

攸县油茶胚状体发生及其组织学观察

彭秋发¹, 戴亚娟¹, 杜跃强², 吕洪飞^{1*}

(1. 浙江师范大学生命化学学院, 浙江金华 321004; 2. 浙江省金华市林业局, 浙江金华 321004)

摘要 [目的]研究以攸县油茶(*Camellia yuhsienensis* Hu)成熟子叶为外植体的胚状体发生情况。[方法]以子叶为外植体, 接种于 MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT 培养基上, 诱导胚性愈伤组织。胚性愈伤组织块转接至以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度 6-BA 和 NAA 的激素组合的培养基上诱导产生胚状体。取不同发育阶段的组织块制作石蜡切片, 进行组织学观察。[结果]成熟子叶块接种于诱导培养基 MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT, 15 d 左右开始出现胚性愈伤组织。胚性愈伤组织转接至培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA 时胚状体诱导率最高, 为 87.78%; 无激素培养基也能诱导胚性愈伤组织产生胚状体, 但诱导率极低, 仅为 6.67%。组织学观察表明, 胚性细胞由愈伤组织表面及其内部邻近的若干细胞分化而来, 经过球形胚、心形胚、子叶形胚等不同发育阶段直至成熟胚状体。[结论]诱导胚性愈伤组织分化为胚状体的最佳培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA。

关键词 攸县油茶; 胚状体; 组织培养; 组织学观察

中图分类号 S565.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)08-3203-02

Study on Somatic Embryogenesis and Histological Observation of *Camellia yuhsienensis* Hu

PENG Qiu-fa et al (College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004)

Abstract [Objective] The research aimed to investigate the somatic embryogenesis from *Camellia yuhsienensis* Hu using cotyledons as explants. [Method] Embryogenic calluses were obtained from cotyledons which had been cultured in MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT. Then, embryogenic calluses were incubated for somatic embryogenesis in MS basic medium with different concentrations of 6-BA and NAA. Somatic embryos at different developmental stages were sectioned and observed under light microscope. [Result] The results showed that the embryogenic calluses were initiated within 15 d. The optimal medium for somatic embryo differentiation was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA and the induction frequency was 87.78%. The somatic embryos were also formed in the MS medium without phytohormones, but the induction frequency was less than 6.67%. The histological observations indicated that somatic embryos originated from epidermal cells or some cells near epidermis. The mature somatic embryos were finally formed via globular embryo, heart-shaped embryo and cotyledon-shaped embryo stages. [Conclusion] The optimal medium for somatic embryos differentiation from embryogenic calluses was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L NAA.

Key words *Camellia yuhsienensis* Hu; Somatic embryo; *In vitro*; Histological observations

攸县油茶(*Camellia yuhsienensis* Hu)又名攸县薄壳香油茶, 系山茶属植物, 为常绿灌木或小乔木。攸县油茶具有果皮薄、含油率高、油质好、抗逆性强等特点, 主要用于食用油生产。同其他山茶种类相比, 攸县油茶是油质最好的物种之一^[1]。培育有香味的茶花是世界茶花界重视的研究课题。经过中国花卉协会观测、筛选, 发现攸县油茶具有浓郁的香味, 花朵稠密, 被筛选为培育芳香、抗寒性强的新品种茶花的 5 种重要杂交亲本之一。目前攸县油茶的研究主要集中在矮化密植、早实丰产^[2]、生态条件研究^[3]以及化学成分含量的研究^[4]等方面。另外, 对山茶属植物组织培养也有过一些研究^[5-7], 但是国内外还没有有关攸县油茶组织培养的报道。为此, 笔者对攸县油茶胚状体诱导的培养基筛选进行了研究, 并对胚状体发生过程中的组织形态学进行了观察, 旨在为今后进一步转基因获得金花色芳香山茶品种奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 攸县油茶种子, 采自金华国际山茶物种园。

1.2 方法

1.2.1 攸县油茶胚性愈伤组织的诱导。外植体用自来水冲洗 3~4 遍, 在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 30 s, 之后用 0.1% 的升汞浸泡 5 min, 最后用无菌水漂洗 2 遍得到无菌外植体。按照张智俊等^[8]的方法将外植体切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块后转接到 MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT 培养基上诱导胚性愈伤组织, 其中含蔗糖 3%, 琼脂 1%, pH 值 5.6~5.8。

1.2.2 胚状体的形成以及根芽分化的诱导。将 NAA 和 6-BA

按照不同浓度组合配制出诱导培养基(表 1)。将胚性愈伤组织块转接到诱导培养基上, 每个培养基配方每次接入 10 瓶, 每瓶 3~4 块。每个配方 3 次重复, 统计胚性愈伤组织诱导出的胚状体数目, 计算诱导率。待胚状体产生后分离, 转接至无激素培养基上诱导根和芽的分化。

表 1 不同浓度 NAA 和 6-BA 配比

Table 1 Proportion of different concentrations of NAA and 6-BA

培养基编号 No. of culture medium	mg/L	
	NAA	6-BA
M1	1.0	1.0
M2	1.5	1.0
M3	2.0	1.0
M4	2.0	0.6
M5	2.0	0.2
M6	2.0	0
M7	0.4	1.0
M8	1.0	0
M9	0.5	0
M10	0	0

1.2.3 培养条件设置。将接种好的各种材料置于培养室, 培养温度保持在 25~28 ℃, 人工辅助光照 12 h/d, 光照强度为 2 500 lx。定期观察生长状态, 记录试验各项数据。

1.2.4 组织学观察。将从愈伤组织到胚状体形成过程的不同阶段培养物样品材料用 FAA 固定液固定 24 h, 用 70% 乙醇冲洗, 经过一系列的脱水、透明和渗蜡石蜡包埋程序, 进行常规石蜡切片。材料均采用纵切切片, 厚度 8~10 μm, 番红固绿染色, 中性树脂胶封固, 在 OLYMPUS BX50 光学显微镜(Olympus Co., Japan)下观察并拍照。

2 结果与分析

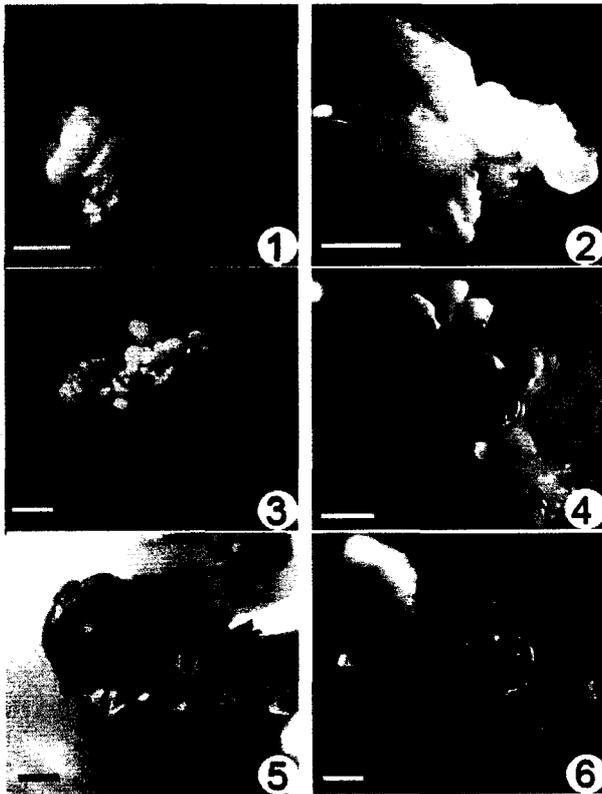
2.1 不同外源激素对胚状体诱导的影响 由图 1 可知, 将经消毒处理过的攸县油茶子叶块接种于培养基后 7 d 左

作者简介 彭秋发(1973-), 男, 江西井冈山人, 硕士研究生, 研究方向: 系统进化与资源植物学, E-mail: pengqiufa@yahoo.com.cn。

* 通讯作者。

收稿日期 2008-01-03

右,子叶块开始膨大,15 d左右开始出现胚性愈伤组织。胚性愈伤组织转接到不同 NAA、6-BA 配比的培养基上,20 d左右表面开始出现胚状体。当外源激素为 2.0 mg/L 6-BA+0.6 mg/L NAA 时,对胚状体的诱导最好,诱导率可达 87.78%。外源激素为 2.0 mg/L 6-BA +1.0 mg/L NAA 时次之,诱导率为 82.22%。在不添加激素的对照培养基上,胚性愈伤组织也能诱导分化出胚状体,但诱导率极低,为 6.67%。将胚状体转接至无激素培养基上,胚状体逐渐变绿,15 d左右分化出芽和根。



注:1 为从子叶外植体诱导出的胚性愈伤组织;2 为从胚性愈伤组织诱导出的胚状体;3~6 为从胚状体分化出的芽和根;标尺=1 cm。
Note: 1. Embryogenic callus induced from cotyledon; 2. Embryo induced from embryogenic callus; 3-6: Buds and roots induced differentiated from embryo. Bar=1 cm.

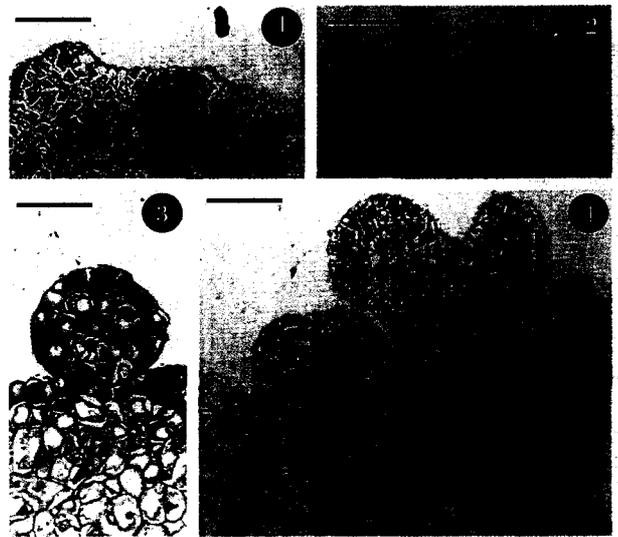
图 1 攸县油茶子叶的胚状体发生情况

Fig. 1 Embryogenesis status of the cotyledon of *Camellia yuhsienensis* Hu

2.2 胚状体发生的组织学观察 由图 2 可知,胚性细胞由愈伤组织表面及其内部邻近的若干细胞分化而来,发生胚状体的原始细胞的细胞质浓厚,染色较深,与周围其余细胞有着较为明显的界限。原始细胞经过多次分裂后,较快地形成细胞较小、胞质浓厚的多细胞早期球形胚。早期球形胚进一步发育便形成球形胚。球形胚具有清晰的轮廓,细胞具分生组织状态,与母体维管联系逐渐减少。进一步培养后球形胚进行横向与纵向分裂并形成心形胚和子叶形胚。子叶形胚与周围其他组织的联系越来越疏松,处于联结部位的其他叶肉组织细胞拉长变大,成为结构疏松的薄壁组织。这可能有利于营养物质的运输和原球茎个体从母体的分离。

3 结论与讨论

胚状体是植物组织培养中起源于一个非合子细胞,经过胚胎发生和胚胎发育过程形成的胚状体结构。庄承纪等



注:1 为从愈伤组织分化出的胚性细胞;2 为早期球形胚;3 为球形胚;4 为心形胚和子叶形胚;标尺=200 μm。

Note: 1. Embryonic cell differentiated from embryogenic callus; 2. Early globular embryo; 3. Globular embryo; 4. Heart-shape embryo and cotyledon-shape embryo. Bar=200 μm.

图 2 胚状体发生的组织切片学观察

Fig. 2 Observation of tissue section of embryoid form

在研究茶梅组织培养时认为,茶梅子叶接种在 NAA 和 6-BA 的培养基中可以直接诱导产生胚状体^[8]。而张智俊等认为,油茶快繁时需先将子叶外植体诱导得到胚性愈伤组织,再用胚性愈伤组织分化产生胚状体;同时发现有时胚状体可以直接从子叶外植体上发生,但诱导率极低^[9]。这与该文的研究结果相似。这可能是不同的物种之间因亲缘关系远近不同而所需的培养基配方及组培方法不同所致。

攸县油茶体细胞胚胎发生的组织学研究表明,表层的薄壁细胞经脱分化恢复分生能力,形成胚性细胞团。从切片中可以观察到胚性细胞团与周围组织具有较清晰的界限,其细胞表现出核大,细胞质浓,染色深,细胞排列紧密等特点,说明胚性细胞团具有强烈的分生能力。随着细胞的不断分裂和分化,胚性细胞团发育成球形胚、心形胚、子叶形胚,最后发育成熟形成完整植株。组织培养过程中,胚状体发生具有不同步性。该试验在同一切片上同时看到球形胚、心形胚、子叶形胚等不同发育阶段的胚状体,这说明攸县油茶子叶愈伤组织上胚性细胞的分裂和胚状体的形成是不同步的。

参考文献

- [1] 高继银, PARKS C R, 杜跃强. 山茶属植物主要原种彩色图集[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2005: 1-30.
- [2] 黄爱珠, 庄瑞林, 董汝湘, 等. 攸县油茶生物学特性及矮化密植早丰产的研究[J]. 林业科学研究, 1991, 4(6): 608-615.
- [3] 肖杰, 林少韩. 攸县油茶的生态条件及其主要经济性状的初步调查[J]. 经济林研究, 1986, 4(1): 47-53.
- [4] 李玉善, 汪建文. 攸县油茶皂素积累和油脂形成关系的研究[J]. 经济林研究, 1988, 6(2): 9-12.
- [5] 张智俊, 罗淑萍, 李亚玲, 等. 油茶优良无性系子叶体细胞胚植株再生[J]. 植物学通报, 2005, 22(S): 43-49.
- [6] PEDROSOL M C, PAISL M S. Direct embryo formation in leaves of *Camellia japonica* L. [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(11): 639-643.
- [7] KATAEVAL N V, ALEXANDROVAL I G, BUTENKOL R G, et al. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 27(2): 149-154.
- [8] 庄承纪, 段金玉, 周建葵. 茶梅体细胞胚胎发生和植株的再生[J]. 云南植物研究, 1988, 10(2): 241-244.