

·组织培养简讯·

珍稀濒危植物香果树胚性细胞悬浮系的建立和植株再生

熊丹¹, 陈发菊^{1, 2*}, 梁宏伟¹, 王玉兵¹

¹三峡大学生物技术研究中心, 湖北省天然产物研究与利用重点实验室, 宜昌 443002

²湖北民族学院湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 恩施 445000

摘要 以香果树(*Emmenopterys henryi*)未成熟种子为试材, 探讨不同的接种量、基本培养基、糖浓度及植物生长调节物质等对体细胞胚胎生长的影响, 建立稳定的香果树胚性细胞悬浮培养与植株再生体系。结果表明: 悬浮培养条件下, 最适接种量为2%(鲜重); 较适合的基本培养基为MS; 蔗糖浓度为1%时容易使球形胚聚合体愈伤化, 浓度为3%和6%适合球形胚聚合体增殖, 浓度为9%则容易使球形胚聚合体褐化; 添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的MS液体培养基, 当初始蔗糖浓度为3%, 然后逐步提高到6%则有利于香果树各个发育阶段的同步化; 子叶胚转到不含任何植物生长调节物质的MS固体培养基中可以长成正常植株。

关键词 胚性悬浮细胞, 香果树, 植株再生, 体细胞胚胎发生

熊丹, 陈发菊, 梁宏伟, 王玉兵 (2008). 珍稀濒危植物香果树胚性细胞悬浮系的建立和植株再生. 植物学通报 25, 337-343.

植物细胞悬浮培养(plant cell suspension culture)在现代生物学研究中有广泛的应用。植物悬浮细胞系可以用来分离原生质, 制造人工种子, 筛选突变体, 生产次生代谢物质以及进行植物细胞代谢生理和生化特征等方面的研究。

香果树(*Emmenopterys henryi*), 别名丁木, 为茜草科(Rubiaceae)香果树属高大乔木, 我国特有单种属植物, 第四纪冰川幸存的古老孑遗树种。香果树的分布零散, 种群数量不多, 自然条件下种子萌发力极低, 天然更新能力差, 现存数量有限, 处于濒危状态, 已被列为国家二级重点保护植物和林业部公布的国家珍贵树种。该树种在我国主要分布在江西、福建、湖南和湖北等地海拔 400 - 1 400 m 的土壤湿润肥沃的山坡和谷地。香果树材质洁白细密, 纹理通直, 是一种优良用材树种。它树姿优美, 花色艳丽, 也是很好的观赏植物(傅立国和金鉴明, 1992)。迄今为止, 国内外通过体细胞胚发生途径来大量繁殖香果树的报道很少, 仅有姬飞腾等(2005)利用香果树叶片为外植体, 通过固体和悬浮培养诱导出

体细胞胚胎, 但对于细胞悬浮培养的相关影响因子尚未有系统的研究报道。本文以香果树未成熟种子为外植体, 探讨不同的接种量、基本培养基、糖浓度及生长调节物质等对体细胞胚胎生长的影响, 建立了稳定的细胞悬浮培养与植株再生体系, 以期为香果树的细胞工程和基因工程研究奠定基础。

1 材料与方法

香果树(*Emmenopterys henryi* Oliv)幼嫩果实于2004年8月采自神农架自然保护区。取香果树幼嫩果实(果龄30天左右)在洗涤液中用软刷刷洗, 然后用洗涤液浸泡30分钟, 自来水冲洗2小时, 在超净工作台上用75%乙醇灭菌1分钟, $0.1\% \text{HgCl}_2$ 消毒15分钟, 无菌水清洗5次。用手术刀纵向切开果皮, 挑出未成熟种子备用。

1.1 胚性愈伤组织的诱导

将未成熟种子接种到附加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的 MS 固体

收稿日期: 2007-03-13; 接受日期: 2007-11-29

基金项目: 湖北省生物资源保护与利用重点实验室开放基金(No.2007010)、国家林业局自然保护区研究中心项目(No.460-8101)和宜昌市科技局重点攻关项目(No.A06209)

* 通讯作者。E-mail: chen fj616@163.com

培养基(Murashige and Skoog, 1962)中培养。6天后产生浅绿色致密愈伤组织, 继续培养4天后, 将浅绿色愈伤组织转移到附加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的MS培养基上培养30天, 浅绿色愈伤组织逐渐变为黑色。继代培养40天, 从黑色的愈伤组织表面生长出浅黄色疏松的胚性愈伤组织。在培养基中添加3%(w/v)蔗糖和0.8%(w/v)琼脂。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 或 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节pH值, 在灭菌前各培养基pH值为6.0, 121°C 灭菌20分钟。培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度为 $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间每天16小时。

1.2 悬浮体系的建立

1.2.1 球形胚聚合体的获得

将浅黄色胚性愈伤接种到含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的MS液体培养基中, 添加3%蔗糖, 100 mL三角瓶中加50 mL液体培养基。置摇床上培养, 转速为每分钟120转, 培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度为 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间每天16小时。每14天继代1次, 继代时用60目尼龙网过滤处理, 使其大小均一。继代2次后, 显微观察, 悬浮培养物主要由球形胚聚合体组成。将获得的大小均一的球形胚聚合体作为初始材料用于筛选对体细胞胚胎发生最适的基本培养基、接种量、蔗糖浓度和植物生长调节剂等。

1.2.2 不同接种量对球形胚聚合体生长的影响

分别以0.4%、1.0%、2.0%、3.0%和5.0%(w/v)接种量(鲜重)将球形胚聚合体接种到含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的MS液体培养基中, 添加3%蔗糖, 每个处理重复4次。培养14天后, 观察球形胚聚合体的生长情况并统计其生长量。

选取较优的接种量(2.0%)处理组测定悬浮培养物生长过程中pH值和生长量的变化, 设4个重复, 每隔2天取其充分摇匀的悬浮培养物5 mL, $8000 \times g$ 离心10分钟, 将沉淀物称重, 同时测上清液pH值, 共测定10次。

1.2.3 基本培养基对球形胚聚合体生长的影响

将球形胚聚合体以2.0%的接种量接种到1/2MS(大量元

素减半, 其余成分同MS)、MS、B5(Lloyd and McCown, 1980)和WPM(Gamborg et al., 1968)4种基本培养基中, 不添加任何生长调节剂, 每个处理设4个重复。培养14天后, 观察球形胚聚合体的生长情况并统计其生长量。

1.2.4 不同浓度的蔗糖对球形胚聚合体生长的影响

将 1.0 g 球形胚聚合体接种到50 mL附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的MS液体培养基中, 添加不同浓度的蔗糖(0%、1%、3%、6%和9%)。每个处理设4个重复。14天后观察球形胚聚合体的生长情况并统计其生长量。

1.2.5 不同种类和浓度的生长调节物质及蔗糖浓度对体细胞胚胎同步化的影响

将球形胚聚合体转到MS液体培养基中, 附加 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 0.005、0.01、0.05 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, 培养基编号依次为D1、D2、D3和D4, 编号D5为附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的MS液体培养基, 并添加不同浓度的蔗糖(1%、3%和6%)。每个处理设4个重复。隔适当时间换液, 更换液体时蔗糖浓度有所改变。观察不同种类和浓度的生长调节物质及蔗糖浓度对体细胞胚胎不同发育阶段同步化的影响。

1.3 数据处理

用SPSS 13.0软件分析数据, 以最小显著差数法(LSD)评价差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 不同初始细胞密度下的球形胚聚合体的增殖

在悬浮培养过程中, 球形胚聚合体不停地产生新的球形胚, 同时体积较大的球形胚脱离球形胚聚合体, 继续培养, 得到了心形胚、鱼雷形胚和子叶胚, 最后获得成熟胚。悬浮培养中初始细胞密度对球形胚聚合体的增殖有显著影响(表1)。初始细胞密度太小(接种量为1%)或

表 1 接种量对香果树球形胚聚合体增殖的影响

Table 1 Effects of inoculation quantity on proliferation of globular embryos of *Emmenopterys henryi*

Inoculation quantity(%)	0.4	1.0	2.0	3.0	5.0
Growth yield(g)	2.2±0.40 c	4.2±0.12 b	5.5±0.47 a	6.3±0.33 a	5.3±0.40 ab

同一行数字后不同字母分别代表 0.05 水平差异显著。
Means preceding the same letter for each line were not different statistically at 5% probability as determined by LSD multiple comparisons.

太大(接种量为 5%)时, 球形胚聚合体的增殖较少; 当接种量为 2% 或 3% 时, 球形胚聚合体的增殖没有显著差异, 都比较大; 但接种量为 3% 时, 培养一段时间后, 球形胚聚合体颜色逐渐由浅黄色变成灰褐色, 并且培养液由澄清变浑浊。因此, 初始细胞密度为 2% 最有利于香果树球形胚聚合体的增殖。

球形胚聚合体的鲜重变化呈 S 形曲线, 整个生长周期可分为缓慢生长期(第 0-8 天)、对数生长期(第 8-14 天)和停滞期(第 14-18 天)(图 1)。培养液 pH 值的变化近似 V 形曲线(图 2)。在接种后 1-8 天内 pH 值不断下降, 从 6.0 下降到最低点 4.6, 此阶段球形胚聚合体增长缓慢; 第 8-14 天 pH 值迅速回升, 从 4.6 增加到 5.71, 此阶段球形胚聚合体增长迅速; 第 14-16 天, pH 值缓慢回升, 此时球形胚聚合体增加缓慢; 第 16 天以后 pH 值和球形胚聚合体的增加都几乎停滞, 此时如不及时更换新鲜培养基, 悬浮细胞将老化死亡。

2.2 基本培养基对球形胚聚合体生长的影响

先期诱导的胚性愈伤组织(图 3A, B), 经培养处理(1.2.1 节)获得了球形胚聚合体作为悬浮培养初始材料(图 3C)。将球形胚聚合体以 2% 的接种量接种到 1/2MS、MS、B5 和 WPM 4 种基本培养基中, 不添加任何植物生长调节剂。14 天后, 球形胚聚合体的生长情况和生长量如表 2。在 B5 基本培养基中球形胚聚合体生长迅速, 生长量最大, 球形胚聚合体逐渐长成半透明的球形胚、心形胚和鱼雷胚(图 3D), 并得到较多半透明的绿色子叶胚, 但胚状体的颜色逐渐变成浅灰黄色, 向非胚性愈伤发展。在 MS 基本培养基中, 球形胚聚合体颗粒均一且细碎, 浅黄色结实的球形胚较多, 生长量较大。在 WPM 基本培养基中, 球形胚聚合体增殖较少, 逐渐长成透明的球形胚、心形胚、鱼雷胚和毛状的绿色子叶胚, 同时有乳白色的子叶胚生成(图 3E), 颗粒非常不均一, 胚

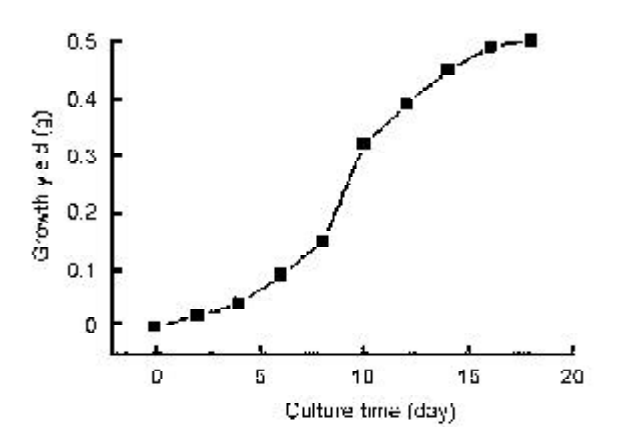


图 1 悬浮培养过程中细胞生长曲线

Figure 1 Growth curve of suspension cells

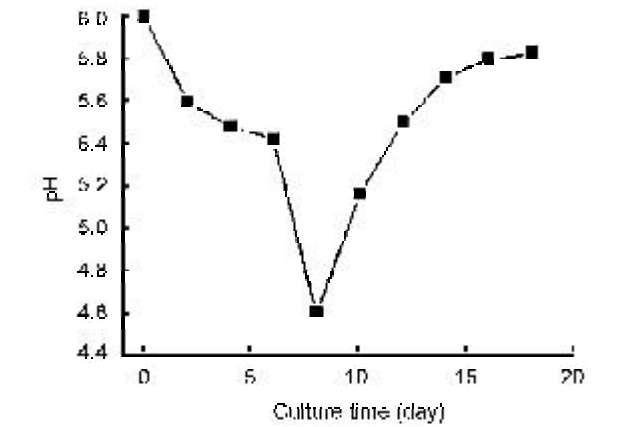


图 2 细胞悬浮培养过程中 pH 值的变化

Figure 2 Variation in pH during the period of culture

表 2 基本培养基对球形胚聚合体生长的影响

Table 2 Effects of the basal medium on growth of somatic embryos of *Emmenopterys henryi*

Basal medium	Growth yield(g)	Characteristics of somatic embryos
1/2MS	1.6±0.17 c	Uniform particles, a considerable number of grayish yellow and compacted globular embryos
MS	4.0±0.60 b	More uniform and fine particles, a considerable number of light yellow and compacted globular embryos
B5	5.5±0.60 a	More uniform and grayish yellow particles, a considerable number of green seedlings
WPM	2.4±0.41 c	Non-uniform, semitransparent and grey yellow particles, badly grow

同一列数字后不同字母分别代表 0.05 水平差异显著。

Means preceding the same letter for each line were not different statistically at 5% probability as determined by LSD multiple comparisons.

表 3 不同浓度的蔗糖对球形胚聚合体增殖的影响

Table 3 Effects of sucrose concentrations on proliferation of somatic embryos of *Emmenopterys henryi*

Sucrose concentrations(%)	0	1	3	6	9
Growth yield(g)	1.1±0.07 d	2.0±0.29 c	5.5±0.47 a	5.4±0.32 a	4.2±0.23 b

同一行数字后不同字母分别代表 0.05 水平差异显著。

Means preceding the same letter for each line were not different statistically at 5% probability as determined by LSD multiple comparisons.

状体的颜色逐渐变成灰黄色, 向非胚性愈伤发展, 继续培养, 生长越来越差。在 1/2MS 培养基中, 浅黄色的球形胚聚合体逐渐变成灰黄色, 生长缓慢。因此较适合体细胞生长的基本培养基为 MS 培养基。

2.3 不同浓度的蔗糖对球形胚聚合体生长的影响

取 1.0 g 球形胚聚合体接种到 50 mL MS 液体培养基中, 附加 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 和 0.5 mg·L⁻¹ NAA 并添加不同浓度的蔗糖(0、1%、3%、6% 和 9%)。14 天后, 观察球形胚聚合体的生长情况并统计其生长量(表 3)。结果显示, 糖浓度对球形胚聚合体的生长影响较大。不加蔗糖的球形胚聚合体几乎不增殖, 生长非常缓慢; 蔗糖浓度为 3% 和 6% 的培养基中, 球形胚聚合体增殖量最大; 当蔗糖浓度增加到 9% 时, 浅黄色的球形胚聚合体逐渐褐化, 球形胚聚合体生长受阻。

2.4 不同种类和浓度的生长调节物质及蔗糖浓度对体细胞胚胎同步化的影响

将球形胚聚合体接种到含有不同种类和浓度的生长调节物质及与不同浓度蔗糖组配的液体培养基中摇床培养,

每个处理设 4 个重复。间隔适当时间换液, 更换液体时蔗糖浓度改变。在不同浓度的蔗糖对球形胚聚合体生长的影响实验中, 发现不加蔗糖时球形胚聚合体几乎不增殖; 当蔗糖浓度为 9%, 球形胚聚合体易褐化。故在进行蔗糖浓度对体细胞胚胎同步化的影响实验时, 蔗糖只选择了 1%、3% 和 6% 这 3 种浓度, 观察生长调节物质及蔗糖浓度 2 个因素对体细胞胚胎不同发育阶段同步化的影响。

2.4.1 初始蔗糖浓度为 1% 时的体细胞胚胎生长情况

将球形胚聚合体转移到含 1% 蔗糖的液体培养基中, 编号依次为 D1、D2、D3、D4 和 D5, 显示胚生长缓慢且个体小。D1 和 D3 中大多数胚为球形胚, 透明, 表面为絮状, 看似愈伤化(图 3F)。D2、D4 和 D5 中的胚比 D1 和 D3 规则, 半透明或白色不透明, 愈伤化程度比 D1 和 D3 低。培养一段时间后, 将来源于附加 1% 蔗糖(D3)的培养物转入附加 3% 蔗糖的培养基(D3)中培养。2 - 3 天后球形胚从一端长出根状物(图 3G), 同时也有鱼雷胚, 但一端大多数长出根来, 成为有明显根端的鱼雷胚。接着用 6% 的蔗糖处理, 有明显根端的鱼雷胚会向子叶胚方向发展, 这些子叶胚可进一步发育, 长成植株, 但植株

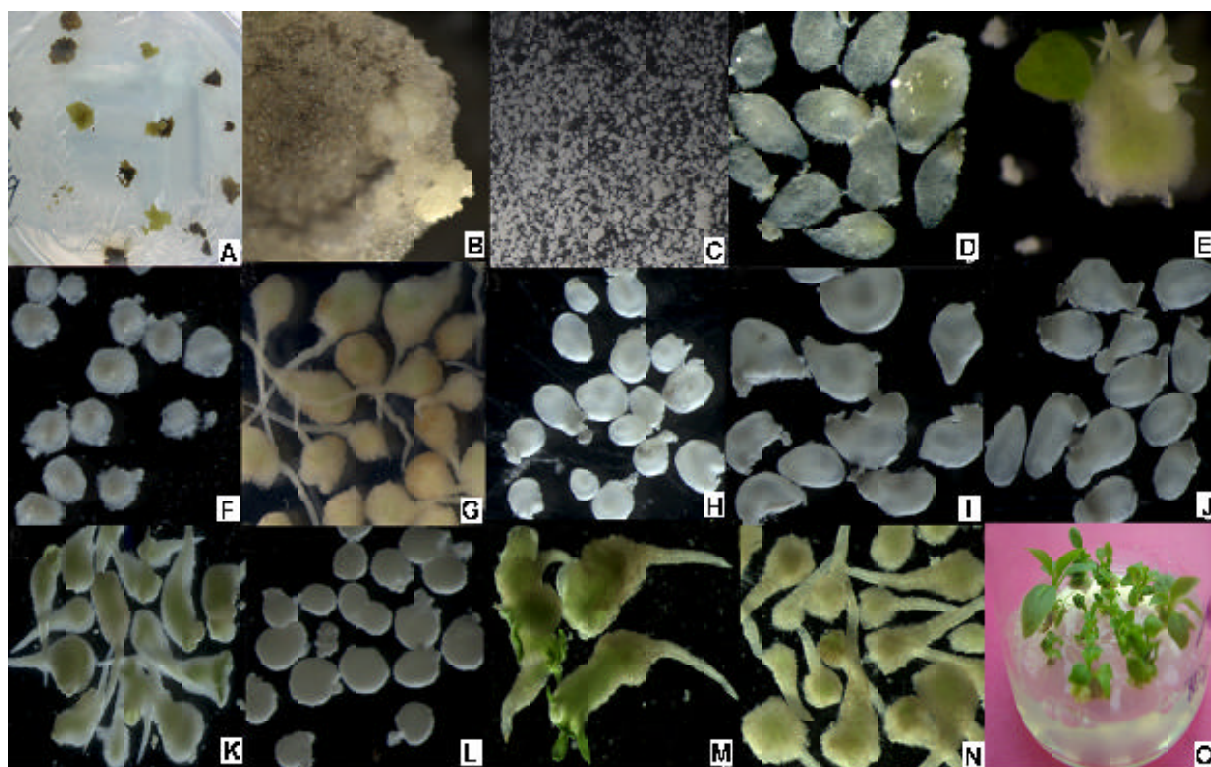


图3 悬浮培养条件下香果树体细胞胚胎生长情况和植株再生

(A)黑色的愈伤组织和浅黄色胚性愈伤组织; (B) 圆球状的聚集体; (C) 悬浮培养初始材料; (D) 在B5培养基中生成的鱼雷胚; (E) 在WPM培养基中生成的乳白色子叶胚; (F) 蔗糖浓度为1%, 激素配比为D3($\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$)培养条件下的球形胚; (G)长出根的胚; (H) 蔗糖浓度为3%, 激素配比为D4($\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$)的培养条件下的胚状体; (I) 蔗糖浓度为3%, 激素配比为D4的培养条件下的三角形胚; (J) 蔗糖浓度为3%, 激素配比为D4的培养条件下的鱼雷胚; (K) 蔗糖浓度为6%, 激素配比为D4的培养条件下的子叶胚; (L) 蔗糖浓度为3%, 激素配比为D2 ($\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$)和D5 ($\text{MS}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$)的培养条件下的球形胚; (M) 发育完整的植株; (N) 带有明显根端的鱼雷胚; (O) 再生植株

Figure 3 The growth of somatic embryos and plant regeneration of *Emmenopterys henryi* in suspension culture

(A) Dark callus and light yellow embryogenic callus; (B) Globular aggregates; (C) Initial materials in suspension culture; (D) Torpedo embryos generated in B5 medium; (E) Oyster white cotyledon embryos generated in WPM medium; (F) Globular embryos generated in the medium whose sucrose concentration was 1% and PGR concentration was D3($\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$); (G) Embryos with root; (H) Somatic embryos generated in the medium whose sucrose concentration was 3% and PGR concentration was D4 ($\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$); (I) Triangle embryos generated in the medium whose sucrose concentration was 3% and PGR concentration was D4; (J) Torpedo embryos generated in the medium whose sucrose concentration was 3% and PGR concentration was D4; (K) Cotyledon embryos generated in the medium whose sucrose concentration was 6% and PGR concentration was D4; (L) Globular embryos generated in the medium whose sucrose concentration was 3% and PGR concentration was D2 ($\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$) and D5 ($\text{MS}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$); (M) Developmental mature plants; (N) Torpedos with obvious root apex; (O) Regenerated plants

比较弱小。将在添加1%蔗糖的D3中培养14天的悬浮培养物, 转入含6%蔗糖的D3中, 胚内部变为绿色, 向非胚性愈伤发展, 不再进一步分化。

2.4.2 初始蔗糖浓度为3%时的体细胞胚胎生长情况
在蔗糖初始浓度为3%、编号分别为D2、D4和D5中培养的球形胚聚集体生长较快, 且个体比较大, 表面光

滑。D4 中的体细胞胚胎为透明或半透明(图 3H-J)。在蔗糖浓度提高到 6% 的 D4 中继续培养, 显示无明显根端的鱼雷胚能进一步发育成子叶胚(图 3K)。D2 和 D5 中的球形胚为白色不透明(图 3L), 在蔗糖浓度提高到 6% 的 D2 和 D5 中培养, 胚经历心形胚、无明显根端的鱼雷胚和子叶胚, 最后发育成完整的植株(图 3M), 其中 D5 培养基中生成的再生植株最多。将在初始蔗糖浓度为 3% 的 D2 中生长的悬浮培养物转移到含蔗糖 6% 的 D2 中, 14 天后转入含蔗糖 1% 的 D2 培养液中, 愈伤上长出透明鱼雷胚, 质软, 生长比较均一, 但不能进一步发育。将初始蔗糖浓度为 3% 的 D2 中生长的胚状体转移到含 1% 蔗糖的 D2 中, 胚开始褐化, 失去发育能力。

2.5 悬浮体系的建立

本研究证明初始细胞密度为 2% 最有利于香果树球形胚聚合体增殖; 继代周期是 14 天; 较适合球形胚聚合体的基本培养基为 MS。悬浮培养条件下, 1% 的蔗糖浓度容易使胚愈伤化, 3% 和 6% 的蔗糖浓度适合球形胚聚合体增殖, 9% 的蔗糖浓度容易使球形胚聚合体褐化。添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 液体培养基, 初始蔗糖浓度为 3%, 然后逐步提高蔗糖浓度到 6% 有利于香果树体细胞胚胎不同发育阶段的同步化。以 2.0% 的接种量将球形胚聚合体接种到含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 液体培养基中, 添加 3% 蔗糖, 培养 14 天, 平均 1.0 g 培养物可产生约 1.1×10^5 个球形胚, 有 95% 的球形胚发育为子叶胚。

2.6 植株再生和移栽

将香果树带有明显根端的鱼雷胚(图 3N)接种到不添加任何生长调节物质的 MS 固体培养基中, 结果显示不能长成植株, 但将其转入含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 固体培养基中, 则可以萌发成植株。将已经长出 2 片子叶的子叶胚转移到不含任何植物生长调节物质的 MS 固体培养基上, 茎端先发育, 然后开始长根, 最终长成正常植株(图 3O)。子叶胚转变为再生植株的频率可达 100%, 形态上没有观察到畸形苗, 移栽成活率达 95% 以上。

3 讨论

细胞悬浮培养是植物细胞生产工业化必经的重要步骤, 通过悬浮培养可获得大量的体细胞胚。与固体培养相比, 细胞悬浮培养具有细胞繁殖速度快, 能大规模培养和可提供大量均匀一致的植物细胞培养物的特点。本实验中, 液体培养的悬浮细胞分裂速度快, 球形胚数量多且较同步, 并可以得到较多的各个时期的胚。球形胚经过体胚成熟和体胚萌发等步骤, 成功获得了体胚的再生植株。

蔗糖在体胚发生过程中不仅可作为碳源, 而且可作为渗透剂调节培养基渗透势(Park and Ahn, 2005; Shohael et al., 2006; Jheng et al., 2006)。本实验中, 蔗糖的浓度不同, 则香果树体细胞胚胎的生长情况也有些不同。当初始蔗糖浓度比较低时, 胚容易发生早熟现象, 胚个体小, 容易愈伤化, 且几天后就跨越正常的发育阶段长出根来, 生成的植株比较弱小。在初始蔗糖浓度为 3% 的培养基中, 胚个体大, 生长正常, 不易再次愈伤化, 最有利于形成正常的香果树体细胞胚。在悬浮培养过程中逐步提高蔗糖浓度有利于香果树体细胞胚胎不同发育阶段的同步化。在蔗糖浓度改变的过程中, 改变的范围不宜过大, 应逐渐提高糖浓度, 如果糖浓度跨度过大, 则形成的胚极易愈伤化。

进一步研究利用生物反应器大规模生产香果树体细胞胚胎, 将会节约成本, 提高生产效率。由于体胚发生体系较为稳定, 可以在分子水平上研究胚胎发生的机理。体细胞胚胎发生系统是遗传转化研究的良好受体系统, 利用农杆菌介导的转化方法, 可以转入有用抗性基因, 进行遗传改良研究。

参考文献

- 傅立国, 金鉴明 (1992). 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第一册). 北京: 科学出版社. pp. 568-569.
- 姬飞腾, 李凤兰, 高述民, 陈发菊 (2005). 香果树体细胞胚胎发生. 植物生理学通讯 41, 619-621.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158.

- Jheng FY, Do YY, Liauh YW, Chung JP, Huang PL (2006). Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. *Plant Sci* **170**, 1133-1140.
- Lloyd G, McCown B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Propagators Soc* **30**, 421-427.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-498.
- Park SY, Ahn JK (2005). Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Sci* **168**, 1221-1225.
- Shohael AM, Chakrabarty D, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY (2006). Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Proc Biochem* **41**, 512-518.

Establishment of Embryogenic Cell Suspension Culture and Plant Regeneration of Rare Endangered Plant *Emmenopterys henryi*

Dan Xiong¹, Faju Chen^{1, 2*}, Hongwei Liang¹, Yubing Wang¹

¹Key Laboratory of Natural Products Research and Development of Hubei Province, Biotechnology Research Center of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

²Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China

Abstract Embryogenic cell suspension cultures were established from calli of immature seeds of *Emmenopterys henryi*. Callus could be obtained from immature seeds on MS solid medium augmented with 2.0 mg·L⁻¹ 6-benzylaminopurine (6-BA) and 3% sucrose. Embryogenic calli were induced on MS basal medium supplemented with 0.1 mg·L⁻¹ N-acetyl aspartate (NAA) and 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA. Numerous somatic embryoids appeared on MS liquid basal nutrient medium with 0.5 mg·L⁻¹ NAA and 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA. The optimal value of the initial cell density was 2.0% (fresh weight). Several parameters that might be associated with growth were determined over a 14-day period. The embryo-derived plantlets with well-developed roots and shoots were transferred successfully to the greenhouse, with a high survival rate of 95%.

Key words embryogenic suspension cell, *Emmenopterys henryi*, plant regeneration, somatic embryogenesis

Xiong D, Chen FJ, Liang HW, Wang YB (2008). Establishment of embryogenic cell suspension culture and plant regeneration of rare endangered plant *Emmenopterys henryi*. *Chin Bull Bot* **25**, 337-343.

* Author for correspondence. E-mail: chenfj616@163.com

(责任编辑: 白羽红)