

# 文冠果体细胞胚胎发生体系建立

李 晶, 王承义, 舒 钰, 孙海滨, 刘 强, 王 丹

(黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘 要:** 以文冠果果实的幼果期、中期和成熟期种胚为外植体, 利用组织培养技术, 对影响文冠果体细胞胚胎发生多种培养因子进行筛选, 建立稳定的文冠果体细胞胚胎发生的培养体系。结果表明: 文冠果果实发育中期的种胚诱导体细胞胚效果较好, 种胚在 MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+2%蔗糖的固体培养基上暗培养形成愈伤组织, 在 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+2%蔗糖的固体培养基上暗培养产生体细胞胚。

**关键词:** 文冠果; 体细胞胚胎; 发生; 体系

**中图分类号:** S 565.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0140-04

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.)为无患子科文冠果属落叶灌木或小乔木, 原产自我国北方, 自然分布于陕西、甘肃、山西、河南、河北、内蒙古、宁夏、辽宁等省区。

文冠果具有较强的适应性和抗逆能力, 根系发达、根萌蘖性强, 是绿化荒山的先锋树种, 适合长江以北的广大地区栽培。种子营养丰富、种仁含油率高, 是我国特有的珍稀木本油料植物, 文冠果作为生物质能源树种, 具有很高的应用价值及发展潜力。

文冠果处于半栽培半野生的状态, 属于异花授粉植物, 多系自然杂交品种, 后代分离现象严重<sup>[1]</sup>。另外, 种源不足, 单株产量相差悬殊, 扦插繁育又很困难, 利用组培技术进行繁殖是实现种苗良种化的一条重要途径。有关文冠果组织培养方面的研究也有很多报道。如张桂琴等<sup>[2]</sup>对文冠果嫩茎和茎尖进行了组织培养研究; 王永明和陈颖<sup>[3]</sup>对文冠果组织培养的初步研究; 近期, 顾玉红等<sup>[4]</sup>利用文冠果果实成熟期的种胚在弱光固体和悬浮培养基中诱导体细胞胚发生; 张娜等<sup>[5]</sup>又对文冠果组织培养技术及体细胞胚发生进行了研究, 发现文冠果的组培具有一定的难度, 表现在试管植株长势较弱、增殖率不高以及生根困难等几个方面, 因而影响了文冠果良种化经营进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 材料来源** 以文冠果种子发育不同时期的种胚为试材, 试材取自黑龙江省森林植物园的成龄植株。采摘果实分3个时期进行: 6月中旬为幼果期, 果实大小为成熟时的1/6~1/4, 种皮白色、柔软, 内容物为无色透明稠密液体, 结构分化尚不明显; 7月中旬为中期, 果实大小已接近成熟时的80%, 种皮白色、较软, 种胚淡绿色, 子叶和胚轴已发育完全; 8月中旬为果实成熟期, 果皮虽为绿色, 但已硬化, 种皮也变为棕色、较硬。

**1.1.2 材料处理** 果实采集后放入2~5℃条件下冷藏24 h后使用。接种前取出冷藏的果实, 先用洗洁净清洗表面污垢, 用自来水冲洗3 min, 再用次氯酸钙饱和水溶液表面消毒15 min, 消毒完毕后, 用无菌水冲洗4~5遍, 用无菌滤纸吸干表面水分备用。

### 1.2 试验方法

文冠果幼果期试材, 用解剖刀切开果皮和果肉, 取出带有种皮的种子, 直接接种到诱导愈伤组织的培养基中; 文冠果种子发育中期和成熟期的试材, 则须去掉种皮, 夹取种胚, 接种于诱导培养基中。诱导愈伤组织的培养基为MS, 附加KT、BA和2,4-D, 2%蔗糖, 0.58%琼脂粉, 培养基pH 5.8, 进行暗培养15~20 d。当愈伤组织直径约为0.5 cm时, 将其转入不含2,4-D的诱导体胚发生的培养基上继续进行暗培养, 培养基为MS, 附加KT、BA、NAA和IAA。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子不同发育时期的种胚对诱导愈伤组织的影响

将外植体(种胚)接种到MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+2%蔗糖培养基中, 材料接种后4~5 d, 体积开始增大, 15~20 d可增大到接种时的2倍左右, 同时在

第一作者简介: 李晶(1963-), 女, 硕士, 研究员, 现主要从事园林植物与森林培育工作。E-mail: lijing0426@163.com。

通讯作者: 王承义(1962-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事森林生态与植被恢复研究工作。E-mail: wcy758@tom.com。

基金项目: 黑龙江省科技厅科技攻关资助项目(GB07B303-02); 黑龙江省科技厅攻关重点资助项目(GA09B201-03)。

收稿日期: 2010-03-02

外植体周围开始形成愈伤组织。幼果期种胚形成的愈伤组织为灰白色、不透明、质地紧密;中期和成熟期种胚形成的愈伤组织呈白色、半透明状、质地比较疏松。培养30 d后,调查愈伤组织诱导率。

从表1看出,文冠果种子发育中期的种胚愈伤组织诱导率最高,高达96.30%;其次为幼果期的种胚材料,愈伤组织诱导率为91.38%;成熟期的种胚愈伤组织诱导率最低,仅为75%。幼果期的种胚材料愈伤组织诱导率也较高,但愈伤组织质地紧密,后续的培养试验证明很难诱导体胚发生,而疏松型的愈伤组织则可以诱导体胚发生。因此,选择种子发育中期的种胚作为试材较好(见图1-1)。

表 1 种子不同发育时期的种胚对愈伤组织诱导的影响

种胚发育时期	接种材料数	产生愈伤组织材料数	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织质地
幼果期	23	21	91.38	灰白、致密
中期	27	26	96.30	白、半透明、疏松
成熟期	24	18	75.00	白、半透明、疏松

2.2 基本培养基对诱导种胚愈伤组织的影响

MS、1/2MS和1/3MS 3种基本培养基对文冠果种子发育中期的种胚愈伤组织诱导(见表2),3种培养基均为MS培养基,但无机盐的含量有所不同,其诱导率有很大的差别。培育30 d时,培养基无机盐含量对产生愈伤组织影响较大,将MS培养基大量元素减半后,愈伤组织诱导率从85.35%降低到了68.42%,将大量元素减到1/3后,愈伤组织诱导率则降低到了42.38%,这说明在文冠果种胚愈伤组织诱导中,培养基中无机盐浓度较低不适宜诱导愈伤组织。

表 2 不同基本培养基对形成愈伤组织的影响

基本培养基	接种材料数	启动时间	诱导率/%
MS	21	15	85.35
1/2MS	23	14	68.42
1/3MS	18	16	42.38

2.3 不同激素组合对诱导种胚愈伤组织的影响

从表3看出,文冠果种子发育中期的种胚在不同激素组合的培养基中培养,BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L组合诱导率为最高,诱导率为92.21%。其次是BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L组合,诱导率为91.46%,最差组合为KT 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L组合,诱导率为78.65%。

2.4 培养基组合对诱导种胚愈伤组织的影响

将发育中期的种胚接种在不同的培养基组合中,以比较培养基的基本成分和植物激素对形成愈伤组织的影响,材料生长30 d时,结果见表4。

表 3 不同激素组合对种胚形成愈伤组织的影响				
不同激素组合	KT 1.0+	KT 1.0+	BA 1.0+	BA 1.0+
/mg * L <sup>-1</sup>	2 4-D 1.0	2 4-D 2.0	2 4-D 1.0	2 4-D 2.0
诱导率/%	78.65	80.34	92.21	91.46
愈伤组织质地	淡黄、致密	淡黄、致密	淡黄、透明、疏松	黄、半透明、疏松

表 4 不同培养基组合对形成愈伤组织的影响				
培养基成分/mg * L <sup>-1</sup>	接种材料数	产生愈伤组织材料数	诱导率/%	
MS+KT 1.0+2,4-D 1.0+2%蔗糖	25	19	76.00	
MS+KT 1.0+2,4-D 2.0+2%蔗糖	25	20	80.00	
MS+BA 1.0+2,4-D 1.0+2%蔗糖	26	25	96.15	
MS+BA 1.0+2,4-D 2.0+2%蔗糖	28	27	96.43	
1/2 MS+BA 1.0+2,4-D 1.0+2%蔗糖	26	19	73.08	
1/3 MS+BA 1.0+2,4-D 1.0+2%蔗糖	26	12	46.15	

KT与BA相比,诱导愈伤组织的作用略低,适当提高2,4-D浓度,对诱导愈伤组织有一定的促进作用,但考虑到2,4-D用量在1.0mg/L时已有较好的效果,再提高2,4-D浓度,对下一步诱导体胚发生可能会产生抑制作用,因此,认为将BA和2,4-D的含量控制在1.0mg/L为宜。1/2 MS、1/3 MS与MS相比,其盐浓度低,不利于愈伤组织的形成,在该试验条件下,认为MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+2%蔗糖,对诱导种子发育中期的种胚产生愈伤组织有较好的效果,愈伤组织呈淡黄、透明、疏松,诱导率达96.15%(见图1-2)。

2.5 种胚不同发育时期愈伤组织诱导体细胞胚胎发生

当种胚愈伤组织长到直径的0.5 cm大时,将愈伤组织转入不含2,4-D且细胞分裂素含量较高的培养基中继续暗培育,诱导体细胞胚胎发生,产生胚性愈伤组织(见图1-3)。经过30 d左右的诱导,诱导培养基为MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+2%蔗糖,发现致密型愈伤组织均未出现分化,而疏松型的愈伤组织表面出现了体细胞的分化,肉眼能清楚地看到愈伤组织表面生出了白色的细小球状颗粒,再经过15 d左右的培养,逐渐长大成为白色球状胚、圆棒状胚或鱼雷状体胚(见图1-4),不同材料的对比试验结果见表5。

表 5 不同发育时期种胚愈伤组织分化情况				
种胚发育时期	愈伤组织数	分化体胚的愈伤组织数	分化率/%	生长情况
幼果期	21	0	0	—
中期	26	5	19.24	体胚健壮
成熟期	18	2	8.11	体胚弱、稀少

从表5中可以看出,幼果期种胚愈伤组织未能诱导除体细胞胚;发育中期的种胚愈伤组织诱导体细胞胚的效果最好,诱导分化率可达19.24%,且体胚多数饱满健壮,可以正常生长;成熟期种胚愈伤组织虽也能诱导出体细胞胚,但分化率较低,且体细胞胚组织数量稀少,长势弱,不易发育成饱满健壮的体细胞胚。

2.6 培养基组合对诱导体细胞胚胎发生的影响

将种子发育中期种胚形成的愈伤组织转入8种诱

导体细胞胚胎发生的培养基中,暗培养 30 d 后,调查培养基和激素组合对诱导体细胞胚胎发生的影响。

表 6 不同培养基组合对诱导体细胞胚发生的影响

培养基成分/mg · L <sup>-1</sup>	愈伤组织数	分化体胚的愈伤组织数	分化率 / %	生长势
1/2MS+BA 2.0+NAA 0.05+2%蔗糖	20	2	10.00	+
MS+BA 1.0+NAA 0.05+2%蔗糖	20	2	10.00	++
MS+BA 2.0+NAA 0.05+2%蔗糖	20	4	20.00	+++
MS+KT 1.0+NAA 0.05+2%蔗糖	20	0	0	
MS+KT 2.0+NAA 0.05+2%蔗糖	20	3	15.00	+++
MS+KT 2.0+IAA 0.05+2%蔗糖	20	2	10.00	++
B5+BA 2.0+NAA 0.05+2%蔗糖	20	2	10.00	++
MS+BA 2.0+NAA 0.05+2%葡萄糖	20	1	5.00	+

注:生长势+++为优++为中,+为差。

从表 6 可以看出,1/2MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+2%蔗糖的培养基无机盐浓度偏低,体细胞胚分化率低,长势差;BA 与 NAA 组合诱导分化率高于 KT 与 NAA 组合,但二者的体胚长势均好;BA 和 KT 的含量为 2.0 mg/L 时诱导分化好于 1.0 mg/L;KT 与

NAA 组合诱导分化效果好于 KT 与 IAA 组合;BA 2.0 mg/L与 NAA 0.05 mg/L 组合时,蔗糖的诱导效果好于葡萄糖;在该试验条件下,MS 培养基效果优于 B<sub>5</sub> 培养基。总之在 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L +2%蔗糖的培养基组合中,诱导体细胞胚效果较好,分化率达到 20%,产生体细胞胚(见图 1-5)。

当体细胞胚长到 0.5 cm 左右时,放入全光下培养,经 4~5 d 体细胞胚的颜色由白色变为绿色(见图 1-6)。

2.7 胚轴和子叶诱导体细胞胚发生

在外植体的暗培养过程中,也发现有的种胚产生的愈伤组织极少,而且胚轴和子叶不断长粗、增厚,经过约 2 个多月的暗培养,种胚膨大,可达到接种时的 5~8 倍,此时在膨大了的胚轴或子叶的表面长出了少量的甚至是单个的体胚(见图 1-7),这些体胚长势较弱、生长缓慢,若照料不及有时会中途夭折。此种情况,在已成熟种胚材料中较为多见,但这无疑也是文冠果体胚发生的一种方式。

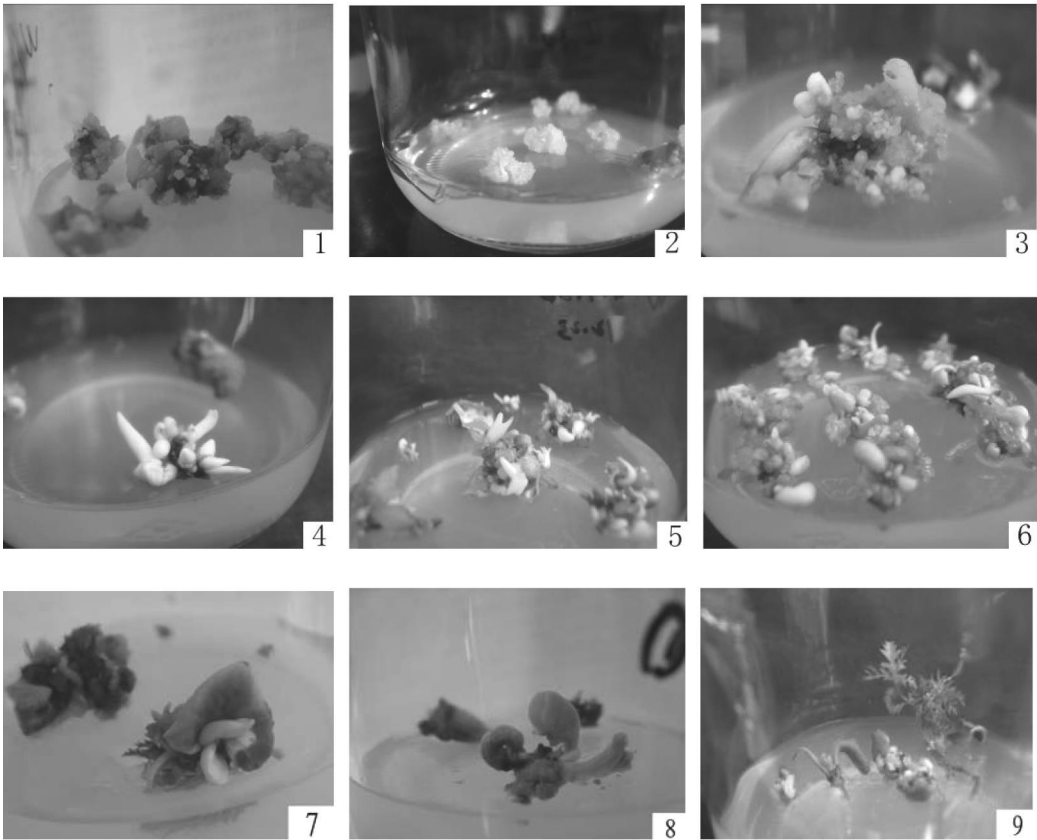


图 1 文冠果体细胞胚发生过程

注:1.成熟中期种子的种胚接种初期产生的愈伤组织;2.在组合培养基诱导下产生的非胚性愈伤组织;3.在不含 2,4-D 的培养基中形成的胚性愈伤组织;4.球形胚、圆棒状胚、鱼雷胚;5.组合培养基诱导的体细胞胚;6.全光照下绿色体细胞胚;7.胚轴子叶诱导体细胞胚;8.子叶展开;9.生长成完整植株。

## 2.8 体细胞胚诱导次生体细胞胚发生(体细胞继代培养)

当体细胞胚发育健全, 即有饱满的子叶和粗壮的胚轴、胚根后, 将其转入诱导体细胞发生的培养基, 在光照条件下培养 3~4 d 后, 体胚顶端子叶处开始变绿, 继而子叶逐渐长大、分开, 其形状颇似合子胚。当其继续生长时, 在子叶、胚轴或胚根上随时都有可能出现次生体细胞胚的分化。其次, 以胚轴和子叶处分化的次生体胚较多, 这是次生体细胞胚发生的主要方式。

用次生体细胞的胚轴和子叶再重新转入诱导体细胞胚发生的培养基中, 仍在光照条件下培养, 约 30 d 后, 次生体细胞的胚轴和子叶上又会诱发形成下一代体胚(图 1-5)和(图 1-6)。如此反复进行, 不断循环下去, 使体胚数量不断扩增。现已用此法连续继代培养 6~7 代, 尚未见胚轴和子叶保持体胚发生的能力有衰减, 说明用此法对体胚进行扩增是可行的。

与此同时, 用体胚长出的真叶和嫩茎作外植体转入诱导体胚发生的培养基中在同样条件下培养了 45 d, 所有材料均未诱发出体细胞胚, 这说明植物胚胎从子叶期发育到真叶期经历了 1 个重要分界点, 子叶期属于胚胎阶段, 在一定条件下可以逆转, 轻而易举地实现胚再生; 一旦长出真叶和幼茎形成新植株, 就意味着跨跃到了一个新阶段, 即完成了一次质的飞跃, 再要逆转回胚胎阶段就十分困难。

## 2.9 体细胞胚诱导形成植株

将成熟的体细胞胚更换到新鲜培养基, 并置于光照条件下培养, 经 4~5 d, 体胚顶端子叶处开始变绿, 并逐渐加快生长, 子叶由圆变长, 2 片子叶之间的缝隙明显可见, 随后 2 片子叶分开(见图 1-8), 成熟体胚若继续进行暗培养, 体胚也能继续长大并生出 2 片子叶, 同时胚根

也开始伸长, 有时胚根能伸长达 6~7 cm, 形成正常根。体胚长出子叶之后, 继而会从 2 片子叶之间的生长点处长出真叶, 然后抽出幼茎, 于是形成了具有根、茎、叶的完整植株(见图 1-9)。

## 3 结论

选择文冠果种子发育中期, 尚未完全成熟的种胚最好, 不仅愈伤组织诱导率高, 而且体细胞胚发生率也最高, 可达到 96.30%。

诱导产生愈伤组织以 MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+2%蔗糖为好, 不仅愈伤组织质地良好, 而且愈伤组织诱导率也高达 96.15%。

从愈伤组织诱导体细胞胚胎发生以 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+2%蔗糖效果为最佳, 体细胞胚发生率可达 20%。

该研究拟通过影响文冠果体细胞胚发生某些因子的试验, 建立一个易行、有效的体胚发生体系, 为文冠果优良无性系的扩繁、人工种子制作和遗传转化等研究打下了基础。

## 参考文献

- [1] 高述民, 杜希华, 李凤兰. 文冠果研究进展[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 296-301.
- [2] 张桂琴, 徐祥龄, 赵志学. 文冠果嫩茎组织诱导植株移栽初获成功[J]. 林业科技通讯, 1980(7): 4-5.
- [3] 王永明, 陈颖. 文冠果组织培养的初步研究[J]. 林业科技通讯, 1981(7): 7-9.
- [4] 顾玉红, 高述民, 郭惠红, 等. 文冠果的体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯, 2004(3): 311-313.
- [5] 张娜, 郭晋平. 文冠果组织培养技术关键环节研究进展与展望[J]. 中国农学通报, 2009(8): 113-116.

# The Establishment of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge Somatic Embryogenesis System

LI Jing, WANG Cheng-yi, SHU Yu, SUN Hai-bin, LIU Qiang, WANG Dan  
(Forestry Research Institute of Heilongjiang Harbin, Heilongjiang 150081)

**Abstract:** In this paper, used young fruit period, mid period and maturity of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge seed embryos as explants. Using tissue culture techniques, screened the factors that affecting *Xanthoceras sorbifolia* Bunge somatic embryogenesis. Established a stable training system for *Xanthoceras sorbifolia* Bunge somatic embryogenesis. The results showed that it was better to use mid period of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge seed embryos for inducing somatic cells. Seed embryos formed callus in the dark culture conditions in MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+2% sucrose solid medium. Seed embryos produced somatic embryos in the dark culture. In the MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+2% sucrose solid medium. The study of somatic embryogenesis for *Xanthoceras sorbifolia* Bunge lay the groundwork for such studies these were fine clones of propagation, artificial seed production and genetic transformation.

**Key words:** *Xanthoceras sorbifolia* Bunge; somatic embryogenesis; system