

文章编号:1001-7380(2019)06-0027-04

# 构树胚性愈伤组织及体胚诱导研究

周鹏<sup>1</sup>, 吴晓清<sup>2</sup>, 黄婧<sup>1</sup>, 张敏<sup>1\*</sup>

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 连云港职业技术学院, 江苏 连云港 222006)

**摘要:**以野生构树组织培养无菌苗茎段为外植体,探讨不同种类、质量浓度的植物生长调节剂对胚性愈伤组织诱导及体胚发生的影响,初步建立愈伤组织诱导及体胚发生技术途径。结果表明,TDZ是影响构树茎段胚性愈伤组织诱导的主要因素,NAA和2,4-D是次要因素,构树胚性愈伤组织最佳培养基为MS+0.05 mg/L TDZ+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D。最佳体胚诱导培养基为MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA,体胚诱导率达到41.33%。

**关键词:**构树;胚性愈伤组织;体胚发生;植物生长调节剂;组织培养

中图分类号:Q943.1;S792.99

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2019.06.006

## Induction of embryogenic callus and somatic embryogenesis of *Broussonetia papyrifera*

Zhou Peng<sup>1</sup>, Wu Xiaoqing<sup>2</sup>, Huang Jing<sup>1</sup>, Zhang Min<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China; 2. Lianyungang Technical College, Lianyungang 222006, China)

**Abstract:** Stems of *Broussonetia papyrifera* were used as explants to explore the effects of growth regulators of different types and concentrations on the induction of callus and somatic embryogenesis. The results showed the effect order on embryonic callus induction is TDZ>NAA>2,4-D, with TDZ as a main factor. The optimum medium for embryonic callus induction is MS+0.05 mg/L TDZ+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D. The optimum medium for somatic embryogenesis is MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA, with the somatic embryogenesis rate of 41.33%.

**Key words:** *Broussonetia papyrifera*; Embryonic callus; Somatic embryogenesis; Plant growth regulator; Tissue culture

构树 (*Broussonetia papyrifera*) 为桑科 (Moreaceae) 构树属落叶乔木或灌木,分布于我国除东北北部、西北北部以外的大部分地区。构树适应性极强,是优良的生态绿化树种<sup>[1-3]</sup>,同时可作为造纸<sup>[4]</sup>和加工青储饲料<sup>[5-6]</sup>等的原材料,发展前景广阔。

目前,构树种苗繁育主要依靠播种、埋根和传统扦插方式<sup>[7-8]</sup>,很难满足市场对构树种苗的需求,限制了其良种的大规模推广<sup>[9]</sup>。利用植物组织培养实现植株再生,可较好解决优良种苗的大规模高效繁殖和商业化生产的问题。特别是通过植物体细胞胚再生途径生产种苗,具有繁殖系数高、遗传稳定等优点,还可为林木分子育种搭建平台<sup>[10-11]</sup>。目前,已有学者对构树组织培养技术进行研

究<sup>[12-14]</sup>,但关于构树体细胞胚诱导的研究尚少,仅见张朝晖等<sup>[15]</sup>以杂交构树叶片为材料,初步探讨了影响构树体细胞胚发生的因素。本研究以野生构树组织培养无菌苗为材料,研究不同植物生长调节剂对茎段外植体胚性愈伤组织诱导和体细胞胚发生的影响,以期为构树的良种繁育及进一步遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以野生构树组织培养无菌苗为试验材料,无菌苗由江苏省林业科学研究院提供。

### 1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养 构树无菌苗根据文献[13]的

收稿日期:2019-09-03;修回日期:2019-10-23

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目“耐盐饲用构树规模化繁育及高效栽培技术集成示范”(LYKJ[2018]04)

作者简介:周鹏(1989-),男,江苏东台人,助理研究员,硕士。主要从事植物组织培养技术研究。

\*通信作者:张敏(1980-),女,内蒙古人,研究员,博士。主要从事生物技术与林木花卉良种繁育工作。

方法培养。取江苏南京当地野生构树当年半木质化枝条,去除叶片,剪成一芽一段的茎段,经过75%酒精预处理60 s,0.1%氯化汞消毒5 min后进行接种。其中,继代培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA,继代周期20 d。生根培养基为1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA,培养天数为25 d。

**1.2.2 愈伤组织的诱导及细胞学观察** 取继代3次,生长一致的组织培养无菌苗,于超净工作台上去掉粗壮的幼苗顶端和根部后,将茎段切成长0.3—0.5 cm的小段,每个小段均不带任何芽点和叶片。将切好的外植体水平接种于愈伤组织诱导培养基上。以MS为基本培养基,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,考察3个植物生长调节剂TDZ, NAA和2,4-D对愈伤组织的诱导的影响,每因素3个水平,共9个处理(见表1),不考虑交互作用。每处理接种10瓶,每瓶外植体2个,重复3次。接种后每7 d观察外植体的形态变化,接种30 d时拍照记录愈伤组织的不同类型,并统计胚性愈伤组织的诱导率。愈伤组织的细胞学观察采用常规的石蜡切片法,具体参照项伟波等<sup>[16]</sup>的方法,利用Olympus BX51显微镜观察拍照。

**1.2.3 体胚的诱导** 挑取长势较好的胚性愈伤组织转接至体胚诱导培养基上,进行体胚的诱导。以MS为基本培养基,添加不同质量浓度的6-BA和NAA,共9个处理(见表3),每个处理10瓶,每瓶接愈伤组织5团,重复3次。培养35 d时统计体胚诱导率。

以上培养基均添加30 g/L蔗糖和6.5 g/L卡拉胶,pH 5.8。培养温度25℃,光照周期为12 h/d,光照度1 500 Lx。

### 1.3 数据统计与分析

胚性愈伤组织诱导率=(诱导出胚性愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100%;

体细胞胚诱导率=(诱导出体细胞胚的愈伤组织数/接种愈伤组织数)×100%;

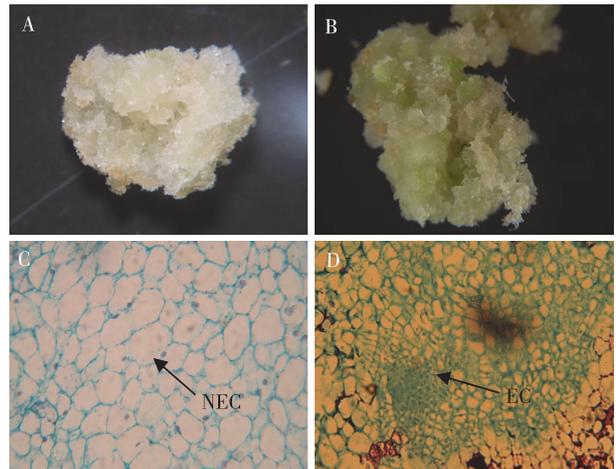
采用Excel 2003和SPSS13.0软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的形成及形态观察

将构树无菌苗茎段接种到愈伤诱导培养基7 d后开始形成愈伤组织,培养30 d后,可见2种类型的愈伤组织。一类愈伤组织为白色,透明、水渍状、

结构疏松(见图1-A),镜检发现其细胞大、形态不规则,核小且偏向一侧(见图1-C),为非胚性愈伤组织。另一类为黄绿色,质地较碎,结构疏松、表面瘤状突起(见图1-B),镜检发现胚性细胞团,细胞排列规则、紧密,体积小,核大且多位于细胞中央(见图1-D)<sup>[16]</sup>,为胚性愈伤组织。



A:非胚性愈伤组织;B:胚性愈伤组织;  
C:非胚性细胞(NEC);D:胚性细胞(EC)

图1 构树体细胞胚诱导

### 2.2 不同植物生长调节剂对茎段胚性愈伤组织诱导的影响

极差分析(见表1)可知,极差 $R$ 的排序为TDZ>NAA>2,4-D。从各因素水平看,TDZ质量浓度上,0.05 mg/L>0.1 mg/L>0.01 mg/L;NAA质量浓度上,1.0 mg/L>0.1 mg/L>0.5 mg/L;2,4-D质量浓度上,0.1 mg/L>0.01 mg/L>0.05 mg/L。方差分析(见表2)可见,TDZ对构树茎段胚性愈伤组织诱导影响达到了显著性水平( $P<0.05$ ),而NAA和2,4-D作用并不显著,这表明TDZ是影响构树茎段外植体胚性愈伤组织诱导的主要因素,NAA和2,4-D是次要因素。根据主要因素选最优水平,次要因素选适宜水平的原则,筛选各因素的最佳组合为A2B3C3,即0.05 mg/L TDZ+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D。

### 2.3 不同植物生长调节剂对体胚诱导的影响

对体胚诱导率进行极差分析(见表3)可知,极差 $R$ 的排序为NAA>6-BA。从各因素水平看,体,NAA质量浓度上,0.1 mg/L>0.05 mg/L>0.01 mg/L;6-BA质量浓度上,1.0 mg/L>1.5 mg/L>0.5 mg/L。方差分析(见表4)可见,NAA显著影响构树体

胚诱导率( $P < 0.05$ ),而6-BA作用未达到显著水平,说明NAA是影响构树体胚诱导的主要因素,6-BA为次要因素。综合考虑,各因素的最佳组合为A3B2,即处理Y8,0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA,此时体细胞胚诱导率为41.33%。

表1 植物生长调节剂组合对胚性愈伤组织诱导的影响

处理	生长调节剂/(mg/L)			胚性愈伤组织诱导率/%
	TDZ	NAA	2,4-D	
1	0.01	0.1	0.01	8.33 f
2	0.01	0.5	0.05	13.33 ef
3	0.01	1.0	0.1	23.33 bcde
4	0.05	0.1	0.05	28.33 bcd
5	0.05	0.5	0.1	30.00 abc
6	0.05	1.0	0.01	40.00 a
7	0.1	0.1	0.1	33.33 ab
8	0.1	0.50	0.01	21.67 cde
9	0.1	1.00	0.05	18.33 def
$K_1$	15.00	23.33	23.33	
$K_2$	32.78	21.67	20.00	
$K_3$	24.44	27.22	28.89	
R	17.78	5.55	8.89	

注:K为同一因素不同水平P值的平均值,R为极差。不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

表2 正交试验方差分析

变异来源(DF)	平方和(SS)	自由度(f)	均方(MS)	均方比(F)	Sig.
TDZ	1 424.074	2	712.037	10.448	0.001
NAA	251.852	2	125.926	1.848	0.183
2,4-D	1 18.519	2	59.259	0.870	0.434
误差	1 362.963	20	68.148		
总变异	18 700.000	27			

表3 植物生长调节剂组合对体胚诱导的影响

处理	生长调节剂/(mg/L)		体胚诱导率/%
	NAA	6-BA	
Y1	0.01	0.5	2.67 d
Y2	0.01	1.0	4.00 d
Y3	0.01	1.5	7.33 d
Y4	0.05	0.5	12.67 d
Y5	0.05	1.0	24.67 c
Y6	0.05	1.5	35.33 ab
Y7	0.10	0.5	36.67 ab
Y8	0.10	1.0	41.33 a
Y9	0.10	1.5	26.67 bc
$K_1$	4.67	17.33	
$K_2$	24.22	23.33	
$K_3$	34.89	23.11	
R	30.22	6.00	

注:K为同一因素不同水平P值的平均值,R为极差。不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

表4 试验方差分析

变异来源(DF)	平方和(SS)	自由度(f)	均方(MS)	均方比(F)	Sig.
NAA	4 228.741	2	2 114.370	34.099	0.000
6-BA	208.296	2	104.148	1.680	0.209
误差	1 364.148	20	68.148		
总变异	18 004.000	27			

### 3 讨论和结论

大量研究表明,植物生长调节剂在调控植物体细胞胚胎诱导过程中起着极其重要的作用,且不同物种或同一物种不同基因型或外植体在体胚发生阶段所需植物生长调节剂种类和质量浓度存在差异<sup>[17-19]</sup>。生长素2,4-D在植物体细胞胚胎诱导中广泛应用,研究表明,多种木本植物在体胚性愈伤组织诱导阶段均需添加2,4-D<sup>[20-21]</sup>。蔡雪玲等研究番木瓜(*Carica papaya*)体胚发生时,NAA在番木瓜愈伤组织诱导和增殖上起着重要作用<sup>[22]</sup>。而本试验中发现,TDZ是影响构树茎段外植体胚性愈伤组织诱导的主要因素,NAA和2,4-D是次要因素。这与鲁娇娇等<sup>[23]</sup>研究的结果一致,后者在研究朱顶红(*Hippeastrum vittatum*)鳞片外植体胚性愈伤组织诱导及体细胞胚发生时,也验证了TDZ对于某些植物体细胞胚诱导的重要性。

研究表明,绝大多数木本植物在体胚诱导过程中必须使用生长素和细胞分裂素,二者配合使用才能获得体细胞胚<sup>[24-25]</sup>。杨强强等<sup>[20]</sup>研究发现,NAA和6-BA是甘薯(*Ipomoea batatas*)体细胞胚诱导的主要因素,而ABA和活性炭为次要因素。在构树体胚的诱导研究中也发现类似的结论,不同配比的NAA和6-BA均能诱导体胚发生,但诱导效果存在较大差异,0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA处理时体胚诱导效果较好。

本研究以野生构树无菌苗茎段为外植体,初步建立了构树体胚诱导体系,这是对前人研究<sup>[15]</sup>从构树叶片获得体胚发生的补充和突破,但从目前的试验结果看,体胚诱导率还是比较低,仍需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 曾鹏,郭朝晖,肖细元,等.构树修复对重金属污染土壤环境质量的影响[J].中国环境科学,2018,38(7):2639-2645.
- [2] XI D, LI J, KUANG Y W, et al. Influence of traffic exhausts on elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of medicinal plant *Broussonetia papyrifera* [J]. Atmospheric Pollution Research, 2013, 4(4):370-376.

- [3] SUN J W, PENG X J, FAN W H, et al. Functional analysis of BpDREB2 gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera* [J]. *Gene*, 2014, 535(2):140-149.
- [4] YAO L, YANG H T, YOO C G, et al. Adsorption of Cellobiohydrolases I onto lignin fractions from dilute acid pretreated *Broussonetia papyrifera* [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(1):957-962.
- [5] 华金玲, 从光雷, 郭亮, 等. 构树对黄淮白山羊瘤胃发酵特性、消化代谢、生产性能及肉品质的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(5):924-931.
- [6] 刘祥圣, 王琳, 宁丽丽, 等. 构树不同部位与奶牛常用粗饲料瘤胃降解特性对比研究[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(8):3612-3620.
- [7] 吴纲, 肖小君, 何开跃, 等. NaCl胁迫对构树种子发芽及幼苗生理生化指标的影响[J]. *江苏林业科技*, 2009, 36(4):8-12.
- [8] 颜培岭, 张敏, 蒋泽平, 等. 光叶楮根繁殖技术初探[J]. *江苏林业科技*, 2008, 35(3):43-46.
- [9] 郝迪菽, 杨宇, 潘明辉, 等. 光叶楮扦插及生根机理研究[J]. *现代园艺*, 2013(9):17.
- [10] PIKILTHONG V, TEERAKATHITI T, THAMCHAIPENET A, et al. Development of somatic embryos for genetic transformation in *Curcuma longa* L. and *Curcuma mangga* Valeton & Zijp [J]. *Agriculture & Natural Resources*, 2016, 50(4):276-285.
- [11] DANIEL M A, DAVID R H A, CAESAR S A, et al. Effect of L-glutamine and casein hydrolysate in the development of somatic embryos from cotyledonary leaf explants in okra (*Abelmoschus esculentus* L. monech) [J]. *South African Journal of Botany*, 2018, 114:223-231.
- [12] 万文, 刘忠华, 魏会琴, 等. 杂交构树茎段组培快繁体系的建立[J]. *福建林业科技*, 2010, 37(1):72-76.
- [13] ZHANG M, FANG Y M, JI Y H, et al. Effects of salt stress on ion content, antioxidant enzymes and protein profile in different tissues of *Broussonetia papyrifera* [J]. *South African Journal of Botany*, 2013, 85(85):1-9.
- [14] 蒋泽平, 梁珍海, 李荣锦, 等. 光叶楮组织培养快速繁殖技术的研究[J]. *江苏林业科技*, 2006, 33(6):10-13.
- [15] 张朝晖, 张宗申, 陈阳, 等. 杂交构树体细胞胚诱导研究[J]. *河南农业科学*, 2016, 45(12):127-131.
- [16] 项伟波, 赵金凯, 吴家胜, 等. 香榧体细胞胚发生、发育的形态与细胞学观察[J]. *园艺学报*, 2015, 42(8):1477-1486.
- [17] 吕秀立, 尹丽娟, 张群, 等. 苏玛栎胚性愈伤组织诱导及体胚发生[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(19):279-285.
- [18] 谢忠利, 李旦, 陈远书, 等. 云南松胚性愈伤组织诱导研究[J]. *西南林业大学学报*, 2019, 39(5):28-34.
- [19] 杨柳, 李志辉, 林立彬. 激素对不同种源樟树体胚发生的影响[J]. *中南林业科技大学学报*, 2018, 38(12):121-126, 141.
- [20] 杨强强, 闫会, 谢昊, 等. 徐紫薯8号胚性愈伤组织的诱导与体细胞胚发生[J]. *江苏师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 37(1):29-33.
- [21] 吕秀立, 尹丽娟, 张群, 等. 苏玛栎胚性愈伤组织诱导及体胚发生[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(19):279-285.
- [22] 蔡雪玲, 陈晓静, 申艳红, 等. 番木瓜胚性愈伤组织的诱导及体胚发生[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2011, 40(2):122-127.
- [23] 鲁娇娇, 严瑞, 何香杉, 等. 朱顶红‘Red Lion’胚性愈伤组织诱导及体细胞胚发生[J]. *园艺学报*, 2016, 43(12):2451-2460.
- [24] 张丽杰, 赵丽蒙, 陆秀君, 等. 水曲柳子叶和下胚轴愈伤组织和体胚的诱导[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(7):1641-1652.
- [25] 李玉珠, 李巧璐, 范艳红, 等. 苜蓿下胚轴愈伤组织诱导和体细胞胚的发生与观察[J]. *中国草地学报*, 2014, 36(6):97-102.

## · 征订启事 ·

### 欢迎订阅 2020 年度《江苏林业科技》

《江苏林业科技》为国内外公开发行的综合性林业科学技术刊物。1974年创刊。为《中国学术期刊(网络版)》入编期刊、全国优秀期刊、江苏省优秀期刊、全国优秀农业期刊、华东地区优秀期刊。加入“万方数据——数字化期刊群”和中国期刊网等。

《江苏林业科技》主要刊登良种选育、育苗造林、园林绿化、林副特产、森林经营、森林保护、调查设计、野生动物等方面的学术论文、科研报告、经验总结,以及林业新成果、新技术,有较强的指导性、技术性、实用性,是林业科研、教学工作者、管理部门及广大林业生产者不可少的参考资料。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告,宣传产品等。

《江苏林业科技》为双月刊,大16开本,国内外公开发行。国内统一刊号:CN 32-1236/S,国际标准刊号:ISSN 1001-7380,每期定价6.00元,全年订费36.00元。全年办理订阅手续,需订阅者请到当地邮局订阅或将订款汇至南京市江宁区东善桥江苏省林业科学研究院本刊编辑部,邮政编码211153。电话(025)52745438,83602820,83602060。由银行或邮局汇寄均可。开户银行:南京市农业银行金鹰支行,户名:江苏省林业科学研究院,帐号:10105101040000010。邮发代号:28-303。