

低温预处理对水曲柳体细胞胚胎发生的影响

李楠^{1,2}, 孔冬梅^{2,3}, 沈海龙^{1,2,*}

¹东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; ²东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; ³山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006

摘要: 用4℃低温预处理未成熟的水曲柳种子0~30 d, 取出种子内的合子胚为外植体诱导体胚发生, 研究低温预处理影响体胚发生的结果表明: 低温预处理过的外植体其体胚发生总数和子叶胚发生数均低于未作低温预处理的; 随着预处理时间的延长, 畸形胚发生数和发生比率与总的体胚发生数和发生率的变化趋势基本相同; 处理20 d的正常胚发生数和发生比率的绝对数虽然很低, 但远高于不作低温预处理的。说明4℃低温预处理对水曲柳体胚发生没有促进作用, 对畸形胚的发生也不能控制, 总的来讲, 适当的低温处理有一定的改善正常体胚发生的潜力。

关键词: 水曲柳; 低温预处理; 体胚发生; 畸形胚

Effect of Low Temperature Pretreatment on Somatic Embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* Rupr.

LI Nan^{1,2}, KONG Dong-Mei^{2,3}, SHEN Hai-Long^{1,2,*}

¹School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ³College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China

Abstract: The effects of low temperature pretreatment on somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* were investigated by using zygotic embryos from immature seeds that pretreated under 4℃ for 0–30 d as explants. The results showed that the total somatic embryos and cotyledonary somatic embryos induced from the pretreated explants were lower than those of control; the fluctuation trends of abnormal somatic embryos and their ratio to total somatic embryos along with the pretreatment time changes were similar to those of total somatic embryos and induction ratio; however, although the absolute normal somatic embryos and its ratio to total somatic embryos were very low in the 20 d treatment, they were much higher than those of control. This indicated that 4℃ low temperature pretreatment had no improvement effect on *F. mandshurica* somatic embryogenesis and abnormal somatic embryo control, but the proper treatment had the potential to improve normal somatic embryogenesis.

Key words: *Fraxinus mandshurica*; low temperature pretreatment; somatic embryogenesis; abnormal somatic embryos

水曲柳是我国东北地区珍贵的硬阔叶用材树种, 同时也有很高的观赏价值, 是国家渐危物种。水曲柳的人工造林和繁殖已经引起人们的高度重视, 组织培养技术用于水曲柳的无性快速繁殖研究已取得了一定的进展(谭燕双和沈海龙 2003; 张惠君和罗凤霞 2003; 张丽杰等 2007)。作为离体培养条件下形态发生和植株再生的途径之一的植物体胚发生, 因其高效转化为完整植株的能力、高度的遗传稳定性和用于良种繁育的潜力而受到广泛关注。水曲柳的体胚诱导虽然取得成功, 但是由于体胚诱导率低和畸形胚发生率高等原因, 致使完整的体胚发生体系的建立和应用受到影响(孔冬梅等2006; 孔

冬梅和沈海龙 2008)。低温预处理是植物体胚发生研究中为改善体胚发生而广泛采用的比较有效的措施之一, 但关于低温预处理对水曲柳体胚发生的效应至今尚未见报道。本文以水曲柳未成熟合子胚为外植体诱导体胚发生, 并研究低温预处理与水曲柳体胚发生的关系, 为探讨改善水曲柳体胚发生的措施提供参考。

收稿 2009-02-23 修定 2009-05-20

资助 国家自然科学基金(30170772)。

* 通讯作者(E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn; Tel/Fax: 0451-82191044)。

材料与方法

水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.)未成熟种子于2007年7月23日采集于东北林业大学哈尔滨实验林场发育良好的母树。采集的种子立即装入纸袋,带回实验室置于4℃冰箱内低温处理10、20和30 d;以未作低温处理的种子为对照。处理后进行材料灭菌和诱导培养。

种子去翅后用自来水冲洗1 d、70%酒精浸泡20~30 s后,在超净工作台上用0.2%的NaClO溶液灭菌15 min,之后用无菌水漂洗5次,备用。

从灭过菌的种子中剥取种胚,再从每个种胚上切取一片子叶用作外植体,切下的子叶将其远轴面朝下,接种于培养基上进行体胚诱导培养。诱导培养基为1/2MS(MS培养基所有成分均减半),附加1.5 mg·L⁻¹ NAA、0.5 mg·L⁻¹ 6-BA、400 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白、70 g·L⁻¹ 蔗糖、6 g·L⁻¹ 琼脂,高压灭菌前调节pH值至5.8。采用暗培养,培养室温度为(25±2)℃,相对湿度为60%~70%。

每处理重复3次,每个重复接种10个外植体,培养6周时记录体胚发生情况,按下列公式统计各项数据,并将结果用SPSS 13.0软件进行方差分析和多重比较(LSD法)。体胚发生数(个)=体细胞胚总数/发生体胚的外植体数;畸形胚发生数(个)=畸形胚总数/发生体胚的外植体数;子叶胚发生数(个)=子叶形体细胞胚总数/发生体胚的外植体数;正常胚发生数(个)=子叶期正常体细胞胚数/发生体胚的外植体数;畸形胚率(%)=子叶期畸形胚数/子叶胚发生总数×100;体胚发生率(%)=发生体细胞胚的外植体数/接种的外植体数×100;子叶胚率(%)=子叶形体细胞胚数/体胚发生总数×100;正常胚率(%)=子叶期正常体细胞胚数/子叶胚发生总数×100。

实验结果

1 低温预处理对水曲柳体胚发生数的影响

图1表明,水曲柳体细胞胚的发生数随着低温预处理时间的延长而呈下降趋势。未经低温预处理的外植体,其体胚发生数量最多(平均每个外植体产生2.99个体细胞胚),其次为预处理20 d的(平均每个外植体产生体胚2.32个),低温预处理10 d和30 d的外植体平均发生体胚数均较低(分别为1.56

个和0.57个)。方差分析显示,低温预处理时间对水曲柳体胚发生数的影响极显著($P<0.01$)。多重比较(图1)表明,未作低温预处理与低温预处理10 d及30 d之间、低温预处理20 d与30 d之间的差异显著($P<0.05$),低温预处理30 d与未作低温预处理、低温预处理10 d及20 d之间差异极显著($P<0.01$)。以未经低温预处理的外植体诱导体细胞胚发生数最高,而低温预处理30 d的最低。

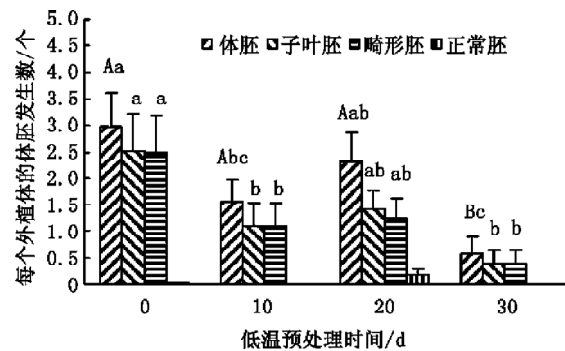


图1 低温预处理时间对水曲柳体胚发生数的影响

Fig.1 Effect of low temperature pretreatment on induction number of somatic embryos of *F. mandshurica*

图中小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著;大写字母表示在 $P<0.01$ 水平上差异极显著。

此外,外植体培养6周的多数体细胞胚发育至子叶期的方差分析显示,低温预处理对子叶胚发生数的影响显著($P<0.05$)。不作低温预处理的发生数最多(每个外植体2.50个),且与低温预处理10 d和30 d间差异显著($P<0.05$),处理20 d的子叶胚的发生数次之(每个外植体1.42个),处理10 d和30 d的不产生子叶胚,说明未经低温预处理的外植体上有较多的体胚能够整齐一致地发育至子叶胚阶段。

2 低温预处理对畸形胚发生数的影响

由于体细胞胚的形态在子叶胚时期最容易分辨,所以我们只对子叶期的体细胞胚进行畸形胚和正常胚数量的统计。由图1可以看出,水曲柳畸形胚发生数随着低温预处理时间的延长而变化的趋势与体胚发生数及子叶胚发生数的相同,即畸形胚发生数随着体胚发生数的增多而增多,随着体胚发生数的减少而减少。方差分析和多重比较(图1)显示,低温预处理时间对水曲柳畸形胚发生数的影响显著($P<0.05$),未作预处理与低温预处理10 d和低温预处理30 d的之间差异显著($P<0.05$)。

此外,经低温预处理后,畸形胚率均在80%以上,其中低温预处理10 d和30 d的畸胚率达到100%,即所形成的子叶胚全部呈畸形。低温预处理时间对水曲柳畸形胚发生率的影响差异不显著($P>0.05$) (图2)。可见,处理30 d之内的低温预处理对降低水曲柳畸形胚的发生没有控制作用。

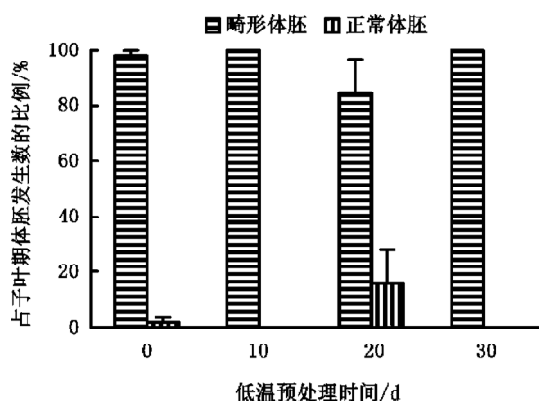


图2 低温预处理时间对水曲柳畸形胚率和正常胚率的影响

Fig.2 Effect of low temperature pretreatment on induction ratios of abnormal and normal somatic embryos of *F. mandshurica*

3 低温预处理对正常胚发生数的影响

方差分析显示,低温预处理时间对正常胚发生数的影响不显著。由图1可以看出,经低温预处理的外植体正常胚发生数很少,未低温预处理的为每外植体0.02个,低温预处理20 d的为每外植体0.17个,而低温预处理10 d和30 d的正常子叶胚均未发生。不过,低温预处理20 d的虽然体胚发生数和子叶胚发生数均低于未作低温预处理的,但正常胚发生数则比其高,且是所有处理中最高的,是未作低温预处理的850%。另由图2可以看出,未作低温预处理和低温预处理20 d的正常胚发生比率虽然很低(分别为1.79%和15.63%),但是处理20 d的正常胚发生比率远高于未作低温预处理的(是其873%)。

4 低温预处理对各种体细胞胚发生率的影响

经过低温预处理的外植体培养6周时的体胚发生率达到最大值。由图3可以看出,随着低温预处理时间的延长,水曲柳体胚发生率呈现下降—升高—下降的趋势,与体胚发生数的变化趋势相同。不经低温预处理的体胚发生率最高,达到22.22%。

但方差分析表明,低温预处理时间对水曲柳体胚发生率的影响不显著,说明4℃低温预处理10、20和30 d不能提高水曲柳体胚发生率。

此外,未作低温预处理和低温预处理10、20和30 d的子叶胚率分别为76.69%、61.90%、74.10%和53.33%,其变化趋势与体胚发生率的相同。

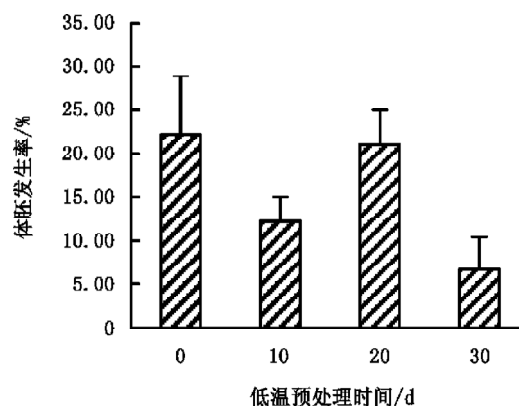


图3 低温预处理时间对水曲柳体胚发生率的影响

Fig.3 Effect of low temperature pretreatment on induction rate of total somatic embryos of *F. mandshurica*

讨 论

作为促进脱分化和再分化的一项有效措施,低温预处理早已广泛用于植物组织培养中。如低温处理可提高水稻花药(赵成章1980)和籼稻花培(沈清景1983)愈伤组织诱导率和绿苗分化率,以及小麦成熟胚愈伤组织分化能力。一般认为,低温预处理是通过改变组织中激素水平或游离氨基酸含量而发生作用的(Sunderland等1984;徐武等1997;黄剑华等2001)。已有的研究表明,低温预处理对一些植物体胚诱导和成苗也有作用。如接种前将大豆幼荚于4℃低温中预处理3~4 d可以提高其未成熟子叶的体胚诱导频率(王萍等2002)。适当的低温预处理可改善大豆和平贝母(袁澍等2003)及欧洲甜樱(Reidiboym-Talleux等2000)体胚发生和植株的再生,还可提高羽衣甘蓝(冯辉等2007)和甘蓝型油菜(朱彦涛等2005)小孢子的产胚率。鸭茅草的叶片在4℃低温下预培养1~7 d后再转入21℃中培养时,叶片体胚发生可以得到促进,每个外植体的苗数量增加,体胚苗的质量也可以得到改善(Tomaszewski Jr等1994)。低温预处理可以提高甘蓝型油菜小孢子的胚胎发生能力,但胚发生的同步性降低(郭世星

等 2005)。花楸经 2~5 °C 预处理 3~7 d, 其幼胚的体胚发生能力下降(沈海龙等 2008)。这说明不同植物对低温预处理的反应并不相同。

本文结果表明, 对接种前的外植体用 4 °C 低温处理 10、20 和 30 d 后, 水曲柳体胚总体发生和子叶胚发生没有得到促进, 畸形胚发生也未得到控制。这与前人的结果不一致, 但与沈海龙等(2008)报道的花楸中结果相似。不过, 4 °C 低温预处理 20 d 的正常体胚发生数和发生比率的绝对数虽然很低, 但比未作低温预处理的高, 这是值得关注的, 应该深入研究。

参考文献

- 冯辉, 冯建云, 姜凤英, 郭妹, 傅越(2007). 影响羽衣甘蓝游离小孢子培养中胚状体发生的几个因素. 植物生理学通讯, 43 (3): 545~546
- 郭世星, 牛应泽, 刘玉贞(2005). 低温预处理对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响. 中国农学通报, 21 (9): 231~233
- 黄剑华, 陆瑞菊, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅(2001). 低温预处理对大麦花药内源游离氨基酸和多胺水平的影响. 中国农业科学, 34 (6): 626~631
- 孔冬梅, 沈海龙(2008). 植物组织培养中畸形胚的发生和控制. 植物生理学通讯, 44 (5): 1018~1024
- 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): 130~133
- 沈海龙, 高翔翔, 杨玲(2008). 甘露醇、蔗糖和低温预处理对花楸体细胞胚诱导的影响. 植物生理学通讯, 44 (4): 677~681
- 沈清景(1983). 低温预处理提高籼稻花培愈伤组织诱导率和绿苗率的研究. 植物生理学通讯, (6): 31~32
- 谭燕双, 沈海龙(2003). 水曲柳下胚轴的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 39 (6): 623
- 王萍, 卫居香, 李宜程, 吴颖, 王罡(2002). 低温预处理对大豆未成熟子叶胚胎发生影响的研究. 吉林农业大学学报, 24 (3): 27~29
- 徐武, 李鸣, 张敬, 方红曼, 李安生(1997). 低温预处理过程中大麦花药内源激素的变化. 遗传学报, 24 (2): 165~169
- 袁澍, 贾永炯, 林宏辉(2003). 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素. 植物生理学通讯, 39 (5): 508~512
- 张惠君, 罗凤霞(2003). 水曲柳未成熟胚的离体培养研究. 林业科学, 38 (3): 63~69
- 张丽杰, 张丽玮, 冯丹丹, 赵霞, 沈海龙(2007). 水曲柳腋芽离体快繁研究初报. 植物研究, 27 (3): 319~324
- 赵成章(1980). 低温处理对水稻花药愈伤组织的诱导、分化的影响. 植物生理学通讯, (3): 37~40
- 朱彦涛, 李殿荣, 杨淑慎(2005). 低温预处理和基因型对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 33 (5): 88~94
- Reidiboym-Tallex L, Sourdioux M, Grenier E, March GGD (2000). Lipid composition of somatic and zygotic embryos from *Prunus avium*. Effect of a cold treatment on somatic embryo quality. *Physiol Plant*, 108: 194~201
- Sunderland N, Huang B, Hills GJ (1984). Disposition of pollen *in situ* and its relevance to anther/pollen culture. *J Exp Bot*, 35: 521~530
- Tomaszewski Jr Z, Kuklin AI, Sams CE, Conger BV (1994). Influence of low temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchardgrass leaves. *Plant Growth Regul*, 14: 229~234