

黄山栾树体细胞胚的发生和组织学观察

冯大领^{1,*}, 李伟², 张洁¹, 李鹏涛¹, 李明¹, 赵书岗¹, 史宝胜³, 彭伟秀³

¹河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; ²北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ³河北农业大学园林与旅游学院, 河北保定 071001

摘要: 黄山栾树无菌苗的节间和叶柄离体培养后, 其体细胞胚发生的结果表明: 节间愈伤组织可诱导产生体细胞胚, 而叶柄愈伤组织则生根; 节间愈伤组织诱导培养基为MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5~3.0 mg·L⁻¹ NAA; 节间胚性愈伤组织诱导培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D; 胚性愈伤组织转移到无植物生长调节剂的MS培养基上可发育成正常植株。组织学观察表明, 体细胞胚在胚性愈伤组织中有的发生于愈伤组织表层细胞, 有的发生在愈伤组织内部。黄山栾树体细胞胚的形成经历球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚几个阶段, 这与合子胚的发育途径相似。

关键词: 黄山栾树; 体细胞胚; 胚性愈伤组织; 组织学

Observation of Somatic Embryogenesis and Histology in *Koelreuteria bipinnata* Franch var. *integrifoliola* T. Chen

FENG Da-Ling^{1,*}, LI Wei², ZHANG Jie¹, LI Peng-Tao¹, LI Ming¹, ZHAO Shu-Gang¹, SHI Bao-Sheng³, PENG Wei-Xiu³

¹College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; ²College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ³College of Landscape Architecture and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China

Abstract: Somatic embryogenesis of *Koelreuteria bipinnata* var. *integrifoliola* was studied in this paper. The results showed that somatic embryos were obtained from intersegment callus, and leafstalk callus produced root. Intersegment callus was MS medium+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5~3.0 mg·L⁻¹ NAA. Embryonic callus was MS medium+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D. Embryonic callus cells developed to normal seedlings when subcultured on MS medium without plant growth regulator. Histological observation revealed that the somatic embryos produced from cells of superficial callus or cells of inner callus and it successively developed through globular-shaped, heart-shaped, torpedo stages and cotyledon stages, similar to the development of zygotic embryo.

Key words: *Koelreuteria bipinnata* var. *integrifoliola*; somatic embryo; embryonic callus; histology

黄山栾树, 又名全缘叶栾树、灯笼树, 是无患子科(Sapindaceae)栾树属(*Koelreuteria*)植物(刘玉壶和罗献瑞1985)。此树种是一个优良的园林观赏树种, 主要分布在长江流域以南地区, 在北方其幼树难过冬, 从而限制了黄山栾树在北方地区的推广应用, 因此培育适应性广的黄山栾树品种显得非常重要。组织培养技术尤其是体细胞胚发生的培养技术可能是筛选理想的变异植株的技术途径。体细胞胚发生具有数量多、繁殖速度快、结构完整的特点。黄山栾树体细胞胚发生的研究对建立黄山栾树的无性繁殖系, 进行基因工程或细胞工程育种筛选变异植株, 研究其细胞分化和形态发生机制等都有一定的意义。黄山栾树体细胞胚发生的研究尚无报道。本文以黄山栾树节间和叶柄为材料, 对其体细胞胚的发生进行了研究。

材料与方法

以黄山栾树(*Koelreuteria bipinnata* Franch var. *integrifoliola* T. Chen)无菌苗的节间(不带芽的茎段)和叶柄为材料进行诱导。

将无菌苗的节间和叶柄分别切成0.5~1.0 cm切段, 接种于愈伤组织诱导培养基上, 每种外植体接种30个。在愈伤组织诱导培养基上生长40 d后, 将未生根的愈伤组织接到胚性愈伤组织诱导培养基中。40 d后, 将胚性愈伤组织接入不加植物生长

收稿 2009-05-25 修定 2009-09-03

资助 北京林业大学林木、花卉遗传育种教育部重点实验室开放基金(05-04)。

* 通讯作者(E-mail: bjdalingfeng@163.com; Tel: 0312-7528241)

调节剂的MS培养基中,进行成苗培养。

诱导愈伤组织的培养基为MS加30 g·L⁻¹的蔗糖、7 g·L⁻¹琼脂粉(以下培养基与此相同),培养基中的植物生长调节剂为2,4-D+NAA,其浓度分别为0.5、1.5、3.0 mg·L⁻¹(表1)。用1 mol·L⁻¹ NaOH和1 mol·L⁻¹ HCl调节pH值为5.8~6.0(以下培养基与此相同)。诱导胚性愈伤组织培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D。培养室中温度为(25±1) °C,光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹,光/暗周期为16 h/8 h,湿度为45%~57%。

组织学观察时,将早期培养的愈伤组织、胚性愈伤组织以及正在发育的体细胞胚分别用38%福尔马林:冰醋酸:70%酒精为5:5:90的FAA固定液固定48 h,石蜡包埋,1%番红-0.5%固绿染色,石蜡切片厚度为10 μm,封片后用OLYMPUS显微镜和显微摄像系统观察照相。后期体细胞胚及成苗用CANONG610数码相机照相。

结果与讨论

1 不同外植体和不同浓度植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

分别将节间和叶柄接种到愈伤组织诱导培养基上,培养6 d以后,在切口处可见到呈瘤状突起状的愈伤组织,继续培养30 d后统计愈伤组织的诱导率和生根率的结果(表1)表明:(1)叶柄培养30 d后,其愈伤组织的诱导率普遍低于节间,最高达到87%,最低为30%。其诱导率没有随着2,4-D浓度的增加而上升,当2,4-D浓度达到3.0 mg·L⁻¹时,诱

导率反而下降,最低为33%。从生长状态看,愈伤组织的颜色为浅绿,在各个处理中均分化生根,其生根率均为100%,这说明培养基中添加一定浓度的2,4-D和NAA有利于叶柄愈伤组织生根,但对于胚性愈伤组织的诱导不利。(2)节间愈伤组织的诱导率比叶柄高,当2,4-D浓度为1.5和3.0 mg·L⁻¹时,均为100%;2,4-D浓度为0.5 mg·L⁻¹时,其诱导率最低为85%。从生长状态看,愈伤组织为黄绿色,其生根率要远远低于叶柄愈伤组织,最低只有10%,随着2,4-D浓度的升高,愈伤组织的生根率逐渐下降。黄山栎树节间和叶柄的愈伤组织诱导和分化情况有很大差异,这与胡忠等(2006)、Pinto等(2002)、Höfer等(1999)和Kintzios等(1999)的结果一致。据此可以认为,黄山栎树以节间诱导愈伤组织,在培养基中添加3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.5~3.0 mg·L⁻¹ NAA,其愈伤组织的诱导率高,生根率较低,从而有利于胚性愈伤组织的诱导。

2 胚性愈伤组织的诱导

将培养基MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5~3.0 mg·L⁻¹ NAA上培养40 d的节间愈伤组织(不生根)转入胚性愈伤组织诱导培养基上。40 d后,愈伤组织呈黄白色,继续培养后,其表面出现绿色斑点(图1-a),随后陆续出现少量早期胚状体,可以发育成成熟的体细胞胚。

3 体细胞胚的发生

将胚性愈伤组织转接到MS基本培养基中,7 d后愈伤组织表面出现大量的芽状体(图1-b),而后依序发育为球形胚(图1-c)、心形胚(图1-d)、鱼雷

表1 不同外植体和植物生长调节剂组合对愈伤组织的影响

Table 1 Effects of different explants and plant growth regulator on callus of *K. bipinnata* var. *integrifoliola*

2,4-D 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	叶柄愈伤组织		节间愈伤组织	
		诱导率 /%	生根率 /%	诱导率 /%	生根率 /%
0.5	0.5	50	100	85	87
0.5	1.5	87	100	91	87
0.5	3.0	38	100	85	50
1.5	0.5	57	100	100	40
1.5	1.5	57	100	100	50
1.5	3.0	30	100	100	63
3.0	0.5	33	100	100	10
3.0	1.5	75	100	100	20
3.0	3.0	36	100	100	30

诱导率 = 长出愈伤组织的外植体数 / 总外植体数 × 100%; 生根率 = 生根的愈伤外植体数 / 总愈伤外植体数 × 100%。

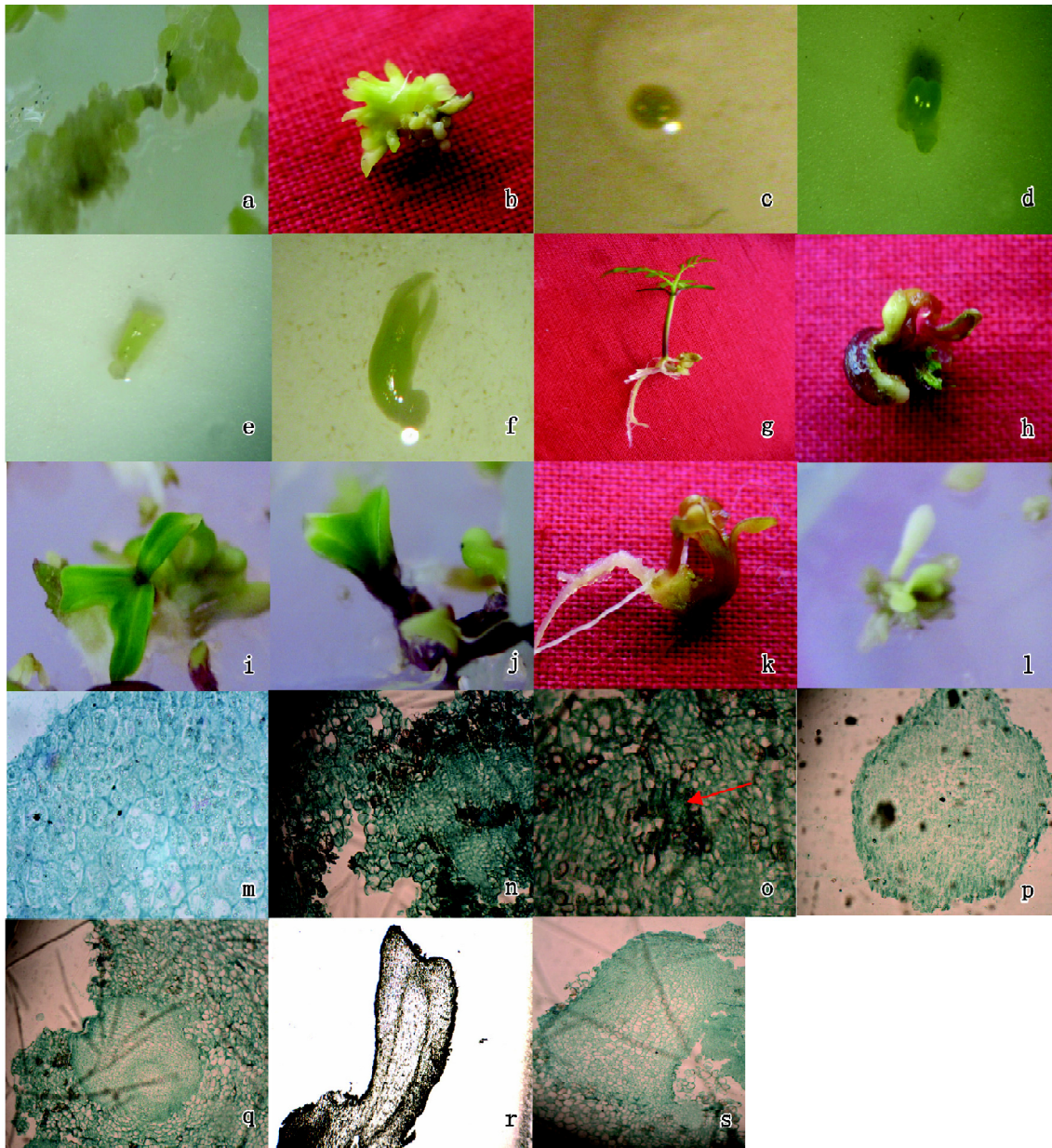


图1 黄山栎树愈伤组织在培养过程中体细胞胚的发生和发育

Fig.1 Morphogenesis and development of somatic embryos in the process of callus culture of *K. bipinnata* var. *integrifoliola*

a: 胚性愈伤组织出现绿色斑点; b: 胚状体; c: 球形胚; d: 心形胚; e: 鱼雷胚; f: 子叶胚; g: 正常植株; h: 胚轴肥大; i、j: 子叶畸形; k: 玻璃化胚; l: 白化胚; m: 非胚性愈伤组织(400×); n: 胚性愈伤组织(400×); o: 多细胞原胚(400×); p: 游离下来的球形胚(40×); q: 愈伤组织内部发育的胚(100×); r: 鱼雷胚内有形成层(40×); s: 愈伤组织表面发育的多细胞原胚(100×)。

胚(图 1-e)和子叶胚(图 1-f)。这一发育过程与合子胚发生途径相同。继续培养后, 此体细胞胚可进一步发育形成完整的植株(图 1-g)。在诱导愈伤组织和胚性愈伤组织过程中均须添加 2,4-D。但胚性愈伤组织向体细胞胚和成熟植株发育时, 培养基中不需添加 2,4-D, 显示 2,4-D 的作用有阶段性, 在诱导胚性愈伤组织阶段促进, 而在胚状体发育成完整植

株阶段有抑制作用, 这与韩碧文和刘淑兰(1988)的结果一致。此外, 在培养过程中, 大部分体细胞胚可发育成完整植株, 但也有少量体细胞胚发育畸形, 如胚轴肥大呈扁形(图 1-h)、子叶呈畸形(图 1-i、j), 产生玻璃化胚(图 1-k)和白化胚(图 1-l)。如果将某些畸形胚(如子叶畸形或玻璃化胚)转接到不加植物生长调节剂的新鲜培养基中继续培养也有可能发

育成正常的植株。

4 体细胞胚发生的组织学观察

解剖学观察表明,非胚性愈伤组织的各个细胞结构紧凑(图 1-m);而在胚性愈伤组织分化过程中其细胞结构变得松散(图 1-n),细胞较小,细胞质浓,染色较深。在这些松散的愈伤组织表层或内部会形成染色深的多细胞原胚(图 1-o),细胞较小。多细胞原胚继续呈纵向、横向分裂,进而形成具有完好的表皮细胞的球形胚,球形胚形成明显的孤立化状态,有的球形胚从愈伤组织中脱落下来(图 1-p),有的直接分化成心形胚,但此种心形胚并不完全脱离愈伤组织(图 1-q),球形胚向心形胚分化时可见到明显的形成层分布。心形胚继续伸长生长发育成鱼雷胚,鱼雷胚胚轴内有形成层出现(图 1-r),子叶原基在发育过程中,细胞分裂生长不平衡,造成子叶的长短不一,鱼雷胚进一步发育成子叶胚。此外,我们还观察到,体细胞胚在胚性愈伤组织中的

发生部位不同,有的发生于愈伤组织表面(图 1-s),有的发生在愈伤组织内部(图 1-q),但其是起源于单个细胞还是胚性细胞团,还有待进一步探讨。

参考文献

- 韩碧文,刘淑兰(1988).植物离体体细胞胚胎发生.植物生理学通讯, 10 (1): 9~15
- 胡忠,徐艳,高欢欢,关秀琼(2006).影响宁夏枸杞愈伤组织体细胞胚发生的因素.汕头大学学报, 21 (4): 57~63
- 刘玉壶,罗献瑞(1985).中国植物志(第47卷,第1分册).北京:科学出版社, 56~58
- Höfer M, Touraev A, Heberle-Bors E (1999). Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Rep*, 18: 1012~1017
- Kintzios S, Manos C, Makri O (1999). Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.). *Plant Cell Rep*, 18: 467~472
- Pinto G, Santos C, Neves L, Araújo C (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globules* Labill. *Plant Cell Rep*, 21: 208~213