

大叶相思体细胞胚胎发生的初步研究⁽²⁰⁾

张宏伟 黄学林 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要 以种子萌发的无菌苗下胚轴为外植体, 在 $B_5 + 2, 4-D (10^{-4} \text{ mol/L}) + BA (10^{-6} \text{ mol/L}) + CH 0.5 \text{ g/L}$ 的固体培养基上培养 4 周, 获得了胚性愈伤组织. 该愈伤组织经 $B_5 + 2, 4-D (10^{-4} \text{ mol/L})$ 的液体培养基 7 d 的诱导在 $B_5 + L$ 谷氨酰胺 (200 mg/L) + $CH (0.5 \text{ g/L})$ 的液体培养基上培养 14 d 产生了球形胚. 球形胚具有明显的两极, 但只是根端发育, 苗端并没有发育.

关键词 大叶相思, 体细胞胚胎发生, 球形胚

分类号 Q 945

大叶相思 (*Acacia auriculiformis*) 是原产澳洲的热带多年生木本豆科植物. 由于其适应性强, 生长迅速, 根系具有根瘤, 木材用途广泛, 现在华南沿海各地广为种植. 近几年国内外对大叶相思的组织培养也日益重视, 但都属器官发生^[1~3], 尚未见到大叶相思体细胞胚胎发生的报道. 在组织培养中, 木本豆科植物的体细胞胚胎发生较为困难. 据报导, 仅在槐树^[4], *Albizia richardiana*^[5], *Acacia koa*^[6] 等少数几种植物取得成功. 本文研究了大叶相思体胚发生的基本条件, 利用大叶相思无菌苗下胚轴产生的愈伤组织进行悬浮培养, 获得了球形胚.

1 材料与与方法

海南直杆大叶相思种子由中国林科院热带林业研究所杨民权先生提供. 种子用 95% 硫酸浸泡 25 min, 流水洗净, 0.1% $HgCl_2$ 消毒 8 min, 无菌水洗净, 接种在培养基 I: $1/4 MS + 1\%$ 蔗糖的固体培养基上. 7 d 后, 切取无菌苗下胚轴成 0.5~1 cm 长的小段, 两片子叶纵切成相同的 4 片, 接种在诱导愈伤组织培养基上. 为了获得胚性愈伤组织, 对外植体 (下胚轴, 子叶), 培养基成份包括基本培养基 (B_5 , ER , MS), 激素的配比 (BA 分别与不同浓度的 $2, 4-D$, NAA 组合), 以及蛋白水解物 (水解乳蛋白, LH 和水解酪蛋白, CH) 的有无组成 18 个组合的正交试验. 愈伤组织 1 个月继代 1 次. 把经过统计确定为具有胚胎发生能力的愈伤组织转移到 $B_5 + 2, 4-D (10^{-4} \text{ mol/L})$ 的液体培养基 (ED) 上诱导体胚发生, 7 d 后, 培养物用尼龙筛网过滤 (弃去 20 目以上和 100 目以下培养物) 转移到 $B_5 + L$ 谷氨酰胺 (200 mg/L) + $CH (0.5 \text{ g/L})$ 的液体培养基 (ED) 上, 促使体胚发生和发育. 摇床的转速为 100 r/min , 培养室温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 每天光照 12 h, 光强度 $1500 \sim 3000 \text{ lx}$.

愈伤组织的涂片观察按李正理^[7]方法. 球形胚的组织学切片按一般石蜡切片法制片^[7], 材料用 FAA 固定液固定并保存, 切片厚度 $8 \sim 10 \mu\text{m}$, 番红—固绿染色.

(20) 收稿日期: 1996-04-11 张宏伟, 女, 28 岁, 讲师, 现在第一军医大学工作.

2 结果与讨论

2.1 胚性愈伤组织诱导的培养条件及其组织学特点 正交试验以及镜检的结果表明(表 1), 在获得胚性愈伤组织的过程中, 激素的作用特别是 2, 4-D 的作用最关键. NAA 诱导的愈

表 1 正交配制和试验结果
Tab. 1 Combinations of orthogonal test and results

外植体	基本培养基	生长素 (mol/L)	BA (mol/L)	附加物 (g/L)	愈伤组织 发生频 (%)	外 观	细胞形态
下胚轴	ER	NAA 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	LH 0. 5	26. 6	疏松、浅黄、长根	体积较小,内容物较多, 形态多样,管状居多
子叶	MS	NAA 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0	75. 0	绿色、致密; 水样透明,疏松	/
叶柄	B ₅	NAA 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	CH 0. 5	0	/	/
子叶	B ₅	NAA 10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0	100	绿色、致密; 浅黄、疏松	少数分生团,管状细胞 占多数
叶柄	ER	NAA 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	CH 0. 5	28. 6	浅黄、致密	管状,体积较大
下胚轴	MS	NAA 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	LH 0. 5	94. 4	浅黄、疏松	体积较大,分生团少,管 状居多
叶柄	MS	NAA 10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	LH 0. 5	100	白色、透明	体积大,管状或不规则 虫状
下胚轴	B ₅	NAA 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0	100	黄绿色,疏松; 白色,致密,长根	体积大,管状、球形及虫 状均有,管状居多
子叶	ER	NAA 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	CH 0. 5	100	浅黄,疏松; 白色,致密	体积大,管状居多
子叶	MS	2, 4- D 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	CH 0. 5	0	/	/
叶柄	B ₅	2, 4- D 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	LH 0. 5	25. 9	白色,透明,蔬 松	体积大,球形、管状均 有,后者居多
下胚轴	ER	2, 4- D 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	0	76. 9	浅黄,疏松	分生团较多,细胞体积 较小
叶柄	ER	2, 4- D 10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0	53. 8	浅黄,疏松	管状、球形均有,后者居 多
下胚轴	MS	2, 4- D 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	CH 0. 5	100	浅黄,透明,疏松; 黄白色,致密	管状细胞占多数
子叶	B ₅	2, 4- D 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	LH 0. 5	100	浅黄,致密	/
下胚轴	B ₅	2, 4- D 10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	CH 0. 5	100	浅黄,湿润颗粒状	分生团很多,胞质浓厚, 体积较小,球形细胞占 多数
子叶	ER	2, 4- D 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	LH 0. 5	100	黄绿色,致密	/
叶柄	MS	2, 4- D 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	0	0	/	

伤组织易直接生根, 高浓度的 2, 4-D (10^{-4} mol/L) 与低浓度的 BA (10^{-6} mol/L) 组合最好. 基本培养基以 B₅ 较合适, 外植体以下胚轴较好. 蛋白水解物的加入可以改善培养基的营养状况. 以下胚轴为外植体, 在 B₅+ 2, 4-D (10^{-4} mol/L) + BA (10^{-6} mol/L) + CH (0.5 g/L) 的固体培养基上长出的愈伤组织生长速度适中, 外观呈浅黄色, 结构松散, 湿润, 颗粒状 (图 1-1), 涂片观察, 细胞呈球形且多具分生细胞团, 为胚性愈伤组织 (图 1-2), 其余则为非胚性愈伤组织 (图 1-3).

2.2 球形胚的产生 在 E₁ 培养基上的培养物在外观上并无明显变化, 也无明显增殖, 随后转移到 E₂ 培养基上培养. 两周后, 愈伤组织增殖明显, 瓶底出现鱼卵状的颗粒 (图 1-4). 该颗粒的组织切片表明: 它有两个明显的极端, 在两端各有一个分生组织区 (图 1-5), 表明该鱼卵状颗粒即为球形胚. 将球形胚及时转移到新鲜的 E₂ 培养基上, 球形胚只发育出根端, 苗端没有进一步发育, 生根的球形胚切片表明, 在相应茎端仍保留着一个分生组织区 (图 1-6).

体胚分化后不能进一步发育的情况还出现在白三叶草^[8], 大豆^[9]等植物中. 将白三叶草子叶^[8]连续放在 40 mg/L 的 2, 4-D 培养基上培养, 体胚发育停留在球形胚阶段, 或者形成次生胚, 但从未超过球形胚阶段. 而子叶放在相同浓度的 2, 4-D 上培养 10 d 即转移到无激素的培养基上, 则产生了子叶型胚^[8]. 另外, 用高浓度 2, 4-D 诱导的大豆体胚发育停留在较早的阶段 (球形胚), 而相同浓度的 NAA 诱导的体胚则可发育至成熟. 这与本试验的结果相反^[9]. 在本试验中曾经在所有阶段用 NAA 代替 2, 4-D, 但 NAA 除了利于根分化之外, 并未使球形胚发育至成熟. 事实上, 在诱导豆科植物体胚发生中, 不同种类植物对 2, 4-D 和 NAA 反应很不相同. 如何使大叶相思球形胚芽端发育, 体胚进一步发育成熟, 还需进一步的研究.

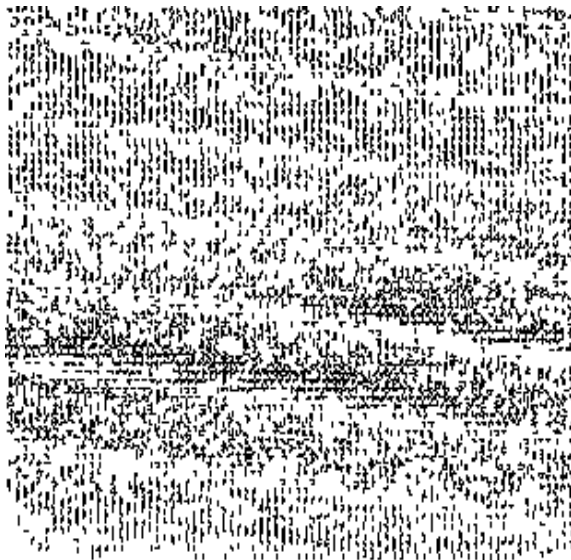


图 1 大叶相思体细胞胚发生过程及其组织学形态

Fig. 1 The process of *Acacia auriculiformis* somatic embryogenesis and its histological forms

1 从下胚轴上诱导产生的胚性愈伤组织 $\times 8$ 4

2 胚性愈伤组织的细胞 $\times 96$ 3 非胚性愈伤组织的

细胞 $\times 96$ 4 鱼卵状的球形胚 $\times 8$ 4 5 球形胚纵

切面 $\times 15$ RM: 根端分生组织; SM: 芽端分生组织

6 球形胚的进一步发育 SM: 芽端分生组织

参 考 文 献

- 1 颜慕勤, 陈平. 大叶相思的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 1988, 1: 29
- 2 Aradhan M, Agrwal R, Gupta S C. In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis*—a leguminous tree. Plant Cell Tissue and Organ Cult, 1989, 19: 65~ 70
- 3 Rang Rao G V, Prasad M N V. Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis*—multipurpose tree Legume. J Plant Physiol, 1991, 137: 625~ 627
- 4 王喆之, 李克勤, 郝联芳, 等. 槐树的组织培养及植株再生. 植物生理学通讯, 1992, 28 (2): 131
- 5 Tomar U K, Gupta S C. Somatic embryogenesis and organogenesis in allus cultures of a tree legume—*Albizia richardiana* king. Plant Cell Rep, 1988, 7: 70~ 73
- 6 Skolmen R G. *Acacia* (*Acacia* Kca Gray). In Bajj Y P S (ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees I. Berlin Springer Verlag, 1986. 375~ 384
- 7 李正理. 植物制片技术. 北京: 科学出版社, 1991. 103~ 104, 138~ 149
- 8 Parrott W A. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. Plant Cell Rep, 1991, 10: 17~ 21
- 9 Dahmer M L, Hildebrand D F, Collin G B. Comparative protein accumulation patterns in soybean somatic and zygotic embryos. In Vitro Cell Dev Biol, 1992, 289: 106~ 114

Preliminary Study on Somatic Embryogenesis of a Tree Legume—*Acacia auriculiformis*

Zhang Hongwei* Huang Xuelin Fu Jiarui

Abstract The somatic embryogenesis of *Acacia auriculiformis* was studied. Embryogenic calli were attained from hypocotyl of aseptically germinated seedlings in B₅ basal medium supplemented with 10^{-4} mol/L of 2, 4-D, 10^{-6} mol/L of BA and 0.5 g/L of Casein Hydrolysate (CH). To induce embryogenesis the embryogenic calli were then transferred to the B₅ basal medium containing 10^{-4} mol/L of 2, 4-D on a shaker at 100 r/min. After one week the cultures were transferred to the B₅ basal medium supplemented with 200 mg/L of L-Glutamine and 0.5 g/L of CH. The globular embryos appeared two weeks later. Histological research showed that the globular embryos had an obvious bipolar. They developed only roots but no shoots.

Keywords *Acacia auriculiformis*, somatic embryogenesis, globular embryo

* School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275