

领春木体细胞胚胎发生及植株再生

冉佳鑫, 王玉宇, 宋丹, 陈发菊*

三峡大学生物技术研究中心, 湖北宜昌443002

摘要: 以领春木(*Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms.)种子幼胚为试验材料, 对领春木体细胞胚胎发生进行了研究。结果表明: 在附加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+3%蔗糖+0.8%琼脂的MS培养基上可诱导出愈伤组织。愈伤组织在附加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基上可形成体细胞胚; 体胚在附加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+0.1% PVP的1/2MS培养基上能大量增殖; 将成熟体胚转移到不添加任何植物生长调节剂的MS培养基上, 培养60 d, 形成正常植株。

关键词: 领春木; 组织培养; 体细胞胚胎发生

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms.

RAN Jia-Xin, WANG Yu-Yu, SONG Dan, CHEN Fa-Ju*

Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

Abstract: Study on somatic embryogenesis from immature embryos in rare endangered plant *Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms. was achieved. The results showed that the best medium to induce the callus was MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+3% sucrose +0.8% agar. The callus could transform to somatic embryo on the medium with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA. A great quantity of somatic embryos could proliferate on 1/2MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+0.1% PVP medium. The somatic embryos could develop to seedlings after 60 days on the medium of MS without plant growth regulator.

Key words: *Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms.; tissue culture; somatic embryogenesis

领春木(*Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms.)属领春木科(Eupteleaceae), 单属(杨得坡等1999), 少种落叶乔木, 是第三纪古老孑遗植物(薛达元等1991)和稀有珍贵的古老树种, 为典型的东亚植物区系成分的特征种, 在植物形态结构方面表现出很多原始性状(如: 雌、雄蕊多数, 轮生), 对研究植物系统演化发育、古植物区系和古代地理气候方面有重要的学术价值。该树种花果成簇, 红艳夺目, 是观赏价值很高的园林绿化树种(陈坤浩等2007)。然而在自然环境中, 领春木更新能力弱(杨得坡等1999), 生境胁迫较大, 在群落竞争中处于劣势地位, 属衰退种, 被列为国家三级重点保护植物(傅立国和金鉴明1992)。目前领春木在世界许多地方已灭绝, 保护该物种和自然生态系统的多样性已迫在眉睫。

目前国内外对于领春木的研究主要集中于对领春木生态及遗传多样性(王芳2008; Wei和Jiang 2012)、形态解剖学(李红芳2005)、生长发育规律(贺超锋等2009)等方面, 而对于领春木再生体系的

建立极少见报道, 国内仅见邢世海和陈娜(2005)以茎段为外植体诱导出愈伤组织的报道。植物体细胞胚发生与发育的研究不仅对揭示细胞分化、形态发生和胚发生等具有重要意义, 而且胚性细胞还是外源基因的良好受体。本实验研究领春木体细胞胚的发生, 为领春木原生质体培养、优良无性系的繁殖、保护珍贵种质资源、基因工程和突变体筛选等研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

领春木(*Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms.)未成熟种子(处于幼胚阶段)采自神农架自然保护区关门山。

收稿 2012-07-19 修定 2012-08-07

资助 国家自然科学基金(30670202)。

* 通讯作者(E-mail: chenjf616@163.com; Tel: 0717-6397188)。

2 方法

2.1 外植体处理

将采集的领春木未成熟种子在自来水下冲洗10~12 h, 然后用75%酒精表面灭菌30 s, 接着用30%的NaClO灭菌6~8 min, 无菌水洗5次, 将未成熟种子切开, 挑出幼胚接种到培养基上。

2.2 培养条件

以MS为基本培养基, 加蔗糖30 g·L⁻¹和琼脂8 g·L⁻¹, pH调至6.0, 培养温度为(25±2) °C。采用光照和黑暗两种光照处理, 光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间16 h·d⁻¹。

2.3 愈伤组织的诱导

将灭菌的外植体接种到MS添加1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D和6-BA (0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)不同组合的培养基上诱导愈伤组织, 30 d后统计愈伤组织诱导率。

2.4 体胚分化和增殖

将诱导的愈伤组织转接到MS添加0.5 mg·L⁻¹ NAA和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基上, 继代2次后将体细胞胚转到附加NAA (0、0.5、0.05 mg·L⁻¹)和6-BA (0、0.5 mg·L⁻¹)不同组合的1/2MS (即MS中的大量元素减半, 其他元素不变)培养基上, 观察体细胞胚增殖情况。在领春木体细胞胚的继代过程中, 为防止培养过程中的褐化现象, 培养基中加入0.1%的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

2.5 体胚萌发与植株再生

将增殖后的体细胞胚转接到不添加任何植物生长调节剂的MS培养基中, 观察体胚萌发情况。

实验结果

1 愈伤组织的诱导

1.1 不同光照条件对领春木愈伤组织诱导的影响

将幼胚置于光照和黑暗两种光照条件下进行培养, 结果表明, 领春木幼胚无论是在光照还是在黑暗条件下均能诱导出愈伤组织, 但在光照条件下诱导产生愈伤组织的时间早于黑暗条件, 可提前15 d, 光照可以刺激领春木愈伤组织的诱导。

1.2 不同植物生长调节剂组合对领春木愈伤组织诱导的影响

将幼胚接种到不同组合的诱导培养基上。30 d后观察发现, 在MS附加1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1、

0.5、1.0 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基上均能诱导出愈伤组织(表1), 愈伤组织呈黄色, 粘稠状, 表面较光滑(图1-A), 以1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA组合最佳, 诱导率100%, 而1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA组合未能诱导出愈伤组织, 可能高浓度的细胞分裂素抑制了低浓度生长素的作用, 而难以诱导出愈伤组织。

2 体胚分化和增殖

将愈伤组织转接到MS附加0.5 mg·L⁻¹ NAA和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基上, 继代培养2次, 40 d后开始产生黄色颗粒状、表面较光滑的体细胞胚, 可以观察到球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚等不同时期的体细胞胚(图1-B~E), 在同一个愈伤组织团块中也可观察到不同时期的体细胞胚(图1-F、H)。

将产生的体细胞胚转到以1/2MS为基本培养基附加不同浓度NAA和6-BA组合的培养基中进行增殖培养(表2)。观察发现, 在不添加任何植物生长调节剂的1/2MS培养基中, 体细胞胚增殖很少, 增值倍数只有1.18, 生长缓慢, 极易褐化且褐化程度极其严重。在添加0.1% PVP后, 褐化程度有一定的减轻。添加0.1% PVP和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA时, 体细胞胚大量增殖, 褐化程度相对减轻, 而在添加0.1% PVP和0.5 mg·L⁻¹ NAA、0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的组合培养基上, 胚性愈伤组织分化产生不同时期的体细胞胚, 体细胞胚大量增殖, 褐化极少, 但如果长期在此条件下培养, 体细胞胚容易再次愈伤化。在添加0.1% PVP和0.05 mg·L⁻¹ NAA、0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基上, 不但产生黄色颗粒状、表面较光滑的体细胞胚, 而且增殖多, 增值倍数达到21, 褐化极少。本实验发现一旦愈伤组织分化出体胚后, 在适当条件下会大量增殖。

3 体胚萌发与植株再生

将增殖后的体细胞胚, 转移到不加任何激素的MS培养基上, 在光照条件下, 体细胞胚开始呈现绿色(图1-G)。40 d后, 体胚萌发产生再生植株(图1-I)。

讨 论

本实验以领春木幼胚为外植体, 以MS为基本培养基, 添加1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA, 接

表1 不同植物生长调节剂组合对领春木愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulator combinations on callus induction of *E. pleiospermum*

2,4-D/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织颜色	愈伤组织质地
1.0	0.1	60	米黄	粘稠光滑
1.0	0.5	100	浅黄	粘稠光滑
1.0	1.0	50	浅黄	粘稠光滑
1.0	2.0	0	—	—

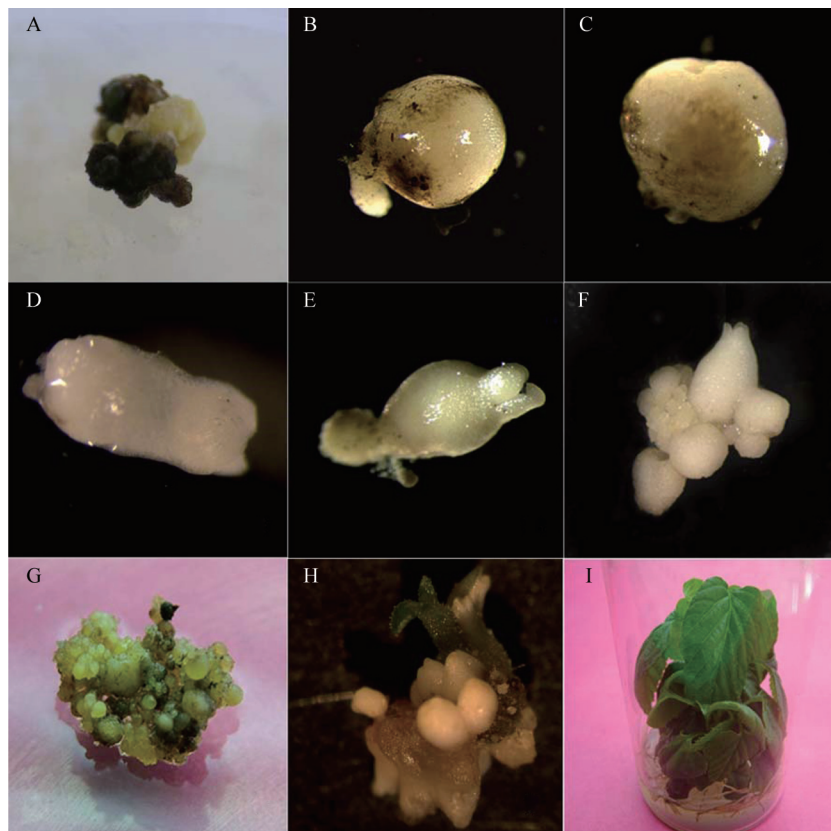


图1 领春木的体细胞胚胎发生

Fig.1 Somatic embryogenesis of *E. pleiospermum*

A: 培养30 d产生的愈伤组织; B: 球形胚; C: 心形胚; D: 鱼雷胚; E: 子叶胚; F: 不同发育阶段的体细胞胚胎; G: 转绿的体细胞胚; H: 萌发的体胚; I: 再生植株。

表2 领春木体细胞胚在不同成分的培养基上的增殖情况
Table 2 The proliferation conditions of somatic embryos of *E. pleiospermum* on different medium

NAA/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹	PVP/%	褐化程度	增殖倍数
0	0	0	++++	1.18
0	0	0.1	+++	1.2
0	0.5	0.1	++	4
0.5	0.5	0.1	+	10
0.05	0.5	0.1	+	21

++++表示褐化极其严重, +++表示褐化很严重, ++表示褐化较少, +表示褐化极少。

种30 d诱导产生胚性愈伤组织, 在去除2,4-D, 添加NAA与6-BA组合的情况下, 产生体细胞胚。在预实验中, 我们选择了不同浓度的2,4-D诱导愈伤组织, 发现高浓度的2,4-D效果没有较低浓度的2,4-D效果好, 甚至抑制愈伤组织的产生, 这一现象在其他研究也有报道(陈金慧等2003), 2,4-D浓度过低也不利于愈伤组织的诱导。可能是因为外植体为幼嫩的种胚, 较高浓度的2,4-D对种子本身产生了损害作用, 抑制了愈伤组织的发生, 而太低浓度的2,4-D不能够引起种子脱分化而产生愈伤组织,

所以本实验选择 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的2,4-D。

在植物体细胞胚的诱导过程中,存在各个方面的影响因素,包括外植体基因型及其生理状态、外源植物生长调节剂、培养基、培养条件等,其中外源植物生长调节剂是非常重要的影响因素(Gallego等2001;赖钟雄和桑庆亮2003),特别是2,4-D对胚性愈伤组织诱导和胚性能力的维持有着至关重要的作用(von Arnold等2002;Fehér等2003)。在本实验领春木体细胞胚的诱导中,添加2,4-D的培养基能诱导出胚性愈伤组织,去除2,4-D的情况下,结合6-BA与NAA的使用才能够形成体细胞胚。有研究指出胚性愈伤组织形成后,如不及时转入去除2,4-D的培养基中,则胚性细胞就不能进入体细胞胚胎发育阶段(崔凯荣等2000)。

根据愈伤组织生长发育的细胞学特点,可将其分为诱导期、分裂期(增殖期)和分化期(器官和体细胞胚形成期)(杨和平和程井辰1991)。本实验中,非胚性愈伤组织经过40 d的诱导才形成胚性愈伤组织,胚性愈伤组织经过40 d左右诱导分化出不同发育时期的体胚,并进一步发育形成正常植株,说明非胚性愈伤组织转变成胚性愈伤组织以及分化形成体胚是一个非常复杂的过程,受多方面因素的影响。在本实验中,胚性愈伤组织诱导率不高,从愈伤组织诱导到形成完整植株所需时间较长,还有待进一步探求更为有效的方法以提高胚性愈伤组织诱导率和出愈时间。

参考文献

陈金慧,施季森,诸葛强,黄敏仁(2003).植物体细胞胚胎发生机理

- 的研究进展.南京林业大学学报(自然科学版),27(1):75~80
- 陈坤浩,骆强,谢永贵,周应书,吴诚(2007).贵州大方喀斯特区领春木群落特征研究.武汉植物学研究,25(5):515~520
- 崔凯荣,邢更生,周攻克,新民,王亚馥(2000).植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节.遗传,22(5):349~354
- 傅立国,金鉴明(1992).中国植物红皮书:稀有濒危植物(第一册).北京:科学出版社,680~681
- 贺超锋,段生君,翟云力(2009).领春木的生长发育规律.安徽农学通报,15(22):90~92
- 赖钟雄,桑庆亮(2003).荔枝胚性愈伤组织体胚发生系统的优化及转化抗性愈伤组织培养再生植株.应用与环境生物学报,9(2):131~136
- 李红芳(2005).领春木属(领春木科)的形态、结构、发育及系统位置的研究[硕士论文].陕西:西北大学
- 王芳(2008).孑遗珍稀植物领春木群落生态和遗传多样性研究[硕士论文].重庆:西南大学
- 邢世海,陈娜(2005).珍稀濒危植物领春木愈伤组织的培养.安徽农业科学,33(1):69~71
- 薛达元,蒋明康,李正方,黄致远,宗世贤,杨开红(1991).苏浙皖地区珍稀濒危植物分级指标的研究.中国环境科学,11(3):161~166
- 杨得坡,张晋豫,张铭哲,赵体顺(1999).珍稀濒危保护植物领春木(*Euptelea pleiospermum*)的生态调查研究.河南科学,17(2):50~51
- 杨和平,程井辰(1991).植物体细胞胚发生的生理生化研究进展.植物学通报,8(2):1~8
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 74: 201~228
- Gallego P, Hita O, Villalobos N, Dorado A, Martin L, Guerra H (2001). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago arborea* L. *In Vitro Cell Dev Biol*, 37(2): 199~204
- von Arnold S, Sabara I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 69: 233~249
- Wei X, Jiang M (2012). Limited genetic impacts of habitat fragmentation in an "old rare" relict tree, *Euptelea pleiospermum* (Eupteleaceae). *Plant Ecol*, 213(6): 909~917