

甜樱桃体细胞胚胎发生及植株再生的研究

吴雅琴, 赵艳华, 刘国俭, 李春敏

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

摘要:以甜樱桃红灯为材料, 幼果用 0.1% HgCl_2 进行消毒, 在无菌条件下取出未成熟胚子叶进行诱导, 在胚成苗后进行继代和生根培养。培养结果表明, 以 MS 为基本培养基, 在 2, 4-D 为 2.0 mg/L 时培养基上胚性愈伤组织诱导率较高, 为 53.7%; 愈伤组织经过数次继代后转移至 MS 附加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 培养基上可诱导体细胞胚的形成, 诱导率可达 81.0%。体细胞胚在合适的培养基上可继续生长和增殖。

关键词: 甜樱桃; 愈伤组织; 体细胞胚胎; 植株再生

中图分类号: S662.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006) 增刊-0125-04

Somatic Embryogenesis of Sweet Cherry and Plantlet Regeneration

WU Ya qin, ZHAO Yanhua, LIU Guo jian, LI Chunmin

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry
Sciences, Changli 066600, China)

Abstract: Cultivars sweet cherry Hongdeng was used as the materials. An immature pterodia was taken from young fruit disinfected with 0.1% HgCl_2 . Shoot multiplication culture and rooting culture were conducted after emergence of seedlings. The result indicates that the embryogenic callus (EC) frequency was 53.1% at 2 mg/L of 2, 4-D added in MS medium. After subcultured for several times, somatic embryogenesis at high frequency (81.0%) was obtained on MS medium supplemented with 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L. Somatic embryos can keep on growing and proliferating on appropriate medium.

Key words: Sweet cherry; Callus; Somatic embryogenesis; Plantlet regeneration

随着人们生活水平的提高, 果品市场对甜樱桃的需求也不断提高, 其栽培面积不断扩大, 常规育种方法已不能满足现代化农业对甜樱桃品质的要求。随着生物技术的发展, 为果树新品种的选育提供了新的手段^[1~3]。目前, 国内外已有许多关于果树的体细胞胚发生和植株再生方面的研究报道^[4~13]。诱导体细胞胚形成再生植株是果树组织快速繁殖的一个重要、有效的途径, 它以繁殖系数高、周期短、结构完整等优点而被广泛采用。本文研究了甜樱桃体细胞胚的发生及植株再生, 为进一步建立甜樱桃离体再生系统和快繁体系打下基础, 从而为种质改良和遗传转化提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试品种为自然授粉的甜樱桃红灯, 未成熟幼胚子叶。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌外植体的建立 取花后 35 d 生长良好的幼果, 经 75% 的乙醇表面灭菌 2~3 min, 用无菌水冲洗 3 次, 放入 0.1% HgCl_2 溶液中消毒 9 min, 用无菌水冲洗 4~5 次。在无菌条件下, 用解剖刀片将种子切开, 将未成熟幼胚子叶取出接种在 9 种含有不同激素的 MS 培养基上(附加 3.0% 蔗糖, 0.5% 琼脂)上进行培养。每瓶培养基接种幼胚子叶 4 个, 每

收稿日期: 2006-05-20

基金项目: 河北省农林科学院青年基金资助项目(A03-3-04-03)

作者简介: 吴雅琴(1969-), 女, 陕西澄城人, 副研究员, 主要从事果树生物技术与种质创新研究。

处理接种数见表 1。

1.2.2 愈伤组织诱导 用 Y₁: MS+ 6_BA 1.0 mg/L + 2,4_D 0.5 mg/L; Y₂: MS+ 6_BA 1.0 mg/L + 2,4_D 1.0 mg/L; Y₃: MS + 6_BA 1.0 mg/L + 2,4_D 2.0 mg/L; Y₄: MS + 6_BA 1.0 mg/L + 2,4_D 3.0 mg/L; Y₅: MS+ 6_BA 0.5 mg/L + 2,4_D 0.5 mg/L; Y₆: MS+ 6_BA 0.5 mg/L + 2,4_D 1.0 mg/L; Y₇: MS + 6_BA 0.5 mg/L + 2,4_D 2.0 mg/L; Y₈: MS+ 6_BA 0.5 mg/L + 2,4_D 3.0 mg/L; Y₉: MS + 2,4_D 2.0 mg/L 共 9 种含有不同激素的 MS 培养基上诱导愈伤组织。暗培养 24 h 后转入正常培养。培养温度为 25~ 27 ℃, 光照 16 h/d, 光照强度为 2 000 lx, pH5.8。

1.2.3 胚性愈伤组织的诱导及继代培养 将幼胚接种到含不同浓度的 2,4_D 的诱导培养基上, 约 20 d 开始启动。取生长致密、白色透明的愈伤组织块, 将其接种在 Y₃ 培养基(附加 200 mg/L 的水解酪蛋白)上进行继代培养, 每 28 d 周继代 1 次。继代 4~ 5 次后, 出现疏松颗粒状胚性愈伤组织, 选择颗粒较细的愈伤组织进行继代培养, 并加快继代频率, 当愈伤组织变得松散、颗粒均匀且生长迅速时, 改为 28 d 继代 1 次, 以保持愈伤组织的胚性状态。

1.2.4 体细胞胚胎发生 取生长迅速的胚性愈上组织, 2 mm× 2 mm 为一个单位, 进行接种。将其接种在含有不同蔗糖浓度的 Y₃ 培养基上进行培养, 暗培养 24 h 后转入正常培养, 7 d 后观察体细胞胚发生情况。

1.2.5 子叶愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率的计算 愈伤组织诱导率= 诱导出的愈伤外植体的数量/ 接种外植体的数量× 100%; 胚性愈伤组织诱导率= 诱导出的胚性愈伤外植体的数量/ 接种外植体的数量× 100%。

1.2.6 体细胞胚发育及植株再生 将 Y₃ 培养基上诱导出的愈伤组织分别接种在 A₁: MS; A₂: MS+ NAA 0.5 mg/L; A₃: MS + 6_BA 1.0 mg/L; A₄: MS + 6_BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L; A₅: MS+ 6_BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 等 5 种不同的培养基上, 每一培养基接种 30 瓶, 置于温度为 25 ℃ 的黑暗培养箱内培养 5 d 后, 再置于光照条件下进行体细胞胚胎的发生。

1.2.7 再生苗生根培养 待胚萌发苗长到 2 cm 高时, 从基部切下, 转移到生根培养基(1/2 MS+ IAA 0.2 mg/L) 上诱导生根。

2 结果与分析

2.1 6_BA 和 2,4_D 对甜樱桃愈伤组织诱导的影响

剥离的甜樱桃幼胚子叶接种在 MS 愈伤组织诱导培养基 15~ 20 d 后可见胚开始膨大, 30 d 左右有明显的愈伤组织形成。接种 40 d 后统计愈伤组织诱导率(表 1)。9 种培养基中以 Y₄ 培养基诱导率最高, 为 98.2%。观察结果表明, 一定浓度的 6_BA 对幼胚子叶愈伤组织的发生有重要的促进作用。培养 28 d 后, 可见大量质地疏松淡黄色愈伤组织产生(图 1_A), 在经过多次继代培养, 愈伤组织疏松, 且颗粒小, 分散性好。同时会从个别胚上直接诱导出不定芽(图 1_B)。

表 1 6_BA 和 2,4_D 对甜樱桃愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effects of 6_BA and 2,4_D on the callus induction of sweet cherry					
代号 Code	6_BA (mg/L)	2,4- D (mg/L)	接种胚数 (个) No. of embryos	诱导愈伤组织 (个) No. calli of induction	诱导率 (%) Induction frequency
Y ₁	1.0	0.5	40	16	40.0
Y ₂	1.0	1.0	56	34	60.7
Y ₃	1.0	2.0	70	62	88.6
Y ₄	1.0	3.0	42	40	98.2
Y ₅	0.5	0.5	42	12	28.6
Y ₆	0.5	1.0	46	18	39.1
Y ₇	0.5	2.0	29	19	65.5
Y ₈	0.5	3.0	32	14	43.8
Y ₉	0	2.0	41	20	48.8

2.2 体细胞胚胎发生

2.2.1 甜樱桃幼胚子叶体细胞胚胎发生的部位及途径 通过冷冻切片观察发现, 除了幼胚子叶外植体伤口处体细胞胚胎可直接发生外, 体细胞胚胎也可以通过愈伤组织这一间接途径发生, 在这种发生过程中, 体细胞胚胎可通过愈伤组织表面和愈伤组织内部等部位同时发生。

2.2.2 培养基成分与胚性愈伤组织的诱导 幼胚接种到诱导培养基后约 20 d 开始启动, 长出透明的愈伤组织, 30 d 左右, 有些愈伤组织发生褐变。经继代后, 褐变消失, 并转变为白色、快速增殖的胚性愈伤组织, 再经 30 d 左右即可长满整个培养瓶。培养基中外源激素的对比对胚性愈伤组织的诱导及生长有很大的影响, 特别是 2,4_D 的浓度起着至关重要的作用。虽然在各种 2,4_D 浓度的培养基上都能诱导出胚性愈伤组织(图 1- C), 但诱导率存在很大差异: 当 2,4_D 浓度为 0.5 mg/L 时, 诱导率低, 愈伤组

织长势较慢; 当 2, 4 D 浓度为 3.0 mg/L 时, 诱导率较低, 但愈伤组织生长较快; 当 2, 4 D 浓度为 1.0~2.0 mg/L 时, 胚性愈伤组织诱导频率较高(表 2)。

表 2 2,4 D 浓度对诱导频率的影响

Tab.2 Induction effect of 2,4 D concentration			
2,4 D 浓度 (mg/L) Concentration of 2,4_D	接种数 (个) No. of explants	胚性愈伤 组织数(个) No. of embryogenic callus	诱导率 (%) Induction frequency
0.5	82	30	36.6
1.0	72	35	48.6
2.0	82	44	53.7
3.0	70	15	21.4

注: MS 基本培养基 Note: MS basal medium

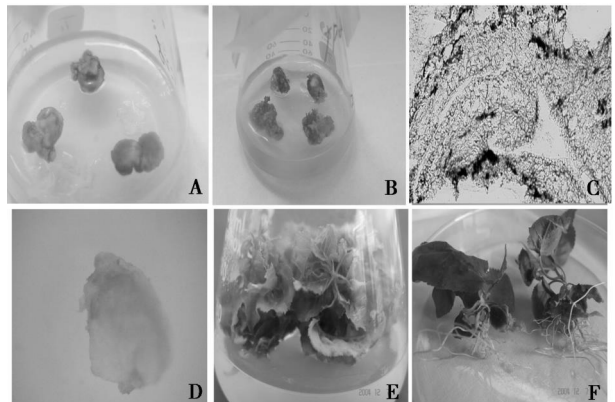
2.2.3 蔗糖对甜樱桃幼胚子叶体细胞胚的诱导
甜樱桃幼胚子叶得胚性愈伤组织在含不同蔗糖浓度的 MS 培养基上培养 7 d 后, 在 1% 和 10% 蔗糖培养基上没有诱导出体细胞胚, 在含 2%, 4%, 6% 和 8% 蔗糖的培养基上均诱导出体细胞胚(图 1- D)。14 d 后, 10% 蔗糖培养基上的细胞已停止生长, 30 d 后在含 2% 和 4% 的培养基上出现大量的体细胞胚, 当浓度为 4% 时, 体细胞胚胎发生率最高, 达到 84.0%。表 3 研究表明, 诱导甜樱桃子叶形成体细胞胚的最佳蔗糖浓度为 4%, 当蔗糖浓度升高时, 体胚发生率会出现明显的降低(表 3)。

表 3 不同蔗糖浓度对甜樱桃体细胞胚诱导的影响

Tab.3 Effects of sucrose concentration on the somatic embryos induction of sweet cherry			
蔗糖浓度 (%) Sucrose concentration	接种愈伤 组织数 No. of explants	体细胞胚胎 诱导率(%) Induction frequency	胚数/愈伤 组织数 Embryos/ Callus
1	23	0	0
2	36	55.5	2.8
4	25	84.0	7.2
6	19	42.1	2.6
8	25	36.0	2.7
10	20	0	0

2.3 胚状体萌发及植株再生

将发育成熟的胚状体转移到含不同激素配比的 MS 培养基上, 观察胚状体的萌发情况(表 4)。可以看出, 在 A₁ 培养基上, 胚状体很少愈伤组织化, 仅为 7.5%, 成苗率为 12.5%, 繁殖系数低且生长缓慢; 在 A₂, A₃, A₄ 和 A₅ 培养基上的体细胞胚, 因培养基中附加有激素而发育较快, 25 d 开始成苗; A₂ 和 A₃ 上的胚状体愈伤化程度分别为 19.6% 和 10.0%; A₄, A₅ 培养基不但能使胚状体萌发, 而且随着时间的延长, 从芽的基部长出大量丛生芽(图 1- E), 培养 30 d 后, 每芽可得 5~10 株无根苗, 繁殖系数和成苗率都高于其他 3 种培养基。从 5 种培养基的培养效果来看, A₄, A₅ 都可使胚状体萌发, 但 A₄ 的成苗率要高。正常的健壮苗在 MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.2 mg/L 培养基上进行继代培养, 待苗长到 2 cm 高时, 从基部切下, 转移到生根培养基 (1/2 MS+ IAA 0.2 mg/L) 上诱导生根, 30 d 后获得完整植株(图 1- F)。



A. 愈伤组织的形成; B. 分化芽的产生; C. 子叶状胚胎 (400×); D. 诱导的体细胞胚 (100×); E. 由分化芽长成的丛生芽; F. 生根的再生植株
A. Development of callus; B. Differentiation of buds; C. Cotyledonary embryos (400×); D. Calli from embryo (100×); E. Clump shootlets from differentiated buds; F. Rooted plantlets

图 1 甜樱桃体细胞胚诱导程序
Fig 1 Somatic embryogenesis of sweet cherry and plantlet regeneration

表 4 不同激素对胚状体萌发的影响

Tab.4 Effects of some phytohormones on somatic embryogenesis						
代号 Code	培养基 (mg/L) Medium	胚状体数 (个) No. of embryogenic	愈伤化胚 Embryogenic callus		成苗率 Plant percent	
			株数 Number	比率(%) Ratio	株数 Number	比率(%) Ratio
A ₁	MS	40	3	7.5	5	12.5
A ₂	MS+ NAA0.5	56	11	19.6	21	37.5
A ₃	MS+ 6-BA1.0	50	5	10.0	11	22.0
A ₄	MS+ 6-BA1.0+ NAA0.1	58	47	81.0	46	79.3
A ₅	MS+ 6-BA1.0+ NAA0.5	52	41	78.8	39	75.0

3 讨论

甜樱桃幼胚子叶愈伤组织体细胞胚胎发生的进程和频率与激素的种类和浓度有关。甜樱桃红灯幼胚子叶胚性愈伤组织诱导培养基为 MS+ 6 BA 1.0 mg/L + 2, 4 D 2.0 mg/L + 4% 蔗糖+ 5% 琼脂; 胚性愈伤组织继代培养基为 MS+ 6 BA 1.0 mg/L + 2, 4 D 2.0 mg/L + 4% 蔗糖+ 5.5% 琼脂, 附加 200 mg/L 的水解酪蛋白, 可提高增殖效果, 加快繁殖速度; 2, 4 D 的浓度对胚性愈伤组织的诱导起很大的作用, 当 2, 4 D 的浓度为 2.0 mg/L 时, 胚性愈伤组织的诱导率较高; 胚状体萌发培养基为 MS+ 6 BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 再生苗继代培养基为 MS+ 6 BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L; 生根培养基为 1/2 MS+ IAA 0.2 mg。

培养小麦、胡萝卜等植物时发现, 适当高浓度的蔗糖可以提高体细胞胚的诱导率, 但高浓度的蔗糖可改变培养基的渗透压, 使细胞失水, 内含物浓度升高, 从而直接影响体细胞胚的成熟^[14~18], 在甜樱桃幼胚子叶上诱导体细胞胚的最佳蔗糖浓度为 4%, 当蔗糖浓度升高时, 体胚发生率会出现明显的降低, 这可能是由于高浓度的蔗糖增加了培养基的渗透压, 影响体细胞胚的发生。

本试验建立的红灯体细胞胚胎发生体系, 不仅繁殖率高, 再生植株移栽成活率也高。而且稳定性好。田间试验结果表明, 再生植株有明显的优势, 在生长势上明显优于同期的胚抢救苗。同时, 由于体细胞胚胎发生体系较为稳定, 可以在分子水平上研究胚胎的发生机理。

参考文献:

- [1] 刘焕芳, 陈学森, 段国成, 等. 甜樱桃与中国樱桃杂种的胚抢救及杂种鉴定[J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 303-308.
- [2] Burger P, Gerber C A, Gerber A, *et al.* Breeding seedless grapes in South Africa by means of embryo rescue[J]. Acta Horticulturae, 2003, 603, 565-569.
- [3] Mancuso M L, Canuso T, Germana M A. Peach breeding programme for early ripening, low chilling requirement cultivars: embryo rescue and somatic embryogenesis[J]. Acta Horticulturae, 2002, 592, 125-129.
- [4] Chen M H, Chen C C, Wang D N, *et al.* Somatic embryo

genesis and plantlet regeneration from immature embryos of *Carica papaya* X *Carica cauliflora* cultured *in vitro* [J]. Can J Bot, 1991, 69: 1913-1918.

- [5] Vieitez F J, San_Jose C, Ballester A, *et al.* Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chesnut [J]. Plant Physiology, 1990, 136: 253-256.
- [6] Yates I E, Rcilly C C. Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of peean [J]. Hort Science, 1990, 25: 573-576.
- [7] Tulecke W, Mcgranahan G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L [J]. Plant Science, 1985, 40: 57-63.
- [8] Wang D, Wergin W P, Zimmerman R H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry [J]. Hort Science, 1984, 19: 71-72.
- [9] Demarch G, Grenier E, Miannay N, *et al.* Potential of somatic embryogenesis in prunus avium immature zygotic embryos [J]. Plant Cell, Organ and Tissue Cult, 1993, 34: 209-215.
- [10] Duart Ph. Improvement of somatic embryogenesis of the cherry dwarf rootstock Immil. Gm9 by the use of different carbon sources [J]. Acta Hort, 1990, 280: 125-127.
- [11] 刘淑兰, 韩碧文, 陈正华. 核桃叶柄体细胞胚胎发生及其细胞学观察 [J]. 北京农业大学学报, 1992, 18: 29-32.
- [12] Faure O. Embryons somatic of *Vitis rupestris* and embryo zygotic of *Vitis* sp: morphologies, histochemiches and development [J]. Can J Bot, 1990, 68: 2305-2315.
- [13] Marino G, Bentazza G, Magnanini E, *et al.* Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1993, (34): 235-244.
- [14] 黄绍兴, 王慧中, 黄美娟. 蔗糖浓度对胡萝卜体细胞胚生长与发育的影响 [J]. 科技通报, 1995, 11(2): 111-115.
- [15] 李俊兰, 张寒霜, 王海波, 等. 陆地棉体细胞胚的白化与植株再生的关系 [J]. 华北农学报, 1997, 12(3): 66-68.
- [16] 董合忠, 焦改丽, 陈志贤. 2, 4 D、KT 对棉花愈伤组织的诱导和体细胞胚胎发生的影响 [J]. 华北农学报, 1993, 8(3): 87-91.
- [17] 孙瑞芬, 李天然, 李, 等. 草莓组培快繁及叶片诱导植株再生的研究 [J]. 华北农学报, 2002, 17(3): 49-53.
- [18] 杜敏霞, 刘湘萍. 洋葱幼蕾离体培养与植株再生的研究 [J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 54-56.