

# 龙牙楸木体细胞胚胎发生的细胞组织学研究

李建民<sup>1</sup>, 张程<sup>2</sup>, 马玉林<sup>1</sup>, 李喜文<sup>3</sup>

(1. 青海师范大学 生命与地理科学学院, 青海 西宁 810008 2. 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100

3. 东北师范大学 遗传与细胞研究所, 吉林 长春 130024)

**摘要:**以龙牙楸木幼芽为外植体,在改良 MS 培养基上以体细胞胚胎发生获得了再生植株并对其进行组织切片和扫描电镜观察。结果表明:龙牙楸木体细胞胚胎发生为典型的单细胞起源。其胚性原始细胞既有内起源,又有外起源。

**关键词:**龙牙楸木; 幼芽; 组织培养; 体细胞胚胎发生; 组织细胞学

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)14-0116-04

龙牙楸木是五加科(Araliaceae)楸木属(*Aralia* L.)的一种多年生乔木药用植物,又称刺老鸦,具有补气、活血、祛风、利湿、止痛等功效。分布于我国东北地区及朝鲜、日本、俄罗斯的西伯利亚地区<sup>[1]</sup>。其幼嫩茎叶作为有名的山菜,倍受我国及东南亚一些国家的青睐。对该植物的组织培养和体细胞胚胎发生再生植株已作了报道<sup>[2]</sup>。现对这一过程进行了组织细胞学和扫描电镜的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以野生龙牙楸木(*Aralia elata* (Miq.)Seem.)的幼芽为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 组织培养** 秋末取落叶枝条,在 23~25℃室内水浸。待其休眠芽萌发出 1~3 cm 的幼芽后剪下,用

70%酒精浸泡 30 s,然后用 0.1%HgCl<sub>2</sub>溶液灭菌 5 min,无菌水冲洗 3~4 次,在无菌条件下将幼芽切成 4 mm 左右的切段,接种于改良 MS 培养基上。基本培养基为 MS 培养基,附加 2%蔗糖、300 mg/L 水解酪蛋白、0.7%琼脂, pH 5.8,添加激素为(1)MS-1 培养基:0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA;(2)MS-2 培养基:2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA;(3)MS-3 培养基:2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+0.2%活性炭。培养温度为 25℃,每日 16 h 光照下培养,光照强度为 1 500~2 000 lx。

**1.2.2 组织解剖学观察** 取不同发育时期的愈伤组织材料,用 FAA 液固定 24 h 以上。常规石蜡切片法制片<sup>[4]</sup>,切片厚 10~13 μm。用番红-固绿对染或苏木精染色,中性树胶封片。置于 Olympus-BH2 显微镜下观察并照相。

**1.2.3 扫描电镜观察** 取不同发育时期的愈伤组织材料,用 2.5%的戊二醛室温下固定 4 h,酒精、醋酸异戊酯系列脱水。用日本 HCP-2CO<sub>2</sub> 临界点干燥仪进行临界点干燥,IB-3 离子溅射仪镀金处理,最后在 HIACHI-S570 扫描电镜上观察、照相。

**第一作者简介:**李建民(1964),男,教授,现从事植物生物技术方面的教学与研究工作。E-mail: Beyond\_3862740@163.com。

**基金项目:**科技部国家科技支撑计划资助项目(2006BA106A15-13);吉林省自然科学基金资助项目。

**收稿日期:**2011-04-19

## Study on Miniature Chinese Rose Stem Section Tissue Culture Rapid Propagation Technical

LIU Hui

(College of Biotechnology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang, Henan 455000)

**Abstract:** The optimal tissue cultures of miniature Chinese rose stem section were singled out using miniature Chinese rose stems as explants, according to the number of bourgeon sprout and cluster buds of successive expanded reproduction. The results showed that the optimal nutrient medium induced lateral bud was MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L and successive nutrient medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L.

**Key words:** miniature Chinese rose stem; tissue culture; 6-BA; NAA

## 2 结果与分析

### 2.1 胚性愈伤组织的形成、体细胞胚发生的诱导及植株再生

龙牙楸木幼芽切段接入 MS-1 培养基培养 7 d 后, 在切段切口处开始膨大, 并形成致密的愈伤组织, 且生长旺盛。1 个月后继代 1 次, 愈伤组织颜色逐渐转为浅黄色, 组织致密。将其转入 MS-2 培养基培养, 愈伤组织长势为先快后慢, 4 周后发现愈伤组织表面开始出现褐化现象, 同时产生一些表面光滑、质地紧密、颜色略淡的胚性颗粒状结构即胚性愈伤组织。将这些褐化的胚性愈伤组织转至含有 0.2% 活性碳的 MS-3 培养基上, 褐化程度被减弱, 愈伤组织呈黄褐色, 颗粒状结构增殖加快。4 周后, 在其黄褐色愈伤组织表面出现许多白色或浅褐色的单独或丛生的粒状突起物。将这些突起物分离下来, 在实体显微镜下观察, 发现正处于球形期、心形期、鱼雷期和子叶期的体细胞胚。继续培养也可观察到发育成转绿的子叶晚期阶段的体细胞胚。培养 5~6 周后, 正常的胚状体很快进一步发育形成幼小植株。从发育过程看, 这种体细胞胚的发育阶段和形态特征与正常合子胚十分相似。统计结果表明, 在 MS-3 培养基上, 体细胞胚诱导率为 75%。及时将幼小植株转移到含 1% 活性碳的 1/2MS 无激素基本培养基上, 小植株生长迅速, 形成具根、茎、叶的完整植

株。1 个月后植株高达 5 cm 左右。

### 2.2 组织解剖学观察

组织切片观察结果表明, 培养在 MS-1 培养基上的愈伤组织是由正在进行平周分裂的分生组织和周围薄壁细胞组成, 其组织外表面呈不规则性状。转移到 MS-2 培养基 3 周后, 此时的愈伤组织是由薄壁细胞组织和胚性细胞团所组成。把这种胚性愈伤组织, 转移到 MS-3 培养基后, 发现在愈伤组织内部和愈伤组织表面均出现了一种圆形的、单个胚性原始细胞(图 1、2)。该细胞的特征是细胞壁加厚、原生质浓、细胞核增大且位于细胞中央和染色较深。位于愈伤组织内部的胚性原始细胞在进行有丝分裂时首先进行横向分裂, 形成 2 个大小不等的顶细胞和基细胞(图 3), 即 2-细胞原胚。之后顶细胞进行 3 次分裂形成八分体。基细胞与八分体一起形成八分体原胚(图 4), 直至形成多细胞原胚(图 5)。而位于表面的胚性原始细胞先进行垂周分裂形成 2-细胞原胚(图 6), 之后经过多次平周分裂和垂周分裂形成附着在愈伤组织表面的早期多细胞原胚(图 7)。以后这些原胚继续发育, 进入体细胞胚的各个发育阶段, 即球形期、心形期(图 8)、鱼雷期、子叶期(图 9)。由图 9 可看到子叶期的体细胞胚表现出强烈的极性并已分化形成叶原基、顶端分生组织及胚根。

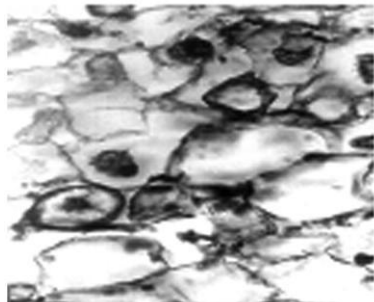


图 1

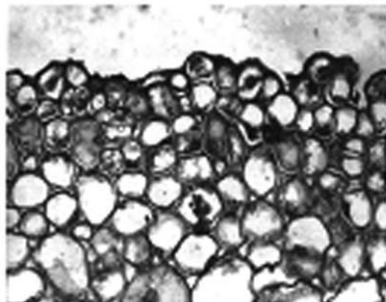


图 2

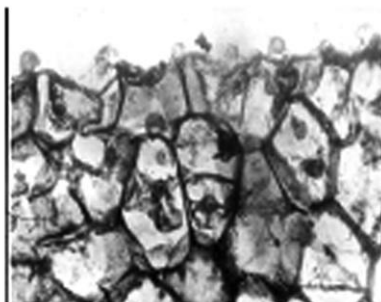


图 3

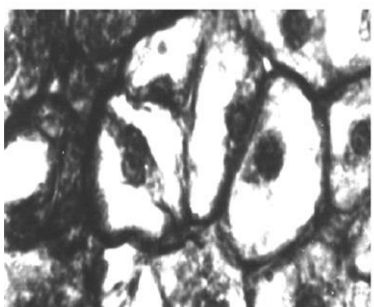


图 4

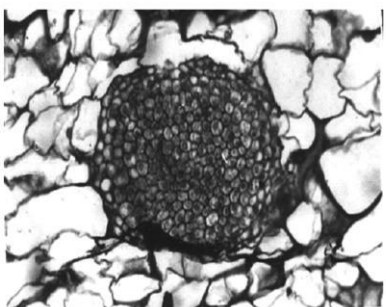


图 5

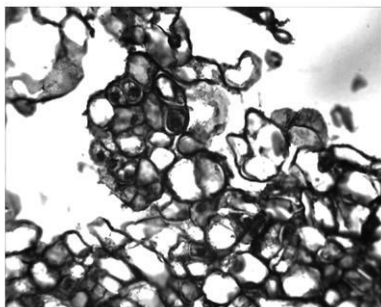


图 6

### 2.3 扫描电镜观察

用扫描电镜观察在 MS-1 培养基上继代培养 1 次后的愈伤组织表面结构时, 看到该表面的细胞大部分

由管状细胞组成(图 10), 较为松散。图 11 所示培养在 MS-2 培养基中胚性分生细胞区域的扫描电镜图象。从中可以看到该区域主要由球形细胞组成, 细胞排列紧

密。另外,可看到由分生细胞分裂后形成的二细胞(图 12)和多细胞团(图 13)。当将这些胚性愈伤组织转入 MS-3 培养基上培养 3~4 周后,可见愈伤组织表面产

生许多胚状体(图 14),继续培养 5~6 周后,可见发育至子叶期的胚状体(图 15)。

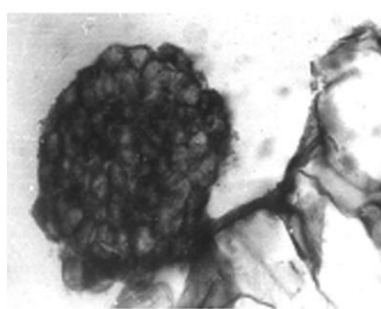


图 7

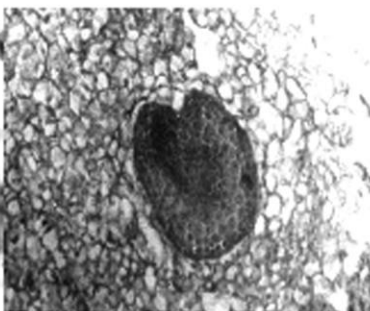


图 8

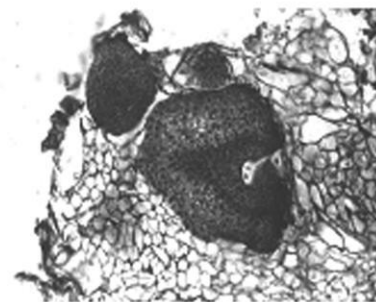


图 9



图 10

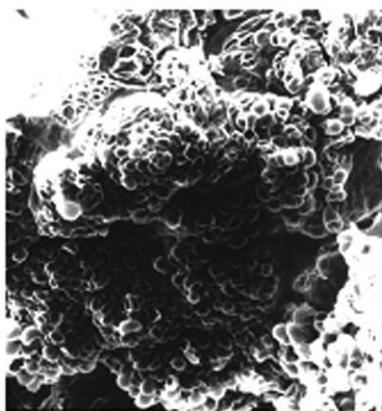


图 11

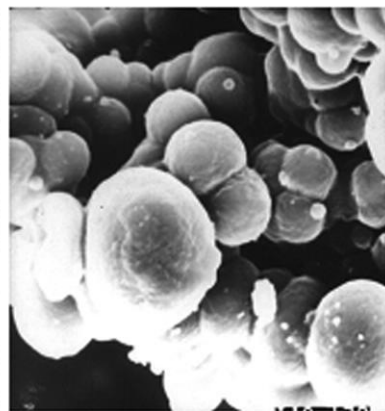


图 12

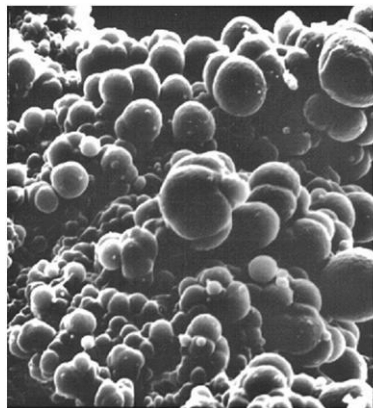


图 13



图 14

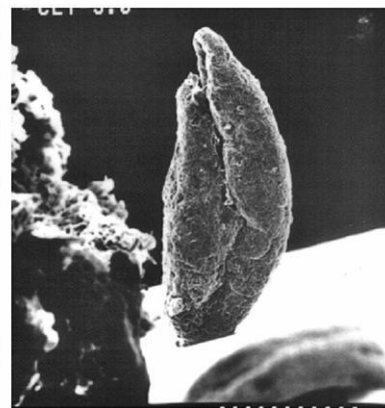


图 15

### 3 讨论与结论

对于体细胞胚胎发生是起源于单细胞还是多细胞集合体,一直存在不同看法<sup>[35]</sup>。从近些年的研究报道看,大多数研究结果认为体细胞胚是起源于单细胞的<sup>[56]</sup>。对该问题的认识是与植物的合子发生联系在一起。在被子植物发育的特定阶段,分化成熟的雌、雄配子经过受精作用产生的合子是一个具有本种植物

的全部遗传信息的特异性细胞。它们单个地游离存在于胚囊里,成为具有全能性的分生细胞。在双子叶植物合子胚发育过程中,合子的第一次分裂往往是横向分裂,表现出细胞的极性化。形成靠珠孔端的基细胞和靠合点端的顶细胞。另外,也有一些植物的合子纵向分裂,形成 2-细胞原胚,表现出细胞分裂轴向对形态建成的重要影响。以后经过 4-细胞原胚、八分体、多细胞原胚等各个不同时期发育成的合子胚。

在离体培养的体细胞胚发生过程中, 胚性原始细胞是在不同培养基和激素等作用下产生的。该细胞的特征是细胞壁加厚、原生质浓、细胞核大, 且位于细胞中央(图 1、2)。胚性原始细胞在首次细胞分裂时表现出明显的极性, 即第一次细胞分裂为不均等分裂。由于体细胞胚发育的不同步性, 在一块愈伤组织或一个胚性复合体中可看到由不同单个胚性细胞分裂形成的二细胞、四细胞、多细胞以及各个不同发育时期的体细胞胚。体细胞胚的发育过程与整体植物合子胚发育过程是十分相似的。因此可推测在离体培养过程中, 体细胞胚状体的发生是由一个胚性原始细胞开始的, 是由单细胞起源的。许多植物的实验也支持了这个观点, 如桉树<sup>[7]</sup>、红豆草<sup>[8]</sup>、石刁柏<sup>[9]</sup>等。一些通过原生质体及悬浮单细胞培养获得体细胞胚的试验, 也直接证明胚状体来源于单个细胞, 如甜菜<sup>[10]</sup>、石防风<sup>[11]</sup>、甘蔗<sup>[12]</sup>等植物。该研究采用组织切片观察, 可看到龙牙楸木的胚性愈伤组织内部或表面均分布一些胚性原始细胞。在其分裂时, 具有明显的极性, 第一次不均等细胞分裂的轴向与细胞长轴相垂直。分裂后形成了 2 个大小不等的顶细胞和基细胞, 以后随着细胞逐渐分裂, 发育形成了球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚等成熟的体细胞胚, 表现出有规律的秩序性。由此可见, 龙牙楸木体细胞胚的发生过程与双子叶植物合子胚的发生过程是十分相似的, 认为龙牙楸木体细胞胚胎发生为典型的单细胞起源。其胚性原始细胞既有内起源, 又有

外起源。

### 参考文献

- [1] 吉林省中医中药研究所. 长白山植物药志[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1982: 78.
- [2] 李建民, 李喜文, 张德炎, 等. 龙牙楸木幼芽体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 实验生物学报, 2001, 34(2): 137-141.
- [3] Street H E Withers L A. The anatomy of embryogenesis in culture. In: Street H E, Tissue Culture and Plant Science Proceedings 3rd International Congress of Plant Tissue and Cell Culture[M]. London: Academic Press, 1974: 71-100.
- [4] Hácis B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus culture[J]. Phytomorphology, 1978, 28: 74-81.
- [5] Ortiz P A, Fama G, Vallejos R H, et al. Cytodifferentiation and cell organization in the somatic embryogenesis of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Biocell, 1996, 20(1): 61-66.
- [6] 崔荣凯, 裴新梧, 王亚巍, 等. ABA 对体细胞胚胎发生的调节作用[J]. 实验生物学报, 1998(2): 195-201.
- [7] 欧阳权, 彭海忠, 李启泉. 桉树愈伤组织发生胚状体研究[J]. 林业科学, 1981, 17(1): 1-7.
- [8] 谷祝平, 郑国辑. 红豆草组织培养中体细胞胚的形成及其胚胎学观察[J]. 实验生物学报, 1987, 20(1): 23-26.
- [9] 赵洁, 程井辰. 石刁柏体细胞胚胎发生的细胞组织学研究[J]. 植物学报, 1992, 34(7): 491-495.
- [10] 李兴锋, 陈惠民. 甜菜原生质体培养直接产生体细胞胚[J]. 植物学报, 1992, 34(5): 402-404.
- [11] 夏光敏, 陈惠民. 石防风细胞悬浮培养中的体细胞胚胎发生[J]. 实验生物学报, 1988, 21(3): 265-269.
- [12] 颜秋生, 张雪琴, 谷明光. 甘蔗原生质体细胞胚胎发生[J]. 植物学报, 1987, 20(3): 242-246.

## Cytology and Histology in Somatic Embryogenesis of *Aralia elata* (Miq.) Seem.

LI Jian-min<sup>1</sup>, ZHANG Cheng<sup>2</sup>, MA Yu-lin<sup>1</sup>, LI Xi-wen<sup>3</sup>

(1. College of Life and Geographical Sciences Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008; 2. Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100; 3. Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun, Jilin 130024)

**Abstract:** Explants excised from the young shoots of *Aralia elata* (Miq.) and cultured on MS media, were able to regenerate new plants through somatic embryogenesis. According to the observation of histology and scanning electron microscopy, the results showed that the origin of somatic embryos was typical unicellular and its embryonic cells have two original modes endogenous origin and exogenous origin.

**Key words:** *Aralia elata* (Miq.) Seem.; young shoot; tissue culture; somatic embryogenesis; cytology and histology