

珙桐体细胞胚胎发生技术研究

令狐高曼¹, 季晓莲², 段榕怡¹, 刘睿¹, 戴钊¹, 董嘉明¹, 徐金颢¹, 康永祥^{1*}

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 杨凌职业技术学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 研究探讨基本培养基类型对珙桐愈伤组织诱导的影响、植物生长调节剂对胚性愈伤组织诱导及体胚发育的影响, 初步建立以未成熟合子胚为外植体, 通过体细胞胚胎发生途径再生珙桐植株的培养方案。结果表明, 在含有 3% 蔗糖、0.3% 凝胶、800 mg/L 水解酪蛋白、400 mg/L L-谷氨酰胺的 MS、1/2MS 和 WPM 基本培养基上均可诱导出愈伤组织, 以 MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA 诱导率最高, 可达 94.0%; 胚性愈伤组织在 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 的培养基上诱导效果较好; 在 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 培养基上, 体胚诱导率可达 22.9%; 成熟体胚在 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L IBA 的萌发培养基上能正常萌发, 其后在添加 1 g/L 活性炭的萌发培养基上转化成完整小植株。组织细胞学观察表明, 珙桐体胚起源于胚性愈伤组织, 经历了球形期、心形期、鱼雷期和子叶期发育阶段, 这与自然条件下的合子胚形成过程相似。

关键词: 珙桐; 胚性愈伤组织; 体细胞胚; 植株再生; 组织细胞学

中图分类号: S792.99

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2024)02-0070-09

Somatic Embryogenesis in *Davidia involucrata*

LINGHU Gao-man¹, JI Xiao-lian², DUAN Rong-yi¹, LIU Rui¹, DAI Zhao¹, DONG Jia-ming¹,
XU Jin-hao¹, KANG Yong-xiang^{1*}

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China;

2. Yangling Vocational and Technical College, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The effects of basic medium types on the callus induction of *Davidia involucrata* and plant growth regulators on embryogenic callus induction and somatic embryo development were studied. A culture scheme for the regeneration of *D. involucrata* plants by somatic embryogenesis with immature zygotic embryos as explants was preliminarily established. The results showed that callus could be induced on MS, 1/2MS and WPM basic media containing 3% sucrose, 0.3% gel, 800 mg/L hydrolyzed casein, 400 mg/L L-glutamine, and MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA had the highest induction rate of 94.0%. The embryogenic callus was induced on MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA medium. On MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA medium, the induction rate of somatic embryos reached 22.9%. Mature somatic embryos could germinate normally on the germination medium of 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L IBA, and then transformed into complete plantlets on the germination medium supplemented with 1 g/L activated carbon. Histocytological observation showed that the somatic embryos originated from embryogenic callus and underwent the development stages of globular-, heart-, torpedo- and cotyledonary-stage, which was similar to the formation process of zygotic embryos under natural conditions.

Key words: *Davidia involucrata*; embryogenic callus; somatic embryos; plantlet regeneration; histocytology

收稿日期: 2023-01-29 修回日期: 2023-03-02

基金项目: 秦岭珍稀植物红豆杉、珙桐高效繁育技术与示范(SXLK2021-01-03)。

第一作者: 令狐高曼。研究方向: 森林培育学。E-mail: 879066569@qq.com

* 通信作者: 康永祥, 博士, 教授。研究方向: 森林培育学。E-mail: yxkang@nwsuaf.edu.cn

珙桐(*Davidia involucrata*)为珙桐科珙桐属落叶乔木,俗称鸽子树,原产于中国,是第三纪古热带植物区系的孑遗种,距今已有一千多万年历史。其系统发育古老,被誉为“活化石”,是我国一级重点保护野生植物^[1]。其树形优美、花型奇特、花苞片洁白,是驰名世界的珍贵观赏树种。珙桐通常采用种子繁殖,由于果皮极厚且果壳木质化严重,一般需2~3 a才能萌发,加之种子败育现象严重,结实率低严重制约其野外种群的扩大和园林应用。国内外学者在解除珙桐种子休眠方面已有相关报道^[2-4],但繁殖效率仍然很低。像扦插繁育和器官发生再生植株这样的方法在珙桐无性繁殖中仍然很困难^[5-7]。因此,开发高效的珙桐繁殖技术是十分必要的。体细胞胚胎发生是指未经配子融合从体细胞产生类似合子胚结构的过程。具有繁殖系数高、周期短等优点。利用体细胞胚胎发生技术快速繁殖植物种,国内外已有不少报道,在许多珍稀濒危木本植物中已取得成功^[8-11]。然而珙桐的体细胞胚胎发生技术研究尚属空白。本研究旨在以珙桐未成熟合子胚为材料诱导体胚发生,研究胚性组织起始、胚性组织保持与增殖、体胚发育、体胚植株转化的关键影响因子。为珙桐体胚发生离体再生植株体系的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2022年7月6日—7月13日于陕西省安康市岚皋县城关镇平溪河巴山珍稀植物繁育基地(108°E, 32°N, 海拔1400 m)林龄30 a左右的人工林中随机选择10株自由授粉优良单株,采集幼果,带回实验室储存于4℃冰箱中保存备用。将果实自来水冲洗20 min,再用75%(v/v)乙醇浸泡消毒10 min,于超净工作台用修枝剪去除果实的外果皮和肉质中果皮,沿内果皮上的沟纹剪开果核,取出带有胚乳未成熟合子胚,置于消毒瓶中。10%(v/v)次氯酸钠浸泡消毒2.5 min,无菌水冲洗4~5次。无菌条件下用解剖刀剥去胚乳,取出未成熟合子胚,水平接种于含培养基的培养皿中。

1.2 培养条件

除基本培养基筛选试验外,所有试验使用添加3%(w/v)蔗糖(CAS: 57-50-1)、0.3%植物凝胶(CAS: 71010-52-1)的MS培养基。除体胚萌发培养基外,所有培养基均添加800 mg/L水解酪蛋白(CAS: 65072-00-6)和400 mg/L L-谷氨酰胺(CAS: 56-85-9),pH调至5.8,121℃高压灭菌20 min。L-谷氨酰胺采用过滤灭菌。每个培养皿(直径

90 mm)倒入约20 mL的培养基,每个培养瓶(高90 mm,直径70 mm)倒入培养基30 mL用于体胚萌发。培养室温度(25±2)℃,胚性愈伤组织诱导、保持和体胚发育采用暗培养,体胚萌发和植株生长采用光培养,以冷白色荧光灯(40 μmol·m⁻²·s⁻¹)为光源,光照16 h/d。

1.3 基本培养基筛选

将珙桐果实中未成熟合子胚接种到添加0.2 mg/L 6-BA、1.0 mg/L 2,4-D的1/2MS、MS、WPM基本培养基上,共3个处理,每个处理接1皿,每皿接种外植体15个,重复3次。培养30 d后统计愈伤组织诱导率。

1.4 胚性愈伤组织的诱导

以MS为基本培养基,添加不同质量浓度6-BA(0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L)与2,4-D(0.5、1.0、2.0 mg/L)组合,以及6-BA(0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L)与NAA(0.5、1.0、2.0 mg/L)组合。每个处理接2皿,每皿接种外植体15个,重复3次。培养30 d后,统计愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率。

1.5 胚性愈伤组织保持与增殖

在胚性愈伤组织诱导过程中,选择诱导效果最佳的一组处理对其初始培养基进行称重,接种合子胚后每3 d随机选取3份样品,测量其鲜重。将样品放入烘箱中70℃处理20 h以上达到恒定重量,称量其干质量。根据测定的鲜质量和干质量值绘制生长曲线。

1.6 体胚发育

取疏松、呈颗粒状的胚性愈伤组织团转入体胚发育培养基0.5、1.0、2.0 mg/L 2,4-D与0.2 mg/L 6-BA组合,以及0.5、1.0、2.0 mg/L NAA与1.0 mg/L 6-BA组合进行体胚诱导。在体视显微镜下实时观察并统计体胚发育情况。

1.7 体细胞胚萌发及植株转化

从发育正常的子叶期体胚中挑选成熟体胚,在萌发培养基上培养。萌发培养基以1/2MS为基础培养基,添加0.5 mg/L 6-BA和0.25 mg/L IBA。在培养开始后4~6周评估萌发和分化。体胚萌发通过出苗来判断,分化通过可见根和芽的建立来判断。

挑选正常萌发和生根的体细胞胚,转移到植株再生培养基上促进地上部分和根系发育。再生培养基在萌发培养基的基础上添加1.0 mg/L的活性炭(Activated Carbon, AC),30 d后观察植株的再生情况。

1.8 组织细胞学观察

在体胚发育阶段,收集不同发育时期的体胚,并将其固定在FAA溶液(福尔马林:冰醋酸:乙醇,

5:5:90, v/v) 中 24 h。将组织在分级系列乙醇中脱水, 然后包埋在石蜡中。在旋转切片机上切割 8 μm 厚的切片, 用番红固绿法染色^[12]。将制作好的石蜡切片在配备照相机的光学显微镜(Olympus)下获得图像。

1.9 统计分析

愈伤组织诱导率(%) = (诱导出愈伤合子胚数/总接种合子胚数) $\times 100\%$

胚性愈伤组织诱导率(%) = (诱导出胚性愈伤合子胚数/总接种合子胚数) $\times 100\%$

使用 SPSS27.0 软件进行数据统计和单因素方差分析(ANOVA), 采用 Duncan's 多重比较法^[13]进行差异显著性($P < 0.05$)测验。用 Origin2022 进行图表的绘制。

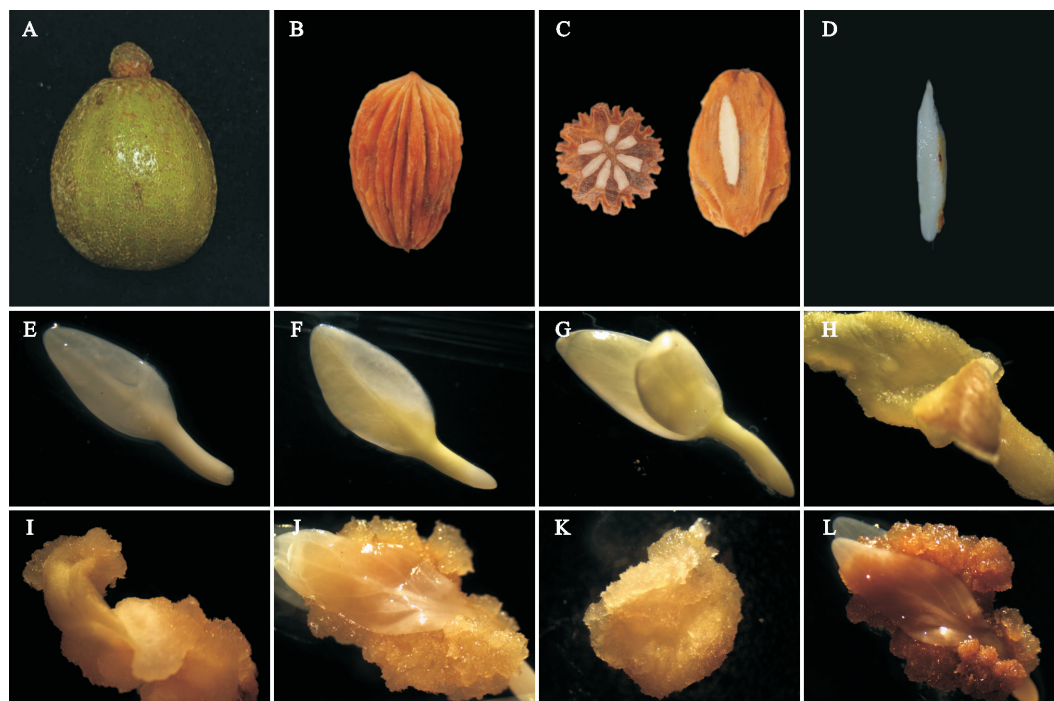
2 结果与分析

2.1 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

珙桐果实为长卵圆形核果(图 1A), 薄膜状外果皮和肉质中果皮包裹木质化内果皮(图 1B), 种子多 3~6 枚, 少见 7 枚(图 1C), 呈长披针形(图 1D)。将去除胚乳的未成熟合子胚接种到愈伤组织诱导培养基上进行暗培养(图 2E), 3 d 后与培养基接触的合

子胚吸取营养, 胚轴与子叶连接处的叶脉由乳白色逐渐开始变黄色(图 1F), 5 d 胚轴膨大萌动, 子叶基本全变黄并开始伸展翻卷(图 1G), 继续培养到 7 d 后合子胚明显愈伤化, 且愈伤组织逐渐形成(图 1H), 14 d 时愈伤组织基本完全长成(图 1I)。还有部分合子胚 15 d 后胚轴和子叶与最初接种时的状态无明显变化, 仍保持乳白色, 而子叶与胚轴连接处直接有愈伤组织的生长(图 1J)。诱导培养 30 d 后, 愈伤组织主要有 2 种类型: 一种为淡黄色状态, 分散性好, 表面有明显颗粒状凸起的胚性愈伤组织(图 1K); 另一种为褐色, 质地紧密, 呈瘤状的非胚性愈伤组织(图 1L)。

不同类型基本培养基附加 0.2 mg/L 6-BA 和 1.0 mg/L 2,4-D 均有愈伤组织形成(图 2)。方差分析表明: 基本培养基类型对愈伤组织诱导率有显著影响($F = 71.03, P < 0.001$), MS 培养基诱导率较高, 1/2MS 和 WPM 培养基略低。观察发现 MS 和 1/2MS 培养基诱导合子胚的子叶和胚轴均产生愈伤组织, 呈白色或黄白色, 质地松软、有颗粒感; WPM 培养基诱导的愈伤组织多集中于合子胚胚轴, 且呈酱状、质地紧实, 长时间培养下子叶和愈伤组织上均出现长根现象。



A. 肉质中果皮的珙桐种子; B. 木质内果皮的珙桐种子; C. 珙桐种子的横切面和纵切面; D. 珙桐胚乳包裹的合子胚; E~J. 合子胚接种 0 d、3 d、5 d、7 d、14 d、15 d 变化; K. 胚性愈伤组织; L. 非胚性愈伤组织。

图 1 珙桐种子及愈伤组织示意图

Fig. 1 Schematic diagram of seed and callus of *D. involucrata*

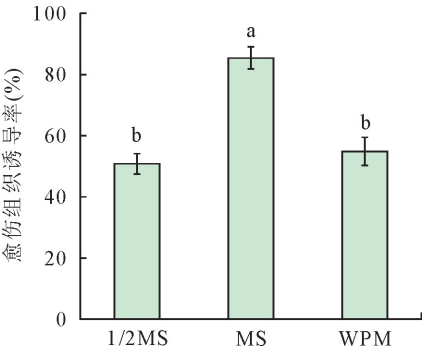
2.2 植物生长调节剂对胚性愈伤组织诱导的影响

将珙桐未成熟合子胚接种于 MS 附加不同植物

生长调节剂的培养基上, 5 d 胚轴膨大, 7 d 子叶和胚轴开始愈伤化, 30 d 后根据细胞学观察(图 6)和形态

学特征相结合统计愈伤组织诱导率(表 1)。方差分析表明,不同质量浓度配比的植物生长调节剂对愈伤组织诱导无显著影响($F=1.314, P=0.276$),但对胚性愈伤组织诱导影响显著($F=115.45, P<0.001$)。在 2,4-D 与 6-BA 组合中,珙桐未成熟合子胚愈伤组织诱导率为 80.2%~94.0%,胚性愈伤组织诱导率为 7.0%~32.1%。2,4-D 质量浓度为 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时,胚性愈伤组织诱导率随 6-BA 质量浓度的提升呈先升高后降低的趋势;2.0 mg/L 2,4-D 和 0.2 mg/L 6-BA 处理下的胚性愈伤组织诱导率最高,达 32.1%。在 NAA 与 6-BA 组合中,珙桐未成熟合子胚愈伤组织诱导率为 20.9%~82.8%,随 NAA 质量浓度增强,愈伤组织诱导率升高;胚性愈伤组织诱导率为 3.4%~33.7%,不同质量浓度的 NAA 处理下,胚性愈伤组织诱导率均随 6-BA 质量浓度的增加呈先增加后降低的趋势,以 0.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L 6-BA 组合的胚性愈伤组织诱导率最高,

可达 33.7%。2,4-D 与 6-BA 组合愈伤组织诱导率整体高于 NAA 与 6-BA 组合,但胚性愈伤组织诱导率在 2 个组合中无明显差异。NAA 与 6-BA 组合在长时间培养下在子叶和愈伤组织上还观察到长根现象,且随 NAA 质量浓度升高而增加。



不同字母表示在不同处理下 $P<0.05$ 水平下的显著性差异。

图 2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Fig. 2 Effect of different media on callus induction

表 1 6-BA 与 2,4-D 或 NAA 对愈伤组织和胚性愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 6-BA and 2,4-D or NAA on callus and embryogenic callus induction

处理	植物生长调节剂/(mg · L ⁻¹)			愈伤组织诱导率(%)	胚性愈伤组织诱导率(%)
	2,4-D	NAA	6-BA		
1	0.5		0.2	84.4±9.7ABCD	7.0±0.6m
2	0.5		0.5	86.3±3.3ABCD	26.8±1.1c
3	0.5		1.0	80.2±12.4CD	21.9±1.5de
4	0.5		2.0	82.8±6.9BCD	12.6±1.4kl
5	1.0		0.2	82.4±4.2CD	12.6±1.1kl
6	1.0		0.5	85.4±3.6ABCD	22.8±2.7d
7	1.0		1.0	92.6±3.0AB	23.0±0.8d
8	1.0		2.0	86.9±4.6ABCD	16.0±1.3hij
9	2.0		0.2	89.9±2.5ABC	32.1±2.1ab
10	2.0		0.5	94.0±4.7A	17.7±1.4fgh
11	2.0		1.0	85.9±5.2ABCD	20.0±0.7ef
12	2.0		2.0	88.3±6.2ABCD	14.8±1.0ijk
13		0.5	0.2	20.9±2.7G	3.4±0.3n
14		0.5	0.5	50.7±6.6F	22.8±1.0d
15		0.5	1.0	57.7±4.9EF	33.7±0.8a
16		0.5	2.0	56.9±6.6EF	25.8±1.0c
17		1.0	0.2	64.7±3.4E	11.4±0.7l
18		1.0	0.5	59.5±2.2EF	22.3±1.3de
19		1.0	1.0	66.0±3.1E	30.1±1.3b
20		1.0	2.0	64.1±2.0E	21.8±1.9de
21		2.0	0.2	78.8±3.0D	12.8±1.5kl
22		2.0	0.5	82.8±3.3BCD	18.8±1.4fg
23		2.0	1.0	80.2±4.1CD	16.4±1.9ghi
24		2.0	2.0	79.3±1.1D	13.8±1.8jkl

注:不同大小写字母表示在 $P<0.05$ 水平下的显著性差异。

2.3 胚性愈伤组织的保持与增殖

由愈伤组织增殖培养生长曲线(图 3)可以看出,第 1 阶段(Ⅰ—Ⅱ)愈伤组织增长缓慢,且多呈白色或透明丝状愈伤,质地蓬松;第 2 阶段(Ⅱ—Ⅲ)愈

伤组织生长迅速,出现淡黄色或黄色颗粒状、分散性好的胚性愈伤组织;第 3 阶段(Ⅲ—Ⅳ)愈伤组织生长速度下降,鲜重生长曲线存在明显的峰值,随后缓慢下降至平稳状态,可能是培养基的营养物质不能

满足愈伤组织生长或愈伤组织开始衰竭脱水导致;第3阶段结束时,愈伤组织呈现出明显的颜色变化,胚性愈伤组织呈明亮的黄白色,而非胚性愈伤组织开始褐化变暗,随着培养时间的推移,胚性愈伤组织的产生逐渐减少。

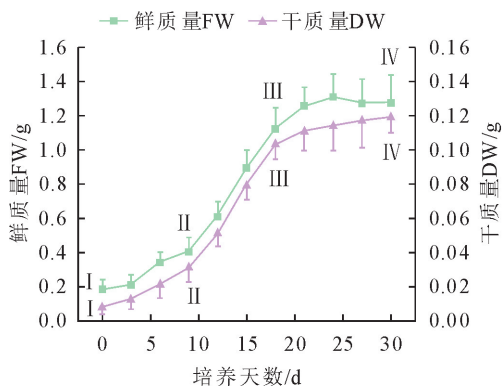


图3 增殖培养愈伤组织生长曲线

Fig. 3 Growth curve of callus in multiplication culture

2.4 体胚发育

将珙桐未成熟合子胚产生的胚性愈伤组织转移到体胚发育培养基上进行体胚诱导。结果表明,在培养15 d,胚性愈伤外层组织开始有光滑的圆形突起产生,逐渐发育成球形体胚(图5A);球形体胚进一步发育伴随细胞分裂分化,胚顶端两侧细胞分裂快于中央,10 d逐渐形成中央凹陷、2个突起的心形体胚(图5B),突起为子叶原基;随着顶端子叶的继续分裂生长,体胚基部部分细胞逐渐发育成胚根,子叶与胚根间的胚轴部分伸长,有明显的胚柄结构,胚体呈现出鱼雷形(图5C),可以清晰地观察到极性的逐步建立;子叶期胚(图5D)有2个明显的子叶和1个下胚轴,成熟期体胚(图5E)分化出明显的淡黄色胚根,子叶张开;10 d后子叶期和成熟期体胚逐渐发育完成,进行养分吸收和运输作用的胚柄逐渐退化消失,至此珙桐体胚发育过程历经球形期、心形期、鱼雷期、子叶期和成熟期等阶段,明显观察到体胚的极性发育过程,这与合子胚形成过程相似。体胚与合子胚相似的发育过程和结构表明其具有发育

成完整植株的能力。同时观察到同一胚性愈伤组织出现不同发育阶段的体胚(图5E),表明珙桐体胚的起始和发育不同步。

初步试验表明,植物生长调节剂对体胚诱导有影响,NAA与6-BA组合处理的体胚诱导率高于2,4-D与6-BA组合,其中1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA体胚诱导最高,可达22.9%。

2.5 体胚萌发及植株转化

将27个成熟期体胚转移到萌发培养基,子叶在1周内变绿。接种2周后,体胚的2片子叶向外伸展。4周后体胚形成茎和根(图5C),该过程中胚根的愈伤化严重,生根率低,根系数量少且质量差。异常萌发的体胚茎和根不同时萌发,通常形成异常的茎或根(图5B),或仅子叶伸长却不长根(图5A)。体胚萌发异常是影响萌发率的重要因素。将仅剩的16个正常萌发的体胚在添加AC的萌发培养基上培养30 d,可获得具有2~3片小叶、根系发育良好的健康植株(图5D)。

2.6 细胞组织学观察

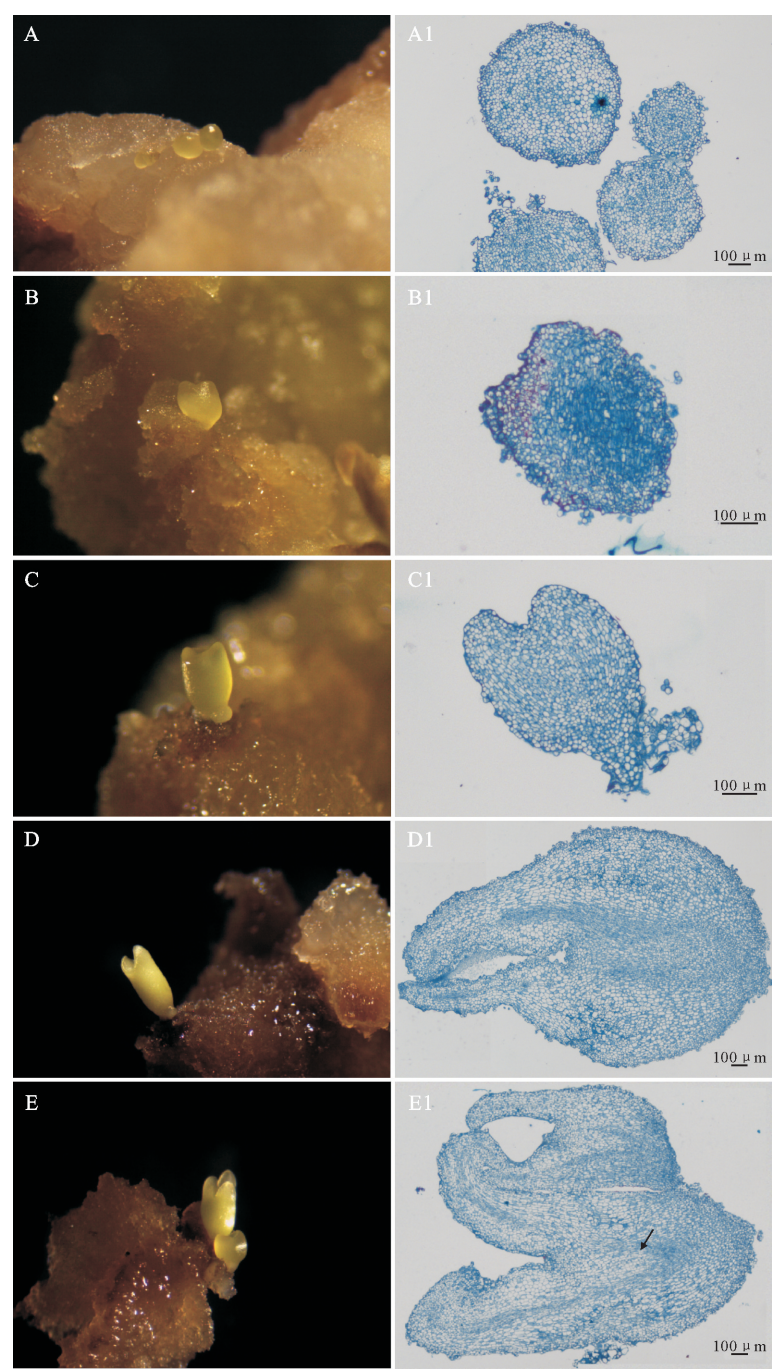
通过对珙桐愈伤组织细胞学观察发现,胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织内部结构有明显的区别,胚性愈伤组织细胞较小,排列紧密,边界明显,细胞核较大几乎占据整个细胞(图6白色箭头),非胚性愈伤组织细胞较大,排列疏松,细胞核几乎没有,细胞间隙很大而且不规则(图6黑色箭头)。

通过对不同发育阶段体胚的组织学观察(图4A1—图4E1)发现,体胚起源于细胞核大、细胞小且排列紧密的胚性愈伤组织形成的胚性细胞团的外层细胞,未观察到深层胚性细胞团分化成体胚。这些细胞连续分裂产生了早期球形胚,随后发育形成球形胚(图4A1)、心形胚(图4B1)、鱼雷胚(图4C1)、子叶胚(图4D1)和成熟胚(图4E1)。在鱼雷期(图4C和图4C1)和子叶期(图4D)阶段观察到明显的胚柄结构。成熟期体胚具有明显的“Y”形结构,以及分化的子叶、胚根和维管束(图4E1)。说明珙桐体胚是从体细胞中发育的类似于合子胚结构的胚状体。

表2 6-BA与2,4-D或NAA对体胚诱导的影响

Table 2 Effects of 6-BA and 2,4-D or NAA on somatic embryo induction

处理	植物生长调节剂/(mg·L ⁻¹)			接种数	体胚数	体胚率(%)
	2,4-D	NAA	6-BA			
1	0.5		0.2	35	3	8.6
2	1.0		0.2	33	6	18.2
3	2.0		0.2	30	0	0.00
4		0.5	1.0	34	6	17.7
5		1.0	1.0	35	8	22.9
6		2.0	1.0	34	4	11.8



A、A1 为球形期;B、B1 为心形期;C、C1 为鱼雷期;D、D1 为子叶期;E、E1 为心形期和成熟体胚,箭头为维管束。

图 4 珙桐体胚不同发育阶段及组织学特性

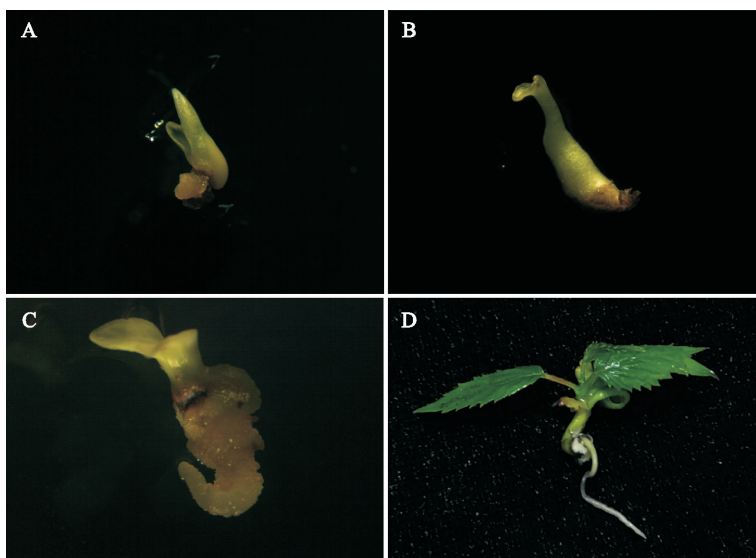
Fig. 4 Characterization of different developmental stages and histology of the somatic embryo from *D. involucrata* somatic embryos

3 讨论

3.1 基本培养基对体胚发生的影响

基本培养基是体细胞胚胎发生诱导的重要外在因素,作用机理在于不同成分及浓度在不同程度上胁迫植物材料生长发育而促进体胚诱导^[14]。在体胚发生过程中,培养基所包含的有机物、大量元素及微量元素不仅为植物材料提供基础营养物质,也能通过调节营养物质比例影响培养基渗透压,直接或间接诱导体胚发生^[15]。体细胞胚胎发生对培养基

的要求因植物种类、基因型、外植体等不同也会有所差异,常见的用于木本植物体胚发生培养基有 MS、B5、WPM、SH 等培养基^[11,16]。据报道,阔叶树种体胚诱导以 MS 为常见培养基,如栓皮栎^[17]、蓝桉^[18]等,文冠果^[19]等体胚在 B5 培养基下成功诱导,核桃^[20]则以 WPM 为体胚最适培养基;马尾松^[21]、杉木^[22]等针叶树种体胚发生却以 DCR 作为基本培养基。本研究通过研究不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响,最终以 MS 培养基成功诱导出珙桐体胚。



A. 仅子叶异常萌发; B. 仅胚根异常萌发; C. 子叶和胚根正常萌发; D. 再生植株。

图 5 珙桐体胚萌发及转化植株

Fig. 5 Germination and conversion plantlets of somatic embryos in *D. involucrata*

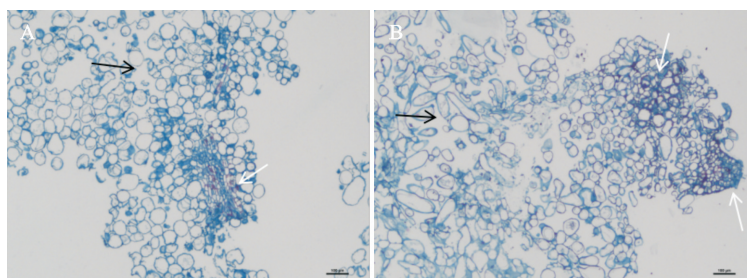


图 6 愈伤组织细胞学观察

Fig. 6 Cytological observation of callus

3.2 植物生长调节剂对体胚发生的影响

培养基中的外源植物生长调节剂是调节体细胞胚胎发生的重要因素。大量研究表明,植物生长调节剂显著影响愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率^[23-25],而胚性愈伤组织的产生是诱导体胚间接发生的关键^[26]。生长素被认为是调节体细胞胚胎发生的重要植物生长调节剂之一。据报道,2,4-D 通过调节外植体中内源生长素水平,在大部分双子叶植物和几乎所有单子叶植物的体胚诱导过程中起重要作用^[24,27]。研究发现,有些植物种在单独添加 2,4-D 的培养基上成功诱导出体胚^[27],而其他植物诱导体细胞胚发生不仅需要生长素(2,4-D、NAA),还需要体胚诱导的另一重要植物生长调节剂——细胞分裂素(如 KT、6-BA)的配合应用^[28-29]。细胞分裂素和生长素的协同作用在被子植物胚性愈伤组织的诱导中效果优于只添加生长素的培养基配方。在体胚被诱导成功后,生长素的作用发生变化^[29]。体胚开始合成内源生长素,因此需要外源生长素更少。例如,Mallón 等^[30]对夏栎体胚增殖培养基中添加

NAA 有负作用。本研究中,在低浓度 6-BA 的组合下,珙桐胚性愈伤组织诱导率随 2,4-D 质量浓度的增加而增加,胚性愈伤组织继代培养中成功诱导出珙桐体胚,而不含植物生长调节剂的 CK 组没有观察到愈伤组织和体胚产生。细胞分裂素 6-BA 与生长素 2,4-D 或 NAA 的组合均观察到珙桐体胚的成功诱导。此外还观察到珙桐体胚诱导过程中 NAA 浓度过高引起培养物根形成,因此在不降低胚性愈伤组织诱导率的情况下,通过降低 NAA 质量浓度可缓解培养物过早生根。其他植物生长调节剂如 KT、TDZ 等在本研究中诱导愈伤组织的效果不显著,但在其他物种中单独与其他植物生长调节剂配合使用对愈伤组织和体胚的诱导有重要作用^[31-32]。

4 结论

在珙桐体细胞胚胎发生过程中,以珙桐未成熟合子胚为外植体,在含有 3% 蔗糖、0.3% 凝胶、800 mg/L 水解酪蛋白、400 mg/L L-谷氨酰胺、2.0 mg/L

L 2, 4-D 和 0.5 mg/L NAA 的 MS、1/2MS 和 WPM 基本培养基上均可诱导出愈伤组织,以 MS 为基本培养基的处理愈伤组织诱导率最高,可达 94.0%,胚性愈伤组织在 MS 基本培养基添加 0.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L 6-BA 的培养基上诱导效果较好。胚性愈伤组织在添加 0.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上体胚诱导率可达 22.9%,体胚发育历经了与自然条件下的合子胚形成过程相似的球形期、心形期、鱼雷期和子叶期发育阶段,成熟体胚在以 1/2MS 为基本培养基并添加 0.5 mg/L 6-BA 和 0.25 mg/L IBA 的萌发培养基上分化出可见根和芽,随后在添加 1g/L 活性炭的萌发培养基上转化成完整小植株。

体胚发育阶段的组织细胞学分析对于探究体胚的起源和发育以及建立有效的体外繁殖方案至关重要。组织细胞学观察表明,珙桐体胚起源于胚性愈伤组织,并经历了与合子胚类似的发育阶段,成熟体胚在形态学和结构学上与合子胚相似,都是双极性的,具有典型的胚根、下胚轴和子叶。

本研究利用珙桐未成熟合子胚首次诱导出珙桐体胚,初步建立了珙桐体细胞胚胎发生植株再生培养方案,但胚性愈伤组织和体胚诱导率较低,需要在后续研究中进一步优化培养方案,以便为珙桐遗传资源的保存和利用提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 鲁兆莉,覃海宁,金效华,等.《国家重点保护野生植物名录》调整的必要性、原则和程序[J]. 生物多样性,2021,29(12): 1577-1582.
LU Z L, TAN H N, JIN X H, *et al.* On the necessity, principle, and process of updating the List of National Key Protected Wild Plants[J]. Biodiversity Science, 2021, 29(12): 1577-1582. (in Chinese)
- [2] 齐刚,苏智先,李劲涛,等.休眠期珙桐种子 cDNA 文库构建及 EST 分析[J]. 林业科学,2009,45(10):69-73.
QI G, SU Z X, LI J S, *et al.* Construction of cDNA library and analysis of the expressed sequenced tags (ESTs) characteristics of dormant seeds of *Davidia involucreata*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(10): 69-73. (in Chinese)
- [3] 余阿梅,苏智先,王立强,等.珍稀濒危植物珙桐胚的萌发与快速繁殖[J]. 植物学报,2009,44(4):491-496.
YUA M, SU Z X, WANG L Q, *et al.* Embryo germination and rapid propagation of rare and endangered plant *Davidia involucreata*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2009, 44(4): 491-496. (in Chinese)
- [4] 雷泞菲,苏智先,陈劲松,等.珍稀濒危植物珙桐果实中的萌发抑制物质[J]. 应用与环境生物学报,2003,9(6):607-610.
LEI N F, SU Z X, CHEN J S, *et al.* Germnati oninhibitors in fruit of rare and endangered *Davda involucreata*[J]. Chin. J. Appl. Environ Biol., 2003, 9(6): 607-610. (in Chinese)
- [5] 聂东玲.珍稀濒危植物扦插繁殖技术研究[J]. 经济林研究, 1999, 17(2): 38-59.
NIE D L. Study on cutting propagation technology of rare and endangered plants[J]. Economic Forest Researches, 1999, 17(2): 38-59. (in Chinese)
- [6] 牛文娟,张涛,邓东周,等.珙桐繁殖技术及生长发育研究进展[J]. 植物生理学报,2013,49(10):1018-1022.
NIU W J, ZHANG T, DENG D Z, *et al.* A review on reproductive technology and growing of *Davidia involucreata* bail[J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49(10): 1018-1022. (in Chinese)
- [7] 邹利娟,苏智先,胡进耀,等.濒危植物珙桐的组织培养与植株再生[J]. 植物研究,2009,29(2):187-192.
ZOU L J, SU Z X, HU J Y, *et al.* Tissue culture and plant regeneration of endangered plant *Davidia involucreata* bail[J]. Bulletin of Botanical Research, 2009, 29(2): 187-192. (in Chinese)
- [8] 熊丹,陈发菊,梁宏伟,等.珍稀濒危植物香果树胚性细胞悬浮系的建立和植株再生[J]. 植物学通报,2008,25(3):337-343.
- [9] NOURHENE J, EMNA Y, WAED T, *et al.* Somatic embryogenesis in *Abies nebrodensis*, an endangered Sicilian fir[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2022, 152(2): 1-12.
- [10] YUPING X, SHUANGYAN C, TENG W, *et al.* Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of endangered *Euryodendron excelsum*[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 20506.
- [11] 贾彩凤,李悦,瞿超.木本植物体细胞胚胎发生技术[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(3):26-29.
JIA C F, LI Y, JU C. The Development of somatic Embryogenesis in woody plants[J]. China Biotechnology, 2004, 24(3): 26-29. (in Chinese)
- [12] 何承坤,郑仲坤,李家慎.植物石蜡切片一步双重整体染色[J]. 福建农学院学报,1989,18(4):565-569.
HE C K, ZHENG S K, LI J S. The whole double-staining method in step for the paraffin section of plant[J]. Journal of Fujian Agricultural College, 1989, 18(4): 565-569. (in Chinese)
- [13] 苏均和. Duncan 多重比较及数据补缺法及其应用[J]. 上海统计,2003(3):23-24.
SU J H. Duncan multiple comparison and data filling method and its application[J]. Shanghai Statistics, 2003(3): 23-24. (in Chinese)
- [14] FEHÉR A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate[J]. BBA-Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849(4): 385-402.
- [15] MARTÍNEZ M T, JOSÉ M C S, VIEITEZ A M, *et al.* Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017, 131(2): 321-333.
- [16] SILVA J A T D, MALABADI R B. Factors affecting somatic embryogenesis in conifers[J]. Journal of Forestry Research, 2012, 23(4): 503-515.
- [17] 张存旭,张焕玲,贾小明,等.栓皮栎体胚的增殖、成熟和萌发[J]. 林业科学,2008,44(6):39-44.

- ZHANG C X, ZHANG H L, JIA X M, *et al.* Proliferation, maturation and germination of somatic embryos in *Quercus variabilis* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2008, 44(6): 39-44. (in Chinese)
- [18] GÓMEZ C, RÍOS D, OLATE M S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill [J]. Interiencia, 2013.
- [19] 顾玉红, 高述民, 郭惠红, 等. 文冠果的体细胞胚胎发生 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 311-313.
- GU Y H, GAO S M, GUO H H, *et al.* Somatic embryogenesis of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Plant Physiology Communications, 2004, 40(3): 311-313. (in Chinese)
- [20] 袁巧平, 董茂山, Jay-Allemand Christian. 离体培养条件下核桃器官发生和体细胞胚胎发生 [J]. 林业科学, 1990, 26(6): 495-499.
- YUAN Q P, DONG M S, JAY-ALLEMAND C. Organogenesis and somatic embryogenesis from the culture of walnut (*Juglans regia* L.) [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1990, 26(6): 495-499. (in Chinese)
- [21] 黄健秋, 卫志明, 许智宏. 马尾松成熟合子胚的体细胞胚胎发生和植株再生 [J]. 植物学报, 1995, 37(4): 289-294.
- HUANG J Q, WEI Z M, XU Z H. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from callus of mature zygotic embryos of masson pine [J]. Acta Botanica Sinica, 1995, 37(4): 289-294. (in Chinese)
- [22] RUIYANG H, YUHAN S, BO W, *et al.* Somatic embryogenesis of immature *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. Zygotic Embryos. [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-14.
- [23] FU J X, LIU C M, HU G B, *et al.* The efficient induction of embryogenic callus and high frequent somatic embryogenesis of in vitro culture of ber [J]. Acta Horticulturae, 2007, 764(764): 205-212.
- [24] JIMÉNEZ V M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic Embryogenesis [J]. Plant Growth Regulation, 2005, 47(2-3): 91-110.
- [25] IVANOVA A, VELCHEVA M, DENCHEV P, *et al.* Endogenous hormone levels during direct somatic Embryogenesis in *Medicago falcata* [J]. Physiologia Plantarum, 2010, 92(1): 85-89.
- [26] 李腾, 杜禹珊, 曹张俊, 等. 植物体细胞胚培养影响因素研究的新进展 [J]. 种子, 2013, 32(3): 49-53.
- LI T, DU Y S, CAO Z J, *et al.* Advancement of researching in influential factors for plant somatic embryogenesis culture [J]. Seed, 2013, 32(3): 49-53. (in Chinese)
- [27] GARCIA C, de ALMEIDA A F, COSTA M, *et al.* Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 137(2): 193-212.
- [28] LI H Y, LIU F S, SONG S L, *et al.* Highly effective organogenesis and somatic embryogenesis of *Clivia* [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 306(111443): 1-7.
- [29] 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 等. 植物生长调节剂对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. 遗传, 2000, 22(5): 349-354.
- CUI K R, XING G S, ZHOU G K, *et al.* The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis [J]. Journal of Heredity, 2000, 22(5): 349-354. (in Chinese)
- [30] MALLÓN R, COVELO P, VIEITEZ A M. Improving secondary embryogenesis in: application of temporary immersion for mass propagation [J]. Trees Structure & Function, 2012, 26(3): 731-741.
- [31] 毛艳萍, 苏智先, 胡进耀, 等. 濒危植物珙桐愈伤组织的诱导及悬浮细胞培养初探 [J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(4): 510-515.
- MAO Y P, SU Z X, HU J Y, *et al.* Callus induction and preliminary study of cell suspension culture in an endangered plant, *Davidia involucrata* [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2010, 28(4): 510-515. (in Chinese)
- [32] GULSHAN C, DARSHNA C, LAL V M, *et al.* Correction to: TDZ-induced direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis on cotyledonary node explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2022, 28(8): 1559.