

## 白刺花胚性愈伤组织诱导和植株再生体系建立

吴丽芳, 魏晓梅, 陆伟东\*

曲靖师范学院生物资源与食品工程学院, 云南高原生物资源保护与利用研究中心, 云南曲靖655011

**摘要:** 本文探讨了不同因素对白刺花(*Sophora davidii*)下胚轴、子叶、茎段三种外植体胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚发生的影响。以MS为基本培养基, 研究了2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)对胚性愈伤组织诱导的影响, 蔗糖对胚性细胞状态的调整, 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)和噻苯隆(TDZ)对体细胞胚形成的调控, 以及脱落酸(ABA)对体细胞胚萌发的影响。白刺花不同外植体接种于愈伤组织诱导培养基上, 能形成胚性、部分胚性和非胚性三种不同类型的愈伤组织, 下胚轴和茎段最佳胚性愈伤组织诱导培养基为MS+2.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+40 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+3 g·L<sup>-1</sup>植物凝胶+100 mg·L<sup>-1</sup>谷氨酰胺+10 g·L<sup>-1</sup>香蕉泥, 诱导率分别为73.8%和41.5%; 子叶最佳胚性愈伤组织诱导培养基为MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+40 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+3 g·L<sup>-1</sup>植物凝胶+100 mg·L<sup>-1</sup>谷氨酰胺+10 g·L<sup>-1</sup>香蕉泥, 诱导率为57.1%。2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA时, 下胚轴体胚发生率最高, 为66.67%, 总胚数为74个·g<sup>-1</sup>; 子叶体胚发生率为57.65%, 总胚数为61个·g<sup>-1</sup>; 茎段体胚发生率49.12%, 总胚数为44个·g<sup>-1</sup>。1.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ时以下胚轴和茎段为外植体的体胚发生率最高分别为80.81%和69.18%, 获得总胚数分别为113和69个·g<sup>-1</sup>; TDZ浓度为1.5 mg·L<sup>-1</sup>时, 子叶体胚发生率最高, 为71.77%, 总胚数87个·g<sup>-1</sup>。0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup> ABA时, 体细胞胚萌发率相对较高, 幼苗生长比较健壮。

**关键词:** 白刺花; 下胚轴; 子叶; 茎段; 胚性愈伤组织; 体细胞胚发生

体细胞胚发生是植物离体培养再生植株重要途径之一, 自1958年Steward和Reinert培养胡萝卜(*Daucus carota* subsp. *sativus*)根通过体细胞胚发生形成完整植株以来, 植物学家对体细胞胚的发生机理进行了广泛的研究。早期体细胞胚研究成果主要来自于草本植物, 自1986年挪威云杉(*Picea abies*)体细胞胚发生首次报道以来(Gupta等1986), 现已在100多种木本植物中成功诱导获得了体细胞胚, 且从体细胞胚发生、发育体系建立及应用等不同深度及广度上开展了相关的研究工作, 如从合子胚和体胚发育的形态解剖、生理生化及分子水平上进行了水曲柳(*Fraxinus mandshurica*) (孔冬梅等2006)、象腿蕉属植物*Ensete superbum* (Mathew和Philip 2003)、心叶椴(*Tilia cordata*) (Kärkönen 2000)比较研究; 花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、火炬松(*Pinus taeda*)、辐射松(*P. radiata*)、挪威云杉、水曲柳、杂交鹅掌楸(*Liriodendron hybrids*)体细胞胚的诱导和植株再生已成功应用于生产实践; 桉树(*Eucalyptus camakdulensis*)、北美鹅掌楸(*L. tulipifera*)、欧洲落叶松(*Larix decidua*)等利用体细胞发生体系, 成功实现了抗逆性、抗虫、抗病

的转移, 对树种改良提供了很好的借鉴。白刺花(*Sophora davidii*)为豆科(Fabaceae)槐属灌木或小乔木, 其根、茎、叶、花及果实含有一种生物碱, 具有清热利咽、解暑、凉血消肿等药用价值(毛晓健等2009)。白刺花粗蛋白含量高(20.79%), 含多种维生素, 民间常把它作为一道绿色佳肴(樊建等2005)。然而白刺花虽结实量大, 但种子硬实率高(吴丽芳等2014), 有一定的休眠性(吴丽芳等2018), 因此自然条件下繁殖幼苗稀少, 发芽不齐, 成为影响种群更新的瓶颈之一。植物体细胞胚具有数量多的特点, 一旦形成体细胞胚就能够快速发育成再生植株, 以体细胞胚胎发生技术短期内快速繁殖苗木具有重要的理论意义和应用价值。为此, 本文研究白刺花体细胞胚发生及植株再生过程中外植体类型、激素种类、蔗糖等影响, 为建立白刺花体细胞胚发生技术和快速成苗体系提供基础资料。

收稿 2018-10-08 修订 2019-01-26

资助 云南省教育厅项目(2014Y440)和曲靖师范学院教育教学改革项目(JGXM2016013和JGXM201812)。

\* 通讯作者(520137982@qq.com)。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试白刺花[*Sophora davidii* (Franch.) Skeels]种子2015年10月采自曲靖师范学院校园内, 试验在曲靖师范学院生物资源与食品工程学院生物技术实验室和云南省高校云贵高原动植物多样性及生态适应性进化重点实验室完成。

### 1.2 白刺花无菌苗获得

将健康饱满无损害的种子划破种皮后, 用体积分数为70%的酒精消毒30 s,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{HgCl}_2$ 消毒12 min, 无菌水冲洗5~6次吸干水分后接种于不添加任何激素的MS+30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+7  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂培养基上, 于弱光(光强 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照 $14 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ )下培养14 d后, 取子叶、下胚轴和茎段作为外植体, 培养温度 $25^\circ\text{C}$ 。

### 1.3 胚性愈伤组织诱导

胚性愈伤组织诱导基本培养基为MS培养基(表1), 附加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-苄氨基腺嘌呤(6-benzyl-

aminopurine, 6-BA)、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻苯隆(thidiazuron, TDZ)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D; 分别设为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 植物凝胶(葡萄糖醛酸、鼠李糖和葡萄糖的混和物)、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺和 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉泥(每1 L溶液中称10 g香蕉, 纱布包裹滤成汁加入), pH 5.8。每种组合接种12瓶, 每瓶接种外植体5、6块; 接种后先暗培养10 d, 再在弱光下培养40 d, 然后观察并统计愈伤组织和胚性愈伤组织诱导情况及诱导率。

愈伤组织诱导率(%)=诱导出愈伤组织外植体数/接种外植体数 $\times 100$ 。

胚性愈伤组织诱导率(%)=诱导出胚性愈伤组织外植体数/接种外植体数 $\times 100$ 。

### 1.4 体细胞胚胎发生

将经蔗糖渗透调节后的胚性细胞和不同外植体诱导产生的胚性愈伤组织转至体胚发生培养基上, 采用MS为基本培养基, 附加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\alpha$ -萘乙酸

表1 2,4-D浓度与白刺花胚性愈伤组织诱导率的关系

Table 1 Correlation between concentration of 2,4-D and embryo callus induction frequency of *S. davidii*

外植体类型	2,4-D浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数	出愈数	胚数	愈伤组织诱导率/%	胚性愈伤组织诱导率/%
下胚轴	1.0	68	62	35	91.2 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	51.5 $\pm$ 0.59 <sup>d</sup>
	1.5	66	63	44	95.5 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	66.7 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>
	2.0	69	67	46	97.1 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	66.7 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>
	2.5	65	60	48	92.3 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	73.8 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>
	3.0	67	64	46	95.5 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	68.7 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>
	3.5	63	61	37	96.8 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	58.7 $\pm$ 1.73 <sup>c</sup>
	4.0	65	62	39	95.4 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	60.0 $\pm$ 0.95 <sup>c</sup>
	子叶	1.0	67	61	31	91.0 $\pm$ 0.87 <sup>bc</sup>
1.5		69	60	37	87.0 $\pm$ 0.71 <sup>d</sup>	53.6 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>
2.0		63	60	36	95.2 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	57.1 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>
2.5		62	59	32	95.2 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	51.6 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>
3.0		65	60	34	92.3 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	52.3 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
3.5		65	58	23	89.2 $\pm$ 0.97 <sup>cd</sup>	39.7 $\pm$ 0.61 <sup>d</sup>
4.0		64	57	19	88.8 $\pm$ 1.31 <sup>cd</sup>	29.7 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>
茎段		1.0	64	53	12	82.8 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>
	1.5	62	51	20	82.3 $\pm$ 0.65 <sup>cd</sup>	32.3 $\pm$ 1.11 <sup>d</sup>
	2.0	66	60	23	90.9 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	34.8 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>
	2.5	65	58	27	89.2 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	41.5 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
	3.0	67	60	25	89.6 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	37.3 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
	3.5	63	54	19	85.7 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	30.2 $\pm$ 0.40 <sup>d</sup>
	4.0	68	55	15	80.9 $\pm$ 0.35 <sup>d</sup>	22.1 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>

同一外植体类型的相同指标数据用不同字母标识表示差异显著( $P<0.05$ ), 下表同。

( $\alpha$ -naphthylacetic acid, NAA)、6-BA (分别设为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5和3.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、TDZ (分别设为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5和3.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 植物凝胶、100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺和40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖,置于20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下培养,40 d后,统计体细胞胚发生率及不同培养基上每克鲜重愈伤组织的体细胞胚总数。

### 1.5 体胚萌发及植株再生

将诱导形成的球形期胚性培养物分别在含有0、0.25、0.5、1.0、1.5和2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸(abscisic acid, ABA)的1/3MS培养基(附加30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖)中培养,每种浓度各接种20瓶。球形胚经过约40 d的发育,统计发育正常的幼苗数,计算体胚萌发率,测定体细胞胚成苗质量。然后将幼苗炼苗后移栽至装有基质(腐殖土:珍珠岩=2:1,体积比)的花盆中,30 d后统计植株成活率。

体胚萌发率(%)=萌发成幼苗的体胚数/接种的体胚数 $\times$ 100。

体细胞胚成苗质量(g)=体细胞胚成苗鲜重-接种时球形胚鲜重。

植株成活率(%)=移栽成活的植株数/移栽的总株数 $\times$ 100。

## 2 实验结果

### 2.1 不同外植体诱导愈伤组织的情况

白刺花下胚轴、子叶和茎段接种于诱导培养基后,从伤口两端(下胚轴和茎段)或叶缘部位首先脱分化启动细胞分裂,最先可见一端明显膨大且形成愈伤组织的是下胚轴,其次是茎段,最慢形成愈伤组织的是子叶。从质地、颜色及形态上可观察到3种类型的愈伤组织,一种淡黄疏松,表面粗糙,有光泽,发生于下胚轴形态学下端、子叶基部和茎段两端,量多,用解剖针轻敲即分散成单一或颗粒状的小细胞团(图1-A);第二种淡黄紧实,生长慢,表面大颗粒状,解剖针轻敲不易散开(图1-B);第三种颜色偏白,水渍状粘稠,部分褐色,易褐化死亡(图1-C)。第一种愈伤组织可以产生体细胞胚,为胚性愈伤组织;第二种还需及时进行继代,调整愈伤状态,可部分转变为胚性愈伤组织;最后一种没有分化能力,为非胚性愈伤组织。

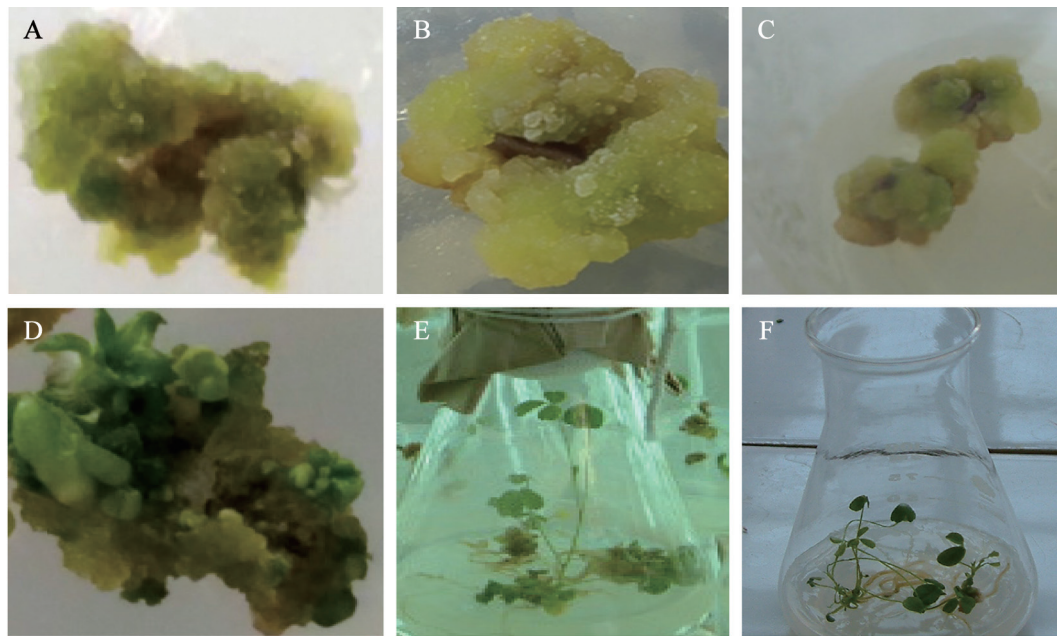


图1 白刺花不同类型的愈伤组织、体细胞胚发生和植株再生

Fig.1 Different types of calli, somatic embryogenesis and plant regeneration of *S. davidii*

A: 胚性愈伤组织; B: 部分胚性愈伤组织; C: 非胚性愈伤组织; D: 下胚轴诱导体细胞胚发生; E: 体细胞胚萌发; F: 幼苗炼苗。



## 2.2 2,4-D对胚性愈伤组织诱导的作用

比较培养基中不同2,4-D浓度对白刺花胚性愈伤组织诱导率的影响(表1), 当2,4-D浓度在1~4 mg·L<sup>-1</sup>时, 下胚轴的愈伤组织诱导效果最好, 其诱导率均在90%以上, 最佳的诱导培养基为MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+40 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+3 g·L<sup>-1</sup>植物凝胶+100 mg·L<sup>-1</sup>谷氨酰胺+10 g·L<sup>-1</sup>香蕉泥, 愈伤组织诱导率达97.1%。子叶的愈伤组织诱导率仅次于下胚轴的诱导效果, 2,4-D浓度2.0~2.5 mg·L<sup>-1</sup>之间都能使愈伤组织诱导率高达95.2%; 茎段的诱导效果不及下胚轴和子叶, 2,4-D浓度2.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 最高诱导率为90.9%。胚性愈伤组织形成过程中, 不同外植体对其有较大的影响, 下胚轴胚性愈伤组织诱导率在51.5%~73.8%之间, 子叶胚性愈伤组织诱导率在29.7%~57.1%之间, 而茎段胚性愈伤组织诱导率仅在18.8%~41.5%之间, 说明外植体类型及2,4-D对愈伤组织及胚性愈伤组织的诱导有较大的影响。

## 2.3 细胞分裂素对体细胞发生的调控

白刺花三种外植体接种于不同浓度6-BA的体胚发生诱导培养基上, 其体细胞胚的形成表现出不同的差异(表2), 体细胞胚形成的效果为下胚轴>子叶>茎段, 当6-BA浓度在0~2 mg·L<sup>-1</sup>时, 各种外植体培养诱导形成的体细胞胚数和体胚发生率随6-BA浓度的增加而提高; 而当6-BA浓度大于2 mg·L<sup>-1</sup>时, 诱导效果反而降低。其中6-BA为2.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 各外植体获得最高的体胚发生率, 下胚轴体胚发生率为66.67%, 总胚数为74个·g<sup>-1</sup>, 总胚数与对照相比, 提高了3.89倍; 子叶体胚发生率为57.65%, 总胚数为61个·g<sup>-1</sup>, 较对照提高了4.36倍; 茎段体胚发生率为49.12%, 总胚数为44个·g<sup>-1</sup>, 较对照提高了3.67倍。

TDZ具有很高的细胞分裂素活性, 能促进多种植物体胚诱导。比较TDZ对白刺花三种外植体体细胞发生的诱导效果(表3)可以看出, 不同外植体体细胞胚形成有较大的差异, 下胚轴和茎段为外植体的

表2 6-BA对体细胞发生的调控

Table 2 Regulation of 6-BA on somatic embryogenesis

6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	下胚轴		子叶		茎段	
	体胚发生率/%	体胚数量/个·g <sup>-1</sup>	体胚发生率/%	体胚数量/个·g <sup>-1</sup>	体胚发生率/%	体胚数量/个·g <sup>-1</sup>
0	28.85±0.59 <sup>e</sup>	19±0.58 <sup>e</sup>	21.41±0.77 <sup>e</sup>	14±1.00 <sup>f</sup>	17.32±0.84 <sup>e</sup>	12±0.58 <sup>f</sup>
0.5	44.35±0.69 <sup>f</sup>	34±1.53 <sup>d</sup>	39.38±0.47 <sup>d</sup>	29±2.31 <sup>e</sup>	24.37±0.34 <sup>d</sup>	19±1.00 <sup>e</sup>
1.0	49.38±0.61 <sup>e</sup>	41±1.00 <sup>c</sup>	41.26±1.89 <sup>d</sup>	35±1.53 <sup>d</sup>	35.19±1.89 <sup>c</sup>	27±1.15 <sup>d</sup>
1.5	59.12±0.61 <sup>b</sup>	63±1.00 <sup>b</sup>	49.19±0.47 <sup>c</sup>	48±1.15 <sup>b</sup>	43.37±0.47 <sup>b</sup>	39±2.00 <sup>b</sup>
2.0	66.67±0.75 <sup>a</sup>	74±1.15 <sup>a</sup>	57.65±0.78 <sup>a</sup>	61±2.30 <sup>a</sup>	49.12±1.58 <sup>a</sup>	44±1.00 <sup>a</sup>
2.5	55.39±0.43 <sup>c</sup>	60±1.53 <sup>b</sup>	53.42±0.43 <sup>b</sup>	44±1.53 <sup>bc</sup>	44.17±0.84 <sup>b</sup>	37±0.58 <sup>b</sup>
3.0	53.13±0.58 <sup>d</sup>	61±2.08 <sup>b</sup>	40.36±1.29 <sup>d</sup>	42±1.00 <sup>c</sup>	37.33±0.71 <sup>c</sup>	31±1.00 <sup>c</sup>

表3 TDZ对体细胞发生的调控

Table 3 Regulation of TDZ on somatic embryogenesis

TDZ浓度/mg·L <sup>-1</sup>	下胚轴		子叶		茎段	
	体胚发生率/%	体胚数量/个·g <sup>-1</sup>	体胚发生率/%	体胚数量/个·g <sup>-1</sup>	体胚发生率/%	体胚数量/个·g <sup>-1</sup>
0	28.85±0.59 <sup>e</sup>	19±0.58 <sup>f</sup>	21.41±0.77 <sup>f</sup>	14±1.00 <sup>e</sup>	17.32±0.84 <sup>f</sup>	12±0.58 <sup>e</sup>
0.5	66.23±0.39 <sup>d</sup>	45±1.53 <sup>e</sup>	45.17±0.48 <sup>c</sup>	31±2.00 <sup>f</sup>	40.34±0.12 <sup>e</sup>	12±1.53 <sup>e</sup>
1.0	80.80±0.29 <sup>a</sup>	113±3.61 <sup>a</sup>	70.24±0.61 <sup>a</sup>	87±1.00 <sup>a</sup>	69.18±0.52 <sup>a</sup>	33±1.53 <sup>d</sup>
1.5	73.19±0.92 <sup>b</sup>	88±2.52 <sup>b</sup>	71.77±0.62 <sup>a</sup>	56±2.64 <sup>c</sup>	60.50±0.53 <sup>b</sup>	69±2.08 <sup>a</sup>
2.0	70.34±0.60 <sup>c</sup>	76±0.58 <sup>c</sup>	56.76±0.23 <sup>b</sup>	61±1.00 <sup>b</sup>	51.69±0.75 <sup>c</sup>	52±1.73 <sup>b</sup>
2.5	54.19±0.29 <sup>e</sup>	54±2.52 <sup>d</sup>	43.47±0.35 <sup>d</sup>	48±1.15 <sup>d</sup>	45.22±0.88 <sup>d</sup>	41±1.15 <sup>c</sup>
3.0	50.36±0.90 <sup>f</sup>	49±1.15 <sup>de</sup>	41.40±0.61 <sup>e</sup>	38±1.00 <sup>ef</sup>	41.79±0.41 <sup>e</sup>	35±1.53 <sup>d</sup>

体胚发生率最高分别为80.80%和69.18%，每克愈伤上最高分别获得113和69个体胚(图1-D); 子叶体胚发生率最高达71.77%，每克愈伤上最高获得87个体胚。

从表2和3中可以看出，细胞分裂素在白刺花体细胞胚胎发生过程中具有明显的诱导效应，一定浓度内(0~2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 0~1.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ)白刺花三种外植体体细胞胚胎发生频率、体细胞胚数随细胞分裂素浓度增加而提高，但超过一定浓度后也会有副作用产生，细胞中容易积累叶绿素，导致老化死亡。6-BA和TDZ两种细胞分裂素相比，TDZ对白刺花体细胞胚胎发生的诱导效果较好，说明外植体类型和细胞分裂素种类对体细胞胚胎的形成有较大的影响。

#### 2.4 体细胞胚的萌发与植株再生

ABA可促进体胚的成熟，球形胚接种于含不同浓度ABA的体胚萌发培养基中(表4)，7 d后可见主根形成，20 d后可以观察到完整的小幼苗(图1-E)，再经20 d培养获得健康的幼苗。不同浓度的ABA培养基上，体细胞胚的萌发情况不同：不加ABA的培养基上，体细胞胚萌发率最低，仅53.85%；而当ABA浓度为1.0 mg·L<sup>-1</sup>时，体细胞胚萌发率高达86.67%。ABA还影响体胚成苗的质量，ABA为0.5 mg·L<sup>-1</sup>时，小苗长势粗壮，单株平均鲜重达102 mg。将得到的小幼苗在培养室中打开瓶塞炼苗7 d后(图1-F)移栽至温室花盆中，前20 d内保持湿度，避免强烈阳光直射，30 d后幼苗移栽成活率达90%以上。

### 3 讨论

在植物体细胞胚诱导研究中，以幼胚、下胚

轴、叶片等为外植体均有报道。本研究中，以白刺花下胚轴、子叶、茎段为外植体诱导形成了胚性、部分胚性和非胚性3种类型的愈伤组织，在体细胞发生、总胚数诱导中，其诱导效果为下胚轴>子叶>茎段，可能是因为植物取材部位不同，生长过程中激素的进行运输和生理状态不同。

植物生长素和细胞分裂素是体细胞胚胎发生过程中常用的两种激素，在已诱导出体细胞胚的实验中，一半多的实验都是用了2,4-D，但2,4-D的使用具有阶段性，通常认为2,4-D在诱导胚性愈伤组织产生阶段促进作用，过高或过低浓度都会对体细胞胚胎的分化和增殖产生影响，长期培养在含2,4-D的培养基上易造成体细胞胚成熟能力的丧失。本研究中在外植体启动脱分化诱导愈伤组织阶段使用了2,4-D，得出2,4-D在1~4 mg·L<sup>-1</sup>时均能诱导白刺花三种外植体愈伤组织和胚性愈伤组织，在2~3 mg·L<sup>-1</sup>胚性愈伤组织的诱导率最高。

培养基中渗透压调节可采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、蔗糖、肌醇、山梨醇等。渗透压在植物离体培养中的作用主要是引起细胞失水，使细胞内含物升高，从而达到调整细胞状态的作用。本研究利用蔗糖作为渗透调节剂，发现60~70 g·L<sup>-1</sup>蔗糖使愈伤组织表面变褐，紧缩，分化能力下降；而30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖愈伤组织变得粘稠，水渍状细胞增多，40~50 g·L<sup>-1</sup>蔗糖浓度为最适调整胚性细胞状态的渗透压。

TDZ是一种具有很高活性的细胞分裂素，对植物体细胞胚胎发生的作用因植物种类而异，它对体胚发生有促进或抑制作用(陈云凤等2006)。在花烛(*Anthurium andraeanum*) (辛伟杰等2006)、

表4 ABA浓度对体细胞胚萌发的影响

Table 4 Effect of ABA concentration on germination of somatic embryos

ABA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	接种数	总幼苗数	体胚萌发率/%	成苗质量/mg·棵 <sup>-1</sup>
0	91	49±1.53 <sup>c</sup>	53.85±0.53 <sup>c</sup>	57±1.00 <sup>d</sup>
0.25	87	60±2.52 <sup>d</sup>	68.97±0.11 <sup>d</sup>	72±1.54 <sup>c</sup>
0.5	88	73±1.00 <sup>b</sup>	82.95±0.39 <sup>b</sup>	102±2.08 <sup>a</sup>
1.0	90	78±1.15 <sup>a</sup>	86.67±0.28 <sup>a</sup>	96±1.53 <sup>b</sup>
1.5	86	63±0.58 <sup>cd</sup>	73.26±0.27 <sup>c</sup>	70±1.15 <sup>c</sup>
2.0	93	65±0.58 <sup>c</sup>	69.89±1.02 <sup>d</sup>	69±0.58 <sup>c</sup>

天竺葵(*Pelargonium × hortorum*) (Visser等 1992)、香蕉(*Musa spp.*) (Xiao等2007; 魏岳荣等2007)、水稻(*Oryza sativa*) (Gairi和Rashid 2004)、孟宗竹(*Bambusa edulis*) (Lin等2004)等体胚诱导中有促进作用,而在棉花(*Gossypium spp.*) (王清连等2004)中却有抑制作用。本研究中,通过对6-BA和TDZ两种激素的对比,发现TDZ对白刺花体细胞胚发生有促进作用。ABA可促进体细胞的发育和体胚的成熟早在1974年就已报道,通常认为,ABA可促进细胞内脂类、蛋白质、淀粉等生物大分子物质的积累,从而促进体细胞胚的成熟。本研究中添加ABA可以促进白刺花体胚萌发,提高体胚成苗的质量。

#### 参考文献(References)

- Che YF, Zhang CR, Huang X, et al (2006). Effect of TDZ on somatic embryogenesis of plant. *Plant Physiol Commun*, 42 (1): 127–133 (in Chinese with English abstract) [陈云凤, 张春荣, 黄霞等(2006). TDZ对植物体细胞胚胎发生的作用. *植物生理学通讯*, 42 (1): 127–133]
- Fan J, Gui M, Zhao T, et al (2005). Study on the nutritional components of wild *Sophora davidii* Rom ex Pavol. *Chin Wild Plant Resour*, 24 (1): 23–25 (in Chinese with English abstract) [樊建, 桂明英, 赵天瑞等(2005). 野生苦刺花食用价值研究. *中国野生植物资源*, 24 (1): 23–25]
- Gairi A, Rashid A (2004). TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tiss Org*, 76 (1): 29–33
- Gupta PK, Durzan DJ (1986). Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In Vitro Cell Dev Biol*, 22 (11): 685–688
- Kärkönen A (2000). Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. *Plant Cell Tiss Org*, 61 (3): 205–214
- Kong D, Shen H, Feng D, et al (2006). Cytological investigation of somatic and zygotic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica*. *Sci Silv Sin*, 42 (12): 130–134 (in Chinese with English abstract) [孔冬梅, 沈海龙, 冯丹丹等(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): 130–134]
- Lin CS, Lin CC, Chang WC (2004). Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tiss Org*, 76 (1): 75–82
- Mao X, Wen M, Jiang X (2009). Research on water decoction partial pharmacodynamics of *Sophora viciifolia*. *Yunnan Tradit Chin Med J*, 30 (2): 44–46 (in Chinese) [毛晓健, 温敏, 蒋孝悝(2009). 白刺花水煎剂的部分药效学研究. *云南中医中药杂志*, 30 (2): 44–46]
- Mathew MM, Philip VJ (2003). Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. *Plant Cell Tiss Org*, 72 (3): 267–275
- Visser C, Qureshi JA, Gill R, et al (1992). Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol*, 99 (4): 1704–1707
- Wang QL, Wang M, Shi HR (2004). Hormones regulation on cotton somatic embryogenesis. *Lett Biotech*, 15 (6): 577–579 (in Chinese with English abstract) [王清连, 王敏, 师海荣(2004). 植物激素对棉花体细胞胚胎发生的诱导及调节作用. *生物技术通讯*, 15 (6): 577–579]
- Wei YR, Yang H, Huang BZ, et al (2007). Effects of picloram, ABA and TDZ on somatic embryogenesis of banana. *Acta Hort Sin*, 34 (1): 81–86 (in Chinese with English abstract) [魏岳荣, 杨护, 黄秉智等(2007). Picloram, ABA和TDZ对香蕉体细胞胚胎发生的影响. *园艺学报*, 34 (1): 81–86]
- Wu L, Lu W, Wei X, et al (2014). Effect of different treatment methods on hard seed germination characteristics for *Sophora davidii*. *Mod Anim Husband*, 2 (6): 47–49 (in Chinese) [吴丽芳, 陆伟东, 魏晓梅等(2014). 不同处理方法对白刺花硬实种子萌发特性的影响研究. *当代畜牧*, 2 (6): 47–49]
- Wu LF, Wei XM, Lu WD, et al (2018). Dormancy mechanism and breaking methods for hard seeds of *Sophora davidii*. *South Agr J*, 49 (5): 944–949 (in Chinese with English abstract) [吴丽芳, 魏晓梅, 陆伟东等(2018). 白刺花硬实种子的休眠机制及休眠解除. *南方农业学报*, 49 (5): 944–949]
- Xiao W, Huang XL, Huang X, et al (2007). Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org*, 90 (2): 191–200
- Xin W, Xu B, Wang G, et al (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. *Acta Hort Sin*, 33 (6): 1281–1286 (in Chinese with English abstract) [辛伟杰, 徐彬, 王广东等(2006). 花烛体细胞胚胎发生及植株再生. *园艺学报*, 33 (6): 1281–1286]

## Embryogenic callus induction and establishment of plant regeneration system of *Sophora davidii*

WU Li-Fang, WEI Xiao-Mei, LU Wei-Dong\*

College of Biological Resource and Food Engineering, Center for Yunnan Plateau Biological Resources Protection and Utilization, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China

**Abstract:** In this paper, the effects of different factors on embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from hypocotyls, cotyledon and stem of *Sophora davidii* were discussed. MS medium was used as basal medium which was added with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) to study the induction of embryo callus. The state of embryonic cells was investigated using sucrose as osmotic regulator. The regulations of 6-benzylaminopurine (6-BA) and thidiazuron (TDZ) on somatic embryo formation and the effect of abscisic acid (ABA) on somatic embryo germination were studied. The results show that three kinds of calli were obtained in callus induction medium, and they were called embryonic, partially embryonated and non-embryonal calli, respectively. The optimal medium for embryogenic callus induction was MS+2.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+40 g·L<sup>-1</sup> sucrose+3 g·L<sup>-1</sup> plant gel+100 mg·L<sup>-1</sup> glutamine+10 g·L<sup>-1</sup> banana slurry, and the rate of induction reached to 73.8% and 41.5%, respectively, from hypocotyl and cotyledon on this medium. The optimal medium for embryogenic callus induction was MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+40 g·L<sup>-1</sup> sucrose+3 g·L<sup>-1</sup> plant gel+100 mg·L<sup>-1</sup> glutamine+10 g·L<sup>-1</sup> banana slurry from stem, and the callus induction rate of cotyledon could reach 57.1%. When the concentration of 6-BA was 2.0 mg·L<sup>-1</sup>, the hypocotyl somatic embryo rate was as high as 66.67%, and the total amount of embryos was 74 g<sup>-1</sup> from hypocotyl; the cotyledon embryo body rate was 57.65%, and total amount of embryos was 61 g<sup>-1</sup> from cotyledon; the stem somatic embryo rate was 49.12%, and the total amount of embryos was 44 g<sup>-1</sup> from stem. When the concentration of TDZ was 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, the rate of somatic embryogenesis was as high as 80.81% when the explant was the hypocotyl, and 69.18% when the explant was the stem, and the total amounts of embryos were 113 and 69 g<sup>-1</sup> from hypocotyl and stem, respectively. When TDZ concentration was 1.5 mg·L<sup>-1</sup>, the rate of somatic embryogenesis was 71.77%, and total amount of embryos from cotyledon was 87 g<sup>-1</sup>. When ABA was added to 0.5–1.0 mg·L<sup>-1</sup>, the rate of somatic embryo germination was relatively high, and the seedling was relatively robust.

**Key words:** *Sophora davidii*; hypocotyl; cotyledon; stem; embryo callus; somatic embryogenesis

Received 2018-10-08 Accepted 2019-01-26

This work was supported by the Yunnan Education Department Program (2014Y440), and Education Teaching Reform Program of Qujing Normal University (JGXM2016013 and JGXM201812).

\*Corresponding author (520137982@qq.com).