

‘长林 53 号’油茶胚发育特征分析 及体胚再生体系优化

胡玉玲, 姚小华*, 任华东, 王开良, 龙 伟

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400)

摘 要: 为了进一步优化普通油茶再生体系并了解外植体生理变化特点, 选择普通油茶‘长林 53 号’不同时期的胚作为体胚再生体系的外植体, 进行多因素多水平正交试验, 同时测定和分析不同胚龄的胚生理生化指标。结果表明: 7、8 月份为茶果的快速生长期, 此时胚中可溶性蛋白、果糖和蔗糖含量逐渐上升, 可溶性总糖含量呈双峰曲线变化, 7 月 27 日, 幼胚中 ABA 含量($110.13 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)及 ABA 与 ZR 含量比值(13.47)都达到最高; 体胚再生体系构建过程表明, 2,4-D 对体胚诱导影响最大, 其次是胚龄; ‘长林 53 号’油茶最佳体胚诱导方法为选择茶果快速膨大期(7 月 27 日)的幼胚作为外植体, 最佳诱导配方为 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TDZ} + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Gly}$; IAA 对胚状体萌发影响最大, 胚状体萌发和组培苗生长最佳配方为 $\text{MS} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TDZ} + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CH}$ 。

关键词: 再生体系优化; 长林 53 号; 生理生化; 胚龄

中图分类号: Q813.1; Q945.6 **文献标志码:** A

Optimization of ‘Changlin 53’ Somatic Embryogenesis Regeneration System and Physiological and Biochemical Characteristics of Explant

HU Yuling, YAO Xiaohua*, REN Huadong, WANG Kailiang, LONG Wei

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China)

Abstract: To further optimize *Camellia oleifera* regeneration system, and to understand about the physiological characteristics of different age of explants, we chose ‘Changlin 53’ young embryo, made multi-factor and multi-level orthogonal experiment. The results showed that: The fruit rapid growth in July and August, the content of soluble protein, total soluble sugar and sucrose slowly increased in this time. The content of ABA($110.13 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), the ratio ABA and ZR(13.47) reached the highest in immature embryo. Effect of the inducing 2,4-D on somatic embryo was the largest, followed by was embryo age. The optimal formula of ‘Changlin 53’ somatic embryo induction was took in MS added $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT}$, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TDZ}$ and $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Gly}$, then took the immature embryo in rapid expanding period as explants. Great influence of the IAA on embryoids germination, the optimal formula of somatic embryo germination and plantlet growth was in MS added $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TDZ}$ and $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CH}$.

Key words: regeneration system optimization; Changlin 53; physiology and biochemistry; embryo age

收稿日期: 2014-05-26; 修改稿收到日期: 2014-10-08

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2009BADB1B01); 油茶产业升级关键技术研究与示范项目(2009BADB1B00)

作者简介: 胡玉玲(1977—), 男, 博士, 主要从事经济林栽培和育种研究。E-mail: huyulin@126.com

* 通信作者: 姚小华, 研究员, 博士生导师, 主要从事经济林栽培和育种研究。E-mail: yaoxh168@163.com

普通油茶(*Camellia oleifera* Abel)是中国目前油茶栽培的重要物种,无论其产量、栽培面积和适生范围都比其他油茶明显大,因此开展对普通油茶研究具有重要意义^[1]。中国油茶经过近 60 年的发展,普通油茶的常规育种和栽培研究达到了空前水平,进入 21 世纪以来,国家投入了大量人力和物力,油茶产量虽有相当程度的提高,但是依然没有从根本上解决油茶产量问题,从而制约了油茶产业的可持续发展^[2-3]。因油茶生产要素成本增加、环境恶化和茶油品质市场要求提高,对油茶分子水平的研究优势日益凸显,其中基因工程和油茶功能基因组学是油茶分子水平研究的重要内容,油茶组培再生体系是油茶基因工程和功能基因组学研究的重要基础,因此构建高效稳定油茶组培再生体系,对油茶的发展具有重要作用。

油茶组培再生体系构建与外植体基因型(品种)、生理状态(胚龄)关系非常紧密^[4-6],本课题组前期的研究发现,普通油茶‘长林 53 号’较易实现体胚再生,并初步确定了基础培养基和加入植物激素及添加物的种类^[7]。为了进一步优化普通油茶组培再生体系和选择最合适胚龄的外植体,并筛选出较容易进行体胚再生的外植体类型,以普通油茶‘长林 53 号’不同时期的幼胚为外植体材料,进一步进行组培再生体系优化,构建高效而稳定的组培再生体系,并确定最易诱导体胚幼胚的胚龄,分析外植体形态和生理特征,以期凭此外植体特征进一步筛选出更多的油茶品种及外植体类型,为油茶基因工程和功能基因组学的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及方法

采样地点为浙江金华东方红林场,于 2013 年 7 月 7 日开始采样,每隔 10 d 采样 1 次,采样标准为选择健康、发育程度和大小接近一致的茶果,当日完成接种。具体如步骤下:幼果采回后,马上取出幼胚,用无菌水冲洗 3 次,然后在超净台用 75%酒精灭菌 1 min,再用 0.1%的 HgCl₂ 灭菌 15 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次,灭菌好的幼胚,用手术刀去除种壳和种皮,将幼胚切成 4~8 块,接种于 60 mm 培养皿中,每皿接种 7~11 个外植体(图版 I, A),每处理为 18 皿,重复 3 次然后在室温为 25 ℃,日照长度为 14 h,光照度为 1 000 lx·m⁻² 条件下培养。

1.2 外植体形态和生理指标测定

随机选择 30 个油茶果,用游标卡尺测定果高和果径大小,用电子称测定果重及籽重,计算出籽率;用考马斯亮蓝比色法测定幼胚中可溶性蛋白含量,用蒽酮比色法测定幼胚中可溶性糖含量,用间苯二酚比色法测定幼胚中蔗糖和果糖含量,用“酶联免疫法”测定幼胚中激素(IAA、GA、ZR 和 ABA)含量^[8-10]。

1.3 再生体系优化试验

1.3.1 体胚诱导 外植体经灭菌后接种在添加不同质量浓度的 2,4-D、KT、TDZ 及 CH 和 Gly 的 MS 培养基中,处理安排采用不同水平的正交试验设计,即 1 个因素为 9 个水平,4 个因素为 3 个水平,试验因素安排及水平见表 1 设计,每 40 d 后进行 1 次继代培养,120 d 后对体胚发生情况进行调查

表 1 L₂₇(9¹×3⁴)正交试验因素和水平
Table 1 Factors and levels of L₂₇(9¹×3⁴) orthogonal experiment/(mg·L⁻¹)

水平 Level	采样时间(月-日) Sampling time (month-day)	激素水平 Hormone			添加物 Additive	第 6 列 Sixth	第 7 列 Seventh	第 8 列 Eighth	第 9 列 Ninth
		2,4-D	KT	TDZ					
1	07-07	0.5	0.5	0.05	0				
2	07-17	1	1	0.5	500(CH)				
3	07-27	5	5	2	500(Gly)				
4	08-06								
5	08-16								
6	08-26								
7	09-05								
8	09-15								
9	09-25								

注:本次试验的添加物为水解络蛋白(CH)和 L-甘氨酸(Gly);第 6 列为不同胚龄的胚与 TDZ 及 2,4-D 与 KT 互作,第 7 列为 2,4-D 与添加物及 KT 与 TDZ 互作,第 9 列为 KT 与添加物互作,下面出现表示都相同。

Note: Additives in this test referred to hydrolysis complex protein (CH) and glycine (L-Gly); The sixth column referred to different embryonic age of embryo with TDZ and 2,4-D with KT interaction term, the seventh column referred to 2,4-D with the additives and KT with TDZ interaction term, the ninth column referred to KT with the additives interaction term. The same as below.

表 2 $L_8(4^1 \times 2^4)$ 正交试验因素和水平Table 2 Factors and levels of $L_8(4^1 \times 2^4)$ orthogonal experiment/(mg · L⁻¹)

水平 Level	激素水平 Hormone			水解酪蛋白 CH	甘氨酸 Gly	第 6 列 Sixth
	IAA	6-BA	TDZ			
1	0	1	0.5	0	0	
2	1	2	1	500	500	
3	2					
4	4					

(图版 I, C), 并统计诱导率, 胚性愈伤组织诱导率 = 胚性愈伤组织块数/接种外植体数。

1.3.2 体胚萌发及生长 将已经诱导出胚状体(图版 I, D)的愈伤组织接种在添加不同质量浓度的 IAA、6-BA、TDZ、CH 和 Gly 的 MS 培养基中, 处理安排也采用混水平的正交试验设计, 即 1 个因素为 4 个水平, 4 个因素为 2 个水平, 试验因素安排及水平见表头设计(表 2), 第 6 列为 IAA 与 Gly 和 6-BA 与 CH 交互项, 接种 40 d 后调查体胚生长状况(图版 I, E), 并统计体胚萌发率, 体胚萌发率 = 已萌发数/胚状体总数, 通过不断继代培养观察组培苗的生长情况(图版 I, G)。

1.4 数据分析

采用 DPS 12.1^[11] 和 Microsoft office 2010 进行相关数据处理和分析, $P \leq 0.05$ 表示显著差异, $P \leq 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 油茶果生长发育过程茶果相关指标变化

从图 1 可以看出, ‘长林 53 号’油茶果重随着果实发育, 重量逐渐增加, 其中在 7 月份增加幅度较大, 果径和果高也逐步增加, 其中果径在 7 月份增加明显, 在 8 月份后增加幅度较小; 油茶果的出籽率总体呈上升趋势, 其中在 7 月 27 日、8 月 26 日和 9 月 25 日出籽率相对较低, 在 7 月 27 日时出籽率最小, 仅为 42.77%。

2.2 幼胚中生理指标变化

2.2.1 碳氮化合物含量变化 从图 2 可以看出, 幼胚中可溶性蛋白含量随着幼胚发育稳定上升, 9 月 5 日后上升幅度非常明显, 在 9 月 15 日达到了最高点(22.01%), 随着种子成熟胚中可溶性蛋白含量又下降; 幼胚中可溶性总糖含量随着幼胚发育总体呈现 3 峰曲线变化, 峰值出现时间点分别为 7 月 17 日、8 月 16 及 9 月 5 日, 峰值随着茶果发育略有下降, 在 9 月 5 日开始随着幼胚成熟可溶性总糖含量急剧下

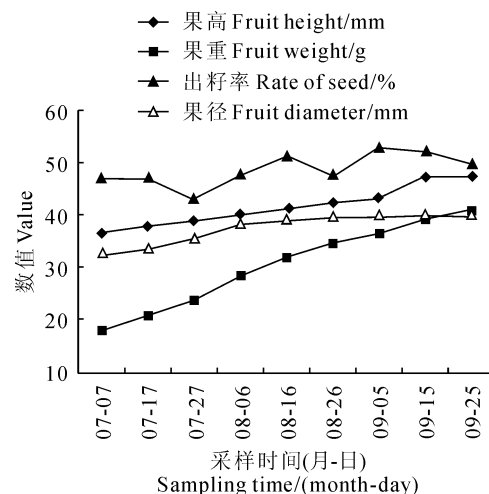


图 1 茶果相关指标变化

Fig. 1 Changes of index on fruit

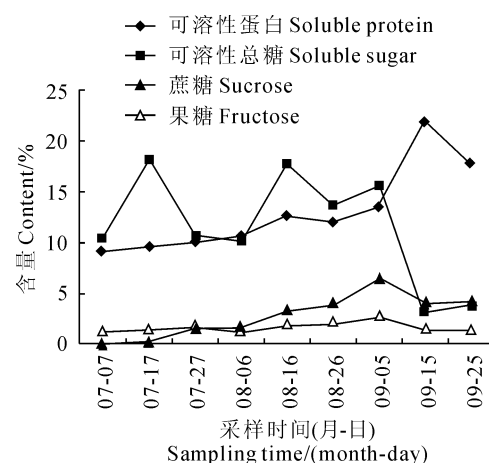


图 2 幼胚中碳氮化合物含量变化

Fig. 2 Changes of nitrogen and carbon compounds in immature embryo

降; 幼胚中蔗糖和果糖含量在 9 月 5 日前缓慢上升, 9 月 5 日后开始缓慢下降, 幼胚中蔗糖和果糖含量变化在一定程度上呈相互消长的关系。

2.2.2 幼胚中激素含量变化 由图 3 可知, 幼胚中 ABA 和 IAA 含量比 GA 和 ZR 含量高, 在幼胚发育早期, 幼胚中 ABA 含量随环境温度的升高迅速增加, 在环境温度超过 40 °C 时(7 月 27 日), 幼胚中 ABA 含量达到 110.13 ng · g⁻¹, 超过了正常水平的 3 倍, 在该过程中 IAA、GA 和 ZR 含量都略有上升趋势, 8 月份开始由于下雨及对油茶进行人工灌溉, 茶果中的幼胚 ABA 含量迅速下降, 其他 3 种激素也有不同程度的下降, 在其后随着幼胚生长发育及环境温度变化 ABA 含量呈上下波动变化, 9 月份开始则呈现持续下降趋势, IAA 和 GA 含量则出现上升-下降-上升变化趋势, ZR 含量变化不明显。

2.2.3 幼胚中不同激素含量比值变化 从图 4 可以看出,ABA 与 ZR 比值在采用初期随着环境温度升高,比值迅速增大,在 7 月 27 日最高,接近其他生长时期的 4 倍,随后又迅速下降,随着幼胚的成熟比值不断变小;IAA 与 GA 和 IAA 与 ZR 比值变化呈现双峰曲线,后者峰型较平缓,前者开始比值下降而后者则略有上升趋势;幼胚中 ZR 与 GA 比值在整个发育过程中变化较平缓,IAA 与 ABA 比值在发育初期下降幅度明显,随后出现上升-下降-上升-下降-上升变化,在 9 月 25 日比值达到最大。

2.3 油茶胚性愈伤组织诱导体系优化

2.3.1 试验因素对胚性愈伤组织诱导影响 为了解不同试验因素及不同试验因素间的互作对胚性愈伤组织诱导率的影响,对试验结果进行了方差分析,从表3可看出胚龄及2,4-D对体胚诱导率有极显著

影响,胚龄和添加物互作及 2,4-D 和 TDZ 互作,对体胚诱导率有显著影响,从极差可看出,2,4-D对体胚诱导率影响最大,其次是胚龄,随后是 KT 与添加物互作,胚龄和添加物互作及 2,4-D 和 TDZ 互作,随后为 KT 和 TDZ,影响最小的是添加物。

2.3.2 试验各因素互作效应分析 从表 4 可以看出,胚龄第三水平(7 月 27 日)和 2,4-D 第一水平($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)互作时体胚诱导率最高,胚龄第三水平(7 月 27 日)和 KT 第一水平($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)互作时体胚诱导率最高,胚龄第三水平(7 月 27 日)和 TDZ 第一水平($0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)互作时体胚诱导率最高,胚龄第三水平(7 月 27 日)和 Gly 互作时体胚诱导率最高,胚诱导率都为 0.83。从同水平因子互作表(表 5)可以看出,2,4-D 第一水平($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 KT 第一水平 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)互作对体胚诱

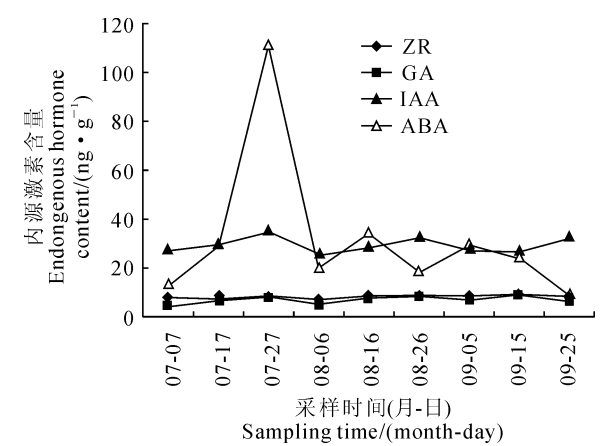


图 3 幼胚中激素含量变化
Fig. 3 Changes of endogenous hormone content in immature embryo

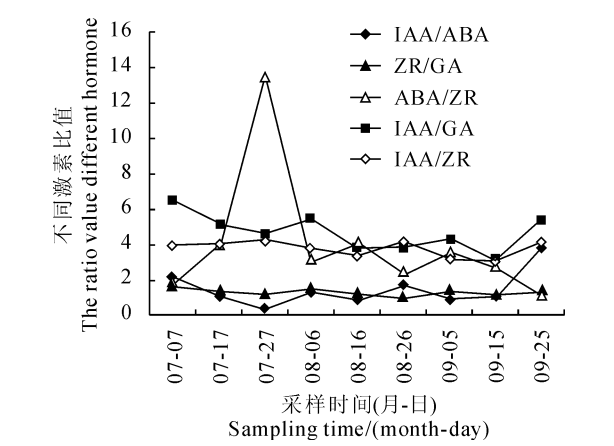


图 4 幼胚中不同激素对比变化
Fig. 4 Comparison of different hormones in immature embryo

表 3 正交设计方差分析表
Table 3 Orthogonal experimental design analysis of variance

变异来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P	极差 Range
区组 Block	0.052 3	2	0.026 2			
胚龄 Age	1.025 5	8	0.128 2	8.738 8	0	0.183 3
2,4-D	0.991 9	2	0.495 9	33.807 8	0	0.413
KT	0.087 9	2	0.044 0	2.997 2	0.058 6	0.124
TDZ	0.060 0	2	0.030 0	2.044 6	0.139 7	0.102 7
添加物 Additives	0.016 9	2	0.008 5	0.576 1	0.565 6	0.050 7
第 6 列 The sixth column	0.116 3	2	0.058 2	3.964 2	0.025 0	0.141 7
第 7 列 The seventh column	0.018 3	2	0.009 2	0.625 5	0.539 0	0.055 4
第 8 列 The eighth column	0.145 6	2	0.072 8	4.962 6	0.010 7	0.162
第 9 列 The ninth column	0.035 5	2	0.017 7	1.208 9	0.306 8	0.077 9
误差 Error	0.762 8	52	0.014 7			
总和 Sum	3.443 8					

表 4 不同因子间不同水平互作效应
Table 4 Interaction among different factors

水平 Level	胚龄与 2,4-D Embryo age and 2,4-D			胚龄与 KT Embryo age and KT			胚龄与 TDZ Embryo age and TDZ			胚龄与添加物 Embryo age and additive		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0.67	0.39	0.45	0.67	0.39	0.45	0.67	0.39	0.45	0.67	0.39	0.45
2	0.72	0.61	0.22	0.72	0.61	0.22	0.72	0.61	0.22	0.22	0.72	0.61
3	0.83	0.45	0.31	0.83	0.45	0.31	0.83	0.45	0.31	0.45	0.31	0.83
4	0.35	0.41	0.30	0.30	0.35	0.41	0.41	0.30	0.35	0.35	0.41	0.30
5	0.50	0.31	0.43	0.43	0.50	0.31	0.31	0.43	0.50	0.43	0.50	0.31
6	0.56	0.26	0.17	0.17	0.56	0.26	0.26	0.17	0.56	0.26	0.17	0.56
7	0.40	0.20	0.00	0.20	0.00	0.40	0.00	0.40	0.20	0.40	0.20	0.00
8	0.48	0.30	0.33	0.30	0.33	0.48	0.33	0.48	0.30	0.33	0.48	0.30
9	0.28	0.23	0.20	0.23	0.20	0.28	0.20	0.28	0.23	0.23	0.20	0.28

导率最高(0.74),2,4-D 第一水平(0.5 mg · L⁻¹)和 TDZ 第一水平(0.05 mg · L⁻¹)互作对体胚诱导率最高(0.74),2,4-D 第一水平(0.5 mg · L⁻¹)和 CH 互作对体胚诱导率最高(0.57),KT 第一水平(0.5 mg · L⁻¹)和 TDZ 第一水平(0.05 mg · L⁻¹)互作对体胚诱导率最高(0.74),KT 第一水平(0.5 mg · L⁻¹)和 Gly 互作对体胚诱导率最高(0.47),TDZ 第一水平(0.05 mg · L⁻¹)和 CH 互作或者 TDZ 第三水平(0.05 mg · L⁻¹)和 Gly 互作对体胚诱导率最高(0.44)。综合各因子间的互作效益可以初步判断,在 Time₃ 2,4-D₁KT₁TDZ₁CH 组合时对体胚诱导率最高,从正交表中可以找到该处理组合刚好是正交设计表中的处理 7,从各处理的体胚诱导均值比较来看也为处理 7 最高(0.83),因此得出最佳处理组合较可靠。

2.4 胚状体萌发及生长的培养基配方优化

2.4.1 试验因素对胚状体萌发及生长的影响 为探讨不同试验因素对胚状体的萌发及生长的影响,对试验结果进行了观察,并对萌发率数据进行方差

表 5 不同因素相同水平间互作效应
Table 5 Interaction among different factors

		水平 Level		
		1	2	3
2,4-D 与 KT 2,4-D and KT	1	0.74	0.24	0.30
	2	0.47	0.48	0.18
	3	0.39	0.33	0.33
2,4-D 与 TDZ 2,4-D and TDZ	1	0.74	0.33	0.18
	2	0.39	0.48	0.30
	3	0.47	0.24	0.33
2,4-D 与添加物 2,4-D and additive	1	0.48	0.31	0.33
	2	0.57	0.33	0.23
	3	0.56	0.40	0.25
KT 与 TDZ KT and TDZ	1	0.74	0.18	0.33
	2	0.30	0.48	0.39
	3	0.24	0.47	0.33
KT 与添加物 KT and additive	1	0.45	0.38	0.29
	2	0.36	0.36	0.40
	3	0.47	0.39	0.35
TDZ 与添加物 TDZ and additive	1	0.42	0.43	0.27
	2	0.44	0.35	0.34
	3	0.38	0.40	0.44

表 6 正交设计方差分析表
Table 6 Orthogonal experimental design analysis of variance

变异来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P	极差 Range
区组 Block	0.056 8	2	0.028 4			
IAA	0.201 0	3	0.067 0	4.449 9	0.021 5	0.164 0
6-BA	0.039 1	1	0.039 1	2.599 0	0.129 2	0.114 7
CH	0.033 7	1	0.033 7	2.240 1	0.156 7	0.106 5
Gly	0.033 6	1	0.033 6	2.230 0	0.157 5	0.106 2
互作 Interaction	0.780 6	1	0.780 6	51.832 8	0	0.512 2
误差 Error	0.210 8	14	0.015 1			
总和 Sum	1.355 8					

分析,从表 6 可看出,多因子互作对体胚萌发效率有极显著影响,生长素对体胚萌发效率有显著影响,其他因素则影响不显著。从极差可看出多因子互作对体胚萌发影响最大,其次是生长素,再次为 6-BA, CH 和 Gly 影响程度接近。

2.4.2 试验各因素互作效应分析 从表 7 可以看出,IAA 第三水平($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 6-BA 第二水平($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)互作对胚状体萌发诱导率最高,IAA 第三水平($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 Gly($500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)互作对胚状体萌发诱导率最高,胚状体萌发诱导率都为 0.73。因此初步可以判定在处理组合 IAA₃6-BA₂Gly₂ 对胚状体萌发最为有利(0.73),该处理组合刚好在正交表中第 6 处理,从表 8 多重比较可以看出,最好的处理也是处理 6,在处理 6 时胚苗生长状态也最好,说明试验结果可靠性较高,因此选择处理 6 组合最佳,即在 MS 培养基中添加 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IAA 和 6-BA,同时添加 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Gly。

表 7 不同因素间互作效应

Table 7 Interaction among different factors

水平 Level	IAA 与 6-BA IAA and 6-BA		IAA 与 CH IAA and CH		IAA 与 Glycine IAA and Glycine	
	1	2	1	2	1	2
1	0.450 3	0.170 2	0.450 3	0.170 2	0.450 3	0.170 2
2	0.422 2	0.713 9	0.422 2	0.713 9	0.713 9	0.422 2
3	0.140 2	0.731 5	0.731 5	0.140 2	0.140 2	0.731 5
4	0.597 2	0.317 5	0.317 5	0.597 2	0.317 5	0.597 2

表 8 多重比较和生长情况

Table 8 Multiple comparison and growth

处理号 Treatment	均值 Mean	处理 Treatment	生长势 Growth performance
6	0.73 a A	1	好 Good
4	0.71 a AB	2	中 Common
7	0.60 ab ABC	3	中 Common
1	0.45 bc ABCD	4	中 Common
3	0.42 bc BCDE	5	差 Bad
8	0.32 cd CDE	6	好 Good
2	0.17 d DE	7	中 Common
5	0.14 d E	8	差 Bad

3 讨 论

3.1 外植体发育状况对体胚诱导影响

研究胚龄对体胚再生的文献比较多,特定的胚龄代表了幼胚中特定的生理、内含物及发育状态,因此研究特定胚龄中的物质成分与培养基中的各种因素互作机制意义非常大,但无论何种外植体,其类

型、所处的发育和生理状态以及取材部位等均会影响体细胞胚的发生^[12-13]。在本次试验中,对普通油茶幼胚在切块接种于培养基后进行不断观察,发现白色的子叶块慢慢变绿,而已经成绿色则表面慢慢粗糙并不断出现突起,可见油茶最有利于体胚再生的胚龄,是在幼胚子叶肉质由白变成绿色,果实迅速膨大期。这与其他体胚再生的相关文献描述情况接近:丛建民等认为生理代谢旺盛,分化程度较低的外植体有利于诱导出体细胞胚,幼嫩的生殖器官比幼嫩的营养器官更有利于诱导出体细胞胚,幼嫩的营养器官比多年生的营养器官更易于诱导出体细胞胚;许智宏等认为以未成熟合子胚作为外植体时,在其发育过程中往往只有一段很短的时期最适用于体细胞胚诱导,一般认为越是幼嫩的合子胚,其体细胞胚发生频率越高^[14-15]。

3.2 外植体中碳氮化合物含量对体胚诱导影响

碳氮化合物是外植体特定状态的重要生理特征,外植体中各种内含物质与培养基中的物质相互作用对胚性愈伤组织产生的重要原因,因此了解较易诱导出体胚外植体中的可溶性蛋白和可溶性糖含量,对快速选择其他外植体类型具有较好的指导作用。植物体细胞胚胎发生过程的实质是基因顺序表达的结果,因此会出现各种蛋白质含量的变化,包括特异蛋白质的出现与消失^[16]。外植体中可溶性蛋白可以作为体胚发生过程中的相关蛋白合成原料,也可能与培养基中含氮化合物相互作用成为体胚诱导的重要影响因子,因此了解较易产生胚性愈伤组织外植体中可溶性蛋白含量,对选择合适的外植体具有重要参考作用。本研究可以看出幼胚中可溶性蛋白含量较低时(10.15%)有利于胚性愈伤组织诱导,这与合子胚储藏蛋白的积累不利于诱导体胚发生^[15]的观点是一致的。

碳水化合物的种类和浓度除会影响愈伤的诱导效果,同时还会影响体细胞胚的生长,不同类型的碳水化合物对体胚生长差异较明显,如葡萄糖对体细胞胚的生长发育效果大于蔗糖的作用^[17-18]。糖类主要作用是作为各种细胞提供能源,另外一个作用就是作为渗透调节剂影响体细胞胚的生长发育和不同分化,可见本研究通过在一定蔗糖浓度(3%)条件下培养,了解最佳状态外植体中的可溶性糖含量,对油茶体胚诱导、选择外植体状态(包括基因型)选择及体胚再生的相关机制具有较好的借鉴作用。从本研究可以看出较低的可溶性总糖及蔗糖和果糖含量有利于胚性愈伤组织的诱导,处于迅速膨大期的油茶幼

胚中糖含量就有这样的特点^[19]。

3.3 外植体内源激素水平对体胚诱导影响

在培养基中加入相应植物生长调节剂,目的在于调节外植体内源激素的变化,内源激素的变化则会引起一系列的生命活动,其中包括胚性细胞的产生,不同外植体状态代表了不同的内源激素状态,因此了解外植体中的内源激素含量对判定选择合适外植体状态具有指导作用。有研究发现,内源 IAA 含量上升或保持在较高的浓度是胚性细胞出现的一个共同标志,因为当外源激素 IAA 进入细胞后,IAA 就会和氨基酸形成复合体,从而影响细胞的分化方向,因此直接添加 IAA 对其合成有反馈抑制,从而影响体胚形成,但是 2,4-D 对 IAA 的合成不存在反馈抑制^[20-21],这与本结论一致,较易产生胚性愈伤组织阶段的幼胚中 IAA 含量($34.71 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)相对较高,2,4-D 对愈伤组织诱导起重要作用。ABA 是植物生长的重要抑制物质,有研究认为较高的 ABA 浓度有利于提高体细胞胚的发生,因为内源 ABA 含量升高植物的体胚就会加快成熟,并且 ABA 具有间接促进各项储藏物质积累,另外 ABA 能够被生长素刺激而含量升高^[22-24],这与本结论是一致的,较易产

生胚性愈伤组织阶段(7 月 27 日)幼胚中 ABA 含量($110.13 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)明显高于其他时期,此时 IAA 含量也较高。由于去年(2013 年 7 月 27 日)的严重干旱导致外植体的 ABA 含量迅速升高,反而有利于体胚再生,这个现象是与前一年的体胚初步构建过程中体胚诱导率略有差异的重要原因^[7]。

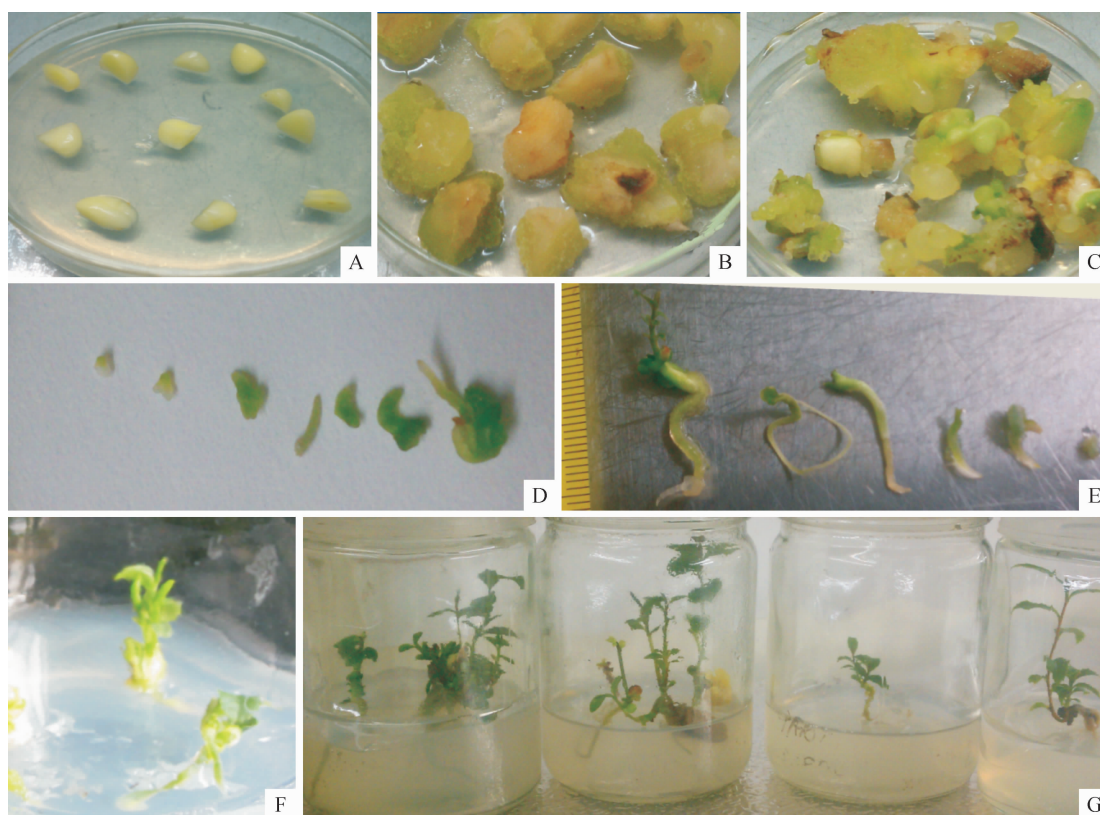
3.4 胚状体萌发及生长的相关影响因素

体胚萌发不仅仅是要实现体胚根的伸长,更要最后完成具有功能的根和茎的生长,正是基于转化这一过程,才能产生后期可成活的小植株,因此提高胚状体萌发率和胚苗的生长,对提高转基因得率具有重要的价值。通过前期的体胚再生初步研究已经清楚,在无激素的 MS 培养基中,胚状体也可以长成植株,但是生长速度缓慢,为了进一步优化胚状体的萌发和后期组培苗生长,需要进一步完善培养配方。有研究表明,IAA 和 6-BA 对胚状体萌发及生长具有重用影响,还有研究认为添加合适类型的氨基酸和蛋白对组培苗生长影响较大,因此探讨以上各种物质对胚状体萌发的影响有重要意义^[4-5],本研究表明:因子互作对体胚萌发影响最大,其次是生长素,再次为 6-BA,两种添加物影响接近。

参考文献:

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 北京:中国林业出版社,2008:1—25.
- [2] 姚小华,王开良,任华东,等. 油茶资源与科学利用研究[M]. 北京:科学出版社,2011:5—19.
- [3] YANG R ZH(杨瑞珍). Sustainable agriculture and ecological agriculture[J]. *World Agriculture*(世界农业),1994,(1):6—7(in Chinese).
- [4] 张智俊. 油茶优良无性系组织培养、RAPD 分子鉴别和 cDNA 文库构建的研究[D]. 长沙:中南林学院,2003.
- [5] 范晓明. 油茶组织培养技术研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2011.
- [6] 刘 虹. 油茶组培体系的建立及 VIGS 系统在油茶、油桐基因功能研究中的应用[D]. 重庆:西南大学,2012.
- [7] HU Y L(胡玉玲),YAO X H(姚小华),REN H D(任华东),et al. Study about *Camellia oleifera* somatic embryogenesis regeneration system[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*(南京林业大学学报),2014,38(3):204—209(in Chinese).
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:182—199.
- [9] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2003:127—134.
- [10] WU S R(吴颂如),CHEN W F(陈婉芬),ZHOU X(周 燮). Enzym linked immunosorbent assay for endogenous plant hormones[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),1988,(5):53—57(in Chinese).
- [11] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [12] 崔凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [13] CONG J M(丛建民),SHEN H L(沈海龙),et al. Physiological and biochemical status of different-types of explants in somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica*[J]. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报),2012,33(1):48—52(in Chinese).
- [14] XU ZH H(许智宏). Plant development and reproduction:advances and prospectives[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报),1999,41(9):909—920(in Chinese).
- [15] MIHO IKEDA-IWAI, MIKIHISA U, SHINOBU S, et al. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*,2003,34(1):107—114.
- [16] XU CH Y(许传营),CHEN X X(陈星旭),XIN W J(辛伟杰),et al. Some physiological and biochemical characteristics of different developmental stages of somatic embryogenesis in anthurium and raeanum[J]. *Guihaia*(广西植物),2010,30(1):117—121(in Chinese).
- [17] ZHU J B(祝建波),ZHU X C(朱先灿),CUI Y(崔 燕),et al. Establishment of higher efficient medicago varia martin regeneration sys-

- tem[J]. *Crops*(作物杂志),2006,(5):14—17(in Chinese).
- [18] ZHANG Q X(张启香),HU H K(胡恒康),WANG ZH J(王正加),et al. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration of *Carya cathayensis*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报),2011,**38**(6):1 063—1 070(in Chinese).
- [19] ZHOU CH F(周长富),YAO X H(姚小华),LIN P(林 萍),et al. Constituent changes associated with seeds development of *Camellia oleifera* abel[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*(中国油料作物学报),2013,**35**(6):680—685(in Chinese).
- [20] CHEN Y F(陈以峰),ZHOU X(周 燮),TANG R SH(汤日圣),et al. Correlation between appearance of embryogenic cells and the IAA levels in rice somatic cell culture[J]. *Journal of Plant*(植物学报),1998,**40**(5):474—477(in Chinese).
- [21] NEBOJSA ILIĆ,ANDERS ÖSTIN,JERRY D COHEN. Differential inhibition of indole-3-acetic acid and tryptophan biosynthesis by indole analogues. I. Tryptophan dependent IAA biosynthesis[J]. *Plant Growth Regulation*,1999,**27**(1):57—62.
- [22] GS PULLMAN,Y ZHANG,BH PHAN. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice[J]. *Plant Cell Reports*,2003,**22**(2):96—104.
- [23] HECTOR G M,NATALIA I,VICTOR K,et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities[J]. *Nature Biotechnology*,2006,**24**(10):1 263—1 269.
- [24] G GARCIA-MARTIN,JA MANZANERA,et al. Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2005,**80**(2):171—177.



图版 I A. 外植体;B. 培养 40 d 后的愈伤组织状态;C. 培养 120 d 后的胚状体;D. 培养 160 d 后芽分化情况;E. 培养 300 d 后根分化情况;F. 培养 360 d 后完整植株再生;G. 培养 420 d 组培苗生长情况。

Plate I Fig. A. Explants;Fig. B. State of calli after 40 d culture;Fig. C. Embryoid bodies after 120 d culture;Fig. D. Buds differentiation after 160 d culture;Fig. E. Root differentiation after 300 d culture;Fig. F. Plants regeneration after 360 d culture;Fig. G. The growth of plantlets after 420 d culture.