

皇冠草体细胞胚胎发生及其体胚发生过程中内源激素的变化

邢登辉 赵云云 黄承芬

(首都师范大学生物系 北京 100037)

摘 要 皇冠草是一种具有重要经济价值的大型观赏水草。以其幼叶为外植体,在 MS 培养基上,短期内(25d),直接诱导获得了体细胞胚。对不同的细胞分裂素及其不同组合的体胚诱导效应进行测试,发现:6-苄氨基嘌呤(6-BA, 1mg/L)和玉米素(Zt, 1mg/L)结合使用效果最好,诱导频率达 100%,平均每个外植体可形成 4.87 个体细胞胚。当在含有 Zt(1mg/L)的 MS 培养基中加入萘乙酸(NAA 0.5mg/L)时,外植体不能形成体细胞胚,而是形成大量的根。在含有吲哚乙酸(IAA, 1mg/L)的 MS 培养基上,成熟的体胚 5d 后即可发育成完整的小植株。72% 的小植株被成功地移栽到了水族箱中。采用 HPLC 法,对自外植体培养之日起到体胚发生和成熟的各个时期的内源激素含量进行了测定。发现各种内源激素的含量均不断增加,10d 后达到对照的 2 倍左右。IAA 含量在培养第 10 天时达到第一个峰值,第二个峰值出现在 25d 后;玉米素和玉米素核苷(Zt + ZR)含量在 15d 后达到最大值(为对照的 8 倍多),然后逐渐下降;赤霉素(GA₃)的变化趋势与细胞分裂素基本相同,但到体胚萌发时,其含量已恢复到对照水平;培养 10d 后的脱落酸(ABA)含量一直保持到了体胚成熟期。

关键词 皇冠草(*Echinodorus orisis* L.), 体细胞胚胎发生, 内源激素

分类号 Q942 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0098-03

体细胞胚胎发生作为离体培养条件下形态发生和植株再生的一条途径,因其高效转化为完整植株的能力、高度遗传稳定性和用于基础研究(如植物的生长、分化和发育问题)的巨大潜力而受到广泛研究^[1]。目前已有 300 多种植物获得体细胞胚^[2]。然而,由于不同物种,甚至同一物种的不同基因型在体胚诱导,体胚的同步发育以及体胚成熟等各个方面对培养条件的要求不同,而使其潜力难以充分发挥^[1]。在这些培养条件中,植物生长调节物质无疑是最为重要的影响因素之一,不同物种对生长调节剂的种类和其浓度水平的要求差异很大。对于细胞分裂素类的要求尤其如此^[2,3]。细胞生长素类(主要是 2,4-D)在不同物种的体细胞胚胎诱导和发育中的作用比较一致,但其早期诱导原胚形成和后期抑制体胚发育的作用模式并非适用于一切物种。而上述结果均是基于对外源生长调节物质的试验。很显然,了解体细胞胚胎发生过程中内源激素物质的变化将更有助于理解其影响体细胞胚胎发生的实质。

皇冠草是一种重要的水生观赏植物。因其雌雄异株且籽株胎生,自然繁殖率很低。通过体细胞胚胎发生获得再生植株应是解决这一问题的一条理想途径。本文报道了皇冠草体细胞胚胎发生及其体胚发生过程中内源激素含量变化的研究结果。

1 材料和方法

1.1 体胚诱导

取来源于北京西直门水草市场的皇冠草,自来水冲洗 2h 后,在超净工作台上将其幼叶(5 天龄,长 3cm 左右)依次浸泡于 70% 酒精 30s,用 0.1% 的升汞 10min 进行表面消毒。然后用无菌蒸馏水冲洗 4 次。每个叶片切成 3 段并接种到盛有 25mL MS 培养基的 100mL 的三角瓶中。MS 培养基含有 3% 的蔗糖和 0.8% 的琼脂,分别含有不同浓度(0.5, 1.0, 2.0mg/L)的各种细胞分裂素[6-BA, Zt, 激动素(Kt)]、Zt(1mg/L) + 6-BA(2mg/L)和 Zt(1mg/L) + NAA(0.5mg/L)的激素组合,pH 值为 5.8,高压灭菌(120℃, 15 h)。培养条件:25℃,光照周期 12h。成熟体胚转移到含有 IAA(1mg/L)的 MS 培养基上。

1.2 组织学研究

为了解体细胞胚的起源和发生过程,进行了组织学研究。自培养之日起,每隔 5d 取培养的外植体 3 枚作为研究材料(以新鲜幼叶切段为对照),直到第 25d 体胚成熟为止。获取的材料经 FAA(含有 50% 的乙醇,6% 的乙酸和 5% 的福尔马林)固定液固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋后,切成 10 μ m 厚的切片。切片用番红固绿双染。

1.3 内源激素含量的测定

自培养之日起,每隔 5d 取一次培养中的外植体,以获取各个发育时期的体胚,以新鲜皇冠草幼叶为对照。采用 HPLC 法,对体细胞胚发生过程中内源激素含量的变化进行了初步研究。方法条件如下:精密称取培养的幼叶外植体 10g 左右于 80% 冰甲醇中,研磨后转移至 100mL 锥形瓶中加 80% 冰甲醇 50mL 摇匀,于冰箱放置过夜,过滤后残渣中加 80% 冰甲醇 50mL,冰水超声振荡 30min 后过滤。合并过滤液并减压浓缩至 5mL,然后用 Sep-Pak C₁₈ 小柱过滤,再经 0.45 μ m 滤膜过滤,上清液待分析。仪器:Waters244 型 HPLC。色谱条件:IAA、GA3、ABA 为:柱,Nova Pak C₁₈(0.4cm \times 15cm);流动相:15% CH₃OH + 20% CH₃CN + 65% H₂O;流速:0.7mL/min;检测器:UV_{254nm} \times 0.1AUFS;定量方法:外标峰高法。Zt + ZR 为:柱:Resolve Pak C₁₈(0.4cm \times 15cm),其它条件同 IAA。整个试验包含 3 次重复。

2 结 果

2.1 体细胞胚胎的发生

外植体在培养基上培养 5d 后,首先沿外植体的切口部位开始膨大,然后在整个外植体上形成许多瘤状突起。大约 20d 后,即可形成完整的体细胞胚。切片观察表明:培养 5d 后,切口部位的许多细胞开始进行分裂,且细胞核较大,胞质丰富。有的细胞进行了一次较为明显的极性细胞分裂并形成了 2 细胞体胚(图版)。10d 后,体胚发育到球形或梨形期(图版-2,3)。15d 后达到心形期(图版-4)。20d 后,在体胚一侧形成一盾片状结构,该结构与胚轴平行(图版-5)。25d 后,形成具有 1 或 2 枚子叶的成熟体胚(图版-6,7)。成熟体胚被转移到含有 IAA(1mg/L)的 MS 培养基上后,很快萌发并长成小植株(图版-8,9)。

2.2 细胞分裂素的体胚诱导效应

对不同的细胞分裂素的体胚诱导效应进行了测试。结果表明不同种类的细胞分裂素以及同种细胞分裂素的不同浓度的体胚诱导效应显著不同(表 1)。其中, Zt(1mg/L)和 6-BA 结合使用效果最好, 诱导频率(100%)和体胚产量(4.87 个体胚/外植体)均达到最大值。各种细胞分裂素单独使用时, 以 6-BA(0.5mg/L)效果最好(100%), Zt, Kt 效果最差。较高浓度玉米素(2.0mg/L)体胚诱导效应优于低浓度的玉米素(0.1mg/L); 6-BA 和 Kt 的效应则与此相反, 随浓度的升高, 体胚诱导频率逐渐降低。把 0.5mg/L 的 NAA 加入含有 Zt(1.0mg/L)的培养基中时, 外植体只能形成大量的根, 而不能形成体细胞胚。

表 1 不同细胞分裂素的体胚诱导效应

Table 1 Effect of cytokinins on somatic embryogenesis

Cytokinins	Conc. / (mg/L)	No. of CE	EE/%	Embryogenic efficiency
Zeatin	0.1	32	0	0
	0.5	29	6.7 ± 3.1	0.07 ± 0.02
	0.5	30	33.0 ± 7.4	0.53 ± 0.05
	2.0	24	96.0 ± 5.2	2.13 ± 0.32
6-BA	0.5	26	100 ± 0.0	2.81 ± 0.24
	1.0	27	26 ± 6.3	0.26 ± 0.01
	2.0	24	25 ± 4.5	0.42 ± 0.03
Kinetin	0.5	25	60 ± 4.7	0.56 ± 0.12
	1.0	27	25 ± 3.3	0.25 ± 0.02
	2.0	23	0	0
Zeatin + 6-BA	1.0 + 1.0	31	100 ± 0.0	4.87 ± 0.35

Note: Each value of cultured explant (CE), percentage of embryogenic explants (% EE) and embryogenic efficiency (number of somatic embryos per cultured explant) represents the mean of 3 independent experiments

2.3 内源激素含量的变化

结果(图 1)表明, 在整个体胚诱导、发育和成熟过程中, 各种内源激素含量的变化很大。在培养的第 5 天, Zt + ZR 的浓度水平已是对照的 7 倍多, 随体胚的进一步发育, 其浓度继续上升直到第 15 天的最高峰, 然后逐渐下降。但直到体胚成熟其浓度仍保持在对照的 7 倍多, 说明体胚中的细胞分裂素水平显著高于叶片。GA₃ 的变化趋势与 Zt + ZR 基本相同。和对照相比, 在培养的第 5 天, IAA 的浓度没有明显变化, 但在第 10 天, 其浓度迅速升高为对照的 2 倍多, 达到第一个峰值, 到第 15 天, 其浓度又恢复到对照水平, 然后, 逐渐升高到培养 25 d 后的第二个峰值。ABA 在整个体胚发生过程中的变化不明显。

3 讨 论

和其它物种的体细胞胚胎发生一样, 皇冠草体细胞胚的发育过程与其合子胚十分相

似。但是,在其体胚发育的后期,盾片状结构的形成却很特殊。因为,尽管皇冠草是一种单子叶植物,但它不属于禾谷类,一般在其胚上没有盾片^[4]。在皇冠草体胚发生过程中,为什么会出现这种盾片状结构,或者,这种盾片状结构在体胚发生过程中的作用是什么有待进一步的研究。

一般认为外源生长素,特别是 2,4-D 在早期体细胞胚的诱导中是必需的。然而,在不含有任何生长素类物质的 MS 培养基上,本研究成功地诱导产生了皇冠草体细胞胚。而且,培养基中一旦加入 NAA,外植体则只能生根,不能形成体细胞胚。这或许是因为水生植物在生理生化状态等各个方面与陆生植物有所不同的缘故。与生长素不同,细胞分裂素在植物体胚发生中的作用还不很清楚。在胡萝卜体细胞胚的诱导中,Halperin^[5]认为 Kt 抑制体胚的发生;Fujimura and Komamine^[6]的实验结果则表明:人工合成的 Kt 和 6-BA 抑制胡萝卜的体细胞胚胎发生,而天然的 Zt 对其体胚诱导有促进作用。在豌豆体胚诱导中,Kysely^[7,8]认为细胞分裂素可以改善豌豆体胚的质量。可见,对于不同的物种,细胞分裂素的体胚诱导效应不同。根据我们的实验结果,皇冠草的体细胞胚胎发生只需细胞分裂素存在就足够了,细胞生长素类物质的存在反而不利于皇冠草体胚的诱导。

有关体细胞胚胎发生过程中内源激素变化的研究报道很少。Sahera AL-bta^[9]曾经对芹菜体胚发生过程中的内源激素变化进行研究,认为在体胚发育的各个时期生长素的含量相对较低,而且几乎没有变化。本研究结果则表明,在皇冠草体胚发生过程中虽然生长素含量相对于细胞分裂素含量较低,但其变化十分明显,在体胚发育的球形期和成熟期形成两个明显的高峰。

Sahera Al-Abta 也研究了芹菜体胚发育各个时期的内源细胞分裂素的含量,认为在体胚成熟时和体胚萌发后,内源细胞分裂素的含量最高,而在完整植株中,其含量下降。而 D.Ernst 对大茴香体胚发育的研究结果则表明,内源细胞分裂素与体胚发育的不同时期没有明显的相关性。本研究结果与 Sahera Al-Abta 对芹菜的研究结果比较一致,所不同的是,在芹菜中体胚成熟时内源细胞分裂素的含量最高,而在皇冠草中,体胚发育到心形时期时内源细胞分裂素的含量即达到最大值。

参 考 文 献

- [1] P. V. Ammirato. In: D. A., Evans Eds, Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan, New York, 1983, 1: 82~123.
- [2] Y. P. S. Bajaj. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 30---Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed, 1994, p. 1.
- [3] R. Harder. *Planta*, 1968, **82**: 193~199.
- [4] 胡适宜. 被子植物胚胎学, 北京: 人民教育出版社, 1983, p. 183.
- [5] W. Halperin. *Science*, 1964, **146**: 408~410.

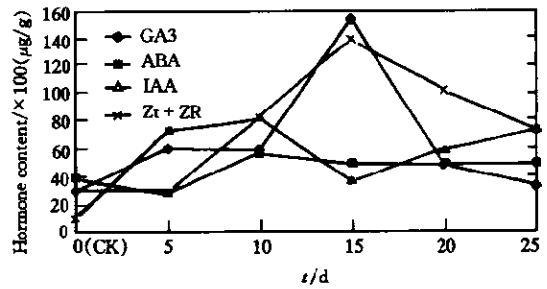


图 1 内源激素的动态变化

Fig. 1 The kinetic change of endogenous hormones contents

- [6] T. Fujimura, A. Komamine. *Plant Sci. Lett.*, 1975, 5: 359~364.
[7] W. Kysely, J. R. Myers, P. A. Lazzeri. *Plant Cell Rep.*, 1987, 6: 305~308.
[8] W. Kysely, H. J. Jacobsen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1990, 20: 7~14.
[9] Sahera Al-Abta, H. A. Collin. *New Phytol.*, 1979, 82: 29~35.

Somatic Embryogenesis of *Echinodorus orisis* L. and the Kinetic Changes of the Endogenous Hormones Contents During the Embryogenetic Process

Xing Denghui Zhao Yunyun Huang Chenfen

(Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract Somatic embryogenesis was achieved from young leaf cuttings of *Echinodorus orisis* L., an aquatic ornamental plant, in a short period(25days). Among the cytokinins and their combinations tested, 6-BA(1mg/L) and Zt(1mg/L) in MS medium induced the highest efficiency(100%) of somatic embryogenesis, with a maximum of 4.87 embryos per explant. Roots instead of somatic embryo were formed when NAA(0.5mg/L) was added to MS medium containing Zt(1mg/L). Matured embryos were germinated and rooted in MS medium with IAA(1mg/L) after 5 days cultivation. Seventy two percent of the rooted plantlets transplanted survived in an aquarium. The endogenous hormone contents in various stages of somatic embryogenetic process were measured by HPLC. The concentrations of all hormones tested were about 2 times that of CK, the cuttings from the untreated fresh leaves, after 10day of incubation. Meanwhile, the concentration of IAA occurred two peaks after 10 and 25 day cultivation respectively. The cytokinin (Zt and ZR) peak, about 8 times more than CK, appeared in 15 days cultivation when the heart-shaped embryo had been formed. The fluctuation of the GA₃ concentration was very similar to that of cytokinin. The ABA, however, remained a stably quite high concentration after 10 days cultivation.

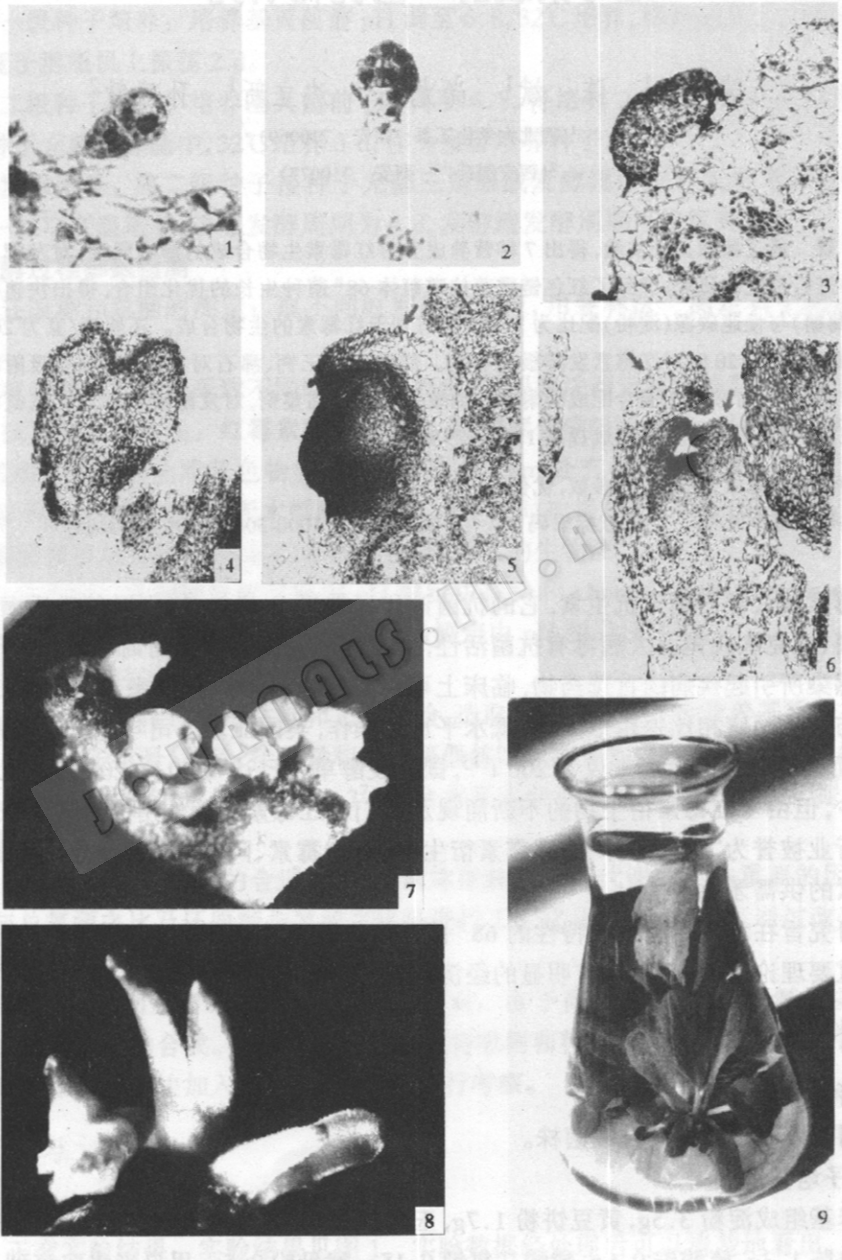
Key words *Echinodorus orisis* L., somatic embryogenesis, endogenous hormone

邢登辉等: 皇冠草体细胞胚胎发生及其体胚发生过程中内源激素的变化

图版

Xing Denghui *et al.*: Somatic embryogenesis of *Echinodorus orisis* L. and the kinetic changes of the endogenous hormones contents during the Embrogenetic process

Plate



1. Two-cell somatic embryo; 2. Globular somatic embryo;
 3. Torpedo-shaped somatic embryo; 4. Heart-shaped somatic embryo;
 5. Somatic embryo with scutellum-like structure(→);
 6. Matured somatic embryo with two cotyledons and scutellum-like structure(→);
 7. Matured embryos; 8. Germinated embryos; 9. Regenerated plantlet