

香果树木细胞胚胎发生

姬飞腾 李凤兰* 高述民 陈发菊

北京林业大学生命科学与生物技术学院, 北京 100083

提要 香果树叶子在附加 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ KT+3% 蔗糖的 MS 固体培养基上培养, 可诱导出愈伤组织。愈伤组织在附加 0.7 mg·L⁻¹ KT+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+3% 蔗糖的 MS 液体培养基中避光悬浮培养时, 可形成体细胞胚胎。体细胞胚胎可在不含植物生长调节剂的 MS 固体培养基上形成正常植株。

关键词 香果树; 体细胞胚胎; 悬浮培养

Somatic Embryogenesis of *Emmenopterys henryi* Oliv

Ji Fei-Teng, Li Feng-Lan*, Gao Shu-Min, Chen Fa-Ju

College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract Calli were induced from leaves of *Emmenopterys henryi* Oliv which were cultured on the solid MS medium containing 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ KT+3% sucrose. Somatic embryos were obtained from calli which were suspensively cultured in liquid MS medium containing 0.7 mg·L⁻¹ KT+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+3% sucrose under dark condition. Somatic embryos were developed to normal seedlings when subcultured on MS medium without plant growth regulators.

Key words *Emmenopterys henryi* Oliv; somatic embryogenesis; suspension culture

香果树(*Emmenopterys henryi* Oliv)为茜草科香果树属落叶乔木, 我国二级保护植物, 树姿高大优美, 是珍稀观赏树种。其木材是雕刻、家具和建筑的优质材料。关于香果树的组织培养, 已有通过形成不定芽获得再生植株的报道^[1~4]。本文建立了香果树木细胞胚胎发生体系, 并初步对体细胞胚胎发生过程作细胞组织学观察。

材料与方法

香果树(*Emmenopterys henryi* Oliv)种子有休眠特性, 种子低温层积 2 个月可破除休眠。取破除休眠后的种子置于 22~25℃湿润条件下, 光照 12 h·d⁻¹, 5 d 萌发后再将萌发的种子植于疏松肥沃的土壤中, 5 个月长大成苗。

取香果树苗叶子, 以 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水漂洗 3 次, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 10 min, 无菌水漂洗 5 次。然后将叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 接种于附加不同生长调节物质的 MS 培养基上培养, 诱导愈伤组织。培养温度为 (25±1)℃, 光照时间 10 h·d⁻¹, 光照度为 28~35 μmol·m⁻²·s⁻¹。

培养 20 d 后, 挑选淡黄色疏松愈伤组织转接到附加 0.7 mg·L⁻¹ KT+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+3% 蔗糖的 MS 液体培养基中, 进行避光悬浮培养。摇床转速 90 r·min⁻¹, 每 7 d 换 1 次新鲜培养液。在体细胞胚胎发育过程中, 取各时期的体细胞胚胎用福尔马林 (5 mL) -冰醋酸 (5 mL) -50% 酒精 (90 mL) 溶液固定, 以石蜡包埋切片, 厚度 10 μm, 经番红固绿染色后观察体细胞胚胎发生过程。

结果与讨论

1 愈伤组织的诱导

接种于附加不同生长调节物质的 MS 培养基上的叶片, 10 d 后切口开始卷曲膨大, 20 d 后形成愈伤组织。从表 1 可以看出, 单独使用 6-BA 可以促进不定芽的生成, 而 NAA 则有较强的促进不定根生成的作用。单独使用 2,4-D 也能诱导出

收稿 2005-03-01 修定 2005-08-29

资助 北京林业大学理科基地基金。

*通讯作者 (E-mail: lifl@bjfu.edu.cn, Tel: 010-62338717)。

表1 不同生长调节剂对香果树愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of various growth regulators on induction of calli of *E. henryi*

培养基	生长调节剂成分及浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	诱导率/%	生长量	愈伤组织特征
MS ₁	6-BA 2.0	29	+	形成不定芽
MS ₂	NAA 2.0	33	+	形成大量不定根
MS ₃	2,4-D 1.0	67	+	淡黄色疏松愈伤组织
MS ₄	2,4-D 1.0+6-BA 0.5	100	+++	淡黄色疏松愈伤组织
MS ₅	2,4-D 1.0+KT 0.5	100	+++	淡黄色疏松愈伤组织

愈伤组织的生长量分为3个等级: 少量(+)、中等(++)、大量(+++)。

愈伤组织, 但加入6-BA或KT后愈伤组织生长量明显提高。附加 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA或 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT的培养基对愈伤组织的诱导效果都较好, 但后者诱导愈伤组织成胚胎的效果稍好一些。

2 体细胞胚的诱导和植株再生

愈伤组织在附加 $0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-

BA+3%蔗糖的MS液体培养基中避光悬浮培养21d后即可看到球形胚(图1-a), 随着培养进程可依次观察到心形胚(图1-b)、鱼雷胚和子叶形胚(图1-c)。在体细胞胚胎发生过程中, 同时有许多不定根生成(图1-e)。子叶胚在悬浮培养基中即可萌发, 或者转入无植物生长调节剂的MS固体培养基上也可形成再生植株(图1-d)。悬浮培养中平均

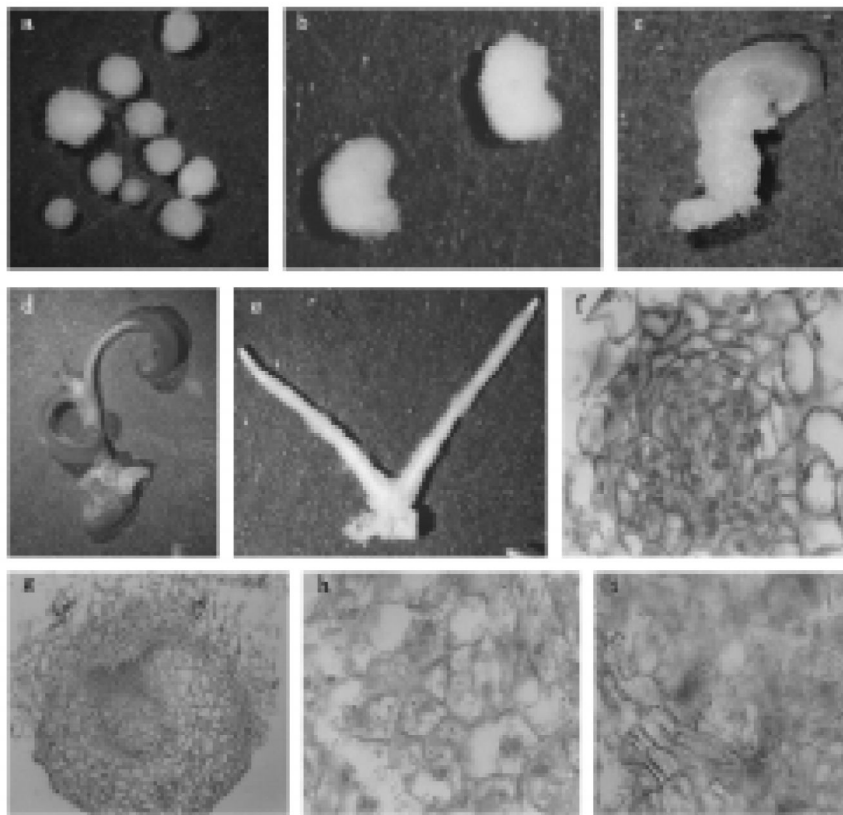


图1 香果树体细胞胚胎和组织的发生过程

Fig. 1 Histogenesis and somatic embryogenesis of *E. henryi*

a: 球形胚; b: 心形胚; c: 子叶胚; d: 再生植株; e: 不定根; f: 多细胞原胚; g: 球形胚后期; h: 球形胚细胞内淀粉粒; i: 胚根端维管组织。

1 g愈伤组织可产生70~80个球形胚,球形胚发育为子叶胚的频率为43%,子叶胚转变为再生植株的频率可达90%。

生长素对香果树体细胞胚胎发生无促进作用,在诱导培养基中加入少量NAA或IBA就会减少体细胞胚胎形成数量。

3 细胞组织学观察

香果树胚性愈伤组织中单个胚性细胞分裂形成多细胞原胚(图1-f),多细胞原胚中的细胞比周围的薄壁细胞体积小,细胞核大,细胞质浓,多细胞原胚继续分裂形成球形胚,球形胚中的分生细胞团上的2个突起形成子叶(图1-g),进入心形胚期,后经鱼雷胚和子叶胚发育成完整植株。

在球形胚和心型胚外周细胞中含有大量淀粉颗粒(图1-h),胚胎中心分裂细胞所含的淀粉颗粒较少,子叶胚外周细胞中淀粉颗粒量明显减少,

形成的淀粉可为胚胎发育提供能量^[5]。

在球形胚时期维管组织已经开始分化,可以观察到初始分化中的螺旋导管。到子叶胚时期,芽端分生细胞不断分化形成胚轴部的维管组织,根端部有数量较多的螺旋导管分化(图1-i)。

参考文献

- 1 徐杏阳,洪树荣,吴立廉.香果树叶外植体诱导植株再生.植物学通报,1983,1(1):40~42
- 2 谈锋,刘玉成,王晓龙.香果树的快速繁殖.西南师范大学学报(自然科学版),1992,17(2):260~263
- 3 谈锋,李淑容,刘咏梅.香果树黑胫病抗病无性系的组织培养和植株再生.云南农业大学学报,1993,8(3):265~268
- 4 周彦兵,谈锋.植物生长调节剂和蔗糖对抗黑胫病香果树丛芽分化的影响.西南师范大学学报(自然科学版),1995,20(6):680~685
- 5 顾玉红,高述民,郭惠红等.文冠果的体细胞胚发生.植物生理学通讯,2004,40(3):311~313