

甘草花丝的胚性愈伤组织诱导 及其体细胞胚的发生*

苟克俭 任 茜

(陕西中药研究所, 陕西咸阳·712100)

S 567.710.3

摘 要 甘草花丝通过离体培养, 在 MS 培养基上形成无结构的愈伤组织。通过调整生长素和细胞分裂素的配比, 使其由无结构的愈伤组织转化为胚性愈伤组织, 进而发育成完整的体细胞胚。胚胎学观察表明, 由体细胞胚发育成的小植株, 其最初的来源是单个细胞。

关键词 甘草, 花丝, 胚性愈伤组织, 胚胎发生

中图分类号 S567.710.353

甘草是重要的常用中药, 由于无计划的采挖, 导致我国各主要产区均面临资源枯竭、质量下降的局面。改良品质、培养良种以促进甘草人工栽培事业的发展已经势在必行。本文报道甘草的体细胞胚胎发生。旨在探讨将基因工程技术^[1]应用于甘草育种的可能性。

1 材料和方法

供试材料 采用野生甘草(*Glycyrrhiza uralensis*), 取小孢子发育阶段为单核靠边期花蕾, 常规表面灭菌, 在无菌条件下剥取花丝、平放于诱导培养基表面, 每管接种10枚, 于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 散射光下培养。

诱导培养 采用 MS 分别附加 GA_3 , $\text{IAA}_{0.1}$, $\text{NAA}_{0.1}$, KT_1 , BA_1 , BA_5 , $\text{BA}_{0.5} + \text{NAA}_{0.5}$, $\text{BA}_{2.5}$ 各 30 mg/L 与不同浓度的 IAA, NAA 组合。

分化培养 为 $1/2\text{MS} + \text{BA}_5 + \text{NAA}_{0.01}$ 。日光灯照明 12 h/d, 照度约 1500 lx。

各种培养基中均添加 $\text{CH}_1\text{g/L}$, $\text{peptone} 1\text{g/L}$, $\text{su} 3\%$, 用 0.7% 琼脂固化。在分化培养中, 不同时间取愈伤组织用纳瓦兴式固定液固定 24 h, 酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。切片厚度 6~8 μm , 香红、固绿对染, 加拿大树胶封片、观察、照像。

2 试验结果

2.1 愈伤组织的诱导

在诱导培养基 $\text{MS} + \text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_{0.5-10}$ 上培养 8~10 d 后, 大部分花丝脱分化形成由薄壁细胞(图1)组成的淡黄色、无结构的愈伤组织; 培养至 20~30 d, 各花丝愈伤组织连在一起, 发育成为约 1cm^3 大小的愈伤组织块; 将这种愈伤组织分割成约 1 mm 大小后移入 $\text{MS} + \text{BA}_{0.5-2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{IAA}_{0.1-10}$ 的培养基上继续培养, 能迅速发育长大, 在 30 d 内发育成 2~3 cm 大小; 经 10 多次转移培养, 其生长速度未见减弱。培养转移后, 其留在培

收稿日期: 1992-05-25.

* 国家“七五”攻关项目。

养瓶内的残渣也能在原培养基上生长,在30d长至1cm大小。

1.2 不同培养基诱导愈伤组织的效果

在诱导培养中,以MS为基本培养基,单一的激素不能诱导出花丝愈伤组织。给培养基添加 $BA_{2.5}+IAA_{0.5}+NAA_5$ 时,诱导率最高,可以达到73%(附表)。

1.3 体细胞胚的形成

将由薄壁细胞组成的愈伤组织转移至分化培养基 $1/2MS+BA_5+NAA_{0.01}$ 上,经过10d以上培养,原先没有结构的愈伤组织形成一些3~5mm大小的团粒聚集在一起的愈伤组织块。这时的切片表明,在薄壁细胞中形成了一些特殊的细胞,这些细胞的原生质较浓、染色较深、细胞核较大(图2),这与胚性愈伤组织的特点^[2]完全一致。在随后的培养过程中,这种单个的特殊细胞通过

附表 不同培养基对愈伤组织诱导率的影响

诱导培养基 (mg/L)	接种 花药数(个)	获愈伤 组织(个)	诱导率(%)
MS	80	0	0
MS+(GA ₃) ₃₀	110	0	0
MS+IAA ₁	70	0	0
MS+NAA ₁	90	0	0
MS+KT ₁	80	0	0
MS+BA ₁	90	0	0
MS+BA ₅	70	0	0
MS+BA _{0.5} +NAA _{0.5}	90	27	30
MS+BA _{2.5} +IAA _{0.2} +NAA ₂	100	70	70
MS+BA _{2.5} +IAA _{0.5} +NAA ₅	110	80	73
MS+BA _{2.5} +IAA _{0.5} +NAA ₁₀	80	40	50

细胞分裂,形成二细胞和多细胞的细胞团(图3,4)以及球形胚、子叶形胚。胚胎学观察表明,由甘草花丝诱导经过愈伤组织阶段而形成的体细胞胚,其发展过程与合子胚的发育过程非常相似(图4~7)。

1.4 完整植株形成

将发育至子叶形胚阶段的体细胞胚转移至 $1/2MS$ 无激素培养基上,经10d左右培养后,即可形成完全的小植株。未及时转移的体细胞胚在分化培养基上保留约一个月后,反而失去分化状态,再次成为一团无结构的愈伤组织。

3 讨 论

1)当前在植物组织培养中,体细胞胚的发生和发育已成为一个重要领域。国内外有关通过体细胞胚途径形成植株的报道很多^[3],但对甘草体细胞胚的研究目前尚未见报道。

2)观察表明,甘草花丝培养中所诱导的体细胞胚是由单个的胚性细胞通过细胞分裂形成的,说明由体细胞发育成的小植株,其最初的来源是单个的胚性细胞。这与谷祝平等的报道是一致的^[2]。

3)本研究结果表明,在MS为基本培养基的条件下,单一的生长素或细胞分裂素不能诱导产生体细胞胚。适当浓度的BA与NAA相配合是产生甘草花丝体细胞胚的必要条件。说明甘草花丝胚性愈伤组织的诱导过程,对激素的要求是比较严格的。

4)在 $1/2MS+BA_5+NAA_{0.01}$ 的分化培养基上,甘草花丝体细胞胚在发育至子叶期后,经过30d培养,再次呈去分化状态,形成一团无结构的愈伤组织,这与红豆草体细胞胚在其LS-2培养基上的表现较为相似^[2]。可能意味着甘草体细胞胚的子叶在1500lx光照下,能够形成一些生长素,这些新产生的生长素被运输到培养基中后,与培养基中原有的

激素一起形成新的激素配比,迫使体细胞胚转向去分化状态,从而再次形成愈伤组织团。

5)甘草花丝体细胞胚发育过程的研究不够仔细,分化率还不够高,这些均有待于进一步研究。



图1~7 甘草花丝的胚性愈伤组织诱导及其体细胞胚发生

图1. 薄壁细胞, $\times 280$; 图2. 单个的胚性细胞, $\times 700$; 图3. 二细胞胚性细胞团, $\times 700$; 图4. 多细胞胚性细胞团, $\times 700$; 图5. 球形胚, $\times 280$; 图6. 子叶形胚, $\times 280$; 图7. 体细胞胚, $\times 444$ 。

参 考 文 献

- 1 吴国良, 叶和春, 李国凤等. 芦苇胚性愈伤组织的形成及植株的再生. 植物学报, 1987, 29: 361~366
- 2 谷祝平, 郑国昌. 红豆草组织培养中体细胞胚的形成及其胚胎学观察. 实验生物学报, 1987, 20(1): 23~29
- 3 韩碧文, 刘淑兰. 植物离体细胞胚胎发生. 植物生理学通讯, 1988, (1): 9~15

Induction of Embryogenic Callus and Somatic Embryogenesis in Vitro Filament Culture of *Glycyrrhiza Uralensis*

Gou Kejian Ren Qian

(Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China, 712000)

Abstract Callus were formed on MS medium by in vitro culture in filaments of *Glycyrrhiza uralensis*. Embryogenic callus developed from somatic embryo were induced by regulating the rate between IAA and CTK. Embryological observations indicated that the original source of the plantlets developed from somatic embryogenic cells is a single embryogenic cell.

Key words *Glycyrrhiza uralensis*, filament embryogenic cell, embryogenesis