

甘露醇、蔗糖和低温预处理对花楸体细胞胚诱导的影响

沈海龙*, 高翔翔, 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: 用渗透剂甘露醇和蔗糖以及2~5 ℃低温分别预处理未成熟合子胚外植体, 研究其对花楸体胚诱导率影响的结果表明, 未成熟的合子胚经1.0 mol·L⁻¹甘露醇预处理24 h后, 接种在添加0.5 mg·L⁻¹ 6-BA、0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D和4%蔗糖的MS培养基上培养可产生大量体胚, 体胚诱导率可达84%, 显著高于未经甘露醇预处理的(诱导率为38%), 每个外植体产生的体胚数可达12.9个。体胚经成熟和萌发培养后形成再生植株。扫描电镜观察表明, 甘露醇预处理可改变外植体表面细胞的有序排列, 改善体胚发生状况, 因而体胚诱导率增加。

关键词: 花楸; 体胚发生; 渗透剂; 低温

Effects of Mannitol, Sucrose and Cold Pretreatment on Somatic Embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.

SHEN Hai-Long*, GAO Xiang-Xiang, YANG Ling

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

Abstract: Effects of pretreatments with osmotica, mannitol and sucrose, and 2–5 ℃ cold storage on immature zygotic embryo explants of *Sorbus pohuashanensis* were conducted. The results showed that abundant somatic embryos formed and the their regeneration rate reached 84% on MS medium supplemented with 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D and 4% sucrose after pretreatment with 1.0 mol·L⁻¹ mannitol for 24 h, average 12.9 somatic embryos per explant were induced, the regeneration rate was much higher than that of untreated explants (control, 38%). The somatic embryos converted into plantlets successfully after maturation and germination culture. Scanning electron micrographs (SEM) revealed that pretreatment with 1.0 mol·L⁻¹ mannitol for 24 h disturbed the distribution pattern of the explant epidermal cells and the somatic embryogenesis was enhanced.

Key words: *Sorbus pohuashanensis*; somatic embryogenesis; osmotica; low temperature

花楸为蔷薇科花楸属小乔木, 是一种观花、观叶、观果俱佳的珍贵经济树种。主要分布在我国黑龙江省小兴安岭、完达山、张广才岭和老爷岭山区; 吉林、辽宁、内蒙古和华北各省, 数量稀少, 常生于较高海拔的山地暗针叶林内, 呈单株散生状态。花楸种子具有休眠的特性, 采用传统的育苗方法, 其发芽率低, 耗时长, 成型慢, 且存在采种母树不足和种子收集困难等缺陷。体细胞胚胎发生和植株再生具有以少量原始繁殖材料获取大量繁殖后代的潜在优势, 可能是解决这些问题的途径之一。体细胞胚胎发生受多种因素影响, 如外植体来源、培养基、生长激素各种添加物、光和温度等(周俊彦和郭扶兴 1996; 袁澍等 2003; 陈小飞等 2007)。有研究表明, 外植体预处理有良好的体胚诱导和体胚苗再生的效应, 其预处理方法有水浸

(Tu等 2005)、光照(D'Onofrio等 1998; Torne等 2001; 袁澍等 2003)、渗透剂(Reidiboym-Talleux等 1999; Iantcheva等 2005; You等 2006; Zhou和Brown 2006)、冷处理(Reidiboym-Talleux等 2000; 袁澍等 2003)、高浓度细胞分裂素(Kintzios等 2000)和其他如嘧啶类化合物、三唑衍生物(Senaratna等 2002)等。尽管不同的物种或基因型对不同处理方法的反应不同, 但采用渗透剂处理和低温处理或二者结合的方法比较广泛且效果较好。本文以花楸未成熟合子胚为材料, 研究渗透调节剂和低温预处理对花楸体细胞胚诱导的影响, 探求提高花楸体胚

收稿 2008-04-11 修定 2008-06-27

资助 国家“十一五”科技支撑项目子课题(2006BAD03A0405)和东北林业大学校立基金(2005-2007)。

* E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn; Tel/Fax: 0451-82191044

诱导率的预处理方法,从而为提高花楸体胚发生效率和体胚苗转化率提供参考。

材料与方法

花楸 [*Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.] 未成熟合子胚于2006年7月中旬采自黑龙江省植物园二十多年生的花楸母树。取洗去杂质后的幼果,用70%的酒精冲洗30 s (重复2次),再用3% NaClO 冲洗10 min后以无菌水冲洗干净,于超净工作台上将幼果顶端切除2~3 mm长,挤出果实剩余部分内的幼胚,作预处理和接种(图1-a~d)。

预处理分两种方法:(1)渗透剂预处理,分别配制浓度为0.5、0.7、1.0 mol·L⁻¹的甘露醇和蔗糖溶液,灭菌后,将上述剥离出的幼胚分别浸泡在不

同溶液中0、3、6、12、24和48 h后接种。每一处理100个幼胚。(2)低温预处理,将上述剥离出的幼胚分别放在2~5 °C的温度下放置0、3、5、7 d后接种。每一处理100个幼胚。

培养基有: MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D+500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白(CH)+4% 蔗糖; MS+0.01 mg·L⁻¹ NAA+4% 蔗糖+500 mg·L⁻¹ CH; MS+5 g·L⁻¹ PEG6000+3%蔗糖; MS+3%蔗糖; MS+0.05 mg·L⁻¹ IBA。各培养基均添加6 g·L⁻¹ 琼脂,高压灭菌前pH调到5.8。

体胚诱导时,将幼胚接种于培养基上进行诱导培养。培养室温度25 °C左右,暗中培养,相对湿度为40%~70%。

植株再生培养时,将诱导培养35 d左右得到



图1 花楸体胚诱导发生过程

Fig.1 Processes of somatic embryogenesis of *S. pohuashanensis*

a: 花楸幼果(1.0×); b: 果实横切面(1.0×); c: 剥离后的幼胚(1.0×); d: 接种后的外植体(1.0×); e: 未经处理的幼胚体胚发生(对照, 1.0×); f: 1.0 mg·L⁻¹甘露醇预处理24 h后的幼胚体胚发生(2.0×); g: 分化的鱼雷型体胚(2.5×); h: 子叶型体胚(1.25×); i: 体胚在试管内萌发(1.0×); j: 体胚形成的再生植株(1.0×)。

的体细胞胚继代到培养基上再培养20 d后, 轻轻将体胚分离下来, 转接到培养基上进行增殖培养; 每30 d更换一次增殖培养基; 有大量子叶型体胚出现时转接到培养基上进行成熟培养, 直至出现大量成熟子叶型体胚时, 将其转至萌发培养基上进行萌发培养, 长出真叶时, 将其接入生根培养基上诱导生根, 直至形成完整植株。培养条件: 培养温度为 (24 ± 2) , 光照强度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 左右, 每天16 h光照/8 h黑暗, 相对湿度为40%~70%。

电镜观察参考谢娇等(2007)和杨玲(2007)文中的方法, 分别取培养前未经预处理的幼胚(剥离出的新鲜幼胚长约4 mm)、培养前经 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇浸泡24 h后的幼胚(长6 mm)和培养3 d后的幼胚用液氮固定后粘于样品台上, 采用美国FEI公司生产的Quanta 200型扫描电子显微镜进行超微形态观察并照相。

体胚诱导率用经诱导产生体胚的外植体个数占接种外植体总数的百分比表示。

结果与讨论

1 未成熟合子胚的体胚发生

未成熟合子胚接种于培养基上, 培养3 d后开始萌动, 2片子叶微微分开并逐渐膨大, 呈淡黄色。1周左右即见有透明颗粒状愈伤组织广泛分布在2片子叶的边缘, 少量分布在表面上。15 d左右可观察到有少量较小的乳白色瘤状突起(早期原胚), 出现于2片子叶上表面。培养20 d时, 可看到子叶边缘的表面上有大量乳白色瘤状突起, 有的

子叶边缘产生大量愈伤组织。30 d左右, 可观察到胚轴以及子叶表面上乳白色突起变大, 呈半透明状, 此时将愈伤组织和瘤状突起剥离开来, 瘤状突起进行继代培养35 d时, 记录体胚数量, 统计体胚诱导率。未经处理幼胚的体胚诱导如图1-e所示。

2 渗透调节剂预处理对体胚的诱导效应

从图1-d可见, 合子胚经渗透剂浸泡后, 子叶均张开, 其中用 0.7 和 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇浸泡12和24 h的子叶张开比较明显; 培养15 d时, 经过 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇浸泡3、6、12、24 h的幼胚均长出鲜黄色的胚性愈伤组织; 培养20 d时, 子叶表面和胚轴延伸处有大量瘤状突起, 少数出现早期体胚; 培养30 d时, 比较多的白色半透明早期体胚呈圆形, 突起于子叶表面。渗透剂预处理后的合子胚, 其子叶张开现象明显, 并较早出现, 愈伤组织出现较早, 早期体胚数量较多。方差分析(表1)表明, 不同外植体预处理方法影响花楸体胚诱导率的差异达到极显著水平($P=0.0001$)。渗透剂浓度对花楸体胚发生的影响显著($P=0.040<0.05$), 预处理时间对花楸体胚发生的影响不显著($P=0.307>0.05$)。采用 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇预处理24 h后的幼胚的体胚诱导率(早期原胚诱导率为84%)最高, 诱导产生的体胚数量每外植体可达12.9个。延长或缩短 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的预处理时间均不能提高体胚诱导率, 其中 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇预处理6、24、48 h时的体胚发生率与未经预处理相比差异均达到显著水平($P=0.01<0.05$ 、 $P=0.01<0.05$ 、 $P=0.02<0.05$)。处理时间24 h下, 其他浓度甘露醇预处理的幼胚体胚诱导率差异不显著($P=0.01<0.05$ 、 $P=0.01<0.05$ 、

表1 甘露醇和蔗糖预处理对花楸体胚诱导率的影响

Table 1 Effects of mannitol and sucrose on the induction rate of somatic embryos of *S. pohuashanensis*

预处理		浸泡时间/h						%
渗透剂	浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	3	6	12	24	48	
对照	0	38.0±3.0 ^{ABCDE}	—	—	—	—	—	
甘露醇	0.5	—	12.0±11.0 ^{CDEF}	0±0 ^F	6.7±11.5 ^{aDEF}	26.3±5.4 ^{BCDEF}	8.3±14.2 ^{DEF}	
甘露醇	0.7	—	11.3±12.8 ^{CDEF}	13.3±15.3 ^{CDEF}	41.0±18.3 ^{ABCD}	61.7±2.0 ^{AB}	6.7±5.8 ^{DEF}	
甘露醇	1.0	—	30.0±10.0 ^{BCDE}	6.7±12.8 ^{DEF}	52.3±9.0 ^{ABC}	84.3±3.3 ^A	22.3±7.1 ^{BCDEF}	
蔗糖	0.5	—	23.3±15.3 ^{BCDEF}	12.0±11.3 ^{CDEF}	10.0±10.0 ^{CDEF}	0±0 ^F	3.0±5.8 ^{EF}	
蔗糖	0.7	—	26.7±20.8 ^{BCDEF}	16.7±15.7 ^{CDEF}	13.3±15.3 ^{CDEF}	3.3±5.8 ^{EF}	10.0±10.0 ^{CDEF}	
蔗糖	1.0	—	10.0±10.0 ^{CDEF}	18.3±20.8 ^{CDEF}	26.7±20.8 ^{BCDEF}	26.7±15.3 ^{BCDEF}	33.3±20.7 ^{ABCDE}	

$P=0.01<0.05$)。1.0 mol·L⁻¹蔗糖预处理的体胚诱导率低于不经预处理水平,但预处理时间为6、12、24 h时的这种差异未达到显著水平($P=0.40>0.05$ 、 $P=1.0>0.05$ 、 $P=0.67>0.05$)。这些与Choi和Soh(1997)、Zhou和Brown(2006)用蔗糖预处理以及You等(2006)用蔗糖和甘露醇预处理刺五加体细胞胚诱导和体胚苗转化效果的结果基本上是一致的;但本文中甘露醇比蔗糖似乎好一些。

3 低温预处理对体胚的诱导效应

低温预处理中以处理5 d的体胚诱导率较高(27%),但低于未经低温预处理的(38%),影响不显著($P=0.355>0.05$) (图2)。培养20 d的合子胚有愈伤组织和少量早期体胚产生。愈伤组织呈淡黄色并伴有瘤状胚性愈伤组织,体胚呈白色不透明状。这说明低温预处理可以降低花楸未成熟合子胚的体胚诱导率,不利于细胞胚性的潜能表达。SPSS分析表明,不同时间的低温预处理对体胚发生率的影响不显著($P=0.776>0.05$ 、 $P=0.280>0.05$ 、 $P=0.188>0.05$)。这些与文献中适当的低温预处理可改善大

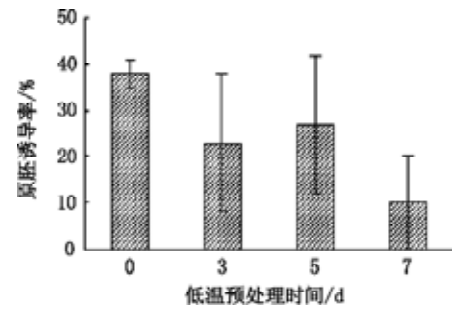


图2 2~5 低温预处理对花楸体胚发生率的影响

Fig.2 Effects of cold pretreatment (2-5) on the induction rate of somatic embryos of *S. pohuashanensis*

豆和平贝母(袁澍等2003)及欧洲甜樱桃(Reidiboym-Talleuxa等2000)体胚发生和植株再生状况的结果不一致,说明2~5 低温预处理并不适用于花楸。

4 花楸幼胚子叶表面细胞的形态学观察

从图3可见,未经渗透剂预处理的子叶表面细胞排列较为规则(图3-a),培养3 d的细胞形态和排列有明显变化,子叶边缘细胞较为规则且细胞排列紧密,没有明显的子叶扩大现象(图3-b);经1.0

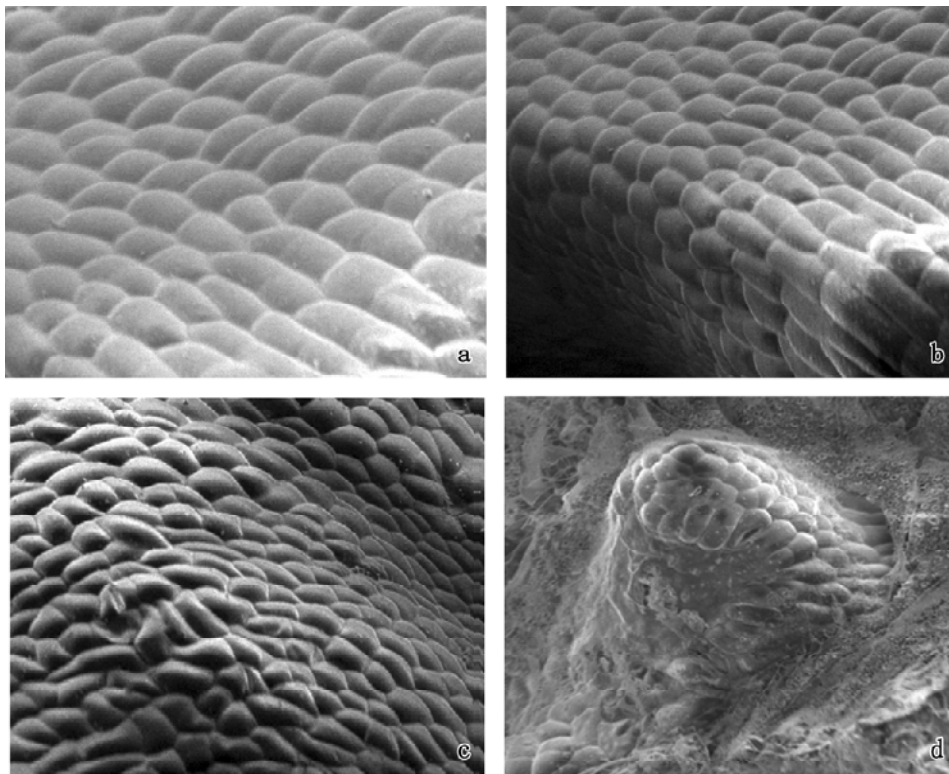


图3 花楸幼胚子叶表面细胞的电镜观察(50 μm)

Fig.3 SEM of immature embryo epidermal cells of *S. pohuashanensis*

a: 未经处理子叶表面细胞(500×); b: 培养3 d的未经处理的子叶表面细胞(500×); c: 1.0 mol·L⁻¹甘露醇浸泡24 h的子叶表面细胞(500×); d: 1.0 mol·L⁻¹甘露醇浸泡24 h和培养3 d的子叶表面细胞(500×)。

mol·L⁻¹甘露醇浸泡24 h的子叶表面细胞排列不紧密,产生不规则的突起(图3-c),培养3 d的子叶表面细胞有明显的凹陷,并伴有多细胞突起,有早期原胚生长(图3-d)。这与Choi和Soh(1997)用蔗糖处理以及You等(2006)用蔗糖和甘露醇处理后刺五加的单胚和合子胚表面细胞产生质壁分离的现象相似。

参考文献

- 陈小飞, 萧浪涛, 鲁旭东, 刘素纯(2007). 外源腐胺对石刁柏愈伤组织胚性能力的影响. 植物生理学通讯, 43 (3): 461~464
- 谢娇, 肖娅萍, 李秀华, 薛婧, 王喆之(2007). 三叶木通叶表面结构的环境扫描电镜观察. 西北植物学报, 27 (3): 0469~0473
- 杨玲(2007). 花椒种子生物学和体细胞胚发生体系研究[博士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 袁澍, 贾勇炯, 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
- 周俊彦, 郭扶兴(1996). 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚发生中的作用. 植物生理学通讯, 32 (4): 247~253
- Choi YE, Soh WY (1997). Enhanced somatic single embryo formation by plasmolyzing pretreatment from cultured ginseng cotyledons. Plant Sci, 130 (2): 197~206
- D'Onofrio C, Morini S, Bellocchi G (1998). Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. Plant Cell Tiss Org Cult, 53: 91~98
- Iantcheva A, Slavov S, Prinsen E, Vlahova M, van Onckelen H, Atanasso A (2005). Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pretreatment. Plant Cell Tiss Org Cult, 81: 37~43
- Kintzios S, Drossopoulos JB, Shortsiianitis E, Peppes D (2000). Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. Sci Hortic, 85(1/2):137~144
- Reidiboym-Talleux L, Diemer F, Sourdioux M, Chapelain K, March GGD (1999). Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. Plant Cell Tiss Org Cult, 55 (3): 199~209
- Reidiboym-Talleux 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
- Senaratna T, Bunn E, Bishop A (2002). Triazole treatment of explant source provides stress tolerance in progeny of Geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey) plants regenerated by somatic embryogenesis. Plant Grow Regul, 36 (2): 169~174
- Somleva M, Odjakova M, Golovinsky E (1993). *In vitro* effect of some pyrimidine analogues on embryogenic response of *Dactylis glomerata* leaf explants. J Plant Physiol, 142 (6): 765~767
- Torne JM, Moysset L, Santos M, Simon E (2001). Effects of light quality on somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. Physiol Plant, 111 (3): 405~411
- Tu S, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (2005). Improved efficiency of somatic embryogenesis from zygotic embryos in *Hyoscyamus niger* by seed water-soaking. Sci Hortic, 106 (3): 440~445
- You XL, Yi JS, Choi YE (2006). Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. Protoplasma, 227: 105~112
- Zhou SJ, Brown DCW (2006). High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. Plant Cell Rep, 25 (3): 166~173