, 王寅冰, 易善军, 宁德鲁(2010). 丽江云杉体细胞胚胎发生. 林业科学, 46 (8): 162~167
- 慈忠玲, 贺晓, 何丽君, 黄堃(1998). 柠条锦鸡儿愈伤组织的培养与分化. 内蒙古林学院学报, 20 (4): 15~19
- 高玫, 李天然(1990). 几种野生豆科锦鸡儿属(*Caragana* Fabr.)植物离体培养过程中器官分化和内源植物激素含量的关系. 内蒙古大学学报(自然科学版), 21 (3): 427~437, 插页1
- 郭连钢, 马润兰, 贺小勇(2007). 柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)幼胚的组织培养和繁殖. 内蒙古农业科技, (5): 46~47
- 胡钠梅, 韩素英, 梁国鲁, 齐力旺(2009). TDZ诱导中间锦鸡儿植株再生. 北方园艺, (8): 204~205
- 霍晓兰, 闫敏, 张强, 孟全业(2009). 不同激素浓度对柠条茎段组织培养的影响. 中国农学通报, 25 (10): 148~150
- 贾丽, 曲式曾(2001). 豆科锦鸡儿属植物研究进展. 植物研究, 21 (4): 515~518
- 孔冬梅, 沈海龙, 冯丹丹, 张丽杰(2006). 水曲柳体细胞胚与合子胚发生的细胞学研究. 林业科学, 42 (12): 130~134
- 牛西午, 胡慧珍, 詹海仙, 任志强, 畅志坚, 杨丽莉(2004). 小叶锦鸡儿的组织培养和快速繁殖. 西北植物学报, 24 (8): 1502~1505
- 秦瑞明, 王迪, 迟福昌(1993). 黑龙江省稀有濒危植物. 哈尔滨: 东北林业大学, 115
- 沈海龙(2005). 植物组织培养. 北京: 中国林业出版社, 107~131
- 宋俊双, 王赞, 孙桂芝, 高洪文(2007). 柠条锦鸡儿的组织培养. 草地学报, 15 (1): 66~69
- 王力华, 邓正正, 姚晓福(2004). 锦鸡儿属中3种植物的组织培养及快速繁殖. 植物生理学通讯, 40 (4): 456
- 王义, 李仙, 赵文君, 孙春玉, 张美萍(2008). 刺五加体细胞胚胎发生过程及解剖学观察. 林业科学, 44 (7): 17~24
- 杨成丽, 范晓娟, 杨军方, 李大力(2007). 金雀花的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 43 (6): 1130
- 张尔荣, 陈峰(1990). 树锦鸡儿的组织培养及快速繁殖. 东北农学院学报, 21 (1): 94~97
- 张强, 郭素娟, 翟明普(2005). 柠条组织培养技术. 福建林学院学报, 25 (3): 256~259
- 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 何志鸿(1989). 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株. 大豆科学, 8 (1): 39~46
- 周以良(1986). 黑龙江省树木志. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 362
- Arunyanart S, Chaitrayagun M (2005). Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). *Sci Horti*, 105 (3): 411~420
- Fernando JA, Melo M, Soares MKM, Appezzato-da-Glória B (2001). Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. *Braz Arch Biol Technol*, 44 (3): 247~255
- Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2008). Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. *Sci Horti*, 118 (2): 168~171
- Rai MK, Akhtar N, Jaiswal VS (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Sci Horti*, 113 (2): 129~133