

# 仙客来体细胞胚胎发生的研究进展

卞福花<sup>1,2</sup>, 曲复宁<sup>2</sup>, 郑彩霞<sup>1</sup>, 由翠荣<sup>2</sup>, 龚雪芹<sup>2</sup>

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院 北京 100083 2. 烟台大学 生化系, 山东 烟台 264005)

**摘要:** 综述了近年来国内外对仙客来体细胞胚胎发生的研究, 表明品种的基因型、外植体的类型、外源激素、外界条件以及附加成分等对胚性愈伤的产生都有重要的影响, 另外综述了仙客来胚性愈伤和体细胞胚胎的保存方法。

**关键词:** 仙客来; 体细胞胚胎; 胚性愈伤

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup> 62; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)08-0070-03

仙客来(*Cyclamen persicum* Mill.) 属报春花科仙客来属半耐寒性具球茎的多年生草本植物, 观赏价值极高, 自然界主要靠种子繁殖, 但后代表现不均一; 此外, 园艺品种大多是杂种一代(F<sub>1</sub>), 用种子繁殖难以保存 F<sub>1</sub> 代的原有性状和杂种优势, 通过分株、扦插、嫁接等营养繁殖也难以达到目的。因此, 采用组织培养繁殖, 保持 F<sub>1</sub> 代的优良性状, 具有一定的实用价值, 但是通过组织培养的方式在体外很难繁殖出非常好的植株来, 曲复宁等<sup>[1]</sup> 认为其主要原因之一是很难建立一个稳定且可以连续继代的增殖体系。仙客来做为一种观赏性极强的植物有着杂交品系的繁殖和大量增殖的要求, 通过体细胞胚胎发生达到此项要求是一种非常有效的体外繁殖方式, 在较短的时间内繁殖频率高, 再生小植株也有较高的均一性<sup>[2]</sup>。结合实验室的相关工作, 对仙客来体细胞胚胎发生的研究进行一定的综述, 旨在为以后的相关工作提供参考。

## 1 胚性愈伤的诱导

植物细胞的全能性表明, 任何一种器官的体细胞, 在适当的条件下都能以一种和合子胚发生相似的方式进行发育, 并能发育成一个完整的植株。但是离体培养条件下影响体细胞胚发生的因素很多, 其内因主要是植物的基因型, 外因主要是培养基中附加成分的种类、浓度以及其他外界因素等。

### 1.1 基因型

仙客来通过体细胞胚繁殖后代的再生能力受到基因型的控制<sup>[3]</sup>, Winkelmann 等利用 30 个不同基因型的植物诱导体胚发生, 结果 29 个有体胚发生的能力。

Pueschel 等<sup>[3]</sup> 对具有体细胞胚发生能力的基因型的后代和没有体细胞胚发生能力的基因型的后代进行了分析, 结果表明体细胞胚发生的潜力不仅受到生理的和环境的影响, 同时受到修饰基因的控制。Winkelmann 和 Serek<sup>[4]</sup> 比较了 32 个杂交品种的体胚发生能力, 发现也有 1 个品种不具有体胚发生能力。

### 1.2 激素

激素对细胞的分化、发育和形态建成起调节作用, 生长素和细胞分裂素的相对浓度大小是影响仙客来胚性愈伤发生的重要因素。Laura M 等<sup>[5]</sup> 认为 2, 4-D 在胚性愈伤的诱导中是必须的, 通过对培养在不同浓度 2, 4-D 的继代培养基且培养时间长短不等的继代愈伤用 25 个随机引物进行 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA 随机扩增多态 DNA) 分析, 表明 2, 4-D 浓度、培养时间长短是影响体胚发生的因素之一。同一品种不同的外植体类型进行胚性愈伤诱导所需激素也不同(见表)。

### 1.3 其他影响因素

1.3.1 温度 仙客来胚性或非胚性愈伤的产生, 温度一般需维持在 20~30℃, 不过在此温度范围内产生的数量和质量不同。有试验表明: 仙客来在 20℃ 产生的胚性愈伤量比 25℃、30℃ 时少<sup>[8]</sup>。

1.3.2 光照 由于仙客来的外植体及新产生的愈伤组织见光极易褐化, 从而导致畸形叶或小植株的产生, 得不到或得到很少正常的胚性愈伤, 光照甚至对胚性细胞的发生起抑制作用<sup>[8]</sup>, 因此为了获得高质量的胚性愈伤, 对仙客来的各种外植体需进行暗培养。Bach<sup>[9]</sup> 研究了不同波长的光对包括仙客来在内的球根球茎类园艺植物愈伤的影响, 发现, 红光和黄光不管基因型如何都促进胚性愈伤的产生、增殖以及体细胞胚的成熟, 蓝光和紫外光刺激体细胞胚的发生但是阻止体胚的成熟。

1.3.3 氧气、二氧化碳浓度 离体细胞的培养需要有适当浓度的氧气和二氧化碳维持其稳定的代谢活动。仙

第一作者简介: 卞福花(1973-), 女, 在读博士, 主要从事植物生长发育研究。E-mail: fh\_bian@163.com。

通讯作者: 曲复宁。E-mail: qfnzp@yahoo.com.cn。

基金项目: 山东省科技攻关资助项目(2004GG4202010)。

收稿日期: 2007-03-28

客来相关的研究主要是针对于生物反应器, 试验结果表 明不同细胞系对氧气和二氧化碳压力的反应不同<sup>[11]</sup>。  
不同的外植体需要不同的激素诱导胚性愈伤表

外植体类型	附加激素	参考文献
成苗的叶片和叶柄	2.4-D 1.0 mg/ L+ KT0.1 mg/ L	Furukawa 等, 2002 <sup>[6]</sup>
白化叶柄	2.4-D 5.0 $\mu$ M+KT 0.5 $\mu$ M	Takamura, 1996 <sup>[7]</sup>
种子子叶、叶柄、球茎和根	2.4-D 5.0 $\mu$ M+KT 0.5 $\mu$ M	Takamura, 2003 <sup>[8]</sup>
种子子叶、叶柄、球茎和根	2.4-D 0.5 $\mu$ M+BA 5 $\mu$ M	Bach 等, 1998 <sup>[9]</sup>
未成熟的子房、未授粉胚珠	2.4-D 2mg/ L+ 2p 0.8 mg/ L	Schwenkel 等, 1998 <sup>[10]</sup>
花药、子房、合子胚花药、子房、合子胚	2.4-D 2mg/ L+ 2p 0.8 mg/ L 2.4-D(1.0~1.5 mg/ L)和 10%椰汁	Laura 等 2003 <sup>[5]</sup> ; Pueschel 等, 2003 <sup>[3]</sup>

注: 基本培养基及其他附加成分略

1.4 胚性愈伤与非胚性愈伤的区分

在愈伤诱导的过程中, 能正确区分出胚性愈伤对于获得大量正常的体胚至关重要。Winkelmann 等<sup>[2]</sup>以仙客来未受精的胚珠为外植体得到不同的愈伤组织, 根据形态、颜色分为两类: 黄色松脆的愈伤和棕色松软含有细胞团的愈伤, 检测发现前者是非胚性愈伤, 后者是胚性愈伤。试验结果还表明非胚性愈伤和胚性愈伤接种在同样的液体培养基中, 表现出不同的结果, 前者无论初始浓度为多少, 细胞生长良好且无褐化的症状, 甚至于细胞浓度高至 40%pcv (细胞密实体积), 后者与前者相比需要较低的初始浓度 (1%~6%pcv), 其中 4%pcv 为最合适, 高于此浓度细胞极易褐化。Ruffoni 等<sup>[13]</sup>却认为白色松脆的为胚性愈伤、棕色的为非胚性愈伤。

但是不同的外植体、不同的激素所诱导出来的愈伤其颜色、形态有所不同, 所以仅凭颜色、形态不能完全确定是否为胚性愈伤, 仍需要其它的手段。

2 体细胞胚的同步化与萌发

2.1 体细胞胚的同步化

只有同步化了的细胞才可能成批地产出成熟的体细胞胚。常用的方法主要有: 饥饿法、阻断法、低温处理法、过滤筛选法; 渗透压分离法; 密度梯度离心法等, 其中过滤分选法较常用且快速。Schmidt 等<sup>[14]</sup>比较了仙客来合子胚和体胚在有丝分裂活动及形态上的差别, 表明合子胚在种子形成的 17 周时间内细胞分裂、拉长及胚的成熟高度同步化, 而体胚形成仅在 3 周内即可形成, 结果导致同步化程度极差 所以为了获得大量体细胞胚首先对胚性愈伤进行同步化处理。

Kreuger 等<sup>[15]</sup>利用渗透压分离法, 对体细胞胚进行了同步化。在没有生长调节剂的发育培养基提高蔗糖含量 (175mM) 为细胞提供比较高的渗透压, 可以有效地确保由原胚形成体细胞胚, 以含有较低蔗糖浓度 (58mM) 的培养基继代诱导球茎产生, 而没有形成体胚。所以在植物的生活过程中, 蔗糖不仅是碳架和能量的来源、是植物新陈代谢、生长、发育等的调节因素, 在体胚发生过程中, 蔗糖作为一种信号分子仍发挥着很重要的作用。

2.2 体细胞胚的萌发

2.4-D 是诱导胚性愈伤发生的重要激素, 但是在形成胚之后, 应及时降低或去掉 2.4-D, 体细胞胚才可以萌发, 如果在这个阶段不降低或除去 2.4-D, 形成的体胚又会形成胚性愈伤细胞团, 即形成次生胚, Ruffuni 等<sup>[6]</sup>实验表明在培养基中加入 10 $\mu$ M 的 ABA (脱落酸) 也可阻止仙客来次生胚的形成, 但并不影响体细胞胚的萌发, 培养基中加入 10 g/ L 的甘露醇和 10 mg/ L 的谷氨酸同样促进体胚的萌发。

2.3 ABA 对体胚成熟的影响

ABA 在被子植物体胚发生的不同分化阶段有很大影响, 在培养基中加入 10 $\mu$ M 的 ABA 可阻止次生胚的形成, 但不影响体细胞胚的成熟和萌发<sup>[16]</sup>。在仙客来中有关的作用机理尚不清楚, Ashihara 等<sup>[17]</sup>在研究云杉 Chinese Spruce (*Picea asperata*) 体细胞胚的发生过程中核苷酸合成的变化时发现加入外源 ABA 后抑制了细胞的增殖, 但刺激了胚的生长, 或许这能给仙客来未来相关的研究提供一个思路。

3 仙客来胚性细胞和体胚的保存

3.1 仙客来胚性细胞的低温保存

维持稳定的悬浮体系需要定期更换新鲜培养基, 不仅耗时耗力, 而且培养一定时间以后形成体胚的能力下降, 如何保存胚性愈伤是研究者不得不考虑的问题, 一些植物种类胚性愈伤的成功的冷冻保存方法已经被报道。

Winkelmann 等<sup>[18]</sup>以仙客来继代培养 7~10 d 的胚性细胞为材料, 首先在含有不同浓度的的蔗糖溶液中预培养, 然后转到-196℃条件下低温保存, 结果表明预培养 2~4 d、0.6 M 的蔗糖浓度是最佳选择, 具有与非冷冻愈伤同样的再生速度, 产生的体胚数甚至比非冷冻的体胚数还高。但是显微观察发现只有小细胞冷冻后有活力, 有液泡的单细胞冷冻后死亡。另外通过冷冻保存降低了人为的和外来污染的可能性、延长了储存时间、降低了成本。

3.2 仙客来体胚的干燥保存

为了获得可储藏的仙客来的体胚采用了干燥保存的方法, 首先诱导体胚的干燥耐受性, 表明大小在 700~1 000 $\mu$ M 之间的鱼雷胚干燥到 0.2 g H<sub>2</sub>O/ (g DW) 后表现出最高的发芽率, 在干燥器里对其进行脱水处理, 发

现含水量高于 24% 时才能发芽, 如果在分化的第 3 周给以 60 g/L 的蔗糖将会产生更多单个体胚<sup>[9]</sup>。

#### 4 结论

结合近些年国内外仙客来体胚发生的相关研究, 对其发生的条件作了较为详细的综述, 尽管它在被子植物中并不具有完全的代表性, 但是为园艺观赏植物的大量繁殖提供一个较为可行的思路。并且体细胞胚的发生可以为研究植物的合子胚胎发生在一定意义上提供替代系统, 尽管以胡萝卜作为体胚发生的模式植物的研究成果, 已经有了较为详细的综述或专著, 但是由于物种的差异, 它同样不能代表全部, 仍需要其它被子植物的相关工作来补充。

#### 参考文献

- [1] 曲复宁, 由翠荣, 龚雪芹, 等. 仙客来组织培养中再生器官类型及增殖稳定性比较[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 559-564.
- [2] Winkelmann T, Hohe A, Püeschel A K. Somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill [J]. Curr. Topics Plant Biol. 2000, 2: 51-62.
- [3] Püeschel A K, Schwenkel H G, Winkelmann T. Inheritance of the ability for regeneration via somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* [J]. Plant Cell, Tiss and Organ Cult. 2003, 72(1): 43-51.
- [4] Winkelmann T, Serek M. Genotypic differences in callus formation and regeneration of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. [J]. Euphytica, 2005, 144: 109-117.
- [5] Laura M, Benedetti L D, Bruna S. *Cyclamen persicum* Mill.: somatic embryogenesis and RAPD analysis of embryogenic callus [J]. Acta Horticulturae 2003, 625: 137-141.
- [6] Furukawa K, Kakiyama F, Kato M. Somatic embryos produced from aseptically seedlings of wild *Cyclamen* species [J]. J Society of High Technology in Agriculture, 2002, 14(2): 71-80.
- [7] Takamura T, Tsutsui M, Tanaka M. Micropropagation of yellow-flowered cyclamen through adventitious organogenesis in medium containing 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, 1996, 48(1): 33-38.
- [8] Takamura T, Nagita Y, Tanaka M. Effects of temperature on in vitro

- plant regeneration through somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill [J]. Horticultural Research, 2003, 2(1): 25-28.
- [9] Bach A, Malik M, Zolneczek B. Organogenesis and somatic embryogenesis in cultures of *Cyclamen persicum* Mill. F1 Medium [J]. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica, 1998, 40: 47-51.
- [10] Schwenkel H G, Winkelmann T. Plant regeneration via somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill [J]. Plant Tiss Cult Biotechnol. 1998, 4: 28-34.
- [11] Hohe A, Winkelmann T, Schwenkel H G. The effect of oxygen partial pressure in bioreactors on cell proliferation and subsequent differentiation of somatic embryos of *Cyclamen persicum* [J]. Plant Cell, Tiss and Organ Cult. 1999, 59(1): 39-45.
- [12] Winkelmann T, Hohe A, Schwenkel H G. Establishing embryogenic suspension cultures in *Cyclamen persicum* Purple Flamed [J]. Advances in Horticultural Science, 1998, 12(1): 25-30.
- [13] Ruffoni B. Embryogenic suspension cultures of cyclamen for the production of artificial seeds [J]. Culture Protectors, 1998, 27(11): 91-96.
- [14] Schmidt T H, Ewald A, Seyring M, Hohe A. Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seeds [J]. Plant Cell Rep. 2006, 25(7): 643-650.
- [15] Kreuger M, Postma E, Brouwer Y, Holst G J van. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium [J]. Physiol. Plant, 1995, 94(4): 605-612.
- [16] Ruffoni B, Semeria L, Profumo P. *Cyclamen persicum* Mill. somatic embryos developed in suspension cultures: histological analysis and conversion to plant [J]. Acta Horticulturae, 2000, 520: 83-90.
- [17] Ashihara H, Stasolla C, Loukanina N. Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine and inosine [J]. Plant Sci. 2001, 160: 647-657.
- [18] Winkelmann T, Mu Bmann V, Serek M. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. [J]. Plant Cell Rep. 2004, 23: 1-8.
- [19] Seyring M, Hohe A. Induction of desiccation-tolerance in somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. [J]. J Horticultural Science and Biotechnology, 2005, 80: 65-69.

## Recent advances in *Cyclamen persicum* Mill. Somatic Embryogenesis

BIAN Fu-hua<sup>1,2</sup>, QU Fu-ning<sup>2</sup>, ZHENG Cai-xia<sup>1</sup>, YOU Cui-rong<sup>2</sup>, GONG Xue-qin<sup>2</sup>

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract:** In this paper, studies on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. were summarized. It showed that genotypes, explants, hormones, environmental conditions and elements of culture-medium had the important effects on the producing of embryogenetic tissue. In addition, the studies on preservation of embryogenic callus and somatic embryos were summarized.

**Key words:** *Cyclamen persicum* Mill.; Somatic embryogenesis; Embryogenic callus