

# 地锦体细胞胚胎发生研究

李正红<sup>1</sup>, 孙振元<sup>2\*</sup>, 刘秀贤<sup>1</sup>, 彭镇华<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:**以地锦幼胚为外植体, 接种在附加 6-BA  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  及 2,4-D  $0\sim 4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的改良 B5 培养基中诱导愈伤组织, 愈伤诱导率 0~100%。对诱导出的愈伤组织采用 6-BA 和 2,4-D 不同浓度组合的培养基进行继代, 对能稳定继代的愈伤组织, 以改良 B5 为基本培养基进行分化培养, 采用 L16(4<sup>4</sup>) 正交设计, 研究 6-BA、NAA、AC 及 LH 四因素不同浓度组合对体细胞胚胎发生的影响。结果表明: 适宜地锦幼胚体细胞胚胎发生的培养基为: 愈伤组织诱导: 改良 B5+ 6-BA  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 2,4-D  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 愈伤组织继代: 改良 B5+ 6-BA  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 2,4-D  $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 胚状体分化及萌发: 改良 B5 基本培养基。胚状体诱导率 33%, 成苗率 53%, 移栽成活率 85%。胚状体为外起源发生方式, 经球形胚、心形胚、鱼雷形胚、子叶形胚等阶段发育成熟。

**关键词:** 地锦; 体细胞胚胎; 植株再生

中图分类号: S722.3<sup>+</sup>7 文献标识: A

## Somatic Embryogenesis of *Parthenocissus tricuspidata*

LI Zheng-hong<sup>1</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>2</sup>, LIU Xiuxian<sup>1</sup>, PENG Zhen-hua<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, China; 2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Calli were induced from immature embryos of *Parthenocissus tricuspidata* which were cultured in improved B5 medium supplemented with  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA and  $0\sim 4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D. The inducing frequency of callus ranged from 0 to 100%. Calli were subcultured in the same base medium with various combinations of 6-BA and 2,4-D. Somatic embryoids occurred from improved B5 medium without any regulators. Results showed that the suitable mediums for embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Parthenocissus tricuspidata* were: (1) callus inducement: improved B5+ 6-BA  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 2,4-D  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (2) subculture medium: improved B5+ 6-BA  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 2,4-D  $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (3) embryogenic and germination medium: improved B5. The embryogenic frequency was 33%, the germination frequency of embryoids was 53%, and the survival ratio after transplant was 85%. Embryoids occurred from exterior of callus and developed through the stages of globular embryoid, heart shaped embryoid, tin fish-shaped embryoid and cotyledon differentiation stage embryoid.

**Key words:** *Parthenocissus tricuspidata*; somatic embryogenesis; plant regeneration

地锦 (*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. & Zucc.) Planch.) 为葡萄科 Vitaceae 地锦属 (*Parthenocissus* Planch.) 植物, 春夏叶色翠绿, 入秋转为鲜红或紫红, 观赏效果好, 且吸盘发达, 攀援能力强, 是园林及城市垂直绿化的优良材料, 也是荒漠、石质山地、公路及铁路护坡植被恢复的理想树种。然而其生长速度

及适应性均不如由北美引入的五叶地锦 (*P. quinquefolia* (L.) Planch.) 理想<sup>[1-3]</sup>。五叶地锦却有吸盘不发达、固着能力差等缺陷<sup>[4]</sup>。为获得综合此二种优良特性的地锦新种质所做的杂交试验表明, 两个种杂交不亲和。因此, 采用体细胞杂交、物理及化学诱变等现代生物技术进行地锦种质创新,

收稿日期: 2004-05-14

项目来源: 国家“863”资助项目(2001AA244031): 地锦种质资源创新及优良品种培育

作者简介: 李正红(1964—), 男, 云南景东人, 副研究员, 博士生。

\* 通讯作者: 孙振元, 研究员, 博士生导师。

才有可能获得理想的优良新种质,而植株再生体系的建立是这些技术获得成功的前提。目前国内外对该属植物育种及植株再生的研究均少见报道。本研究以地锦幼胚为外植体诱导出愈伤组织,并通过体细胞胚胎发生途径成功获得再生植株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为地锦 (*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. & Zucc.) Planch.) 盛花期后 45 d 的幼胚,采自北京中国林业科学研究院内。

### 1.2 方法

(1) 外植体处理:取盛花期后 45 d 的幼果,流水冲洗 30 min, 70% 酒精 2 min, 无菌水洗 3 次, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 10 min, 无菌水洗 4 次, 放于铺有灭菌滤纸的培养皿内吸干表面水分。剥去果皮及种皮, 取幼胚接种于诱导培养基。

(2) 愈伤组织诱导及分化:愈伤组织诱导、继代、胚状体分化及萌发均以改良 B5<sup>[5]</sup> 为基本培养基, 附加蔗糖 3%, 琼脂 0.6%, pH 值 5.8。愈伤组织诱导及继代均为暗培养, 温度 25 ± 2 °C。分化及萌发培养条件:光照 2 000 lx, 12 h · d<sup>-1</sup>, 温度 25 ± 2 °C。

愈伤组织诱导培养基:改良 B5 + 6 BA2, 主要研究 2, 4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响。

试验设置 5 个 2, 4-D 浓度梯度 (mg · L<sup>-1</sup>): I - 0, II - 0.5, III - 1.0, IV - 2.0, V - 4.0。

愈伤组织继代培养基:主要研究 6-BA 及 2, 4-D 对愈伤组织继代效果的影响。设置见表 1 (浓度: mg · L<sup>-1</sup>)。

表 1 愈伤组织继代培养基

培养基	6 BA / (mg · L <sup>-1</sup> )				
	2.0	1.5	1.0	0.5	
2, 4 D / (mg · L <sup>-1</sup> )	1	A	B	C	D
	0.5	E	F	G	H

分化培养基:采用 L16(4<sup>4</sup>) 正交设计, 研究 6 BA、NAA、水解乳蛋白(LH)、活性炭(AC) 四因素 16 个组合对地锦愈伤组织再分化的影响。每处理 5 重复, 每重复 5 块愈伤组织。每 30 d 继代 1 次(见表 2)。

表 2 分化培养基正交设计

水平	6 BA / (mg · mL <sup>-1</sup> )	NAA / (mg · L <sup>-1</sup> )	LH / (mg · L <sup>-1</sup> )	AC / (g · L <sup>-1</sup> )
1	0.0	0	0	0
2	0.5	0.1	100	1
3	1.0	0.5	300	2
4	2.0	1.0	500	5

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导

2.1.1 愈伤组织诱发时间 接种后 5 d, 各处理幼胚均开始生长, 3 周后部分形成具根和芽的小苗, 幼胚生长长度与 2, 4-D 浓度呈明显负相关(图 1), 浓度越高, 下胚轴越是短缩并增粗。

10 d 后 I、IV、V 处理开始出现愈伤组织, 多由胚轴与胚根接合部位及子叶发生。20 d 后 IV、V 处理伸长至 2~3 cm, 但未进一步发育的胚形成愈伤, 约 20% 则胚基本未生长便整个形成愈伤组织。II、III 处理的胚虽然也伸长、膨大, 但最终未形成愈伤组织。

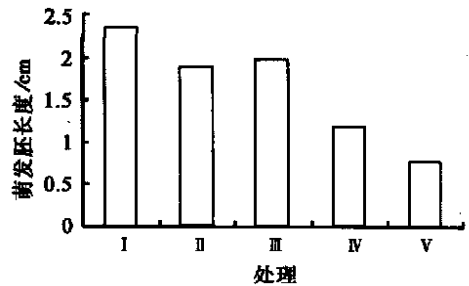


图 1 不同处理幼胚萌发长度

2.1.2 愈伤组织诱导率及类型 处理 I 愈伤组织诱导率为 35%, 但全为白色雪花状。IV、V 处理愈伤组织诱导率达 88% 和 100% (见表 3)。此结果说明地锦幼胚愈伤组织诱导率随 2, 4-D 浓度升高而升高。

表 3 愈伤组织诱导率及类型

处理	处植 体数	愈伤 块数	愈伤诱 导率/%	愈伤组织类型
I	20	7	35	100% (1) 型
II	25	0	0	
III	25	0	0	
IV	25	22	88	85% 为 (2) 型, 15% 为 (3) 型
V	25	25	100	85% 为 (2) 型, 15% 为 (3) 型

愈伤组织据颜色、质地可明显分为三类: (1) 型为白色雪花状, 致密; (2) 型为白色, 糊状, 无粘性; (3) 型为淡黄, 松软, 胶状, 有一定粘性。I 处理全为 (1) 型, IV、V 处理 85% 为 (2) 型, 15% 为 (3) 型。细胞学观察表明, (1) 型细胞圆形或卵圆形, 排列紧密, 大小不规则, 表面存在许多大型特化细胞, 胞质较稀。(2) 型有两类细胞, 约 90% 为管状长细胞, 长度为圆形细胞的 4~5 倍, 少量可达近 15 倍, 内含较多液泡, 细胞间无粘连, 置于水中全部分散; 10% 左右为

圆形细胞,成团镶嵌于长形细胞中,胞质较浓,核大,分化培养时胚状体从这类细胞产生。(3)型细胞圆形,质浓,成团包于一层胶质下。

## 2.2 愈伤组织继代培养

接种 33 d 后,愈伤组织直径达 0.5~1.0 cm。白色雪花状愈伤一般无分化能力,故未进行继代培养。将下胚轴形成的(2)、(3)型愈伤接种于 8 组继代培养基中培养,每 30 d 继代 1 次。继代 3 次后愈伤状态见表 4。

表 4 分化培养 3 个月后愈伤状态

初始愈伤类型	培养基	颜色	质地	生长速度 <sup>①</sup>
(2)型	A	白	稀	++
	B	白	稀	++
	C	白	松散	+++
	D	白	松散	+++
	E	黄褐	稀	+
	F	黄褐	稀	+
	G	白	松散	+++
	H	白	松散	+++
(3)型	A	褐	硬	死亡
	B	褐	硬	死亡
	C	褐	硬	死亡
	D	褐	硬	死亡
	E	褐	硬	死亡
	F	褐	硬	死亡
	G	褐	硬	死亡
	H	褐	硬	死亡

①+ ——慢,++ ——中等,+++ ——快

(3)型愈伤在各处理培养中表面胶质不断增多,最后形成一层硬胶壳,继代 3 次后愈伤全部死亡。

(2)型愈伤培养状况有所不同,A、B 处理生长速度中等,但愈伤形态、颜色正常;C、D、G、H 处理生长极快,愈伤逐渐由糊状变为松散、干燥状;E、F 生长最慢,且愈伤逐渐褐化,继代 6 次后全部死亡。

## 2.3 愈伤组织分化

2.3.1 胚状体诱导 用 6-BA、NAA、水解乳蛋白、活性炭四因素进行 4 水平正交试验。用相同的 16 组培养基对 A、B、C、D、G、H 继代培养基培养的愈伤组织进行分化,每月转接 1 次。

结果 B、C、D、G、H 培养基继代的愈伤经 6 个月分化培养后无胚状体产生。

A 培养基继代的愈伤分化培养 1 周后可看到表面或内部局部变黄绿色,在同样培养基中继代 3 次后,1(基本培养基)、4(基本培养基+ 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+ LH 300 mg·L<sup>-1</sup>)、14(基本培养基+ 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+ LH 100 mg·L<sup>-1</sup>+ AC 5 g·L<sup>-1</sup>)三处理愈伤表面从松散的硬颗粒状愈伤分化出胚状体,分化率分别为 33%、

33%和 13%。此时各处理中愈伤组织状态见表 5。

除上述三处理外,其余处理连续培养 6 个月均未诱导出体胚,愈伤组织大多基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒。6、7 处理则几乎全部愈伤均为绿色硬块。

1 处理培养基中的愈伤组织经继代后能不断生长,且不断产生胚状体,继代 6 次后仍保持胚状体发生能力,从最初分化的 8 块愈伤组织共产生约 3 000 个胚状体,平均每块产生 370 余个。

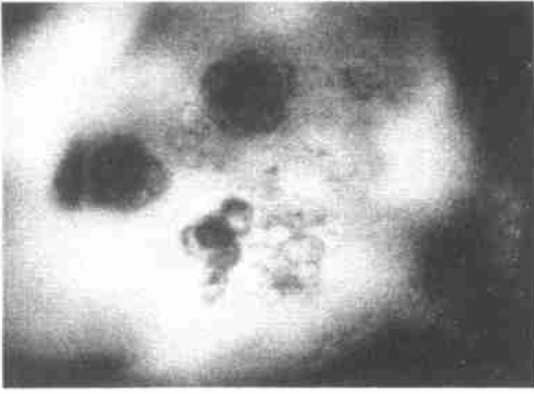
4、14 处理培养基中的胚状体继代 6 次后仍未发育成熟,愈伤及未成熟胚状体均逐渐停止生长并褐化死亡。

通过显微观察,确定胚状体均从愈伤组织表面的圆形细胞产生,即外起源,愈伤底部的长形细胞无胚状体发生。胚状体发育经过球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚等不同时期逐渐发育成熟(图版 1~6),与合子胚发育相类似。

2.3.2 胚状体萌发 分化培养中 1 处理的成熟胚状体在相同培养基中萌发为具根、茎、叶结构的完整小苗。对 39 瓶胚状体萌发情况进行调查,798 个胚状体中有 422 个发育为具真叶的完整小苗,成苗率 53%。其余 47% 胚状体则为畸形胚,如不形成子叶,或单片肥大子叶,或玻璃化等。

表 5 分化培养 3 个月后各处理胚状体分化率及愈伤状态

处理	愈伤数	分化愈伤数	愈伤组织状态
1	30	10	基部乳白色疏松,顶部淡黄硬颗粒
2	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
3	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
4	30	10	基部白色疏松,顶部部分淡黄硬颗粒,部分绿色紧密,无颗粒
5	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
6	30	0	10% 基部白色疏松,顶部绿色紧密,其余全为绿色紧密硬块
7	30	0	全为绿色紧密硬块
8	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
9	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
10	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
11	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
12	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
13	30	0	全为绿色硬块,顶部细胞紫红色
14	30	4	基部白色疏松,顶部部分淡黄硬颗粒,部分绿色紧密,无颗粒
15	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒
16	30	0	基部白色疏松,顶部绿色紧密,无颗粒



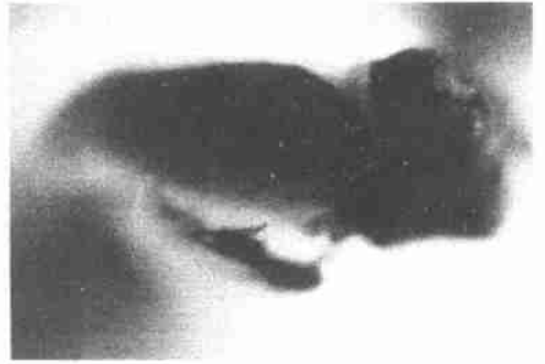
图版1 多细胞原胚



图版2 球状胚



图版3 心形胚



图版4 鱼雷形胚



图版5 子叶形胚



图版6 胚状体萌发

2.3.3 体胚苗移栽 小苗长到 8~10 cm 时,在温度 25 ℃、湿度 75% 左右的玻璃温室中揭盖炼苗 3 d 后移栽,于同样条件温室中培养,第 1 周置于阴凉处,而后置于向阳处,1 个月后调查成活率 85%。

### 3 结论与讨论

(1) 地锦愈伤组织的诱导国内外少见报道。据同科葡萄属(*Vitis* L.) 植物组织培养研究<sup>[6~8]</sup>,在含有 IAA、NAA、NOA、2,4-D 的培养基上均可产生愈伤组织,其中 2,4-D 使用较为普遍,一般浓度在 0.5~2 mg·L<sup>-1</sup> 之间,在一定范围内,随 2,4-D 浓度的增加,愈伤组织诱导率也随之增大,但是,生长素浓度并不是越大越好,过高浓度的 2,4-D 并不利于胚状体的发生。本实验结果与此趋势相同。诱导葡萄(*Vitis* sp.) 幼胚产生胚性愈伤组织的适宜 2,4-D 浓度为 0.5~2 mg·L<sup>-1</sup>,本实验中,低于 1 mg·L<sup>-1</sup> 的 2,4-D 不能诱导地锦幼胚产生胚性愈伤组织,而 4 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 诱导出的愈伤组织经相同分化试验未能产生胚状体,说明浓度可能过高,抑制了胚状体的发生。因此适宜地锦幼胚诱导胚性愈伤组织的 2,4-D 浓度应为 2 mg·L<sup>-1</sup> 左右。

(2) 地锦幼胚诱导出的愈伤组织在多种组合的培养基中均可顺利继代,但生长素与细胞分裂素的比例越低,愈伤组织生长越快,而过快生长的愈伤组织在本研究中未能分化出胚状体。据葡萄胚状体发生研究<sup>[9,10]</sup>,继代培养基保持较高浓度的细胞分裂素和较低浓度的生长素有利于胚状体的诱发,但二者比例若过高,则不利于愈伤组织的生长。本研究得出相似的结果,地锦幼胚愈伤组织能诱导胚状体的适宜继代培养基激素组合为:6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,而 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 与 2,4-D 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 与 2,4-D 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 组合继代培养的愈伤组织不仅生长速度缓慢,且褐化严重,继代 4 次后便全部死亡。

(3) 有学者认为生长素对进入胚胎发生“预决定状态”的细胞来说,会起到抑制胚胎发生和发育的作用<sup>[11]</sup>。本研究用无任何外源激素的改良 B5 基本培

养基成功诱导出胚状体,且胚状体在相同培养基上萌发为正常小苗,而添加低浓度生长素(NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>) 的培养基则未诱导出胚状体,结果与此观点相符合。

(4) 综合愈伤组织诱导、继代及分化结果,适宜地锦幼胚体细胞胚胎发生的适宜培养基为:愈伤组织诱导培养基:改良 B5 基本培养基+ 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>;愈伤组织继代培养基:改良 B5 基本培养基+ 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>;分化及萌发培养基:改良 B5 基本培养基。

(5) 地锦幼胚的胚状体起源于愈伤组织表面,即外起源,胚状体发育经过球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚等不同阶段逐渐发育成熟,为较典型的双子叶植物胚状体发生方式<sup>[12]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 孙振元,陆诗雷.地锦绿化荒山作用初步研究[J].林业科技通讯,2000(3):26~27
- [2] 张毅功,陈欣.人工种植地锦绿化荒山研究简报[J].河北农业大学学报,1999,22(4):107
- [3] 朱徐富.地锦垂直绿化生态效应的初步研究[J].江苏绿化,1994(4):9~10
- [4] 陆明珍,徐筱昌,奉树成,等.高架桥下立柱垂直绿化植物的选择[J].植物资源与环境,1997,6(2):63~64
- [5] 邹昌杰,李佩芬.葡萄花粉植株的诱导[J].植物学报,1981,23(1):79~81
- [6] 曹致义,齐与枢.葡萄组织培养及应用[M].北京:高教出版社,1991
- [7] Rajasekaran K, Mullins M G. Organogenesis in internode explants of grapevines[J]. *Vitis*, 1981, 20: 218~227
- [8] Stamp J A, Meredith C P. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine[J]. *Scientia Horticulturae*, 1988(35):235~250
- [9] 卢炳芝,李佩芬.葡萄花丝胚性愈伤组织的诱导及其植株再生[J].葡萄栽培与酿酒,1994(1):53~55
- [10] Stamp J A, Meredith C P. Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1988, 113(6):941~945
- [11] 黄学林,李筱菊.高等植物组织培养教程[M].北京:北京农业大学出版社,1992
- [12] 崔凯荣,戴若兰.植物体细胞胚胎发生的分子生物学[M].北京:科学出版社,2000