

# 细枝木麻黄离体培养过程中愈伤组织和再生芽的细胞组织学观察

姜清彬<sup>1</sup>, 仲崇禄<sup>1\*</sup>, 陈羽<sup>1</sup>, 刘芬<sup>1,2</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 陈珍<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广州 510520; 2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004)

**摘要:** 为探讨细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq.)愈伤组织分化过程的细胞组织学, 对离体培养条件下的愈伤组织进行扫描电子显微镜和石蜡切片观察, 分析愈伤组织的细胞分裂、分化以及芽再生的发生过程。结果表明, 新鲜外植体培养于愈伤组织诱导培养基上, 伤口处的薄壁细胞开始脱分化, 培养 1 周后形成明显的愈伤组织; 继续培养 2 周后, 胚性愈伤组织形成, 且表层细胞启动分化形成芽原基; 培养 4 周, 可肉眼观察到胚性芽原基, 数量增多并逐渐分化形成不定芽; 培养至第 6 周, 生成不定芽, 并大量增殖和分化。因此, 细枝木麻黄是通过愈伤组织分化形成胚状体的途径进行植株再生的, 为建立细枝木麻黄组织培养高效再生体系提供了理论依据。

**关键词:** 细枝木麻黄; 离体培养; 愈伤组织

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.01.006

## Cytohystological Observation of Callus and Adventitious Buds of *Casuarina cunninghamiana* Miq. *in vitro*

JIANG Qing-bin<sup>1</sup>, ZHONG Chong-lu<sup>1\*</sup>, CHEN Yu<sup>1</sup>, LIU Fen<sup>1,2</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, CHEN Zhen<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 2. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

**Abstract:** In order to understand the cytohystology of *Casuarina cunninghamiana* callus, cell division, callus differentiation and adventitious bud regeneration were studied under scanning electron microscope and paraffin sections. The results showed that parenchyma cells in the wound started dedifferentiation in the callus induction medium. After cultured for one week, callus were induced at the explant wound, and embryonic callus was formed. Bud primordium was induced from surface cells after two weeks. After culturing for a further four weeks, embryonic bud primordium became more increasingly visible, and gradually differentiated to become adventitious bud. After another six weeks, most of the adventitious buds have proliferated and differentiated, and some developed to shoots. It was confirmed that the regeneration of *C. cunninghamiana* could be achieved through embryoid callus differentiation, it would provide basis for establishment of efficient regeneration system in *C. cunninghamiana*.

**Key words:** *Casuarina cunninghamiana* Miq.; *in vitro* culture; Callus

细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq.)是我国木麻黄沿海防护林重要的三大树种之一, 能够抗干旱、耐瘠薄、耐盐碱, 具有速生、抗风、生

物固氮等特点, 广泛应用于沿海沙地和造林困难立地的固氮改土、防风固沙、盐碱地改良和建立农林复合系统, 是热带、亚热带地区的造林先锋树

收稿日期: 2014-07-01

接受日期: 2014-09-13

基金项目: 中央公益性科研院所基金项目(RITFYWZX201203); “十二五”林业科技支撑计划项目(2012BAD01B0603)资助

作者简介: 姜清彬(1982~), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为林业生物技术。E-mail: jiangqingbinhl@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zclritf@126.com

种,也是薪炭和造纸等树种<sup>[1-2]</sup>。木麻黄因其能够与 *Frankia* 放线菌共生固氮,发掘和利用共生固氮基因成为木麻黄分子生物学的热点,而通过愈伤组织再生的转基因技术被广泛用于分析和验证木麻黄共生固氮基因的功能<sup>[3-5]</sup>。目前在木麻黄科(Casuarinaceae)植物中,仅粗枝木麻黄(*C. glauca*)、轮生木麻黄(*Allocasuarina verticillata*)和细枝木麻黄建立了遗传转化和植株再生体系<sup>[6-9]</sup>,并获得了较理想的遗传转化效率和植株再生频率。然而在植株再生过程中,能否获得优良的胚性愈伤组织和是否分化成不定芽是关键基础<sup>[10]</sup>。截至目前,还未见木麻黄科植物愈伤组织和再生芽过程的细胞组织学观察报道。本研究以细枝木麻黄的上胚轴为外植体进行离体组织培养,利用扫描电子显微镜等观察愈伤组织的表面结构特征以及在愈伤组织分化过程中器官发生的形态变化,以期揭示愈伤组织分化过程中的细胞组织学变化规律,为建立细枝木麻黄组织培养高效再生体系提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq.)种子采自福建平潭 16 年生细枝木麻黄优树(平潭 3 号)。种子经消毒<sup>[9]</sup>后播种于 Hoagland 固体培养基<sup>[11]</sup>上,于(27±1)℃,光照 16 h d<sup>-1</sup>和光强 60 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>下的人工气候箱内培养 45 d,取上胚轴切成 10~15 mm 小段作为外植体。

愈伤诱导与再生培养基为 MSC<sup>[9]</sup>(1/2MS 大量元素<sup>[12]</sup>+MS 微量元素+NN 维他命<sup>[13]</sup>)+0.54 μmol L<sup>-1</sup> NAA+3.3 μmol L<sup>-1</sup> BAP+30 g L<sup>-1</sup> 蔗糖, pH=5.9,每 2 周更换新鲜培养基。诱导培养 1 个月后,将愈伤组织切离外植体,在愈伤组织诱导培养基上继代培养,培养条件相同。

外植体在培养开始时以及诱导培养 1、2、4 和 6 周后,随机取样,重复 3 次,用纯水将培养基清洗干净,制作样品。

### 1.2 扫描电子显微镜样品

参照许淑珺等<sup>[14]</sup>的方法制备扫描电子显微镜材料。用 4% 戊二醛固定 12 h 以上,在 4℃ 下保存,用 0.1 mol L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲液 2 h 内冲洗 3 次,每次 40 min,乙醇系列脱水 30%、50%、70%、80%、

90%,每次 15 min,100% 无水乙醇脱水 3 次,每次 10 min。叔丁醇清洗 3 次,每次 10 min,最后一次放置 -20℃ 冰箱,1 h 后用 JFD-310 真空冷冻干燥仪进行干燥,用碳双面胶带固定样品台上, JFC-1600 离子溅射仪进行镀铂金,在 JSM-6360LV 扫描电子显微镜下观察并拍照。

### 1.4 石蜡切片

石蜡切片制作参考赵晟等<sup>[15]</sup>和刘桂芝<sup>[16]</sup>的方法。用 FAA 固定,切片厚度 8 μm,经番红-固绿对染,中性树脂固封, Nikon 显微镜下观察并拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 枝条横切面解剖结构

细枝木麻黄上胚轴外植体小段颜色呈鲜绿色(图 1: A),横切面的电镜扫描和石蜡切片显示,上胚轴最外层有 6 个凸起(图 1: B, C),凸起内的细胞呈长圆柱形,含叶绿体,排列似栅栏。凸起内部为典型的木本植物茎初生结构,由外至内依次是皮层、维管柱和髓,初生韧皮部和初生木质部之间具有形成层。

### 2.2 愈伤组织

将细枝木麻黄上胚轴接种在愈伤组织诱导培养基上,1 周后靠近培养基的上胚轴基部全面启动脱分化,膨大,呈现绿色瘤状物(图 1: D),第 2 周瘤状物迅速膨大(图 1: G),4 周后愈伤组织中出現明显突起,凸起部分呈鲜绿色(图 1: J)。扫描电子显微镜观察,凸起的细胞团表面光滑(图 1: K),由多个细胞组成,细胞排列紧密,大小相似,为胚性愈伤组织表层细胞进行垂周分裂形成的胚状体(图 1: L)。胚性愈伤组织是指具备胚胎发生能力可直接用于体胚发生的愈伤组织,另一部分愈伤组织则因逐渐衰老而呈现出深黄或乳白色(图 1: J, M),细胞体积较大,多以单细胞存在,且细胞间结构疏松(图 1: L, O),为非胚性愈伤组织<sup>[17-18]</sup>。培养 6 周时胚状体增多,而且胚状体的排列更加紧密,生长较为旺盛(图 1: M)。

### 2.3 胚状体的形成与发育过程

细枝木麻黄上胚轴接种在愈伤组织诱导培养基 1 周后,扫描电子显微镜观察愈伤组织表面出现

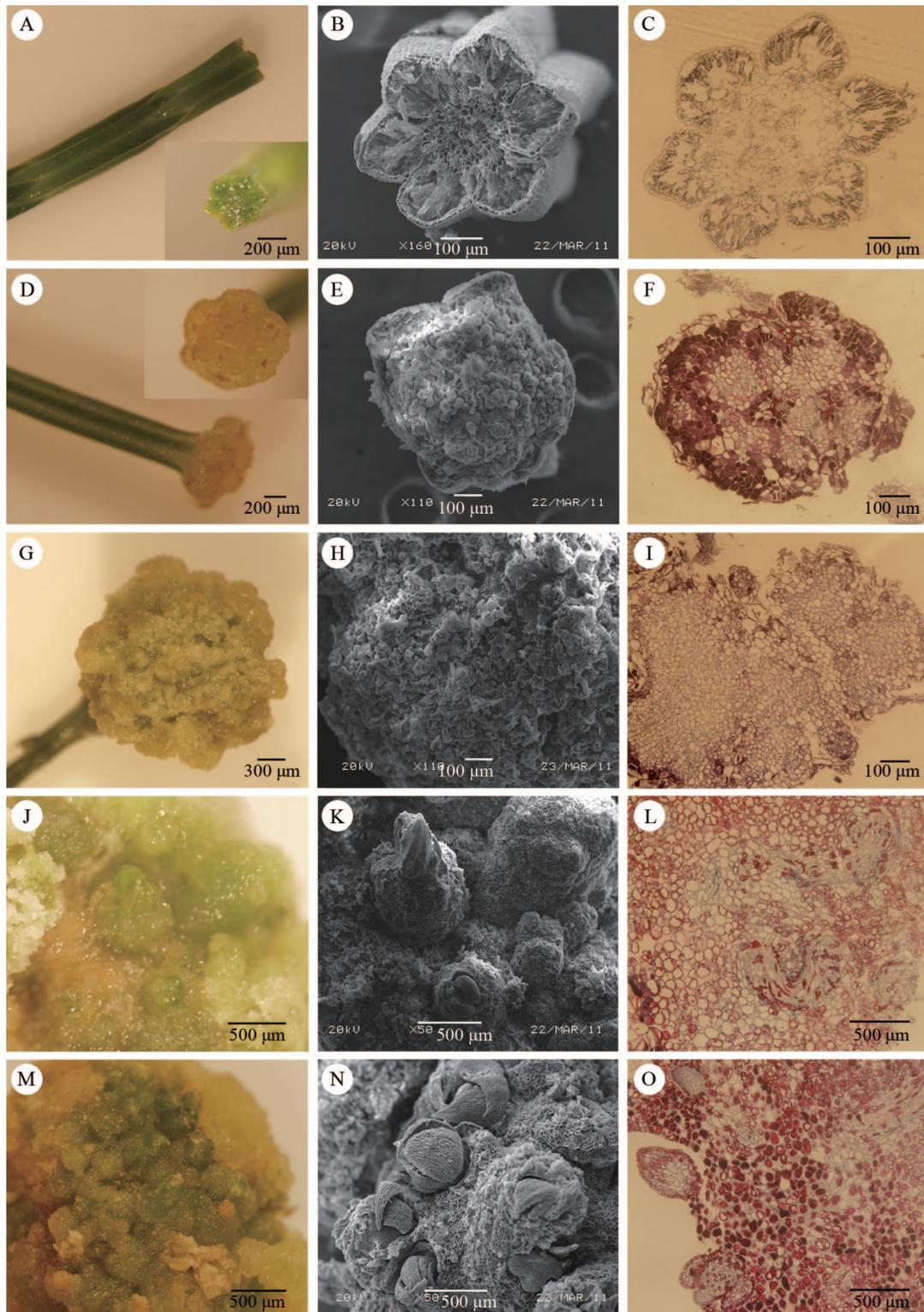


图1 细枝木麻黄的愈伤组织诱导。A~C: 上胚轴; B: 扫描电镜; C: 石蜡切片; D~F: 诱导培养1周的愈伤组织; E: 扫描电镜; F: 石蜡切片; G~I: 诱导培养2周的愈伤组织; H: 扫描电镜; I: 石蜡切片; J~L: 诱导培养4周的愈伤组织; K: 扫描电镜; L: 石蜡切片; M~O: 诱导培养6周的愈伤组织; N: 扫描电镜; O: 石蜡切片。

Fig. 1 Callus induction of *Casuarina cunninghamiana*. A~C: Epicotyl; B: Scanning electron microscope; C: Paraffin section; D~F: Callus induction after cultured one week; E: Scanning electron microscope; F: Paraffin section; G~I: Callus induction after cultured two weeks; H: Scanning electron microscope; I: Paraffin section; J~L: Callus induction after cultured four weeks; K: Scanning electron microscope; L: Paraffin section; M~O: Callus induction after cultured six weeks; N: Scanning electron microscope; O: Paraffin section.

大量团粒细胞结构,即初期的胚性愈伤组织,团粒细胞间结合紧密,团粒与团粒之间松散结合,下层的细胞则呈片状(图 1: E)。石蜡切片也可看出(图 1: F),上胚轴切段的从外至内都有了明显的变化,出现许多形状不规则、个体较小、细胞质较浓的细胞,产生了一些代谢物质,维管束的韧皮部已不明显,形成层细胞层数明显增加,表明产生了次生结构,外植体在诱导培养下全面启动脱分化。诱导培养的第 2 周(图 1: H, I),瘤状愈伤组织迅速膨大,细胞的体积变小,快速进行分裂,细胞数量大大增加。诱导培养 4 周后,愈伤组织表面出现两种不同颜色和形态的凸起(图 1: J),一种是鲜绿色,表面光滑,结构紧密,细胞大小相近,这是胚性愈伤组织表层细胞进行垂周分裂形成的胚状体;另一种是深黄或

乳白色,表面较粗糙,细胞体积较大,多以单细胞存在,且细胞间结构疏松,这是非胚性愈伤组织。电镜扫描显示,胚状体表面结构似芽的生长锥,部分已分化形成叶原基(图 1: K),从绿色凸起部位的切片来看,一些薄壁细胞特化成维管细胞,没有形成具有一定结构的维管系统(图 1: L),外围有 5~6 层排列松散的薄壁细胞,构成了皮层区,最外有一层染色较深的长形细胞,能够保护内部的结构不受旺盛分裂的薄壁细胞干扰,以形成紧密的、具有分生中心的细胞团。胚性愈伤组织继续培养至第 6 周,大量胚性愈伤组织形成紧实的球状体(图 1: M),扫描电子显微镜(图 1: N)下,大部分的胚状体表面已形成了幼叶原基;横切面上(图 1: O)可以看到新的分生细胞团向外凸出,多个幼叶原基开始发育形成

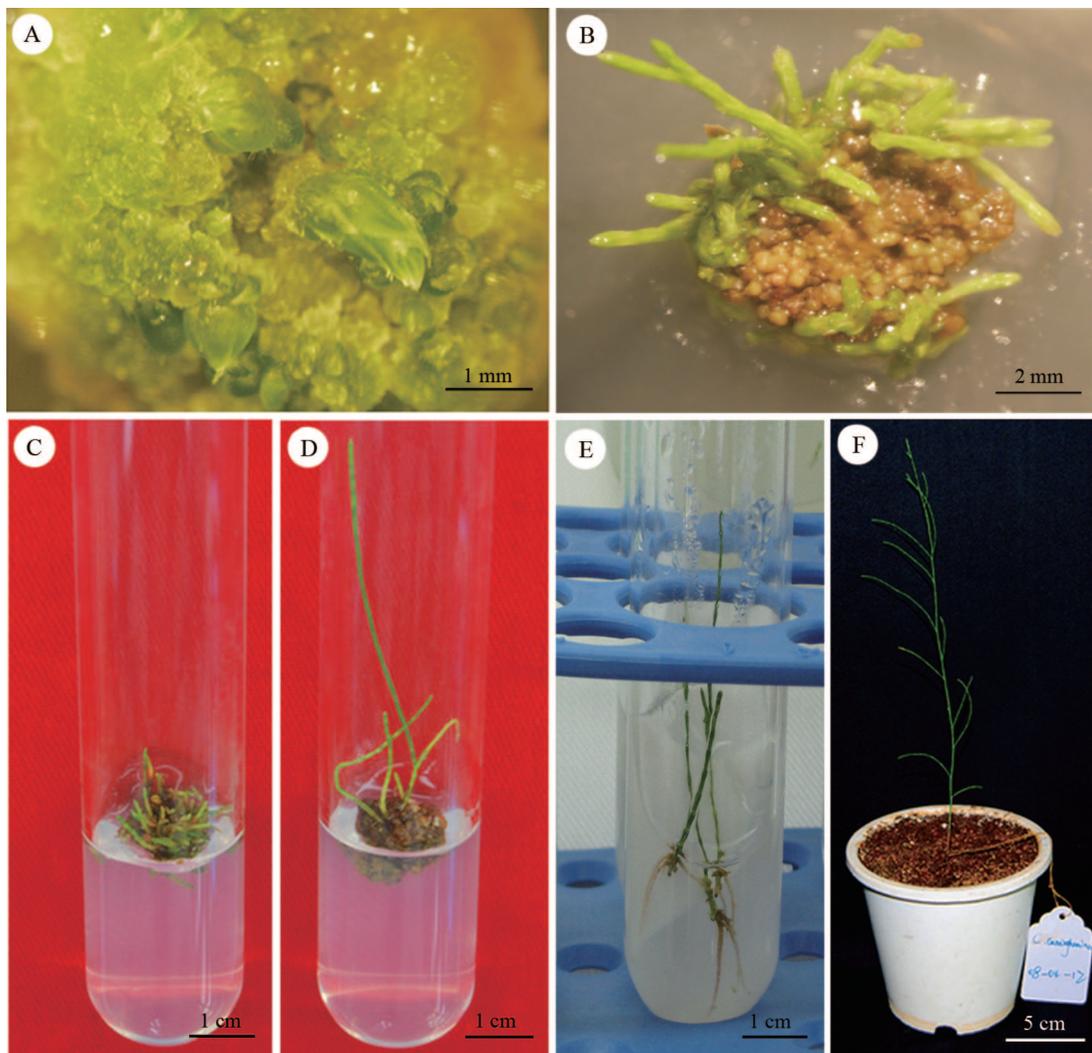


图 2 细枝木麻黄的植株再生。A: 分化的不定芽; B: 大量不定芽再生; C: 不定芽培养; D: 不定芽伸长生长; E: 不定芽生根培养; F: 完整植株。  
Fig. 2 Plant regeneration of *Casuarina cunninghamiana*. A: Adventitious buds differentiated from callus; B: Numerous adventitious buds regenerate; C: Culture of adventitious buds; D: Elongation growth of adventitious buds; E: Rooting culture; F: Regeneration seedling.

不定芽(图 1: N)。

### 3 结论和讨论

本研究利用扫描电子显微镜和石蜡切片技术,观察了细枝木麻黄上胚轴的愈伤组织诱导和芽再生的分化过程,诱导的愈伤组织进一步培养能成功分化出不定芽,表明细枝木麻黄能通过愈伤组织分化胚状体的途径进行植株再生。扫描电子显微镜和石蜡切片观察可以看出,不同时期的愈伤组织在细胞结构和形态上不同,有的可以发育成胚状体,有的则无法完成正常的发育。培养一定时间的同一愈伤组织会同时存在胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织,说明细枝木麻黄也属于愈伤组织发育具有异质性的树种之一<sup>[17]</sup>。

细枝木麻黄胚性愈伤组织细胞体积较小,大小均一,细胞之间结合较为紧密,多以细胞团形式存在,形状呈椭圆形。这与林木杂交鹅掌秋(*Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*)<sup>[18]</sup>和楸树(*Catalpa bungei*)<sup>[19]</sup>的描述较一致,与其他非林木植物胚性愈伤组织的形态和结构也类似。朱向涛等<sup>[17]</sup>报道牡丹(*Paeonia suffruticosa*)的胚性细胞呈椭圆形,排列紧密;鲁旭东等<sup>[20]</sup>报道石刁柏(*Asparagus officinalis*)的胚性愈伤组织表面粗糙,细胞形状规则,呈团状。此外,细枝木麻黄非胚性愈伤组织细胞体积比胚性愈伤组织细胞大,细胞分散不易成团,细胞间隙较多,总体上细胞形态较为规则,呈圆形或椭圆形。一些植物的非胚性愈伤组织细胞形状不规则,如楸树的非胚性细胞有球形和长条形<sup>[19]</sup>,牡丹的呈长形<sup>[17]</sup>,石刁柏的细胞形态不规则,呈片状和雪花状,表面结构疏松<sup>[20]</sup>。但 Häsler 等<sup>[21]</sup>报道甜菜(*Beta vulgaris*)的胚性细胞呈长条形,非正常细胞呈椭圆形。

此外,不同时期愈伤组织的石蜡切片显示,胚状体的形成除了来源于胚性愈伤组织的表面,也有来源于胚性愈伤组织内层部分细胞,并且这两个部分细胞形成胚状体的形状有些差异,即表面的胚状体主要是椭圆形,内部的形状既有椭圆形又有长形。这可能与接触培养基的多少,以及表面不易受细胞压力束缚等原因有关。这是否会引引起胚状体进一步发育形成不定芽还有待进一步研究。但这种结构发生特点在其他植物<sup>[22-24]</sup>胚状体的发生中也有。因此,细枝木麻黄离体再生过程的愈伤组织

诱导和不定芽分化,与其他林木和非林木植物具有较多相似之处,但又不完全相同。在本研究采用的培养条件下,胚性愈伤组织能成功分化不定芽,并能获得再生植株(图 2)。这为建立细枝木麻黄组织培养高效再生体系和转基因植株再生提供理论依据。

**致谢** 本研究中扫描电子显微镜和石蜡切片工作分别得到了中国科学院华南植物园胡晓颖高级工程师和华南农业大学生命科学学院赵晟副教授的大力支持和帮助,中南林业科技大学生命科学与技术学院马英姿副教授审阅论文初稿并提出修改意见,在此一并表示感谢。

### 参考文献

- [1] Zhong C L, Zhang Y, Chen Y, et al. *Casuarina* research and application in China [J]. *Symbiosis*, 2010, 50(1/2): 107-114.
- [2] Jiang Q B. Studies on regeneration system and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2011: 1-133.  
姜清彬. 细枝木麻黄再生体系及农杆菌介导遗传转化研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011: 1-133.
- [3] Franche C, Laplace L, Duhoux E, et al. Actinorhizal symbioses: Recent advances in plant molecular and genetic transformation studies [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1998, 17(1): 1-28.
- [4] Jiang Q B, Zhong C L, Zhang Y, et al. The progress of symbiotic genetic transformation in Casuarinaceae [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2009, 17(2): 205-210.  
姜清彬, 仲崇禄, 张勇, 等. 木麻黄科植物共生基因遗传转化研究进展 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2009, 17(2): 205-210.
- [5] Svistoonoff S, Gherbi H, Nambiar-Veetil M, et al. Contribution of transgenic Casuarinaceae to our knowledge of the actinorhizal symbioses [J]. *Symbiosis*, 2010, 50(1/2): 3-11.
- [6] Le Q V, Bogusz D, Gherbi H, et al. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree [J]. *Plant Sci*, 1996, 118(1): 57-69.
- [7] Franche C, Diouf D, Le Q V, et al. Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocausuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant J*, 1997, 11(4): 897-904.
- [8] Diouf D, Sy M O, Gherbi H, et al. Casuarinaceae [M]// Kole C R, Scorza R, Hall T C. Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species, Vol. 9. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2009: 279-292.
- [9] Jiang Q B, Zhang Y, Zhong C L, et al. Establishment of an *in vitro* plant regeneration protocol for *Casuarina cunninghamiana* Miq. via indirect organogenesis [J]. *New For*, 2012, 43(2): 143-154.
- [10] Tang W, Ouyang P, Guo Z C. Studies on embryogenic callus

- induction and plant regeneration in loblolly pine [J]. *Sci Silv Sin*, 1998, 34(3): 115–119.
- 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛. 火炬松胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究 [J]. *林业科学*, 1998, 34(3): 115–119.
- [11] Hoagland D R, Arnon D I. The Water-culture Method for Growing Plants without Soil [M]. California: University of California College of Agriculture, 1938: 1–347.
- [12] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15(3): 473–497.
- [13] Nitsch J P, Nitsch C. Haploid plants from pollen grains [J]. *Science*, 1996, 163(3862): 85–87.
- [14] Xu S J, Wu L F, Hu X Y, et al. Floral organogenesis and development of *Litchi chinensis* Sonn. cv. Guiwei [J]. *Guihaia*, 2012, 32(2): 167–172.
- 许淑珺, 吴林芳, 胡晓颖, 等. 桂味荔枝花器官的发生和发育过程研究 [J]. *广西植物*, 2012, 32(2): 167–172.
- [15] Zhao S, Sun T X, Li B T, et al. Anatomic studies on leaves from three plants of *Goniothalamus* (Bl.) Hook. f. et Thoms. [J]. *Chin Trad Herb Drug*, 2002, 33(3): 258–260.
- 赵晟, 孙同兴, 李秉滔, 等. 三种哥纳香属药用植物叶的比较解剖研究 [J]. *中草药*, 2002, 33(3): 258–260.
- [16] Liu G Z. The making process of the paraffin section of the specimen [J]. *J Tonghua Teach Coll*, 2004, 25(11): 90–91.
- 刘桂芝. 石蜡切片标本的制作过程 [J]. *通化师范学院学报*, 2004, 25(11): 90–91.
- [17] Zhu X T, Wang Y, Peng Z H, et al. Scanning electron microscopy of *Paeonia suffruticosa* callus [J]. *For Res*, 2011, 24(5): 609–612.
- 朱向涛, 王雁, 彭镇华, 等. 牡丹愈伤组织扫描电镜观察 [J]. *林业科学研究*, 2011, 24(5): 609–612.
- [18] Chen J H, Shi J S, Gan X H, et al. Observation of the somatic embryogenesis of *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera* by scanning electron microscope [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 2005, 29(1): 75–78.
- 陈金慧, 施季森, 甘习华, 等. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生的扫描电镜观察 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2005, 29(1): 75–78.
- [19] Ren Y, Peng F R, Yang Y, et al. Morphological and cytological observation on the different callus in *Catalpa bungei* [J]. *China For Sci Techn*, 2011, 25(5): 43–45.
- 任莺, 彭方仁, 杨燕, 等. 楸树不同类型胚性和非胚性愈伤组织的细胞学观察 [J]. *林业科技开发*, 2011, 25(5): 43–45.
- [20] Lu X D, Xiao L T, Liu H Y, et al. Studying on histology and cytology of three different types calli of *Asparagus* [J]. *J Xiaogan Univ*, 2009, 29(3): 5–9.
- 鲁旭东, 萧浪涛, 刘华英, 等. 石刁柏3种不同类型愈伤组织的组织细胞学研究 [J]. *孝感学院学报*, 2009, 29(3): 5–9.
- [21] Häsler J, Wüest J, Gaspar T, et al. Long term *in vitro*-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level [J]. *Biol Cell*, 2003, 95(6): 357–364.
- [22] Fowke L C, Attree S M, Rennie P J. Scanning electron microscopy of hydrated and desiccated mature somatic embryos and zygotic embryos of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.] [J]. *Plant Cell Rep*, 1994, 13(11): 612–618.
- [23] Zeng J J, Sun Y M, Sun M, et al. Cytohistological observations of callus and adventitious bud of *Isatis indigotica* Fort. [J]. *J SW China Norm Univ (Nat Sci)*, 2004, 29(6): 1069–1072.
- 曾建军, 孙一铭, 孙敏, 等. 菘蓝离体培养过程中愈伤组织和再生芽发生的细胞组织学观察 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2004, 29(6): 1069–1072.
- [24] Ferreira S, Batista D, Serrazina S, et al. Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2009, 96(1): 35–43.