

香樟子叶胚体胚发生诱导的研究

杜 丽

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473000)

摘要: 以香樟的子叶胚为外植体, 以 MS 为基本培养基, 研究不同植物生长调节剂组合对香樟子叶胚体胚发生诱导的影响。结果表明, 配方 MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+水解酪蛋白(CH) 1.0 g/L 对香樟子叶胚的体胚发生诱导率较高, 诱导率为 83.3%, 平均体胚数为 3.4 枚, 且生长状态较好; 香樟体胚经萌发诱导处理后, 萌发率可达 48%。

关键词: 香樟; 子叶胚; 组织培养; 体胚发生

中图分类号: S792.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)10-0108-04

Research on Somatic Embryogenesis Induction from Cotyledonary Embryo of *Cinnamomum camphora* L.

DU Li

(School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473000, China)

Abstract: The effects of different plant hormones combinations at different concentrations on somatic embryogenesis induction from cotyledonary embryos of *Cinnamomum camphora* in MS medium were studied. The results showed that in the medium MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+CH 1.0 g/L, the induction rate of somatic embryogenesis from cotyledonary embryos of *Cinnamomum camphora* was better with 83.3%, and the number of somatic embryos per inducing explants was 3.4, and had a better growth status; after the germination induction for somatic embryos, the germination rate was 48%.

Key words: *Cinnamomum camphora* L.; cotyledonary embryos; tissue culture; somatic embryogenesis

香樟(*Cinnamomum camphora* L.), 樟科, 常绿乔木。初夏开花, 黄绿色, 圆锥花序。因含有特殊的香气和挥发油, 而耐湿、抗腐、祛虫、保存期长, 是最贵重家具、高级建筑、造船和雕刻等的理想用材^[1]。又因其树形优美, 绿荫蔽日, 具有良好观赏价值, 适用于城市绿化, 可作行道树, 也可用于花园、住宅区和公共场所和庭园绿化。香樟原产地及分布区域为我国南方大部分地区, 其栽培范围受到冬季低温的限制, 这成为北方城市园林绿化应用香樟的一个制约性因素, 目前, 通过基因转化增强香樟抗冻性的各

项相关研究正在进行, 但研究基础是建立香樟植株再生体系。

香樟离体培养的植株再生途径以体胚发生为主^[1], 通过选择不同发育时期合子胚作为外植体, 进行体胚发生诱导是比较常见的离体培养方法^[1,2-6]。体胚再生途径作为细胞全能性的一种表达方式, 是开展植物发育生物学理论研究的理想模型, 也为种质资源保存、快速繁殖、人工种子生产、转基因植物及突变体筛选等领域研究提供良好的试验体系^[7], 因其具有材料一致、容易处理、不受季节和植物发育

收稿日期: 2014-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100511); 河南省高校青年骨干教师资助计划(2010GGJS-161); 南阳师范学院博士科研启动项目(nynu200746)

作者简介: 杜 丽(1978-), 女, 河南南阳人, 副教授, 博士, 主要从事园林植物应用及改良工作。E-mail: dldldlucky@163.com

阶段的限制等优点,体胚发生途径成为农杆菌介导的基因转化体系中常用的再生手段^[8-9]。以香樟的未成熟果实中的子叶胚为外植体,研究不同植物生长调节剂组合对香樟子叶胚体胚发生诱导的影响,为建立高效的体胚再生体系,以及应用生物技术改良香樟打下基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选择南阳师范学院校内无病虫害的香樟成年植株为供体母株,8月中旬,采摘其直径1 cm左右未成熟香樟果实为研究材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体获得 将未成熟香樟果实置于超净工作台上消毒(70%乙醇45 s,0.1% HgCl₂溶液8 min),无菌水冲洗3~5次,无菌条件下切开果实,取出子叶胚接种,每一处理接种4皿,每皿接种15粒,共60个外植体。

1.2.2 培养基与培养条件 香樟子叶胚培养采用MS作为基本培养基,添加琼脂粉8 g/L,蔗糖30 g/L以及不同浓度的植物生长调节剂,培养基pH值调至6.0后,保持121℃灭菌20 min。如无特殊说明,外植体培养条件为(24±2)℃,暗培养;诱导所得香樟体胚继代增殖,光照条件仍为暗培养;香樟体胚萌发诱导为光照培养,光照周期为16 h光照/8 h黑暗,光照强度为2 000 lx。

1.2.3 香樟体胚诱导和增殖 将香樟子叶胚接种在以MS为基本培养基,加入1.0 g/L CH(水解酪蛋白),以及不同浓度的6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)和2,4-D(0.05、0.5、1.0 mg/L)组合的培养基中,筛选适宜的香樟体胚诱导培养基。接种后的外植体,暗培养处理28 d,统计体胚诱导率和平均体胚数。体胚诱导率=(诱导出体胚的外植体总数/接种子叶胚总数)×100%,平均体胚数=体胚总数/诱导出体胚的外植体总数。

将诱导产生的香樟体胚切割分离后,接种到上述试验筛选所得最适配方中,进行增殖培养,每4~6周继代一次,暗培养。

1.2.4 香樟体胚再生植株的诱导 将增殖所得香樟体胚接种到不添加任何植物生长调节剂的MS培养基中进行体胚萌发诱导前期处理,暗培养28 d。然后,将香樟体胚转入萌发诱导培养基(G1:MS+3.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+1.0 mg/L GA₃; G2:MS+5.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+1.0

mg/L GA₃)中进行体胚萌发诱导,转入光下培养,观察体胚萌发情况。

2 结果与分析

2.1 香樟子叶胚体胚发生

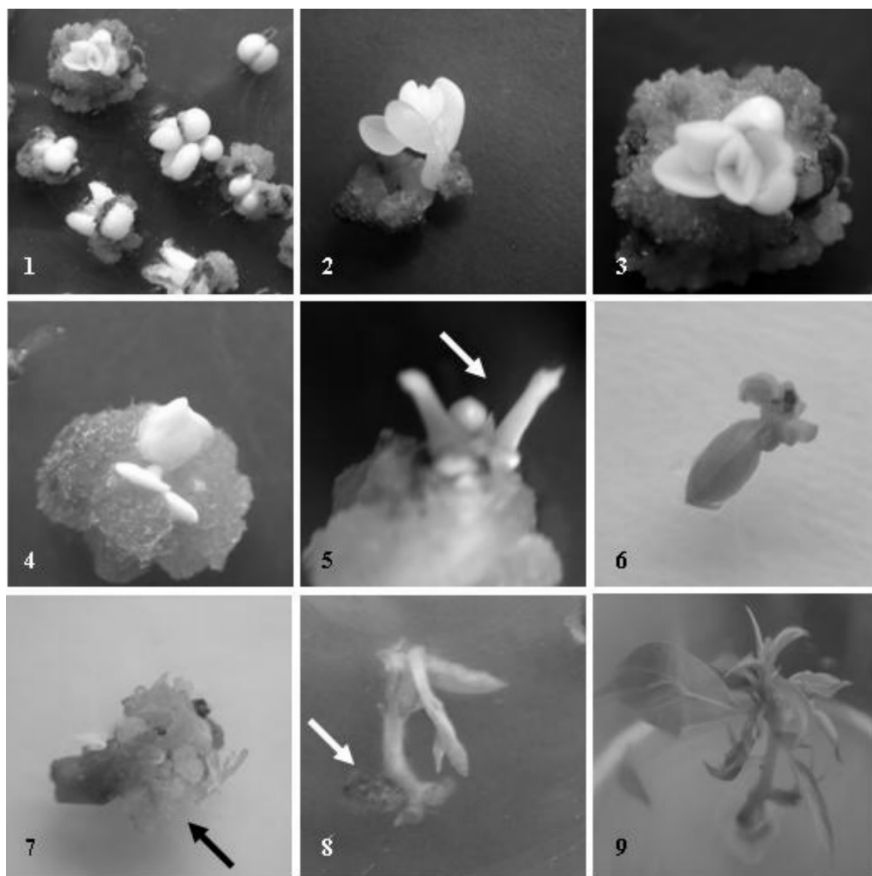
将香樟子叶胚接种于体胚诱导培养基上,进行暗培养10 d左右,可逐渐在外植体上观察到有白色子叶状结构形成;在香樟体胚发生诱导试验中,子叶胚对于不同体胚诱导配方的反应各不相同。在所有测试的配方中,香樟子叶胚体胚发生率较高(图1-1);通常情况下,子叶状的香樟体胚环绕外植体胚轴直接形成(图1-2),随着培养基中2,4-D和6-BA质量浓度的增加,外植体愈伤组织化的情况愈甚,3~5枚体胚聚合在一起生长,已缺乏明显主轴,子叶胚愈伤组织化伴随着香樟体胚形成同时发生(图1-3);在较高浓度的2,4-D配方中,高度愈伤组织化的外植体上,能够观察到白色的香樟体胚零散分布(图1-4)。

对香樟子叶胚进行培养,除了体胚发生外,器官发生同时能够被观察到(图1-5)。在低浓度2,4-D的配方中,可见外植体根器官形成,继续培养,观察不到芽器官的形成,最终得不到完整植株。在某些配方中,能够观察到子叶胚抽生出芽器官,但芽器官是畸形的,叶片是白色子叶状结构(图1-5),这种畸形结构材料继续培养,只能获得子叶状结构增殖,同样无法获得完整植株。此外,在较高浓度6-BA和低浓度2,4-D组合的配方中,可观察到正常的芽器官以低频率发生(数据未列出)。

2.2 不同浓度植物生长调节剂组合对香樟子叶胚体胚发生的影响

将香樟子叶胚接种于不同浓度植物生长调节剂组合的体胚诱导培养基上,体胚诱导率均高于50%;在配方5中,子叶胚体胚诱导率较高,为83.3%,诱导体胚数多达3.4枚。在6-BA质量浓度为2.0 mg/L的配方中,可观察到随着2,4-D质量浓度的增加,外植体愈伤组织化程度加剧。综合考量以下几个指标,体胚诱导率、平均体胚诱导数和外植体愈伤组织化程度,可以得出诱导体胚配方的强弱顺序为:5号、4号、8号>3号、6号、9号>1号、2号、7号;配方5号可以作为香樟体胚增殖配方(表1)。

诱导获得的香樟体胚拆分后转接于配方5中进行继代增殖,暗培养,待材料充足后,进行体胚再生植株诱导培养。



1—4. 子叶胚体发生; 5. 子叶胚畸形萌发; 6. 体胚萌发诱导; 7. 体胚上形成胚性愈伤组织; 8. 体胚萌发; 9. 体胚再生植株

图 1 香樟子叶胚体发生诱导的过程

表 1 不同浓度植物生长调节剂组合对香樟子叶胚体发生的影响

配方编号	2,4-D/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	体胚诱导率/%	平均体胚数/枚	外植体愈伤组织化
1	0.05	0.5	53.3	2.5	+
2	0.05	1.0	61.7	2.4	+
3	0.05	2.0	68.3	3.8	++
4	0.5	0.5	81.7	3.1	+
5	0.5	1.0	83.3	3.4	+
6	0.5	2.0	76.7	2.2	++
7	1.0	0.5	63.3	1.5	++
8	1.0	1.0	85	2.2	+++
9	1.0	2.0	75	3.2	+++

注: +: 外植体少量或者没有形成愈伤组织; ++: 外植体愈伤组织化适中; +++: 外植体愈伤组织化严重。

2.3 香樟体胚再生植株的诱导

将增殖所得香樟体胚接种到不添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基中进行体胚萌发诱导前期处理, 暗培养处理 4 周后, 将诱导获得的香樟体胚转入 2 种体胚植株萌发诱导培养基上, 光照培养, 接种 3 d 后, 部分材料开始逐渐变为绿色, 7~10 d 后, 在绿色香樟体胚基部, 即子叶与子叶结构的连接处, 开

始有芽萌动抽生的迹象(图 1-6)。处理 6 周之后, G1 和 G2 两种香樟植株再生诱导配方对于体胚再生植株诱导率的影响差别不大, 都高于 40%, 分别是 48% 和 45%。培养结果区别在于, 6-BA 质量浓度为 5.0 mg/L 的配方对香樟体胚不仅具有诱导植株再生的作用, 而且还在该处理的体胚上诱导获得了增殖能力很强的黄色颗粒状香樟胚性愈伤组织(图 1-7)。体胚植株再生诱导培养 42 d 之后, 在体胚上诱导获得香樟体胚再生苗(图 1-8), 进而转入香樟再生苗增殖培养基中(图 1-9)进行植株增殖培养。

3 讨论

在本试验中的 9 个诱导配方中, 香樟子叶胚体胚发生率普遍高于 50%, 最高的诱导率达 85%, 表明香樟子叶胚在添加适当植物生长调节剂的培养基上, 尤其是添加生长素 2,4-D 并辅以 CH, 十分容易诱导获得体胚。试验中, 将体胚长期置于 2,4-D 的作用下, 子叶状的体胚不断增殖, 见光处理后, 体胚仍保持增殖态势, 体胚再生植株则很难观察到。可

见 2,4-D 的存在对香樟子叶胚体胚发生有促进作用,而对体胚再生植株不利。因而,在本次体胚再生植株诱导试验中,先将香樟体胚置于不添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基中处理 4 周,之后再选择高浓度细胞分裂素和 GA_3 对体胚进行再生植株诱导处理,结果获得再生植株。

香樟子叶胚的体胚发生同其他物种的体胚发生有所区别,麻栎体胚成熟^[10]经历球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚,后分化出胚芽和胚根,形成独立的完整小植株;香樟的子叶胚则直接形成子叶状体胚,更类似于香樟合子胚子叶的直接增殖。在此后的培养中,可观察到子叶状结构反复形成(或可认为该植物材料停滞于子叶胚阶段),很少能观察到类似于合子胚的常规发育阶段(球形胚、心形胚、鱼雷胚等阶段),如果不经过一系列的处理,很难观察到子叶胚萌发生长。在香樟子叶状体胚的植株再生诱导试验中,其体胚不同于常规体胚的定义,具有两极性;本次试验只是观察到体胚有芽器官的抽生,未见香樟体胚胚芽和胚根的同时形成。这种现象可能与香樟子叶胚极强的直接体胚发生能力有关,使其停滞于体胚增殖阶段(或可称为子叶胚阶段);但也不排除可能是没有找到最适合的体胚成熟方法,使其不能进入到类似于合子胚萌发阶段——两极性萌发。

在东方百合的体胚发生中,研究者认为暗培养是东方百合愈伤组织形成体胚的必要条件^[11];在香樟体胚发生试验中,暗培养同样有利于体胚的增殖,但诱导体胚形成再生植株则需要在光照下进行。此外,在麻栎^[10]的体胚萌发诱导中,采用降低培养基中硝态氮和低温处理一段时间,可使体胚萌发率达 100%。

本研究使用香樟子叶胚作为外植体,获得大量

子叶状体胚,经一系列处理后,能够诱导香樟体胚再生植株,究其体胚如何进行成熟处理,及其细胞发育、形态建成还有许多工作需要进一步研究和完善。

参考文献:

- [1] 杜丽,叶要妹,包满珠. 香樟未成熟合子胚体胚发生及植株再生研究[J]. 林业科学, 2006, 42(6): 37-39.
- [2] 冉佳鑫,王玉宇,宋丹,等. 领春木体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 植物生理学报, 2012, 48(10): 993-996.
- [3] 李清清,叶建仁,朱丽华,等. 黑松未成熟胚的体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 林业科学, 2012, 12(12): 39-44.
- [4] 习洋,胡瑞阳,王欢,等. 刺槐未成熟合子胚的体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 林业科学, 2012, 48(1): 60-69.
- [5] 贾小明,张焕玲,张存旭. 栓皮栎体胚再生与增殖能力的保持研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2011, 44(10): 81-86, 93.
- [6] 乔利仙,隋炯明,谭玲玲,等. 花生体胚诱导及植株再生[J]. 农学报, 2012, 2(10): 9-13.
- [7] 梁艳,沈海龙,李玉花,等. 植物体细胞胚胎发生中乙烯和多胺作用的研究进展[J]. 林业科学, 2012, 48(9): 145-153.
- [8] 于波,吴华玲,黄天带,等. 根癌农杆菌介导的巴西橡胶树胚性悬浮细胞的遗传转化[J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 15-20.
- [9] 申玉华,李望丰,金太成,等. 根癌农杆菌介导的首蓿悬浮胚性愈伤遗传转化体系的建立与优化[J]. 植物研究, 2009, 29(6): 721-727.
- [10] 廖婧,方炎明,虞木奎. 麻栎成熟合子胚外植体体胚发生和植株再生[J]. 西北植物学报, 2012, 32(2): 398-402.
- [11] 胡凤荣,席梦利,刘光欣,等. 东方百合的器官发生与体胚发生研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2007, 31(2): 5-8.