

石刁柏幼胚胚状体发生与细胞学研究

丁鑫^{1,2}, 范双喜¹, 谷建田¹, 高遐虹¹, 高杰², 王俊娟¹

(1. 北京农学院 植物科学技术系, 北京 102206; 2. 新疆农业大学 园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:以3个来自国外的石刁柏品种(C. IL, PURPLE 和 APOLLO)为试材, 研究不同基因型以及培养基中添加 2, 4-D、KT、6-BA 和 NAA 等生长物质对石刁柏幼胚胚状体发生的影响。结果表明, 幼胚在 MS + 2, 4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 培养基中可直接诱导产生体细胞胚。降低 2, 4-D 的浓度, 将诱导产生的体细胞胚组织块继代培养 2~3 次可诱导产生出米黄色颗粒状的胚性愈伤组织, 继而有胚状体的发生。胚性细胞继续分裂形成多细胞原胚, 经球形胚、梨形胚、长形胚、子叶分化期到成熟胚, 其发生的胚状体与单子叶合子胚形成具有相似的过程。

关键词:石刁柏; 组织培养; 体细胞胚发生; 组织细胞学

中图分类号:S68 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2007)增刊-0193-04

Studies on Somatic Embryogenesis and Cell Morphology of Immature *Asparagus officinalis* L. Embryos

DING Xin^{1,2}, FAN Shuang-xi¹, GU Jian-tian¹, GAO Xia-hong¹, GAO Jie², WANG Jun-juan¹

(1. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2. Institute of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Three varieties (C. IL, PURPLE and APOLLO) were applied in somatic embryogenesis of *Asparagus officinalis* L. Different growth substances such as 2, 4-D, KT, 6-BA and NAA were added in the MS substrate. Results indicated that somatic embryos were induced directly from immature embryo axes cultured on basal MS medium supplemented with 2, 4-D 1.0 mg/L, KT 0.5 mg/L and 6-BA 2.0 mg/L. When decreasing the level of 2, 4-D, yellow embryogenic callus were induced from tissue of somatic embryos cultured for 2-3 times, and somatic embryos at different stages appeared. The embryogenic cell first divided into multicellular proembryos, then globular embryoid, pearshaped embryoid, long embryoid, scutiform embryoid and mature embryoid. *Asparagus officinalis* L. embryogenesis from epidermal cells or subepidermal cells was similar to that of the zygotic embryo.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; Tissue culture; Somatic embryogenesis; Histocytology

石刁柏 (*Asparagus officinalis* L.), 俗称芦笋、龙须菜, 百合科天门冬属多年生雌雄异株草本植物。石刁柏属十大名菜之一, 其嫩茎富含多种营养成分, 具有较高的营养和保健价值^[1,2]。石刁柏在组织培养方面研究较多, 尤其是器官发生成苗和愈伤组织成苗的较多, 胚状体途径报道较少^[3-5]。器官发生途径成苗较快, 但生根较难, 且遗传稳定性较差, 在多次继代中容易变异, 而胚状体成苗途径中胚状体具有两极性结构, 利用这一途径进行无性繁殖, 繁殖速度快, 遗传稳定性高, 能克服器官发生途径生根难

的问题。另外, 诱导胚状体成苗, 通过胚性细胞克隆, 人工种子工厂化生产、突变体诱变筛选、种质资源保存和利用均具有重要意义^[6]。石刁柏体细胞胚的诱导培养前景诱人, 可望解决石刁柏无性繁殖中生根难, 特别是某些不易生根材料的繁殖问题, 通过人工胚的培养将为人工种子的制作提供理论基础。

本研究以石刁柏幼胚为外植体, 直接诱导产生体细胞胚或经愈伤组织培养产生体细胞胚, 对其直接和间接的体细胞胚发生的过程进行了组织学和细胞学观察, 以期探讨体细胞胚胎的发生机理和发

收稿日期: 2006-12-10

作者简介: 丁鑫 (1981-), 女, 新疆人, 在读硕士, 主要从事蔬菜抗逆与育种研究

通讯作者: 范双喜 (1964-), 男, 教授, 博士, 主要从事蔬菜栽培与生理研究工作。

育特点提供试验证据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为来自美国的 3 个石刁柏品种: C. IL, PURPLE 和 APOLLO。

1.2 方法

精选石刁柏种子, 在 25 ~ 28℃ 水中浸种 48 h 后, 用 70% 酒精浸泡 30 s 后放于 0.1% 的 HgCl₂ 加数滴吐温-80 溶液中, 搅拌浸泡 8 ~ 10 min, 然后用无菌去离子水冲洗 5 ~ 6 遍, 接种在 MS 培养基上, 于 25 ~ 28℃ 下催芽。7 ~ 10 d 后, 在无菌条件下剥去萌动种子的种皮, 将幼胚分别接种在不同生长物质配比的 3 种初期培养基上(表 1)。

经 15 d 左右诱导获得黄白色、表面光滑且易分散的椭圆形颗粒状愈伤组织, 然后转入表 1 的培养基继代培养。2 ~ 3 次继代后, 诱导产生米黄色颗粒状的胚性愈伤组织, 继而形成不同时期的体细胞胚。每 7 d 取 1 次不同发育阶段体细胞胚, 分别用 50% 乙醇配制的 FAA 固定液固定 24 h, 70% 乙醇冲洗, 经过一系列梯度酒精脱水, 常规石蜡切片法制片, 切

片厚度 8 ~ 10 μm, 番红—固绿染色, 中性树胶封片, 用 Motic DMBA450 型显微镜进行观察和照相^[7]。

表 1 培养基中生长物质浓度配比

Tab.1 The density ratio of growth substances in the media culture

编号 Number	培养基 Culture medium	生长物质含量/(mg/L) Ratio of growth substances			
		2,4-D	6-BA	KT	NAA
初期培养基 Initial stages	I MS	0	2.0	0.5	0
culture medium	II MS	1.0	2.0	0.5	0
继代培养基 Following culture medium	III MS	0	0	0.5	1.0
	MS	0	1.0	0	0.5

2 结果与分析

2.1 不同生长物质对胚性愈伤组织发生的影响

由表 2, 加入 2,4-D 的初期培养基 II 诱导的愈伤组织经继代培养后, 胚性愈伤组织数目最多和形成时间最早。初期培养基 I 和 III 中未加入 2,4-D, 产生胚性愈伤组织数相对较少, 形成时间较长。由此可见, 2,4-D 对体细胞胚发生具有重要的促进作用。培养基中含有一定浓度的 2,4-D 能诱导胚性细胞的形成, 这一结果与前人的报道一致^[3]。

表 2 不同基因型在 3 种培养基的出胚时间胚性愈伤组织数

Tab.2 The time and numbers of embryogenic callus outgrewed of three genotypes in the three culture mediums

品种 Varieties	初期培养基 I Initial stages culture medium I				初期培养基 II Initial stages culture medium II				初期培养基 III Initial stages culture medium III			
	出胚时间 /d	接种胚数 /个	继代愈伤数 /个	胚性愈伤组织数 /个	出胚时间 /d	接种胚数 /个	继代愈伤数 /个	胚性愈伤组织数 /个	出胚时间 /d	接种胚数 /个	继代愈伤数 /个	胚性愈伤组织数 /个
PURPLE	25	20	40	58	19	20	40	78	26	20	40	60
C. IL	22	20	40	62	18	20	40	82	20	20	40	65
APOLLO	24	20	40	60	20	20	40	70	24	20	40	56

2.2 不同基因型对胚性愈伤组织发生的影响

将幼胚接种到 3 种初期培养基, 约 15 d 后转入继代培养基继续培养, 20 d 后相继产生胚性愈伤组织。从表 2 看出, 不同基因型出现胚性愈伤组织的时间和产生胚性愈伤组织数有差异。从胚性愈伤组织产生的时间来看, C. IL 早于 APOLLO 和 PURPLE, 产生胚性愈伤组织数 C. IL > PURPLE > APOLLO。

2.3 愈伤组织形态和细胞形态

相同基因型的愈伤组织的形态有较明显的差异。通过继代培养后, 观察愈伤组织, 其色泽和质地可分为 3 类: 第 1 类为颗粒状、淡黄或白色、绿色, 质地紧密, 生长缓慢(图 1-C); 第 2 类雪花状, 结构松散, 无定形, 生长迅速(图 1-D); 第 3 类为淡黄或暗黄, 质地松软, 无定形, 生长迅速(图 1-F)。3 种不同基因型的石刁柏品种几乎均能产生上述 3 种愈伤组织, 经过多次继代培养后, 颗粒状呈圆形的愈伤组织

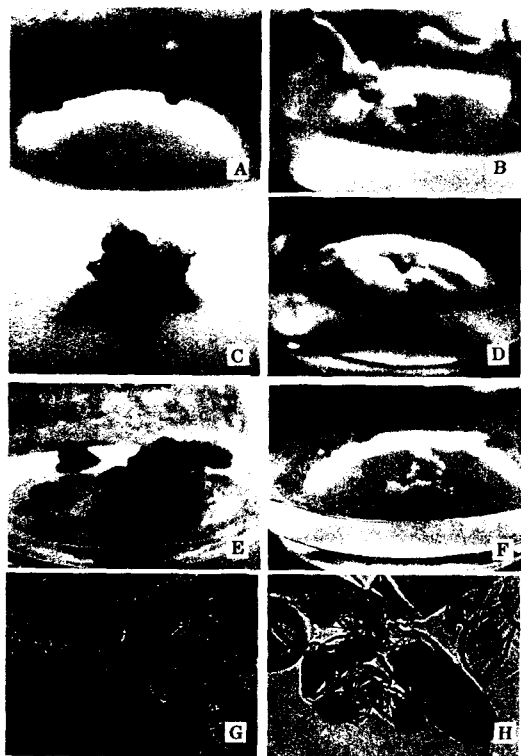
数逐渐增多。

细胞学观察表明, 3 类愈伤组织细胞形态差别很大, 颗粒状愈伤组织的细胞小, 形状比较规则, 呈圆球形, 排列整齐, 具有小的弥散的液泡, 核染色深, 原生质比较浓(图 1-G); 第 2 类或第 3 类的愈伤组织细胞与之不同, 它们排列松散, 大小不规则, 有圆球形、棒状、带状等形状, 差异较大(图 1-H)。

2.4 生长物质对愈伤组织形态发生的影响

不同种生长物质对愈伤组织的诱导率、愈伤组织的生长势、质量均有不同的影响。加入 NAA 诱导形成的愈伤组织疏松、透明、湿润、生长迅速, 接种后第 8 ~ 10 天开始有愈伤组织在胚切口处形成, 12 ~ 15 d 进入迅速生长期; 不加 2,4-D 时, 愈伤组织诱导率较低, 黄绿色、致密、生长缓慢、易褐化, 在浓度为 1.0 mg/L, 愈伤组织深绿色、粘稠、湿润、生长慢、不褐化; 在含 6-BA 的培养基中, 接种后 6 ~ 7 d 开始有

愈伤组织在切口处形成, 10~15 d 进入迅速生长期, 诱导形成的愈伤组织绿色、瘤状、生长缓慢(图 1)。



A. 石刁柏种子; B. 石刁柏种子幼胚; C. 颗粒状, 淡黄或白色、绿色, 质地紧密的愈伤组织; D. 雪花状, 结构松散, 无定形, 生长迅速的愈伤组织; E, F. 淡黄或暗黄, 质地松软, 无定形, 生长迅速的愈伤组织; G. 颗粒状愈伤组织的细胞($\times 400$); H. 雪花状和淡黄质地松软的愈伤组织细胞($\times 400$)

A. Seed of *Asparagus officinalis* L.; B. Immature embryo of *Asparagus officinalis* L.; C. The callus of shape of grain, light yellow or white, green, close texture; D. The callus of shape of snowflake, relax fabric, amorphism growth rapid; E, F. The callus of light yellow or dark yellow, loose texture, amorphism, growth rapid; G. The cell of callus of grain($\times 400$); H. The cell of callus of snowflake and light yellow, loose texture($\times 400$)

图 1 石刁柏愈伤组织发生形态

Fig.1 The callus shapes of *Asparagus officinalis* L.

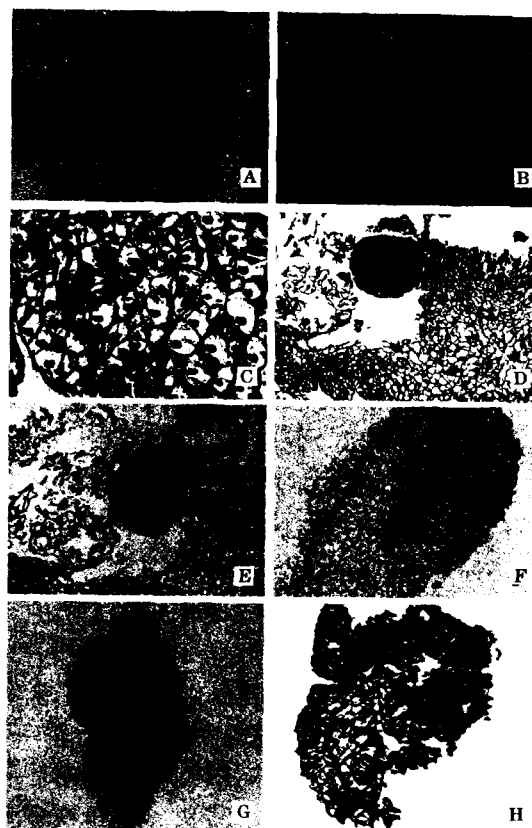
2.5 愈伤组织类型对胚状体发生的影响

将上述三类愈伤组织继续继代培养后, 第 2 类和第 3 类愈伤组织生长迅速, 并不断增殖, 雪花状的愈伤组织增殖迅速。第 1 类颗粒状愈伤组织部分转变第 2 类雪花状或第 3 类质地松软的愈伤组织, 部分为胚性愈伤组织(图 2-A), 其中一部分转变为较疏松的胚性细胞团, 由圆形或椭圆形细胞组成。白色、质地坚硬、颗粒状的愈伤组织, 继续在分化培养基上培养, 渐渐分化出不同发育阶段的胚状体。上述三类愈伤组织中, 第 1 类愈伤组织最早转变为胚性愈伤组织和胚状体的分化, 第 2 类和第 3 类愈伤组织在继代培养中, 一部分颜色和质地慢慢转变, 颗粒状的愈伤组织相继产生, 另一部分在继代培养中褐化死亡。

2.6 胚状体的发生与细胞学观察

在分化培养基上培养 10~20 d 可出现不同发

育阶段的胚状体, 经过石蜡切片的制作和显微观察, 胚状体的发育是随着多细胞原胚的细胞分裂, 胚体逐渐增大发育成球形胚、梨形胚、长形胚、子叶分化期到成熟胚。胚很容易从产生它的愈伤组织上分离, 在胚状体上容易产生一次胚、二次胚, 形成一个胚的集块。



A. 胚性愈伤组织($\times 400$); B. 非胚性愈伤组织($\times 400$); C. 多细胞原胚($\times 1000$); D. 体细胞胚球形期($\times 100$); E. 体细胞胚梨形期($\times 100$); F. 体细胞胚长形期($\times 40$); G. 体细胞胚子叶形期($\times 40$); H. 体细胞胚成熟期($\times 40$)

A. Embryogenic callus($\times 400$); B. Non-embryogenic callus($\times 400$); C. Multicellular original embryo($\times 1000$); D. Global embryoid($\times 100$); E. Pear-shaped embryoid($\times 100$); F. Long-shaped embryoid($\times 100$); G. Cotyledon embryoid($\times 40$); H. Autumn somatic embryogenesis($\times 40$)

图 2 石刁柏胚状体发生形态

Fig.2 Embryoid shapes of *Asparagus officinalis* L.

试验中通过组织切片观察, 随着多细胞原胚的细胞分裂, 胚体逐渐增大成为圆球形, 称球形胚(图 2-D)。晚期的球形胚由于胚体拉长, 成为梨形胚(图 2-F)。这时在胚体周围的细胞通常呈现薄壁化和液泡化, 并逐级趋于解体, 致使胚体与周围细胞间出现较大空隙而处于孤立状态, 因而与原组织很容易分离。梨形胚进一步分化, 继续拉长, 形成长形胚(图 2-F), 并且出现凹沟, 凹沟一侧的细胞分裂迅速, 形成突起成为盾片, 即形成子叶形胚(图 2-G)。最后形成具有类似胚芽鞘和胚根鞘结构或胚芽和胚根的成熟胚(图 2-H)。这与小麦等单子叶植物或同一种

植物的不同组织或器官的外植体在离体培养条件下诱导体细胞胚胎发生有相似的过程,而且与合子胚发生过程大同小异^[8,9]。

3 讨论

石刁柏器官发生型途径遗传稳定性较差^[10],成苗周期长,而胚状体成苗途径则能克服器官培养难以避免的问题^[11],提高胚状体诱导率是该技术能否应用的关键。本试验在愈伤组织诱导中的3种类型愈伤组织中第1类,颗粒状、淡黄或白色、绿色,质地紧密,生长缓慢的愈伤组织中胚状体分化率高,这与赵洁等^[12]发现4种类型愈伤组织中以淡黄色、颗粒状愈伤组织胚状体分化率最高相符。培养基组份对胚状体发生影响显著,培养基中植物激素的种类与比例尤其影响胚状体的形成,激素配比以 MS + 2,4-D 1.0 + BA 2.0 + KT 0.5 最佳。此外,曾报道过^[13]水解乳蛋白,组氨酸及 2% 蔗糖利于胚状体的形成, NH_4^+ 与 NO_3^- 比例以 2:1 最利于胚状体诱导率提高。胚状体途径可以克服组织培养中生根难的问题,但不同基因型差异较大,再生植株染色体数仍有较大变异,从而制约着该技术的进一步应用。

石刁柏胚的胚状体形成经历了两种途径,一是从组织或细胞直接发生,不经过愈伤组织,所产生的愈伤组织通过制作切片直接能观察到在胚状体不同的发育阶段的形状,即胚的发育从球形胚—梨形胚—长形胚—子叶形胚—成熟胚。二是在愈伤组织阶段经继代分化培养后,愈伤组织逐渐转变为胚性愈伤组织,然后经胚状体的不同发育阶段形成。这些能产生体细胞胚的胚性细胞在显微镜下能够很容易的跟周围细胞区分开来,其具有核大、质浓、染色深、细胞排列紧密的特点。这些细胞跟周围的细胞有一个很明显的界限,这就是胚状体原始细胞在开始分裂时形成较清晰的细胞界限。这与 Steward 等^[14]的观点(体细胞与其周围组织之间生理上的隔离是其进行胚状体发生的先决条件)一致。曾在外国也报道过在多细胞阶段胚状体边缘具有较厚的细胞壁与其他细胞隔开^[15]。Zee 等^[16]在芹菜中观察到,在多细胞原胚阶段胚体周围有一层细胞构成“边缘细胞层”,后来此层细胞退化解体,在胚状体与周围组织间形成缝隙。本研究也观察到在石刁柏体细胞胚处于多细胞原胚阶段跟周围的细胞形成较为清晰的细胞界线。

组织培养过程中,胚状体发生具有不同步性^[17]。球形胚、梨形胚、子叶形胚等不同发育阶段的胚状体有时会同时出现。这说明石刁柏胚愈伤组

织上胚性细胞的分裂和胚状体的形成也是不同步的。这种不同步性可能是在某些条件下,胚状体的发生是反复进行的,新的胚胎发生中心有可能从原胚细胞群中或从胚状体再次产生。由于胚状体的发生在快繁、转基因、多倍体诱导等方面有多种用途以及人工种子的生产等方面有着广阔的应用前景,针对石刁柏胚状体的发生,今后尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘克均. 芦笋高产栽培实用技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 9 - 16.
- [2] 龙程, 潘瑞炽. 雌雄石刁柏嫩茎的营养价值和品质的比较研究[J]. 作物学报, 1998, 24(5): 584 - 589.
- [3] 冯晓棠, 彭明生, 徐耀泉, 等. 石刁柏组织培养快繁及其在育种上的应用[J]. 中国蔬菜, 1994(5): 9 - 12.
- [4] 范双喜, 谷建田. 石刁柏胚状体诱导与影响因素的研究[J]. 北京农学院学报, 1995, 10(2): 39 - 43.
- [5] 冯晓棠, 邢定一, 王为民, 等. 芦笋组织培养生根技术研究[J]. 中国蔬菜, 1991, 14(2): 20 - 22.
- [6] 谢从华, 柳俊. 植物细胞工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 36 - 40.
- [7] 林加涵, 魏文玲, 彭宜宪. 现代生物学实验(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 70 - 97.
- [8] 王亚馥, 崔凯荣, 汪丽虹. 小麦体细胞胚发生的超微结构研究[J]. 植物学报, 1994, 36(6): 418 - 422.
- [9] 王亚馥, 崔凯荣, 陈克明. 小麦组织培养中体细胞胚胎发生的细胞胚胎学及淀粉消长动态的研究[J]. 实验生物学报, 1993, 26(3): 259 - 267.
- [10] 范双喜. 适时采收对芦笋幼茎品质的影响[J]. 山西农业科学, 1992(10): 18 - 19.
- [11] 周维燕. 石刁柏花粉胚的发生及纯合株的快速鉴定[J]. 北京农业大学学报, 1992, 18(4): 369 - 372.
- [12] 赵洁, 程并辰. 伤组织形态发生能力及器官发生的研究[J]. 武汉植物学研究, 1992, 10(4): 328 - 332.
- [13] 赵洁. 化学因子对石刁柏胚状体发生的影响(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 113 - 115.
- [14] Steward F C, Mesm O, Mears K. Growth and organized development of cultured cells II. Ormanization culture grown from suspended cells[J]. Am J Bot, 1958, 45: 705 - 708.
- [15] Reinert J, Bajaj Y P S, Zbell B. Aspects of organization-organogenesis and embryonogenesis[M]// Street Plant Tissue and Cell Culture 2nd ed Blackwel, 1978: 389 - 427.
- [16] ZEE S Y, WU S G. Somatic embryonogenesis in the leaf explants of Chinese celery[J]. Aust J Bot, 1980, 28: 429 - 436.
- [17] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 13 - 15.