

文章编号:1007-4961(2008)02-0113-05

饲料型四倍体刺槐幼胚离体培养挽救技术研究

贺佳玉,李 云,姜金仲,郝 晨,曹春伟

(北京林业大学 生物科学与技术学院 林木花卉遗传育种教育部重点实验室,北京 100083)

摘要:遗传变异丰富、具有重要遗传育种价值的饲料型四倍体刺槐幼胚自然败育率很高,研究其离体培养挽救技术具有重要的遗传育种学意义。以处于不同发育时期的饲料型四倍体刺槐幼胚为材料,进行了其离体培养促萌试验,试验结果表明:胚珠的适宜离体培养时期为花后 30 d,萌动率 47.7%;胚珠的适宜萌动培养基为 Nitsch + 6 - BA 0.5 mg/L + IBA 2 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L;筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基上得到的愈伤组织诱导率为 38.6%,并初步诱导出了不定芽;愈伤组织切片表明,饲料型四倍体刺槐幼胚愈伤组织的增殖生长以内起源为主。

关键词:饲料型四倍体刺槐;幼胚促萌;胚败育;组织培养

中图分类号:S 791.27

文献标识码:A

Saving young embryo of tetraploid *Robinia pseudoacacia* for fodder by embryo culture *in vitro*

HE Jia-yu, LI Yun, JIANG Jin-Zhong, HAO Chen, CAO Chun-wei

(Key Laboratory for Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants,
Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The abortion rate of young embryo, which originates from varied genetic material and plays an important role in black locust breeding, of tetraploid *Robinia pseudoacacia* is high. It is necessary to work out how to improve germination of these abortional young embryos by culture *in vitro* for black locust breeding. Therefore the test to save abortional young embryos which were in different development stages, of tetraploid *Robinia pseudoacacia* by culture *in vitro* was conducted. The results indicated that (1) The suitable stage for ovule culture was 30 days after being pollinated and the embryos' culture - response - rate was 47.7%; (2) The suitable development substrates for ovule culture *in vitro* was Nitsch + 6 - BA 0.5mg/L + IBA 2 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L; (3) On the efficient substrates for inducing callus from young embryo, the callus - inducing rate was 38.6% and some adventitious buds were induced; (4) The callus anatomy showed that the proliferation growth of young embryo callus of tetraploid *Robinia pseudoacacia* mainly originated from inner of callus.

Key words: tetraploid *Robinia pseudoacacia* for fodder; young embryo saving; embryo abortion; tissue culture

饲料型四倍体(4n)刺槐是由人工诱导二倍体(2n)刺槐(*Robinia pseudoacacia*)体细胞加倍而育成的植物同源四倍体。李云^[1]、郝晨^[2]、张国君^[3]、王秀芳^[4]及张颖^[5]分别对其微体快繁技术、大小孢子发育时期与花器形态的相关性、叶片营养含量及生长动态、不同栽培地区生物量及不同立地条件下的造林技术进行了研究,从而肯定了其作为饲料树种

的栽培价值。但是,从植物同源四倍体的角度看,它不仅具有栽培价值,而且具有饲料型刺槐遗传改良变异材料价值。

由于饲料型四倍体刺槐有4套同源染色体组,减数分裂中期时同源染色体不能稳定有序地分离,其实生后代常会出现丰富的表现型变异^[6-7];虽然这些变异大多对饲料型四倍体刺槐本身可能是不利

收稿日期:2008-03-01;修改稿收期:2008-03-20

基金项目:北京林业大学研究生自选课题基金项目“饲料型四倍体刺槐幼胚败育机理及其挽救技术研究”(06jj061);国家自然科学基金项目“刺槐同源四倍体花序复化的分子遗传机理研究”(30640036)。

作者简介:贺佳玉(1982-),女,黑龙江人,在读硕士生,主要从事四倍体刺槐有性胚挽救及变异的研究。

通讯作者:李 云(1963-),男,教授,河北蔚县人,研究方向是植物生物技术、树木良种繁育、基因工程。

的,但却是很有价值的刺槐遗传改良原始材料。我们过去的研究结果证明,这些具有遗传改良价值的幼胚大多在发育为成熟种子之前就已败育,或即便是发育为成熟种子,也大多在常规情况下不能萌发。所以如果能够成功提高幼胚萌发率和成苗率,则可大幅度地丰富饲料型刺槐遗传改良原始材料,为遗传改良奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

试验材料采自北京林业大学饲料型四倍体刺槐试验林基地6 a生纯林。分别于2006年6月27号、7月27号和8月16号将幼嫩荚果采回。试验基地位于北京北部远郊区,暖温带亚湿润气候区。

1.2 研究方法

1.2.1 外植体无菌培养体系的建立 将花后10 d、30 d、50 d采集到的荚果,暂保存于4℃冰箱。接种前将荚果流水洗净,按表2灭菌方案灭菌,无菌水冲洗3次,然后用剪刀顺荚果纵轴剪开,用镊子剥出胚珠,接种于初代培养基上(MS+蔗糖30 g/L+琼脂5 g/L+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L,pH 5.8)进行培养,光照强度约500~1000 Lx,光照时间10 h/d,温度为24℃~28℃(光照强度和培养温度以下相同);每种灭菌方式接种30个胚珠、重复3次,比较灭菌效果;接种培养5 d后,统计污染率和诱导率,结果用SPSS软件进行分析。

污染率 = (污染数 ÷ 接种总数) × 100% ;

存活率 = (接种总数 - 污染数 - 死亡数) ÷ 接种总数 × 100%。

1.2.2 幼胚挽救最佳时期选择 分别在花后10 d、30 d、50 d采集荚果,首先按预试验筛选的最佳灭菌方式灭菌,剥出胚珠,将其接种于4类胚珠萌动培养基上(见表1),培养基添加6%蔗糖,0.6%琼脂,pH 5.8,每类培养基接种9皿,10粒/皿。20 d后统计胚珠萌动情况。

表1 胚珠萌动培养基配方

Table 1 Medium for ovules's culture

培养基编号 Medium No.	培养基及附加物 Medium and the concentration
1	ER+6-BA 0.5 mg/L+IBA 2 mg/L+GA ₃ 0.5mg/L
2	Nitsch+6-BA 0.5mg/L+IBA 2 mg/L+GA ₃ 0.5mg/L
3	MS+6-BA 0.5 mg/L+GA ₃ 0.1 mg/L
4	MS+2,4-D 4.0 mg/L+6-BA 0.25 mg/L

1.2.3 幼胚愈伤组织的诱导 将萌动的幼胚转接

入诱导愈伤组织培养基上,培养基以MS+蔗糖30 g/L+琼脂5 g/L+CH 300 mg/L为基本培养基,附加不同种类和浓度的生长调节剂(2,4-D浓度为1.0 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L,6-BA浓度为0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L,NAA浓度为0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L)。按L₉(3)⁴正交表安排试验(见表5),共有9个处理,每个处理接种50个幼胚。接种后采用暗培养15 d再光培养。在连续培养20 d后调查愈伤组织诱导率。诱导率 = (出现愈伤组织数 ÷ 接种总数) × 100%

1.2.4 通过愈伤组织诱导分化不定芽 在经上述诱导产生的生长旺盛且较致密的愈伤组织中,选取不同颜色、质地的愈伤组织,将其切成直径约2.0 cm的小块,接种于分化培养基(配方见表7)上,进行不定芽分化,每种分化培养基上接种50个外植体,不定期调查比较愈伤组织分化的效果。

分化率 = (分化出芽的愈伤组织块数 ÷ 接种总数) × 100%。

2 结果分析

2.1 豆荚表面灭菌

70%乙醇和0.1%升汞对胚珠污染率和活率的影响见表2。

表2 70%乙醇和0.1%升汞对胚珠污染率和存活率的影响
Table 2 Effect of 70% ethanol and 0.1% HgCl₂ on ovule pollution rate and survival rate

处理 Treat ments	70%乙醇 /s 70% ethanol	0.1%升汞 /min 0.1% HgCl ₂	平均污染率 /% Average pollution rate	平均存活率 /% Average survival rate
1	30	0	8.3a	80.7a
2	30	5	4.7b	75.6ab
3	30	10	3.1bc	56.1c
4	60	0	9.4a	82.1a
5	60	5	5.9b	71.7b
6	60	10	2.2c	63.7bc

注:小写字母表示0.05水平差异显著。下同。

由表2可知,豆荚经70%乙醇与0.1%升汞组合灭菌后,胚珠污染率较低,但不同灭菌处理组合的胚珠生存率和污染率有所差异;方差分析(数据转换后)结果表明,处理间差异达到了极显著水平;其中以4号处理灭菌效果较好,虽污染率较高,但存活率最高,6号处理虽然污染率较低,但存活率也较低,说明升汞对胚珠生存有一定危害作用;因此综合考虑污染率和存活率以及升汞对环境的污染效应,4

号处理应是最佳灭菌方案。

2.2 不同取材时期及不同培养基组合与胚珠的萌动率

将胚珠接种到萌动培养基上(图版1),培养20 d后调查胚珠萌动情况,结果见表3。



图版1:接种一周的胚珠;图版2:幼胚从胚珠长出;图版3:幼胚形成的较致密绿色愈伤组织;图版4:结构致密的分生细胞团400x;图版5:示结构疏松的薄壁细胞400x;图版6:愈伤组织分化出芽

Plate 1: Embryo after inoculation; Plate 2: Young embryo grow out of ovule; Plate 3: Thicker and green callus induced from young embryo; Plate 4: Meristematic cell group with compact structure 400x; Plate 5: Parenchyma cells with curmbly structure 400x; Plate 6: Bud differentiated from callus

表3 取材时期对胚珠离体培养的影响

Table 3 Effect of sampling dates on *in vitro* ovules cultured

胚龄/d Sampling dates	保持绿色/% Keep green	膨胀启动/% Start - inflation	萌动率/% Rate of ovules' s culture response
10	0	0	0
30	37	16.3	47.7
50	17.8	5.5	29.3

由表3知,最佳的胚珠挽救时期为花后30 d,胚珠萌动率(表型特征有明显改变、且有明显萌发趋势的胚珠与接种胚珠总数的比值)达到47.7%,且此时期胚珠不易出现褐化、膨胀较为明显、相对其他时期启动早,约接种6~10 d左右即开始出现膨胀,胚珠呈深绿色;10 d时采集的材料极易褐化,接种后4 d即大部分开始褐化,10 d后几乎全部褐化死亡,可能由于此时期幼胚幼嫩且微小,灭菌及剥离操作等可能对其造成机械破坏或损伤,导致严重褐化;50 d采集的材料虽褐化情况稍轻,一直处于绿色饱满状态,但大部分很难膨胀启动,可能此时期胚珠生理发育接近成熟,未发生败育的幼胚不需要萌动期即可直接在成苗培养基上萌发成苗。

不同萌动培养基的胚珠萌动率见表4。由表4可知,培养基类型的优劣顺序为 Nitsch, ER, MS, 最

佳的幼胚珠萌动培养基为2号,其萌动率为32.8%,在培养5 d时即有启动发生;其次是4号培养基,萌动率为26.3%,部分胚珠在接种7 d后有幼胚从中长出(图版2)。

表4 不同培养基对胚珠离体培养的影响

Table 4 Effect of different medium on *in vitro* ovules cultured

培养基编号 Medium No.	萌动率/% Response rate			平均值/% Average rate
	10 d	30 d	50 d	
1	0	37.5	28.6	22.0
2	0	63.6	35.0	32.8
3	0	50.0	14.3	21.4
4	0	39.7	39.1	26.3

2.3 植物生长调节剂对幼胚愈伤组织诱导的影响

培养20 d后,幼胚形成结构多数较致密的绿色海绵状愈伤组织(图版3),只有少数幼胚形成结构疏松的白色海绵状愈伤组织,统计结果见表5。

由表5可以看出,随2,4-D浓度的增加,愈伤组织诱导率有明显提高,当2,4-D浓度为3.0 mg/L时,愈伤组织诱导率最高达38.6%。方差分析结果表明,3种外源激素不同水平之间的诱导效果差异均达到了显著水平,说明3种外源激素对幼胚愈伤组织诱导均具有明显的促进作用。同一外源激素不

表5 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effect of different combination of plant growth regulators on the callus induction

处理 Treatments	2,4-D/ (mg·L ⁻¹)	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	平均诱 导率/% Average inducingrate	差异显 著性 Significant level
8	3.0a	0.5a	0.2c	38.6	a
5	2.0b	0.5a	1.0a	37.5	a
9	3.0a	1.0b	0.5b	37.1	a
2	1.0c	0.5a	0.5b	32.1	ab
7	3.0a	0.2c	1.0a	31.1	ab
4	2.0b	0.2c	0.5b	22.2	bc
3	1.0c	1.0b	1.0a	20.1	c
6	2.0b	1.0b	0.2c	13.8	cd
1	1.0c	0.2c	0.2c	10.9	d

同浓度间的多重比较结果证明,2,4-D以3.0 mg/L的浓度较好,6-BA以0.5 mg/L的浓度较好,NAA各浓度之间差异较为接近。不同处理之间的多重比较结果(见表5)表明,8号、5号、9号处理组合的诱导效果明显优于其他处理组合。综合分析得出最佳组合为:2,4-D 3.0 mg/L,6-BA 0.5 mg/L,NAA 0.2 mg/L。

2.4 愈伤组织生长情况

根据预备试验及相关研究,利用愈伤组织褐化率、结构、颜色及其生长速度4个指标,采取5级制对愈伤组织质量进行评价,以每个重复为一个观测单位(见表6)。

由表6可知,2,4-D浓度对诱导愈伤组织的影响较为明显,它与愈伤组织的生长速度成正相关。在不同光照条件下,浓度较低时,愈伤组织多表现为

表6 不同2,4-D浓度与培养方式对愈伤组织质量的影响

Table 6 Effect of different concentration of 2,4-D and culture way on the callus quality

2,4-D 浓度 (mg·L ⁻¹) Concentration	不同培养方式下愈伤组织状态(颜色、结构、生长速度) Quality of the callus (Color, Structure, Growth) in different culture ways		
	暗培养 Cultivate in dark	光培养 Cultivate in light	先暗培养 10 d 再光培养 Dark for 10 d then light
1.0	浅黄色,致密,慢	绿色,致密,慢	浅绿色,致密,较慢
2.0	浅黄色,松软,较慢	绿色,致密,较快	绿色,较疏松,较快
3.0	白色疏松,较慢	浅绿色,较疏松,较快	绿色,疏松,较快
4.0	白色疏松,较快	绿白色,较疏松,快	绿白色,疏松,快

比较致密,颜色为浅黄或绿色;浓度较高时,愈伤组织多为疏松,无规则海绵状,颜色较浅。不同光照对诱导愈伤组织的影响较为明显,在相同2,4-D浓度条件下,当暗培养时,愈伤组织的生长速度较慢,密度较疏松,颜色较浅;在全光下培养,生长速度则较快,密度较疏松,绿色较深。由于致密的愈伤组织更利于进一步的分化培养,因此,较低浓度的2,4-D和光下培养是较好的幼胚培养条件。

2.5 通过愈伤组织诱导分化不定芽

不同培养基对愈伤组织分化的影响见表7。由表7可知,不定期调查分化结果,发现在诱导分化15 d后,只有1号和3号培养基组合上出现部分愈伤组织不定芽分化(图版6),但频率较低,分别为16%和4.3%。15 d后大部分培养基上未分化的愈伤组织开始出现褐化死亡,未能进一步分化出不定芽。

表7 不同培养基对愈伤组织分化的影响

Table 7 Effect of different medium on the callus differentiation

培养基编号 Medium No.	培养基及附加物 Medium and the concentration	接种数/块 No. of callus	平均分化率/% Average differentiation rate
1	MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 3.0 mg/L	50+50+50	16%
2	MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L	50+50+50	0.0
3	MS(WPM)+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	50+50+50	4.3%
4	MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+AgNO ₃ 10 mg/L	50+50+50	0.0

2.6 不同愈伤组织的发育组织观察

通过组织细胞学显微观察表明,诱导出的愈伤

组织团可分为两种细胞形态:一种为致密愈伤组织,表面有很多分生细胞,细胞质较浓,核仁大而明显,

细胞规则而紧密排列成分生细胞团,除液泡部分染色较深外,细胞多数为绿色颗粒状,分布于愈伤组织团的内部(图版4),不直接与培养基接触,并形成许多突起,表现出细胞分生能力较强,但分生速度较慢,往往由于表面与内部分裂速度不同,其底部出现空腔。另一种是其结构呈疏松的雪花状或呈水渍状;愈伤组织细胞大,核相对较小,内部几乎为液泡所占据,原生质被一个大液泡挤到细胞边缘,形成液泡化程度高的薄壁组织细胞,在切片中染色较浅(图版5),该类型愈伤组织在继代培养时极易出现褐化现象,有的直接与培养基接触,表现出分生速度较快。

胚性愈伤组织的增殖生长从内层即薄壁细胞内的胚性细胞开始,小细胞团内的胚性细胞具有旺盛的分裂能力,使细胞团不断增大;同时细胞团外部的细胞逐渐停止分裂,成为非胚性细胞,内部胚性细胞保持分裂能力,使突起细胞团继续长大,当长到一定程度时便会与母体分离,形成新的独立的一团胚性愈伤组织,其在生长的同时内部不断有胚性细胞开始新一轮分裂突起,因此整团愈伤组织看上去表面有许多细胞团的突起。从上述过程可以看出,胚性愈伤组织的发生可能是内起源。

3 小结

饲料型四倍体刺槐胚珠的适宜离体培养时期为授粉后30 d,萌动率最高为47.7%;从幼胚愈伤组织分诱导分化,分化率不高,初步从愈伤组织诱导出了不定芽。说明其组培特性已经发生较大变化,如其愈伤组织分化培养基的附加物种类和浓度就与李云^[8]、王树芝^[9]、沈峻岭^[10]等所报道的情况有所差

异,这从一个方面说明饲料型四倍体刺槐实生后代较之亲本发生了很大的变异。饲料型四倍体刺槐幼胚和亲本遗传基础的差异以及幼胚自身遗传基础的不完整性——幼胚的起源,可能直接影响了离体培养挽救的难度和复杂性,本研究在一定程度上提高了幼胚的萌动率,但为了最大限度地获取饲料型四倍体刺槐有性繁殖所创造的变异材料,今后还需要调整思路,作更深一步的研究和探索。

参考文献:

- [1] 李云,田砚亭,钱永强,等.NAA和IBA对四倍体刺槐试管苗生根影响及不定根发育过程解剖观察[J].林业科学,2004,40(5):75-79.
- [2] 郝晨,李云,姜金仲,等.四倍体刺槐大小孢子发育时期与花器形态的相关性[J].核农学报,2006,20(4):292-295.
- [3] 张国君,李云,姜金仲,等.饲料型四倍体刺槐叶粉营养价值的比较研究[J].草业科学,2007,24(1):26-30.
- [4] 王秀芳,李悦.区域化试验中饲料型四倍体刺槐生物量比较[J].林业科技,2003,28(2):1-3.
- [5] 张颖.提高四倍体刺槐荒山造林成活率的试验[J].防护林科技,2003,58(1):18-19.
- [6] 姜金仲,李云,程金新.植物同源四倍体刺槐生殖特性及DNA遗传结构的变异[J].遗传,2006,28(9):1185-1190.
- [7] 程治军,秦瑞珍,张欣,等.多倍体化引起植物表型突变的分子机理研究[J].作物学报,2005,31(7):940-943.
- [8] 李云,王树芝,田砚亭,等.NAA和IBA对四倍体刺槐试管苗生根影响及不定根发育过程解剖观察[J].林业科学,2004,40(3):75-79.
- [9] 王树芝,田砚亭,李云.四倍体刺槐无性系组织培养技术的研究[J].核农学报,2002,16(1):40-44.
- [10] 沈峻岭,赵芳,李云,等.速生型刺槐遗传转化体系的建立[J].核农学报,2006,22(6):35-38.

(编辑 刘彦琴)