

香榧体细胞胚发生的研究

姜新兵 陈力耕* 何新华

(浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘要: 以香榧胚为外植体进行体细胞胚的诱导, 在 SH+6-BA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 的培养基上愈伤组织诱导率可达到 69.8%; 愈伤组织经过数次继代后转移至 1/2 SH+6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上可诱导体细胞胚的形成, 诱导率可达 70.3%, 体细胞胚在合适的培养基上可继续生长和增殖。这是国内外首次通过组织培养成功获得香榧体细胞胚的报道。

关键词: 香榧; 胚; 愈伤组织; 体细胞胚发生

中图分类号: S 664.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 05-0654-03

Studies on the Somatic Embryogenesis of *Torreya grandis*

Jiang Xinbing, Chen Ligeng*, and He Xinhua

(Department of Horticulture, Zhejiang University, the State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development and Biotechnology, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Calli were induced from embryo of *Torreya grandis*, and the highest induction frequency (69.8%) was obtained on SH basal medium supplemented with 6-BA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L. After subcultured for several times, somatic embryogenesis at high frequency (70.3%) was obtained on 1/2 SH medium supplemented with 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L. Somatic embryos can keep on growing and proliferating on appropriate medium. It is the first reported that somatic embryos were successfully cultured from *T. grandis* in the world.

Key words: *Torreya grandis*; Embryo; Callus; Somatic embryogenesis

1 目的、材料与方法

香榧 (*Torreya grandis* Fort.) 属裸子植物红豆杉科 (Taxaceae) 榧属 (*Torreya*), 为我国特产干果, 主要分布于浙江、安徽、福建、四川、湖北等地。香榧为雌雄异株, 自然条件下种子萌发缓慢, 繁殖周期长, 现有的繁殖方式如实生播种、嫁接、扦插法, 成苗比较困难, 成活率低, 难以满足生产上的要求。由于榧属植物组织培养相当困难, 至今国内外尚未有香榧组织培养方面的报道。香榧与红豆杉同科, 国内外对红豆杉体细胞胚的研究已经有少量的报道^[1,2], 通过组培也可能获得香榧的体细胞胚。为此, 我们进行了本试验, 为进一步建立香榧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和技术支撑。

供试材料香榧种子采自浙江大学园艺系果园和浙江省诸暨市。去掉假种皮和外种皮, 经过流水冲洗后, 用 75%乙醇表面灭菌 2~3 min, 用无菌水冲洗 3 次, 0.1% HgCl₂ 灭菌 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 在超净工作台上剥离种胚, 接种于诱导培养基, 每瓶培养基接种胚 3 个, 每处理接种胚数见表 1, 重复 3 次。愈伤诱导和继代的基本培养基为 SH^[3], 体细胞胚诱导和生长基本培养基为 1/2 SH, 均添加琼脂 7.5 g/L, 蔗糖 20 g/L, pH 5.8。培养室温度为 (25 ± 1) °C, 光照 16 h/d, 光照强度 2000 lx。

收稿日期: 2004-01-06; 修回日期: 2004-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070634); 高等学校博士点基金项目 (20030335118)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lgchen@zju.edu.cn)

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

剥离的胚接种在 SH 愈伤组织诱导培养基 15~20 d 后可见胚开始膨大, 30 d 左右可见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)。从愈伤组织的诱导效果上看, 在本试验生长调节剂浓度范围内, 以 6-BA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 的诱导率最高, 为 69.8%, 当 2,4-D 为 0.5 mg/L 时, 诱导率随 6-BA 浓度的升高而下降, 同时会从个别胚上直接诱导出不定芽, 这虽不利于愈伤组织的形成, 但对于快繁来说是值得利用的途径, 其诱导率有待于进一步研究。

愈伤组织刚形成时生长非常缓慢, 经过多次继代后可保持较快的速度生长。生长旺盛的愈伤组织呈疏松状, 颜色为黄色(图版, 1)。在愈伤组织的继代生长过程中也发现愈伤组织的表面形成一些绿色的器官原基结构, 但最终并未形成芽或者根。

初期诱导的愈伤组织在继代过程中极易发生褐变而死亡。为降低褐变的程度, 在继代的培养基中添加 1% 的活性炭, 对降低褐变和促进愈伤组织的生长都有良好的作用。

2.2 体细胞胚的形成

愈伤组织在逐渐降低生长调节剂水平的培养基上经过多次继代后, 转接至含有不同浓度 6-BA 和 NAA 的 1/2 SH 培养基上进行体细胞胚的诱导。20 d 后在含不同水平的 6-BA 和 NAA 的培养基上均能产生体细胞胚, (图版, 2~4), 随着培养时间的延长, 产生体细胞胚的愈伤组织数以及体细胞胚的数目也继续增加, 40 d 后基本稳定, 此时对愈伤组织产生体细胞胚的诱导率进行统计, 结果见表 2。

由表 2 可见, 当不添加 6-BA 时, 体胚诱导率随 NAA 的升高而下降, 其诱导率分别为 19.6%、3.6% 和 1.1%; 在只含有 6-BA 0.1 mg/L 的培养基上体细胞胚的诱导率有明显的上升, 但是愈伤组织生长缓慢, 褐化程度也比较高; 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的培养基上虽然分化率最高, 但体细胞胚的长势缓慢, 畸形体细胞胚的数目增多; 当 6-BA 增加至 1.0 mg/L 时诱导率明显的下降, 在仅含有 6-BA 1.0 mg/L 的培养基上无体胚形成; 6-BA 与 NAA 为 11 时诱导效果最好, 在添加 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 或 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的培养基上, 体细胞胚分化率分别为 70.3% 和 70.8%, 但前者长势最佳, 是体细胞胚诱导的最佳培养基。这说明体细胞胚的形成在低浓度的 6-BA 和 NAA 协同作用下效果较好。

2.3 体细胞胚的生长和增殖

体细胞胚在合适的培养基上能够继续生长和快速增殖。由愈伤组织诱导的体细胞胚呈淡黄色或白

表 1 6-BA 和 2,4-D 对香榧胚愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 6-BA, 2,4-D on the callus induction of *Torreya grandis*

6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	接种胚数 No. of embryos	诱导愈伤组织数 No. calli of induction	诱导率 Induction frequency (%)
0.1	0.5	63	44	69.8
0.1	1.0	57	34	59.6
0.5	0.5	51	25	49.0
0.5	1.0	69	44	63.8
1.0	0.5	71	21	29.6
1.0	1.0	60	24	40.0

注: SH 基本培养基。Note: SH basal medium.

表 2 6-BA 和 NAA 对香榧体细胞胚诱导的影响

Table 2 Effects of 6-BA, NAA on the somatic embryogenesis of *Torreya grandis*

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	愈伤组织数 No. of calli	体细胞胚诱导率 Induction frequency of somatic embryos (%)
0	0	46	19.6
0	0.1	56	3.6
0	0.5	70	1.1
0.1	0	56	50.0
0.1	0.1	64	70.3
0.1	0.5	63	28.6
0.5	0	76	55.3
0.5	0.1	66	74.2
0.5	0.5	48	70.8
1.0	0	57	0
1.0	0.1	51	5.7
1.0	0.5	64	34.3

注: 1/2 SH 基本培养基。Note: 1/2 SH basal medium.

色棒状, 在不含生长调节剂的 1/2 SH 和含 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 或 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的 1/2 SH 培养基上均能继续生长, 其中以 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 且黑暗培养的增殖率最高, 增殖倍数达 3.0 (表 3), 且体细胞胚的生长势最好。

形成完整植株的试验仍在进行中。

表 3 6-BA 和 NAA 浓度对体细胞胚继代增殖的影响

Table 3 Effects of 6-BA, NAA of somatic embryos on subculture proliferation

基本培养基 Basal medium	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	增殖倍数 Proliferation times
1/2 SH	0.1	0.1	2.95
1/2 SH	0.5	0.1	2.11
1/2 SH	0.5	0.5	3.00

参考文献:

- 1 Salandy A, Grafton L, Uddin M R, et al. Establishing an embryogenic cell suspension culture system in florida yew (*Taxus floridana*). *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1993, 29: 75
- 2 邱德有, 李如玉, 李 铃. 红豆杉及南方红豆杉体细胞胚发生的研究. *林业科学*, 1998, 34 (6): 50~54
- 3 Schenk T, Schenk R U, Hildebrandt A C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 1972, 50: 199~204



图版说明: 1. 胚的愈伤组织; 2. 诱导的体细胞胚; 3. 带胚根的体细胞胚 (胚根); 4. 子叶期体细胞胚 (子叶)。

Explanation of plates: 1. Calli from embryo of *Torreya grandis*; 2. Somatic embryos from calli; 3. Somatic embryos with radicles (radicle); 4. Cotyledonary embryos (cotyledon).

出版信息

《梅国际登录双年报》

《梅国际登录双年报》(2001~2002) 已由中国林业出版社出版, 中、英文对照, 全世界发行。本次双年报刊登 142 个梅花和果梅品种, 国内售价每本 18 元, 函款均寄北京林业大学 123 信箱, 邮编: 100083, 梅品种国际登录中心办公室陈瑞丹收。

梅品种国际登录中心