

湿地松体细胞胚胎发生和植株再生

唐巍¹ 欧阳藩¹ 郭仲琛²

(¹中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; ²中国科学院植物研究所)

摘要 以湿地松 (*Pinus elliottii* Engelm.) 的未成熟合子胚为外植体, 在附加 8 mg/L 2, 4-D 和 4 mg/L BA 的 LP 培养基上诱导出胚性愈伤组织。在含 1 mg/L 2, 4-D 和 0.5 mg/L BA 的培养基上保持并增殖。提高培养基的渗透压后, 愈伤组织内形成大量的胚性胚柄细胞团和早期原胚。在附加 4 mg/L ABA, 75 g/L PEG 和 5 g/L 活性炭的 LP 培养基上, 早期原胚发育形成粗壮的子叶胚。在无激素 LP 培养基上, 成熟的体细胞胚萌发并发育形成再生完整植株。体细胞胚转换成小植株的频率为 15.6%。

关键词 湿地松; 体细胞胚胎发生; 植株再生

Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine Tang Wei and Ouyang Fan (State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Academia Sinica, Beijing 100080), Guo Zhong-Chen (Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093), *J. Plant Resour. & Environ.* 1997, 6(2): 8~11
Embryogenic callus was initiated from immature zygotic embryos of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) cultured on LP medium containing 8 mg/L 2, 4-D and 4 mg/L BA. Multiplication can be achieved on LP medium with 1 mg/L 2, 4-D and 0.5 mg/L BA. Embryonal suspensor masses and early stage proembryos were formed from embryogenic callus cultured on high osmotic pressure medium. Early stage embryos developed into cotyledonary embryos on LP medium supplemented with 4 mg/L ABA, 75 g/L PEG and 5 g/L activated charcoal. Mature somatic embryos germinated into regeneration plantlet on medium with hormone-free. The frequency of somatic embryos converted into regeneration plantlets is 15.6%.

Key words *Pinus elliottii* Engelm.; somatic embryogenesis; plantlet regeneration

湿地松 (*Pinus elliottii* Engelm.) 是重要的绿化和造林树种。湿地松胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚胎发生植株再生的研究在国内尚未见报道。在国外, Jain 等^[1]于 1989 年首次进行了湿地松未成熟合子胚的离体培养, 诱导出胚性愈伤组织并经体细胞胚胎发生途径获得早期体细胞胚。1995 年, Newton 等^[2]在 DCR 培养基上获得湿地松未成熟合子胚培养体细胞胚胎发生的再生植株。但体细胞胚的植株再生频率低(10%)。本文以湿地松的未成熟合子胚为外植体进行培养, 旨在建立较高频率的植株再生体系, 以用于湿地松的遗传转化和品种改良。

1. 材料和方法

1.1 材料来源

* 国家“863”课题资助

收稿日期 1996-12-26

实验用未成熟种子采自湖南省邵阳市和湖南省张家界市林场,球果采回后用塑料袋包好,于4℃冰箱中保存1个月后,根据实验设计进行胚性愈伤组织的诱导。

1.2 体细胞胚胎发生植株再生的培养程序

湿地松未成熟合子胚培养体细胞胚胎发生植株再生的培养过程如下:1) 胚性愈伤组织的诱导:LP+8 mg/L 2,4-D+4mg/L BA+400 mg/L CH+400 mg/L 谷氨酰胺;2) 胚性愈伤组织的保持和增殖:LP+1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+400 mg/L CH+400 mg/L 谷氨酰胺;3) 体细胞胚的发育:LP+1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+400 mg/L CH+400 mg/L 谷氨酰胺+8 g/L 肌醇;4) 体细胞胚的成熟:LP+4 mg/L ABA+75 g/L PEG+5 g/L 活性炭;5) 体细胞胚的萌发:无激素 LP。所有培养基中的蔗糖浓度均为30 g/L,琼脂6.5 g/L,pH 5.8。每一处理的外植体数均为30~50个。实验重复3次,所有培养均在LRH-250-G型光照培养箱中完成。愈伤组织的诱导、保持和增殖为暗培养,温度 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 。体细胞胚的发育、成熟和萌发为光照培养,光照14 h/d,光强1500 Lx,温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

1.3 细胞学观察

石蜡切片参照桂耀林等^[3]的方法,切片厚度8 μm ,番红-固绿二重染色,Opton I型显微镜观察并照相。

2. 结 果

2.1 胚性愈伤组织的诱导、保持和增殖

在松属植物的离体培养中,选择合适的外植体是其体细胞胚胎发生植株再生成功的关键。以不同发育时期的湿地松未成熟合子胚(子叶尚未发育完全)为外植体,在LP培养基上进行了8周的愈伤组织诱导实验,结果表明(表1):产地不同的湿地松未成熟合子胚,其胚性愈伤组织诱导频率有一定差异,采自邵阳的湿地松的胚性愈伤组织诱导频率高于张家界湿地松。外植体的发育时期不同,胚性愈伤组织的诱导频率差异明显,7月上旬到7月中旬所采的湿地松未成熟合子胚的胚性愈伤组织诱导频率较高,最高的胚性愈伤组织诱导频率达25.2%。从形态学上看,胚性愈伤组织的共同特征是:白色、半透明和有较大的粘性(图1-1)。

表1 采集时间对湿地松胚性愈伤组织诱导频率(%)的影响

Tab 1 Influence of the collection date on the frequency (%) of embryogenic callus of *Pinus elliotii*

材料来源 Source of materials	胚性愈伤组织诱导频率 Frequency of embryogenic callus							
	10/6*	18/6	26/6	4/7	12/7	20/7	28/7	5/8
邵阳 Shaoyang	1.2	5.1	9.3	19.6	25.2	11.2	9.7	7.6
张家界 Zhangjiajie	0.8	4.9	5.2	18.2	21.7	10.5	9.1	5.3

* 采集日期(日/月) Collection date (day/month)

诱导产生的白色半透明粘性大的胚性愈伤组织转移到降低了2,4-D和BA浓度的胚性愈伤组织保持和增殖培养基上继续培养,每3周继代1次,2次继代后,可见愈伤组织内形成了少量的胚性胚柄细胞团(ESM)。但ESM的体积较小,胚端细胞和胚柄细胞的细胞轮廓可以分辨出来。将增殖培养3~6周的胚性愈伤组织转移到提高了渗透压的体细胞胚发育培养基上,培养6周后,胚性愈伤组织上形成了大量的胚性胚柄细胞团和早期原胚(ESP)。ESP的胚性顶端由许多紧密排列的细胞组成,辨不出细胞轮廓,但整个胚性顶端的轮廓十分清晰,胚柄

的体积较大,由多个伸长和高度液泡化的细胞组成,细胞中有许多颗粒状贮存物(图 1-2)。

2.2 体细胞胚的分化和成熟

将胚性愈伤组织在体细胞胚发育培养基上反复进行继代培养,愈伤组织上形成大量的ESM和ESP,但ESM和ESP的胚性头部较小,难以进一步发育。为了使已经形成的ESM和ESP进一步发育成子叶胚,需要除去培养基中的2,4-D和BA,并添加ABA和PEG,形成一种有利于胚性顶端细胞分裂增殖形成体积较大的胚性头部的体细胞胚的培养环境。不同浓度ABA和PEG对体细胞胚分化频率的影响见表2。在4 mg/L ABA和75 g/L PEG的条件下,每克愈伤组织上所形成的球形及子叶形体细胞胚的数量最多。

2.3 体细胞胚的萌发和植株再生

成熟体细胞胚在无激素体细胞胚萌发培养基上培养4周后,在子叶之间形成了幼叶,这种萌发的体细胞胚有自己独立的维管系统(图 1-3)。在无激素LP培养基上继代2~3次后,萌发的体细胞胚生长发育形成具有数片针叶的再生小植株(图 1-4)。

表2 ABA和PEG对湿地松体细胞胚分化频率的影响
Tab 2 Influence of ABA and PEG 6000 on differentiation frequency of somatic embryos (average embryos/gram calli) of *Pinus elliottii*

处理 Treatment		体细胞胚分化频率 Differentiation frequency of somatic embryos	
ABA (mg/L)	PEG 6000 (g/L)	邵阳 Shaoyang	张家界 Zhangjiajie
0	0	1.2	0.9
2	0	3.7	1.8
4	30	7.2	5.6
4	50	12.3	9.8
4	75	42.7	31.5
4	90	17.6	15.1
8	50	13.2	10.3
8	75	16.1	12.4
8	90	12.5	11.7

3. 讨 论

松属植物离体培养体细胞胚胎发生植株再生的研究进展较快,目前已在10种松属植物的离体培养中经体细胞胚胎发生获得了再生植株^[4,5]。在国内,黄健秋等首先在马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)^[6]和云南松(*Pinus yunnanensis* Franch.)^[7]的成熟合子胚培养中经体细胞胚胎发生获得了再生植株。近年来,外源标记基因如GUS基因等在松属植物中瞬间表达的研究已有报道^[8],但尚未见松属植物转化成功的先例。Gupta等^[9]认为,很难获得松属植物转基因植株的主要原因不在于细胞转化技术,而在于没有建立起很好的松属植物离体培养植株再生体系。因此,在现阶段,建立良好的植株再生体系,掌握其再生过程中的生理生化变化规律,无疑是松属植物基因工程研究中的一个重要内容。

裸子植物尤其是松属植物的离体培养植株再生体系的建立比被子植物困难,其培养过程复杂,对培养条件的要求也较高。Jones等^[10]认为松属植物的离体植株再生条件为:胚性愈伤组织的诱导要求有较高浓度的2,4-D,体细胞胚的诱导要求降低2,4-D浓度,体细胞胚的成熟要求ABA和PEG的存在。作者在湿地松的离体培养中所建立的再生体系,其培养过程和Jones等^[10]的报道基本相似,所不同的是,在体细胞胚的诱导过程中,除降低2,4-D浓度外,还提高了培养基的渗透压。本研究建立的湿地松植株再生体系,为其离体快速繁殖和以品种改良为目的的遗传转化研究奠定了基础。

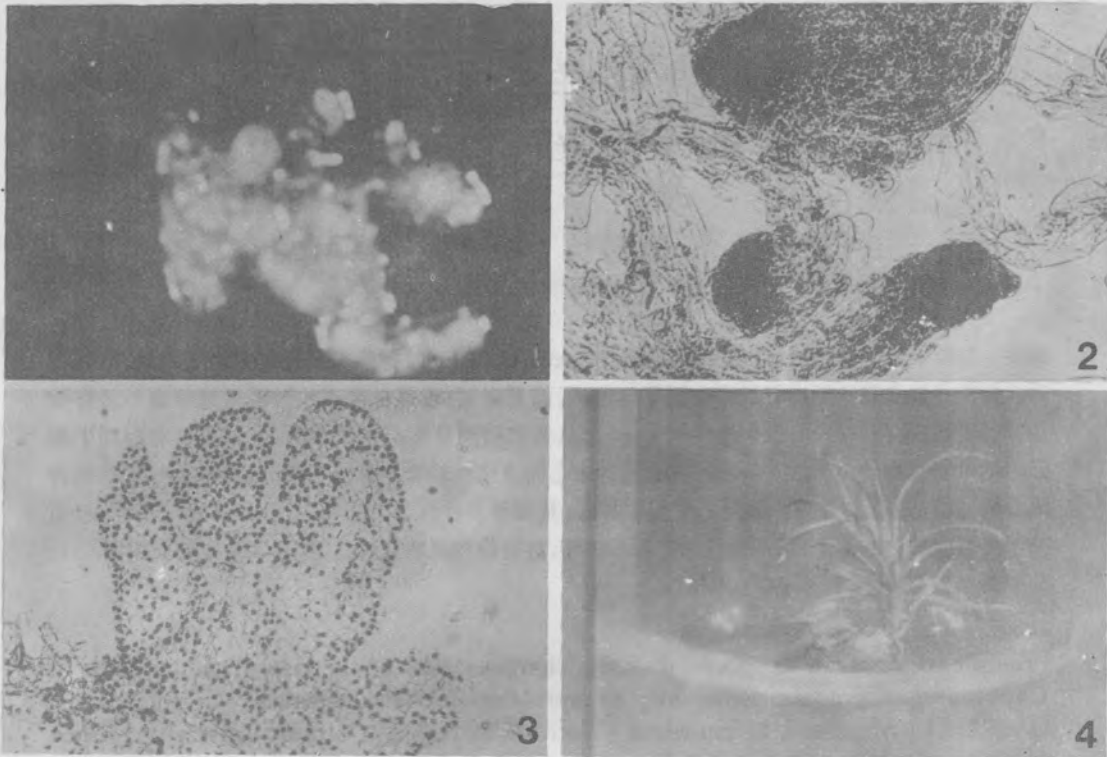


图1 湿地松体细胞胚胎发生和植株再生

Fig 1 Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine

1. 胚性愈伤组织×5 embryogenic calli×5; 2. 胚性胚柄细胞团×40 embryonal suspensor masses×40;
3. 萌发的体细胞胚×15 germinated somatic embryo×15; 4. 再生植株×1.5 regeneration plantlet×1.5

参 考 文 献

- Jain S M, Dong N, Newton R J. Somatic embryogenesis in slash pine from immature embryos cultured in vitro. *Plant Sci*, 1989, 65: 233~241.
- Newton R J. Somatic embryogenesis in slash pine. In: Jain S M, Gupta P K, Newton R J. ed. *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub, 1995, 90~108.
- 桂耀林. 光学显微镜样品的制作. 见:孙敬三, 桂耀林主编, *植物细胞工程实验技术*. 北京: 科学出版社, 1995. 340~352.
- 唐 巍, 杨映根, 桂耀林. 松柏类植物体细胞胚胎发生的研究和应用. *植物学通报*, 1996, 13(1):25~31.
- Attree S M, Fowke L C. Embryogeny of gymnosperms. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 35: 1~35.
- 黄健秋, 卫志明, 许智宏. 马尾松成熟合子胚的体细胞胚胎发生和植株再生. *科学通报*, 1995, 40(1):72~75.
- 黄健秋, 卫志明, 许智宏. 云南松成熟胚的体细胞胚胎的发生研究. *实验生物学报*, 1995, 28(4):371~379.
- Stomp A M, Weissinger A, Sederoff R R. Transient expression from microprojectile-mediated DNA transfer in *Pinus taeda*. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 187~190.
- Gupta P K, Durzan D J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology*, 1987, 5: 147~151.
- Jones N B, van Staden J. Plantlets production from somatic embryos of *Pinus patula*. *J Plant Physiol*, 1995, 145: 519~525

(责任编辑:宗世贤)