

· 研究报告 ·

雷竹体细胞胚诱导的初步研究

裴海燕¹, 林新春¹, 方伟¹, 黄丽春^{2*}

¹浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 临安 311300

²台湾“中央研究院”植物研究所, 台北 115

摘要 以雷竹(*Phyllostachys violascens*)种胚为外植体, 脱分化产生愈伤组织, 愈伤组织诱导产生体细胞胚, 并发育成苗。实验结果表明: 愈伤组织诱导体细胞胚基本培养基为MS无机盐+20 g·L⁻¹葡萄糖(glucose)+10 mg·L⁻¹腺嘌呤(adenine sulfate)+0.5 g·L⁻¹麦芽抽提物(malt extract)+0.1 mg·L⁻¹6-BA+0.01 mg·L⁻¹氨氯吡啶酸(picloram)+10 g·L⁻¹type A agar; 将基本培养基中的氨氯吡啶酸浓度升高至0.1 mg·L⁻¹即为愈伤组织诱导的最佳培养基, 早期子叶胚是愈伤组织诱导的最佳胚体; 愈伤组织在添加0.001 mg·L⁻¹TDZ和0.3 mg·L⁻¹ABA的愈伤组织最佳培养基上光照培养4周后, 去除其中的ABA, 并添加0.1 mg·L⁻¹NAA继续培养1个月, 体细胞胚数量最多可达87.43%, 该培养基是体细胞胚发生的最佳培养基; 将上述体细胞胚发生培养基中的6-BA浓度升高至1 mg·L⁻¹, 继代培养2个月后有小苗出现。组织学观察显示, 体细胞胚细胞核大、质浓且多数呈球形原胚状。

关键词 愈伤组织, 组织学, 雷竹, 体细胞胚

裴海燕, 林新春, 方伟, 黄丽春 (2011). 雷竹体细胞胚诱导的初步研究. 植物学报 46, 170–178.

雷竹(*Phyllostachys violascens*)(又名早竹、早园竹), 别名雷公竹, 隶属禾本科竹亚科刚竹属, 小型散生, 是中国特有的优良笋用竹种, 栽培历史悠久。在所有的竹笋品种中雷竹出笋时间最早, 具有笋期长、笋味美、年年出笋、效益高和适应性强等优点, 其营养价值和商品价值较高。此外, 其地下鞭根系发达, 固土保水能力强, 竹林蔓延发展速度快, 可用于园林绿化等, 目前已成为全国各大竹产区的主要竹种。

近年来, 尽管雷竹零星开花非常普遍, 但获取种子十分困难(付顺华等, 2002)。目前, 雷竹林还主要依靠传统移栽母竹或竹鞭来繁殖后代, 这种方式不仅繁殖速度慢、用地多、成本高并受季节限制, 而且长此以往将会导致竹种品质退化或竹林成片开花死亡的灾难性后果, 并会使有计划地选种、育种及多世代遗传改良变得更加困难。借助竹子组织培养植株再生这一技术平台, 希望能够对竹子的内在遗传变异和生理生化机理进行深入探究。相对其它植物而言, 竹类组织培养的研究起步较晚, 迄今为止仅有30年的历史。Metha等(1982)在第5届国际植物组织培养会议上首

次报告了印度荻竹(*Bambusa arundinacea*)成熟胚诱导胚性愈伤组织及体细胞胚再生获得植株, 引起了人们的极大关注, 这意味着竹子通过体细胞胚发生方式获得再生植株是完全可行的。Huang和Murashige(1983)以绿竹(*Bambusa oldhamii*)、凤凰竹(*Bambusa multiplex*)、翠竹(*Sasa pygmaea*)和人面竹(*Phyllostachys aurea*)4个竹种生长活跃的侧芽和顶芽的芽尖为外植体, 详细研究了愈伤组织的诱导条件。Yeh和Chang(1986)以绿竹花序为外植体, 通过体胚发生获得了再生植株。我国竹子的组织培养起始于以黄竹(*Dendrocalamus membranaceus*) (阙国宁和诸葛强, 1991)和印度荻竹嫩节为外植体诱导愈伤组织并再生植株。之后又出现了一些关于其它竹种植株再生成功的报道, 如王裕霞等(2007)对马来甜龙竹(*Dendrocalamus asper*)等9个观赏竹的丛生芽增殖生根及愈伤组织增殖分化的微繁进行了研究, 并进行了无菌条件下秋水仙素芽的诱变实验; 袁金玲等(2009)以凤凰竹小穗和种胚为外植体, 诱导胚性愈伤组织并成功实现了植株再生。体细胞胚胎发生途径在

收稿日期: 2010-03-02; 接受日期: 2010-07-05

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(No.Z3100366)

* 通讯作者。E-mail: lchuang@zafu.edu.cn

许多植物中均有成功报道,其高效性也得到了人们的普遍认可(周键等,2008)。然而关于竹子组织培养的报道主要集中在丛生竹种上,并且绝大部分均是通过芽繁芽的方式获得再生植株,对于繁殖相对困难的散生竹,通过体细胞胚再生植株则十分罕见。鉴于散生竹雷竹的市场前景十分可观,且目前尚无其组织培养的报道,本文利用雷竹的种胚为外植体,成功诱导体细胞胚并发育成体胚小苗,以期雷竹快繁及其遗传转化体系的建立奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2008年9—10月挖取当年生雷竹(*Phyllostachys violascens* A. et Riv.)植株移栽到浙江农林大学智能温室,在花盆中培养,待到第2年春季5月采集种子。

1.2 外植体消毒

待种子长至长约0.8—1.0 cm时,去掉外稃,选取饱满且完整的籽粒,用自来水冲洗0.5小时,无菌条件下在0.5%的次氯酸钠溶液(内含少量吐温-20)中真空灭菌10分钟,无菌水冲洗5—6次。在解剖显微镜下挑取种胚,接种到预备好的培养基中。

1.3 培养条件筛选

1.3.1 不同时期种胚的愈伤组织诱导

挑取的无菌种胚,可大致分为3种类型,即透明球形期胚(图1A)、透明早期子叶胚(图1B)和乳白色晚期子叶胚(图1C)。筛选各时期长势一致的胚体分别接种在MS+20 g·L⁻¹glucose+10 mg·L⁻¹Ad+0.5 g·L⁻¹ME+0.1 mg·L⁻¹6-BA+0.01 mg·L⁻¹picloram+10 g·L⁻¹type A agar培养基上。

1.3.2 愈伤组织诱导培养基中生长素类物质的筛选

选取长势一致且透明的早期子叶胚接种到MS+20 g·L⁻¹glucose+10 mg·L⁻¹Ad+0.5 g·L⁻¹ME+0.1 mg·L⁻¹6-BA+10 g·L⁻¹type A agar诱导培养基上,分别添加0、0.5、1和2 mg·L⁻¹2,4-D; 0.03、0.1和0.3 mg·L⁻¹picloram; 0.5、1和2 mg·L⁻¹NAA,共10种培养基用来筛选适宜激素。

1.3.3 TDZ和ABA对胚性愈伤组织生长的影响

选取长势相同的愈伤组织接种到MS+20 g·L⁻¹glucose+10 mg·L⁻¹Ad+0.5 g·L⁻¹ME+0.1 mg·L⁻¹6-BA+0.1 mg·L⁻¹picloram+10 g·L⁻¹type A agar培养基上,分别附加0、0.3、1 mg·L⁻¹ABA及0、0.001 mg·L⁻¹TDZ,并配成不同组合,即为筛选胚性愈伤组织的6种培养基。

1.3.4 体细胞胚诱导培养基中NAA、吲哚乙酸及吲哚丁酸的筛选

选择生长状态一致的胚性愈伤组织接种到MS+20 g·L⁻¹glucose+10 mg·L⁻¹Ad+0.5 g·L⁻¹ME+0.1 mg·L⁻¹6-BA+0.001 mg·L⁻¹TDZ+0.1 mg·L⁻¹picloram+10 g·L⁻¹type A agar培养基上,分别附加0、0.03、0.1、0.3、1 mg·L⁻¹NAA; 0.03、0.1、0.3、1 mg·L⁻¹IAA; 0.03、0.1、0.3、1 mg·L⁻¹IBA,配成筛选体细胞胚的13种培养基。考察不同浓度的NAA、吲哚乙酸和吲哚丁酸对体细胞胚的影响。

1.3.5 培养条件与数据处理

种胚接种后,先在(25±2)°C的暗室中培养14天,待愈伤组织形成后,再移至光周期为16小时光照/8小时黑暗、光照强度为2 500 lux的培养室中继续培养,形成胚性细胞团和体细胞胚。

愈伤组织诱导率(%)=(每个处理产生的愈伤组织总数/接种的外植体总数)×100%。体细胞胚诱导率(%)=(每个处理产生的体细胞胚总数/接种的外植体总数)×100%。褐化程度(级): 1为未褐化; 2为轻微褐化; 3为中度褐化; 4为重度褐化; 5为全褐化。愈伤组织致密程度(级): 1代表松散易碎; 2代表轻微聚集; 3代表中度聚集; 4代表紧密聚集; 5代表高度致密团块状。

1.4 组织细胞学观察

分别选取白色松散的非胚性愈伤组织、淡黄色致密胚性愈伤组织和体细胞胚3种不同形态的培养材料制作石蜡切片,进行组织结构观察。样品用FAA固定液固定24小时以上,70%乙醇冲洗,经过一系列脱水、透明和渗蜡,石蜡包埋后,进行常规石蜡切片。用番红-固绿法染色,中性树胶封固后,在光学显微镜(Olympus BH-2)下观察并拍照。

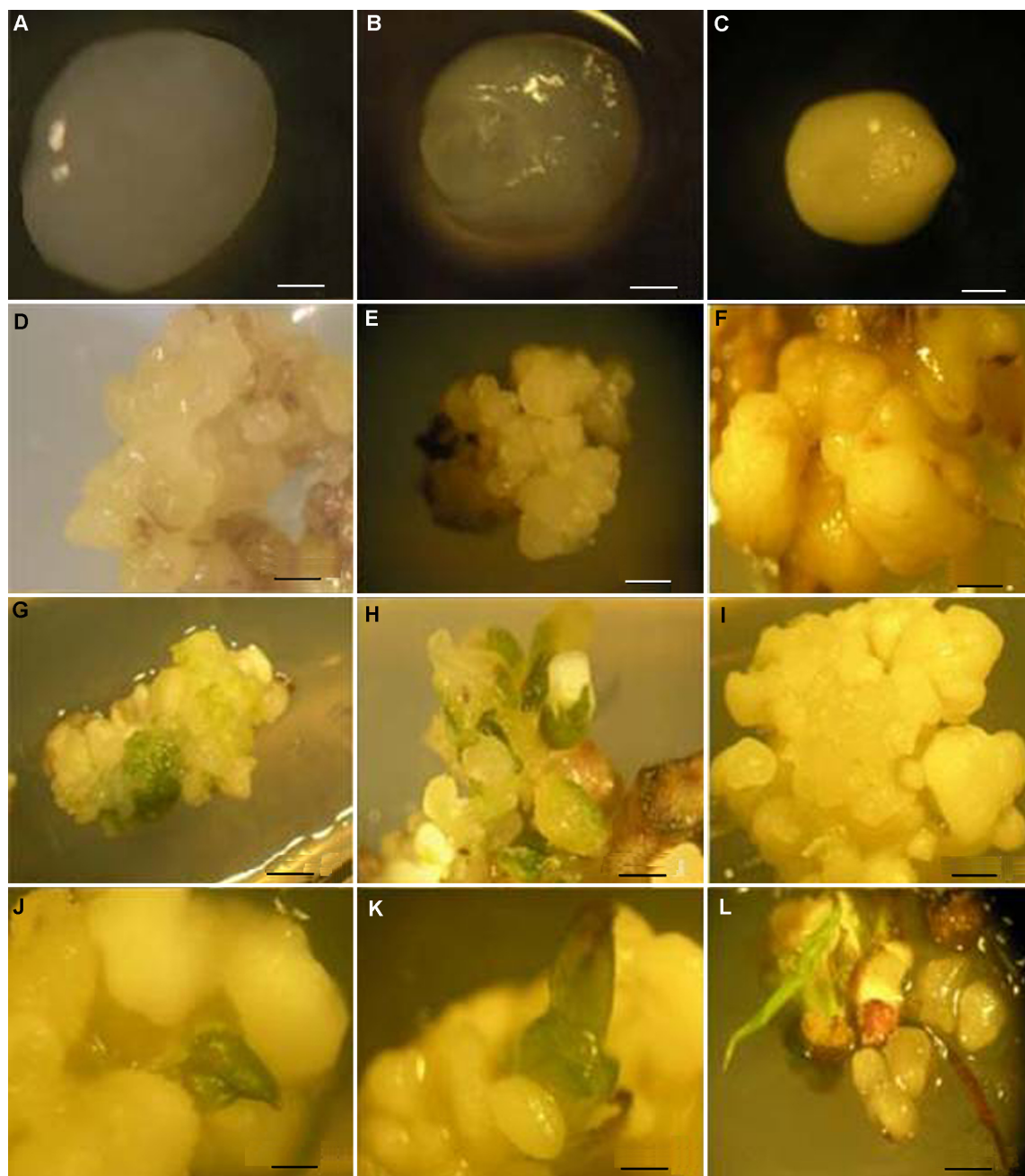


图1 雷竹体细胞胚诱导过程

(A) 球形胚; (B) 早期子叶胚; (C) 晚期子叶胚; (D) 白色水渍状松散的愈伤组织; (E) 淡黄色致密的颗粒状愈伤组织; (F) 分化的球形体细胞胚; (G) 棍棒形体细胞胚; (H) 光下转绿梨形体细胞胚且联合成树枝状; (I) 淡黄色梨形体细胞胚; (J) 从体细胞胚中伸出芽; (K) 分化后的芽伸长明显; (L) 2个月后体细胞胚再生试管苗。Bar=600 μm

Figure 1 The process of somatic embryogenesis of *Phyllostachys violascens*

(A) Globular embryo; (B) Early cotyledon embryo; (C) Later cotyledon embryo; (D) White watermark loose callus; (E) Slightly yellow granular callus; (F) Differentiated globular somatic embryo; (G) Club-shaped somatic embryo; (H) Green pear-shaped somatic embryo in light and combined into dendritic; (I) Yellow pear-shaped somatic embryo; (J) Spread buds nodule from embryoid; (K) Elongating significantly after the shoot differentiation; (L) Plantlet regenerated from somatic embryo after two months. Bar=600 μm

2 结果与讨论

2.1 不同时期的种胚对愈伤组织诱导的影响

以不同时期的种胚为外植体诱导愈伤组织, 14天和30天的种胚诱导率差异较大(图2和图3)。

种胚接种3天后开始发育, 1周后胚体明显膨大并发育成愈伤组织, 球形胚和早期子叶胚诱导的愈伤组织较多, 晚期子叶胚诱导的愈伤组织发育略迟, 种胚接种15天后普遍发生愈伤组织。球体胚脱分化膨大成水团状透明愈伤组织, 接种14天诱导率最大, 可达60%。但随着时间的延长, 愈伤组织进一步发育变得异常困难, 绝大部分水团结构开始褐化或者逐渐萎缩以至枯死, 极少数能够继续发育。接种14天, 早期子叶胚诱导的愈伤组织数量也较多, 并且均能够继续发育, 并逐渐形成光滑结实的颗粒状结构, 具有继续分化的潜能, 早期子叶胚是愈伤组织诱导体细胞胚胎发生的理想外植体。胚龄晚的晚期子叶胚在14天和30天其愈伤组织诱导率均较低, 并且诱导的愈伤组织无再分化的趋势, 但此期的大部分种胚均能够直接萌发成具有芽和根的试管苗, 且萌发率较高。

2.2 2,4-D、Picloram和NAA对愈伤组织诱导的影响

2,4-D、picloram和NAA均能够诱导早期子叶胚产生愈伤组织(表1)。2,4-D与picloram的诱导率均较高。对愈伤组织继续培养, 观察发现在添加2,4-D的各处理中, 愈伤组织表面多为疏松颗粒, 呈白色水渍状, 质地松软, 增殖速度快, 但褐化严重, 更换培养基1周后, 愈伤组织又发生褐化, 只有少数为致密结构(图1D)。Picloram的处理优于2,4-D, 多数愈伤组织发生后均能够继续发育, 产生淡黄色的致密结构(图1E), 褐化周期长, 但可通过继代缓解。Picloram的最佳处理浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在此浓度下愈伤组织结构致密, 并成颗粒状, 诱导率可达62.38%, 但增殖较慢, Picloram是目前诱导雷竹愈伤组织较适宜的外源激素。添加NAA的各处理效果明显差于2,4-D和picloram, 极少有愈伤组织发生且生长缓慢, 甚至有些颗粒会聚集成瘤状, 褐化极为严重, 因此NAA不适宜单独用来诱导愈伤组织。

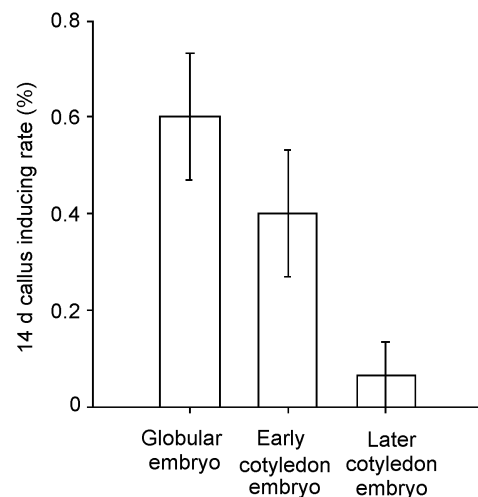


图2 14天后球形胚、早期子叶胚和晚期子叶胚对雷竹愈伤组织诱导的影响

Figure 2 Effects of globular, early cotyledon and later cotyledon embryo on inducing callus of *Phyllostachys violascens* at 14 days

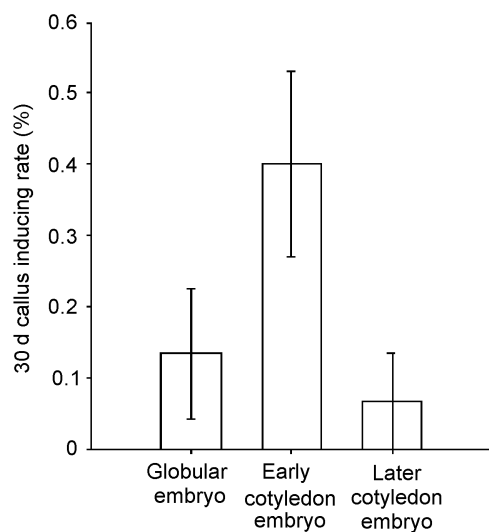


图3 30天后球形胚、早期子叶胚和晚期子叶胚对雷竹愈伤组织诱导的影响

Figure 3 Effects of globular, early cotyledon and later cotyledon embryo on inducing callus of *Phyllostachys violascens* at 30 days

2.3 TDZ和ABA对胚性愈伤组织生长的影响

为了能够诱导出可以增殖且致密结实的胚性愈伤组织, 我们测试了TDZ和ABA组合对愈伤组织诱导的影响。

从表2可以看出, TDZ和ABA两因素的随机组合对胚性愈伤组织的增殖、分化及发育状态的影响明显不同。在所有TDZ处理浓度下添加ABA的各处理中, 愈伤组织均紧密光滑并呈坚实的团块状, 置于光照下, 淡黄色透明的胚性愈伤组织无褐化发生或仅轻微褐化。在未添加ABA的各处理中, 大部分愈伤组织略显松散, 光照下培养愈伤组织可增殖, 但褐化加重, 更换培养基也不能够缓解。我们在培养中发现ABA的浓度不宜过高或添加时间过长(一般不超过40天), 长时间添加ABA, 淡黄色的块状结构将逐渐萎蔫。TDZ有助于愈伤组织的增殖, 低浓度的TDZ可显著增加愈伤组织的数量, 并有利于胚性细胞团的形态建成, 这可能与愈伤组织继续发育时TDZ可以同时满足其对细胞分裂素和生长素的要求有关, 即可能与TDZ通过调节生长素代谢来发挥作用等有关(Thomas and Katterman, 1986; 徐华松等, 1996)。随着TDZ浓度的升高, 愈伤组织的增殖数量仍较多, 但会出现玻璃化和褐化现象, 色泽暗淡, 继续发育趋势渐弱, 不再适合胚性愈伤组织的生长。当TDZ浓度为0.001 mg·L⁻¹, ABA浓度为0.3 mg·L⁻¹时(培养20–30天), 有利于胚性愈伤组织的增殖和分化。

2.4 NAA、IAA和IBA对体细胞胚诱导的影响

胚性愈伤组织进一步发育可形成体细胞胚, NAA、IAA和IBA对体细胞胚诱导的结果见表3。从表3可以看出,

在含有3种生长素的培养基中均有体细胞胚生成, 但差异显著。与其它2种生长素相比, NAA明显有利于体细胞胚的发生。利用体视显微镜观察发现, 在胚性愈伤组织中紧密排列着分化发育成不同形状的体细胞胚: (1) 球形体细胞胚: 能沿胚性愈伤组织周缘分裂、突起明显且大小不均; 或者从愈伤组织中脱离出来, 独立分裂成胚性细胞团, 或继续分化成梨形胚(图1F)。(2) 棍棒状体细胞胚: 通过球形胚不均等分裂形成, 上端分裂快, 膨大明显, 呈椭球状突起; 下端分裂慢, 狭长(图1G)。(3) 梨形体细胞胚: 淡黄色、光滑、排列致密且凸凹不平(图1I); 或者在光照下转绿, 分裂成簇状枝(图1H)。使用浓度为0.1 mg·L⁻¹的NAA处理, 形成上述结构的体细胞胚的数量最多, 可达87%, 其相对应的培养基是胚性愈伤组织再生体细胞胚的最佳培养基。在胚性愈伤组织培养基上添加IAA和IBA也可产生体细胞胚, 但诱导率低且长势较差。尤其是在添加IBA的各处理中, 只有当IBA的浓度为0.3 mg·L⁻¹时才有少量的体细胞胚发生且褐化严重。在添加IAA的各处理中, 虽均有一定数量的体细胞胚出现, 但继续培养, 畸形胚和瘤状结构增多, 并且在部分瘤状结构上萌发有数条细小的根系, 褐化也很严重, 丧失了继续发育成体细胞胚的潜能。

将上述体细胞胚转移至基本培养基上, 并将BA浓度升高至1 mg·L⁻¹, 继续培养、观察, 发现体细胞胚的发育潜力很大。先是胚芽和胚轴分化, 继而形成

表1 生长素对雷竹愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different auxins on inducing callus of *Phyllostachys violascens*

Number	Concentration of auxins (mg·L ⁻¹)			Callus inducing rate (%)	Browning degree	Note
	2,4-D	Picloram	NAA			
1	0	0	0	0 c	4.18 a	
2	0.5	0	0	26.87 abc	3.01 bc	Loose callus
3	1.0	0	0	48.52 ab	3.44 b	White soft fragile callus
4	2.0	0	0	62.38 a	4.18 a	White watermark loose callus
5	0	0.03	0	41.58 ab	2.59 df	More dense particles
6	0	0.10	0	62.38 a	2.27 fg	Many particles, yellow, compact hard
7	0	0.30	0	47.03 ab	2.57 efg	With dense, uneven
8	0	0	0.5	0 c	3.30 bc	
9	0	0	1.0	13.44 bc	2.59 df	No proliferation and procedures
10	0	0	2.0	27.72 abc	2.03 g	Shrinkage of tumor-like structure

多重比较采用邓肯氏新复极差(Duncan's SSR)法。不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。NAA: 萘乙酸

Data were means (Duncan's test SSR). Small letters represent significant difference at 0.05 level. NAA: Naphthalene acetic acid

表2 TDZ和ABA组合对雷竹胚性愈伤组织生长状态的影响

Table 2 Effect of TDZ and ABA interaction on embryogenic callus growing state of *Phyllostachys violascens*

Number	Concentration of auxins (mg·L ⁻¹)		Mass per culture (g)	Increase mass per culture (g)	Callus compact degree	Note
	TDZ	ABA				
1	0	0	2.25	0.474 14 e	3.439 67 d	No change
2	0	0.3	2.25	0.531 30 d	4.609 15 ab	Small particles into clumps
3	0	1.0	2.25	0.494 62 de	4.471 57 abc	Particle aggregation
4	0.001	0	2.25	1.483 61 b	3.429 92 d	White loose grain
5	0.001	0.3	2.25	1.545 48 a	4.640 48 a	Yellow mass, solid
6	0.001	1.0	2.25	1.538 91 ab	4.236 96 abc	Agglomerate, little browning
7	0.010	0	2.25	0.996 69 c	3.295 41 d	Slightly loose, many
8	0.010	0.3	2.25	1.058 04 c	4.505 97 ab	Particles slightly more dense
9	0.010	1.0	2.25	1.005 76 c	3.852 43 bcd	Browning increased significantly

多重比较采用邓肯氏新复极差(Duncan's SSR)法。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。TDZ: 噻重氮苯基脒; ABA: 脱落酸
Data were means (Duncan's test SSR). Small letters represent significant difference at 0.05 level. TDZ: Thidiazuron; ABA: Absciscic acid

表3 植物生长调节剂对雷竹体细胞胚诱导的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllostachys violascens*

Number	Concentration of auxins (mg·L ⁻¹)			Embryoid inducing rate (%)	Note
	NAA	IAA	IBA		
1	0	0	0	13.45 def	A small number of globular
2	0.03	0	0	68.79 ab	More globular embryo, a small number of pear-shaped embryo
3	0.10	0	0	87.43 a	Embryos of various shapes, clear and more pear-shaped embryo
4	0.30	0	0	67.25 ab	Globular embryo more closely integrated
5	1	0	0	48.16 bc	Embryo differentiation, root length significantly
6	0	0.03	0	40.35 bcd	Embryo takes the shape of radial
7	0	0.10	0	41.28 bcd	Part of the abnormal embryo morphology
8	0	0.30	0	33.63 cde	Browning increased
9	0	1	0	20.64 cdef	Showed tumor-like structures
10	0	0	0.03	0 f	
11	0	0	0.10	0 f	
12	0	0	0.30	6.88 ef	Browning seriously, difficult to continue development
13	0	0	1	0 f	

多重比较采用邓肯氏新复极差(Duncan's SSR)法。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。NAA: 萘乙酸; IAA: 吲哚乙酸; IBA: 吲哚丁酸
Data were means (Duncan's test SSR). Small letters represent significant difference at 0.05 level. NAA: Naphthalene acetic acid; IAA: Indole-3-acetic acid; IBA: Indolebutyric acid

胚根并不断伸长, 随着时间的推移, 胚根逐渐明显(图1J, K), 2个月后有小苗出现, 芽长约1 cm, 根长约2 cm, 长势健壮, 继代培养增殖良好(图1L)。

2.5 愈伤组织及其体细胞胚的细胞学观察

通过切片观察发现, 白色松散的非胚性愈伤组织、淡黄色致密的胚性愈伤组织和体细胞胚的细胞结构不同。非胚性愈伤组织由无规则的薄壁细胞构成, 细胞

体积大, 胞质稀少, 细胞核不明显, 较少形成细胞团结构且染色较浅(图4A); 胚性愈伤组织细胞体积小, 胞质浓厚, 细胞核大, 核仁明显, 染色深, 各个细胞结合紧密, 几乎不存在空隙, 具有继续分裂分化的潜能(图4B); 体细胞胚从胚性愈伤组织的最外层表面发育而来, 胚性愈伤组织首先在外围形成旺盛的生长区域, 这部分细胞类似于原形成层, 染色明显深于邻近细胞。胚性细胞不断地分裂, 形成多个细胞的小细

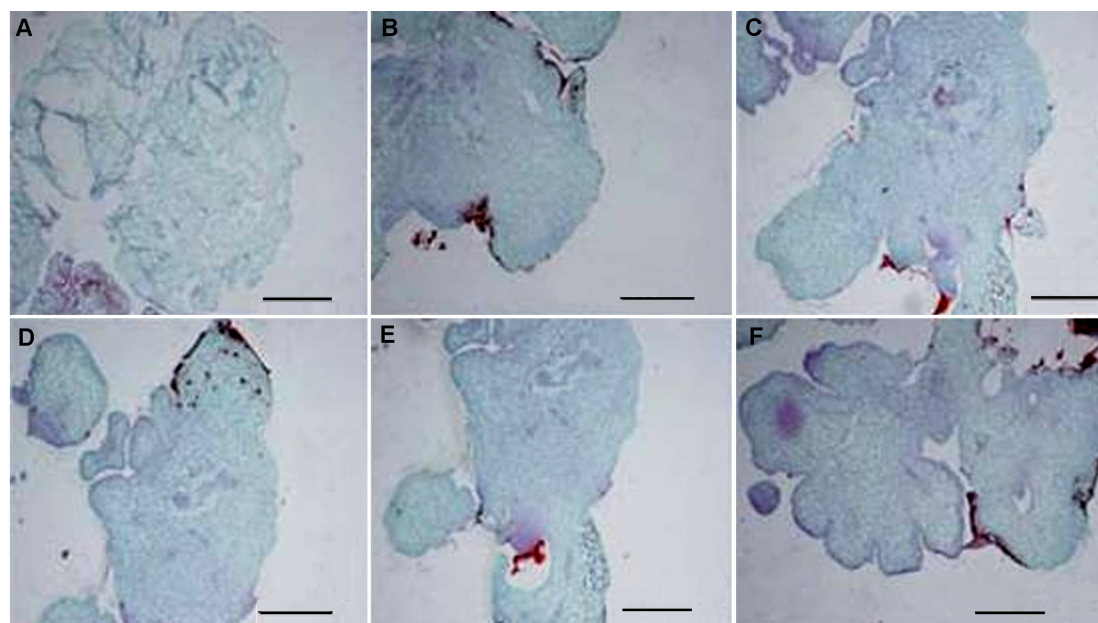


图4 雷竹体细胞胚诱导的切片观察

(A) 白色水渍状松散的愈伤组织; (B) 淡黄色致密的颗粒状愈伤组织; (C)–(F) 体细胞胚。Bar=200 μm

Figure 4 Microscopy observation of inducing somatic embryogenesis of *Phyllostachys violascens*

(A) White watermark loose callus; (B) Slightly yellow granular callus; (C)–(F) Somatic embryogenesis. Bar=200 μm

胞团, 成突起状。小细胞团内的细胞均是体积小、核大的胚性细胞, 具有旺盛的分裂能力, 进而使细胞团不断增大, 当细胞团增大到一定程度时, 新细胞团便会从整个组织中脱离出来, 并逐渐形成早期的多细胞球状原胚(图4C–F)。

2.6 讨论

无论是裸子植物还是被子植物, 在离体条件下, 它们的体细胞均有胚胎发生或器官发生的能力, 这是一种普遍现象(朱澍, 1978; 胡适宜, 1982; 崔凯荣等, 1993)。但大量的资料表明, 进行体细胞胚诱导或器官发生时, 选取外植体的时期十分关键(周俊彦, 1981; 袁澍等, 2003)。王玉英等(1981)对比单核早期与单核靠边期(双核期)的花药培养后, 指出单核靠边期是诱导辣椒(*Capsicum annuum*)愈伤组织的最佳时期。石太渊等(1999)指出诱导玉米(*Zea mays*)愈伤组织时, 其幼穗的诱导率最高, 成熟胚的诱导率较低。利用雷竹种胚为外植体诱导体细胞胚发生, 选取最佳胚体时期也至关重要。一般情况下, 越早期的细

胞, 其全能性越高, 脱分化诱导愈伤组织的效果越好(韩碧文和刘淑兰, 1998; 崔凯荣等, 2001)。雷竹的胚体有3种状态, 其中, 早期子叶胚最有利于诱导胚性愈伤组织。雷竹最早的球形胚虽然在悬浮状态下是一个自由滚动的独立球体, 但其体内胚体调控的生理机制尚不完善, 不具备执行细胞全能性的功能。晚期子叶胚则分化程度高, 不利于脱分化。

竹子的种胚来源有限, 因此筛选适宜的植物生长调节剂对诱导愈伤组织非常关键。许多研究表明(崔凯荣等, 2000; Kaur and Kothari, 2004): 2,4-D对愈伤组织诱导乃至整个体细胞胚发生必不可少。Evans等(1981)分析发现, 57.7%的双子叶植物和所有单子叶植物在体胚发生的诱导阶段均使用了2,4-D。禾本科植物愈伤组织的诱导则往往需要更高浓度的2,4-D。我们对雷竹的实验表明, 2,4-D对愈伤组织的产生必不可少, 它可使愈伤组织的出愈率增高, 前期增殖也较好, 但随着培养时间的延长(或反复继代), 一部分愈伤组织易碎并水渍化(或形成黄褐色瘤状结构), 不再具有发育能力; 另一部分愈伤组织虽长势较好, 但

也不再进一步发育,而被锁定在一个往复循环的增殖阶段。因此在对雷竹体细胞胚进行培养时,脱分化愈伤组织诱导后,必须及时降低2,4-D的浓度(或除去2,4-D),胚性愈伤组织才能够沿体细胞胚的发育途径正常发育。在一些文献中也有关于picloram诱导体细胞胚再生的报道(Groll et al., 2001; Karami et al., 2007)。对雷竹的研究表明, Picloram诱导愈伤组织的效果优于2,4-D,二者对出愈率和致密胚性愈伤率的影响差异不大,因此均适合雷竹愈伤组织的诱导,这可能与物种的不同有关。

大量的资料表明,愈伤组织一般可分为3种类型:(1) 柔软易碎的非胚性愈伤组织;(2) 淡黄色且外形结节状的致密胚性愈伤组织(吴益民, 1999),具有体细胞胚发生能力;(3) 黏性愈伤组织,散布于易碎型与致密型愈伤组织之间,具有体细胞胚发生能力,通过该种愈伤组织诱导体细胞胚再生植株效果最好。实验观察发现,致密胚性愈伤组织在添加ABA的培养基上生长,可防止后期出现畸形胚的异常增殖和水渍化现象,发育的体细胞胚的形态结构与合子胚十分相似,这很可能与ABA可诱导休眠、增强体细胞胚胎发生和防止畸形胚的产生等作用有关(黄学林和李筱菊, 1995),这也是胚性愈伤组织极性分化和体细胞胚发生的关键生理变化时期。此外,实验观察还发现,ABA的添加时间不宜过长,否则胚性愈伤组织的分泌物会增多,不利于其继续分化。TDZ是近年来发现的一种特殊的细胞分裂素类物质(Thomas and Katterman, 1986; Chalupa, 1988),低浓度的TDZ有利于雷竹胚性愈伤组织的增殖,TDZ通过调节生长素代谢可同时满足外植体对细胞分裂素和生长素的需求。目前也有关于TDZ对一些植物的愈伤组织诱导或体细胞胚胎发生影响的报道(Zhou et al., 1994; 徐晓峰和黄学林, 2003)。体细胞胚与合子胚的继续发育过程是否一致,有待进一步探究。

雷竹的胚性愈伤组织在最佳培养条件下可分化为体细胞胚,其分化率可达87%。但不能在培养基上反复继代保存,长时间培养,体细胞胚的形态发生能力会逐渐降低,甚至丧失,但执行器官和胚胎分化的功能不一定会随之消失。出现这种情况,可通过改变外部处理条件(如适当更换培养基成分)使细胞内在的分化潜力重新得到恢复,甚至有可能在完全褐化的组织中长出新生长点,进而再分化出胚性细胞团。其

机理可能与细胞或组织内激素平衡关系的改变或者细胞对外源生长物质敏感性的改变有关(周俊彦和郭扶兴, 1996; 魏岳荣等, 2007)。

参考文献

- 崔凯荣, 陈克明, 王晓哲, 王亚馥 (1993). 植物体细胞胚胎发生研究的某些现状. 植物学通报 10, 14-20.
- 崔凯荣, 邢更生, 周攻克, 刘新民, 王亚馥 (2001). 体细胞胚发生的生化基础. 生命科学 13, 28-33.
- 崔凯荣, 邢更生, 周攻克, 刘新民, 王亚馥 (2000). 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. 遗传 22, 349-354.
- 付顺华, 吴家森, 余永清, 朱玉球 (2002). 雷竹种子特性及苗期生长观察. 山东林业科技 (1), 11-12.
- 韩碧文, 刘淑兰 (1998). 植物离体体细胞胚胎发生. 植物生理学通讯 10, 9-15.
- 胡适宜 (1982). 被子植物胚胎学. 北京: 高等教育出版社. pp. 237-247.
- 黄学林, 李筱菊 (1995). 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控. 北京: 科学出版社. pp. 195-198.
- 阙国宁, 诸葛强 (1991). 竹子愈伤组织培养与植株再生. 竹子研究汇刊 10(4), 79-80.
- 石太渊, 杨立国, 杜艳艳 (1999). 玉米体细胞培养中不同基因型和外植体的反应. 国外农学——杂粮作物 19(5), 11-14.
- 王裕霞, 曾庆圣, 陈远玲, 罗建群, 陈凤如 (2007). 丛生观赏竹组培微繁殖与诱变的初步研究. 竹子研究汇刊 26(4), 11-16.
- 王玉英, 李春玲, 蒋钟仁 (1981). 辣椒和甜椒花药培养的新进展. 园艺学报 8(2), 41-45.
- 魏岳荣, 杨护, 黄秉智, 黄霞, 黄学林, 邱继水, 许林兵 (2007). Picloram, ABA和TDZ对香蕉体细胞胚胎发生的影响. 园艺学报 34, 81-86.
- 吴益民 (1999). 当前竹子的组织培养和植株再生研究. 竹子研究汇刊 18, 32-37.
- 徐华松, 徐九龙, 黄学林 (1996). TDZ在植物组织培养中的作用. 广西植物 16, 77-80.
- 徐晓峰, 黄学林 (2003). TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报 20, 227-237.
- 袁金玲, 顾小平, 李潞滨, 岳晋军, 姚娜, 郭广平 (2009). 孝顺竹愈伤组织诱导及植株再生. 林业科学 45, 35-40.
- 袁澍, 贾勇炯, 林宏辉 (2003). 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素. 植物生理学通讯 39, 508-512.

- 周键, 孙建波, 彭明 (2008). 高等植物体细胞胚胎发生的研究进展. 中国农学通报 **24**(2), 129–133.
- 周俊彦 (1981). 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体. I. 植物体细胞的胚状体发生. 植物生理学报 **7**, 389–397.
- 周俊彦, 郭扶兴 (1996). 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚发生中的作用. 植物生理学通讯 **34**, 247–253.
- 朱激 (1978). 植物组织培养中的胚状体. 遗传学报 **5**, 79–88.
- Chalupa V (1988). Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol Plant* **30**, 414–421.
- Evans DA, Sharp WR, Flick CE (1981). Growth and behavior of cell cultures. In: Thorpe TA, ed. *Plant Tissue Culture—Methods and Applications in Agriculture*. New York: Academic Press. pp. 45–113.
- Groll J, Mycock DJ, Gray VM, Laminski S (2001). Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **65**, 201–210.
- Huang LC, Murashige T (1983). Tissue culture investigation of bamboo. I. Callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. *Bot Bull Acad Sin* **24**, 31–52.
- Karami O, Deljou A, Pour AM (2007). Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. *Plant Growth Regul* **51**, 33–39.
- Kaur P, Kothari SL (2004). *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **77**, 73–79.
- Metha U, Rao IVR, Ram HYM (1982). Somatic embryogenesis in bamboo. In: Proc 5th International Congress of Plant Tissue Cell Culture. pp. 109–110.
- Thomas JC, Katterman FR (1986). Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiol* **81**, 681–683.
- Yeh ML, Chang WC (1986). Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence of *Bambusa beecheyana* Munro var. *becchcyana*. *Plant Cell Rep* **5**, 409–411.
- Zhou JY, Ma H, Guo FX, Luo XT (1994). Effect of thidiazuron of somatic embryogenesis in *Cayratia japonica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **36**, 73–79.

A Preliminary Study of Somatic Embryogenesis of *Phyllostachys violascens* In Vitro

Haiyan Pei¹, Xinchun Lin¹, Wei Fang¹, Lichun Huang^{2*}

¹The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China; ²Institute of Botany, "Academia Sinica", Taipei 115, China

Abstract *Phyllostachys violascens* zygotic embryos served as explants in inducing somatic embryo and subsequent plant regeneration. Murashige and Skoog salts with 20 g·L⁻¹ glucose, 10 mg·L⁻¹ adenine sulfate, 0.5 g·L⁻¹ malt extract, 0.1 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.01 mg·L⁻¹ 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram) and 10 g·L⁻¹ type A agar was selected as the basal medium for inducing somatic embryo. Early cotyledon embryos were used as explants for inducing compact callus formation in basal medium with increased picloram (0.1 mg·L⁻¹). This medium was the best for inducing embryogenic callus. Somatic embryogenesis reached 87.4% when embryogenic callus was transferred to the medium and supplemented with 0.001 mg·L⁻¹ thidiazuron and 0.3 mg·L⁻¹ abscisic acid for 4 weeks, then abscisic acid removed and 0.1 mg·L⁻¹ N-acetyl-aspartate added for 1 month. Small plantlets were finally observed when 6-BA was increased to 1 mg·L⁻¹ after 2 months in culture. Histological examination of somatic embryo illustrated large nuclei and dense cytoplasm cells, paired with globular proembryos.

Key words callus, histology, *Phyllostachys violascens*, somatic embryo

Pei HY, Lin XC, Fang W, Huang LC (2011). A preliminary study of somatic embryogenesis of *Phyllostachys violascens* in vitro. *Chin Bull Bot* **46**, 170–178.

* Author for correspondence. E-mail: lchuang@zafu.edu.cn