

# 长寿花胚性愈伤组织的诱导及胚状体再生

陈超 王桂兰 田立民 崔瑞生

(唐山师范学院生物科学技术系, 唐山 063000)

**摘要:** 研究了长寿花胚性愈伤组织的筛选, 胚状体的诱导发生、发育过程及植株再生。经过对外观及细胞学观察, 看出外观质地疏松、颗粒状的淡黄色愈伤组织细胞圆形且形状规则, 是胚性愈伤组织。诱导胚性愈伤组织的最适培养基为: MS + 2, 4-D  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 胚状体的诱导培养基为 MS + BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 活性炭  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 胚状体诱导率可达  $185 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$  胚状体; 胚状体的再生培养基为 MS + 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。利用石蜡切片对胚状体的发生过程进行了观察。

**关键词:** 长寿花; 胚性愈伤组织; 胚状体; 再生

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0249-04

## Embryoid Induction and Regeneration in Callus of *Kalanchoe blossfeldiana*

Chen Chao, Wang Guilan, Tian Limin, and Cui Ruisheng

(Department of Biological Science and Technology, Tangshan Teacher's College, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** The study aimed on the selection of embryonic callus of *Kalanchoe blossfeldiana*, the induction of embryoid, morphogenesis of embryoid and regeneration. The grain-like, light yellow and loose callus was embryonic callus. During the inducing of embryoid, the culture mediums with different growth regulator concentration were used. Finally the culture medium with the highest of reduction frequency was MS + BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + Sucrose  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + Active carbon  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $185 \text{ embryoid per gram}$ ). The regeneration medium was MS + Sucrose  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The appearance and growing of embryoid were also observed through paraffin slices of callus. The development procedure of embryoid was procell of embryoid, globular stage, heart-shape stage and cotyledonary stage.

**Key words:** *Kalanchoe blossfeldiana*; Embryonic callus; Embryoid; Regeneration

### 1 目的、材料与方法

长寿花 (*Kalanchoe blossfeldiana*) 为景天科伽蓝菜属多年生短日照多浆植物, 作为盆花栽培的多为矮生性状较强的园艺杂交品种。花有红色、粉红色、橙黄色、黄色、白色等, 是优良的室内观赏花卉, 一般不结种子, 靠扦插繁殖。虽有组培快繁方面的报道<sup>[1]</sup>, 但未见对胚性愈伤组织、胚状体的诱导及再生、胚状体的发生发育过程进行深入的研究报道。

本试验采用长寿花红色品种 'Rako' 和橙黄色品种 'Petero'。自本校温室取植株幼叶, 流水冲洗 0.5 h 以上, 70% 酒精消毒 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 5 min, 无菌水冲洗 4~5 次。将叶切成  $1 \text{ cm}^2$  左右的小块, 接种于诱导培养基上 (也可取长寿花试管苗的叶片接种), 愈伤组织长出后, 将其剥离转入继代培养基获得大量愈伤组织。挑取质地疏松、呈颗粒状的淡黄色胚性愈伤组织继代培养, 再转接到胚状体诱导培养基上, 最后将诱导出的胚性愈伤组织接种到再生培养基上。以上各种培养基中均加入蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 琼脂  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.8。培养温度  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照  $2000 \text{ lx}$ ,  $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

挑取各种愈伤组织制成压片, 用 Motic 数码显微镜进行观察照相。挑选带有各阶段胚状体的胚性愈伤组织, 用卡诺固定液固定, 常规石蜡制片法切片, 厚度  $8 \mu\text{m}$ , 番红染色, 用 Nikon LABPHOTO

II 型显微镜进行观察照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚性愈伤组织的诱导及细胞学观察

愈伤组织诱导以 MS 作为基本培养基, 先后添加 1、2、3、4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D + 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D + 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA, 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D + 0.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 等, 经对愈伤组织的诱导速度、诱导率及生长速度等几个方面的比较, 认为培养基 MS + 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D + 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 效果最好。外植体接种 15 d, 膨胀变厚, 边缘出现白色绒状物质, 随后愈伤组织在切口附近出现, 随时间的延长叶片的厚度可达到原来的 2~3 倍 (见图版, 1), 这一现象可能是长寿花叶表皮较厚, 叶内部产生的愈伤难于突破表皮所致。如在接种时将叶片剖开, 有助于解决这一问题。诱导出的愈伤组织在外观上可分为淡黄色、黄褐色、黄绿色、暗黄表面带黑、白色等几种。细胞学观察结果显示, 淡黄色愈伤组织细胞呈圆形且形状规则, 可正常分化 (见图版, 2), 此种愈伤组织即为胚性愈伤组织。长寿花两个品种诱导出的愈伤组织种类及外观形态差异不大。将挑选出的淡黄色愈伤组织在相同配方的培养基上继代即获得胚性愈伤组织 (见图版, 3)。2,4-D 浓度过高或过低均不利于胚性愈伤组织的诱导, 在胚性愈伤的诱导中添加一定浓度的 BA 是必要的。

利用试管苗切取外植体进行接种时, 不要把一株小苗接种于培养基上, 这样会导致小苗不断生长发育, 一定要茎、叶分离后分别接种才能诱导出愈伤组织。

### 2.2 胚状体诱导

不同生长调节剂的配比试验 (如表 1) 结果显示, 胚性愈伤组织诱导产生胚状体速度最快、诱导率最高的是 5 号培养基, 6、7、8 号培养基也出现了较多的胚状体。1、3、9、11、13、19 号培养基中出现愈伤组织变绿且向外突出的现象, 有少量的胚状体发生。其余培养基中无胚状体发生。从试验结果看, MS 培养基较 1/2MS 培养基更利于胚状体的诱导, 这可能与长寿花胚状体的诱导需要较高的

表 1 胚性愈伤组织胚状体的诱导率

Table 1 The induction rate of embryonic callus

培养基 Medium	序号 Number	6-BA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Ad ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	活性炭 Active carbon ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	每克胚性愈伤组织中胚状体个数 The number of embryoids in embryonic callus per gram		
						未成熟胚状体 Unmature embryoid	成熟胚状体 Mature embryoid	总数 Total amount
MS	1	2	0.2	5	—	8	0	8
	2	2	0.2	5	4	0	0	0
	3	1	0.1	5	—	6	2	8
	4	1	0.1	5	4	0	0	0
	5	2	0.2	—	4	112	73	185
	6	1	0.1	—	4	96	61	157
	7	—	—	—	4	90	58	148
	8	3	0.3	—	—	45	32	77
	9	3	0.3	5	—	7	2	9
	10	3	0.3	5	4	0	0	0
1/2MS	11	2	0.2	5	—	10	1	11
	12	2	0.2	5	4	0	0	0
	13	1	0.1	5	—	6	1	7
	14	1	0.1	5	4	0	0	0
	15	2	0.2	—	4	0	0	0
	16	1	0.1	—	4	0	0	0
	17	—	—	—	4	0	0	0
	18	3	0.3	—	—	0	0	0
	19	3	0.3	5	—	5	0	5
	20	3	0.3	5	4	0	0	0

注: 此表数据为红色品种诱导处理 38 d 的统计结果。

Note: The data in this table were results from red variety in 38 days since induced treatment.

离子浓度、较丰富的营养条件有关。在培养基中添加生长调节剂对提高胚状体的诱导率是有利的, 加入活性炭有促进胚状体诱导的作用, 而 Ad (硫酸腺嘌呤) 与活性炭的组合中均未出现胚状体, 说明 Ad 对胚状体的诱导起副作用。

比较不同品种长寿花胚状体发生发育过程发现, 在胚性愈伤组织的分化中, 红色品种 14 d 便有大量胚状体长出, 胚性愈伤组织颜色首先由淡黄变褐随即诱导出胚状体 (见图版, 4); 而橙黄色品种则分化较慢, 胚性愈伤组织颜色由淡黄变绿随之诱导出胚状体。

### 2.3 胚状体发生的形态细胞学观察

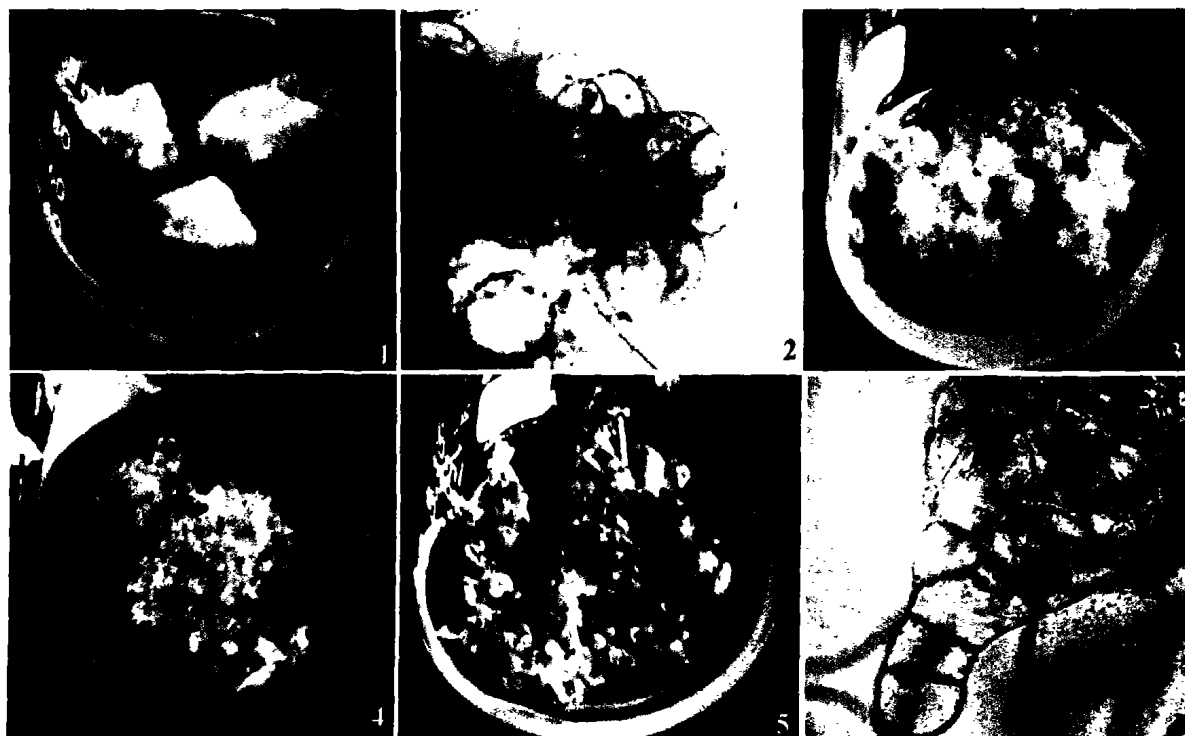
胚性愈伤组织的切片观察显示, 胚状体起源于胚性愈伤组织内部单个胚状体原始细胞, 该细胞的细胞质浓, 染色深, 细胞核大而圆。胚性细胞进行多次分裂, 形成小细胞团, 历经多细胞胚、球形胚、心形胚、子叶胚最后发育成熟 (见图版, 6~12)。这和正常双子叶合子胚的发育过程相似<sup>[2]</sup>。

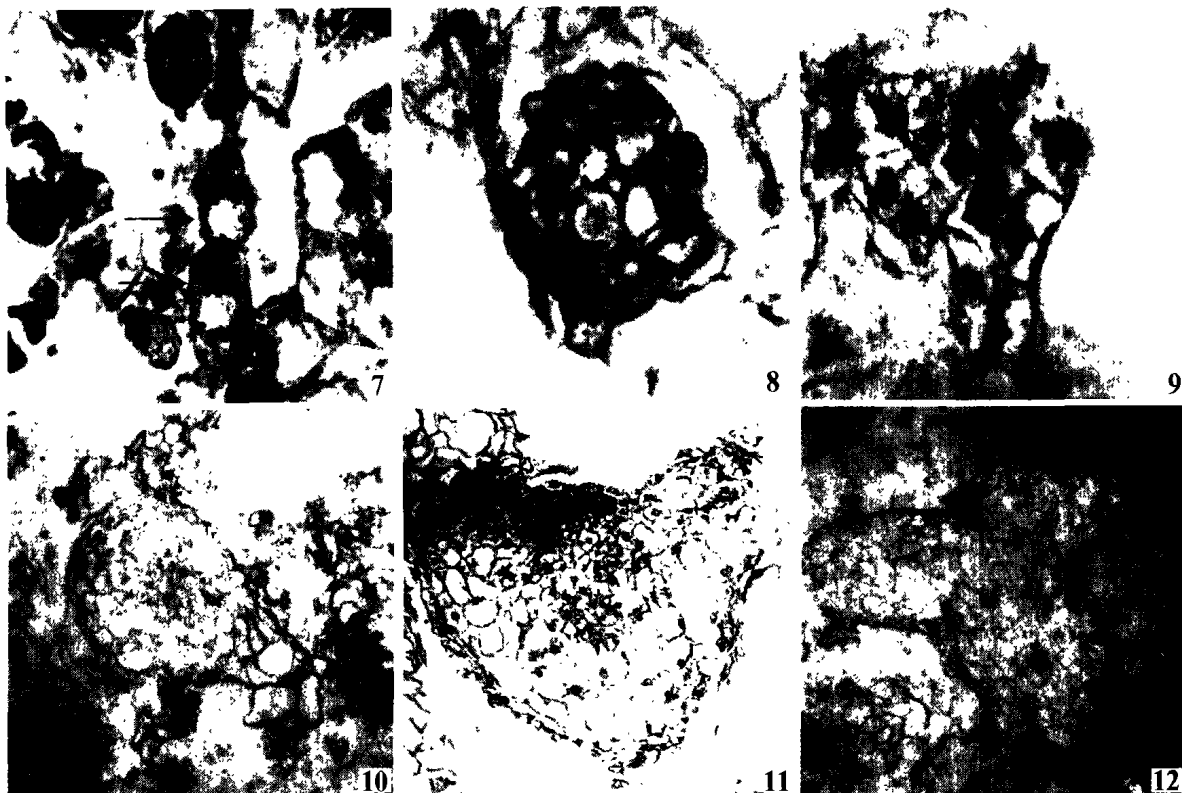
### 2.4 胚状体的再生

将诱导出胚状体的胚性愈伤组织接于①MS + 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 琼脂  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和②MS + 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 琼脂  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 活性炭  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  再生培养基, 不同发育时期的胚状体陆续发育成幼苗 (见图版, 5)。培养基中加入活性炭对苗的形成具有不利的作用, 会出现大量的玻璃化苗。如在胚状体诱导培养基上持续培养, 也可直接成苗, 但也发生大量玻璃化苗。所以, 胚状体再生最好将诱导出胚状体的胚性愈伤组织转接到不加活性碳的 MS 培养基上。多种因素可能造成玻璃化<sup>[3,4]</sup>, 本研究中此现象的出现推测可能是活性炭吸附营养物, 造成大量胚状体在进一步发育中营养缺乏以及渗透压增高等综合因素造成的。

### 2.5 试管苗移栽

移栽前在温室内对瓶苗进行增光 ( $5000 \sim 10000 \text{ lx}$ ) 降温 ( $20^\circ\text{C}$  左右) 锻炼, 出瓶前 2~3 d 开瓶盖降湿。移栽时取出小苗, 洗去培养基, 将小苗栽入以蛭石和草炭 (1:1) 为基质的穴盘中, 基质在栽苗前用 0.1% 甲基托布津喷淋消毒。移栽后湿度保持在 90% 以上, 逐步降低至温室正常湿度。温度控制在  $25^\circ\text{C}$  左右, 7 d 后叶面喷施 1/2 MS 大量元素营养液, 每周 1 次, 30 d 后进入常规管理。依以上方法进行试管苗的出瓶, 成活率可达 98% 以上。





图版说明: 1. 愈伤组织诱导; 2. 胚性愈伤组织中的小细胞团, 600 $\times$ ; 3. 胚性愈伤组织; 4. 胚状体再生; 5. 再生成苗; 6. 胚性愈伤组织中的胚状体, 400 $\times$ ; 7. 多个胚状体原始细胞 (箭头所示), 600 $\times$ ; 8. 胚状体多细胞胚阶段, 400 $\times$ ; 9, 10. 胚状体球形胚阶段, 100 $\times$ ; 11. 胚状体心形胚阶段, 40 $\times$ ; 12. 胚状体成熟胚阶段, 40 $\times$

**Explanation of plates:** 1. Callus induction; 2. Small cell group in embryonic callus; 3. Embryonic callus; 4. Regenerated embryo; 5. Regenerated plant; 6. Embryoid in embryonic callus, 400 $\times$ ; 7. Several procell of embryo, 600 $\times$ ; 8. Multi-cell stage of embryo, 400 $\times$ ; 9, 10. Globular stage of embryo, 100 $\times$ ; 11. Heart-shape stage of embryo, 40 $\times$ ; 12. Cotyledonary stage of embryo, 40 $\times$ .

### 参考文献:

- 1 韦三立. 花卉组织培养. 北京: 中国林业出版社, 2001. 99
- 2 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 高等教育出版社, 1984. 179~182
- 3 李映红, 郭仲琛. 青杆体细胞胚胎发生及小苗形成的研究. 见: 中国科学院植物研究所, 兰州大学生物系主编. 植物细胞工程应用基础研究新进展. 北京: 学术期刊出版社, 1989. 49~53
- 4 卜学贤, 陈维伦. 试管植物的玻璃化现象. 见: 中国科学院植物研究所, 兰州大学生物系主编. 植物细胞工程应用基础研究新进展. 北京: 学术期刊出版社, 1989. 90~96

### 新书推荐

## 《中国木本植物种子》

全书共收集 492 属、1276 个种 (含变种和亚种)。按属或种简要记述生长习性、分布、用途和开花结实特点; 着重描述果实的采收、种子调制、种子储藏、发芽前的种子处理、发芽测定、播种等主要生产环节的要点。参与撰稿的多达 70 余人, 均为国内知名学者专家。本书融集体智慧之大成, 汇科学研究之精华, 既总结生产实践的先进经验, 又验之于撰稿人的直接知识; 记载翔实, 描述准确, 数据来源于实际。每个属或种均配有种子外观图和剖视图, 种子发芽进程图。具有先进性、科学性和实用性, 可供植物工作者、园林工作者、院校师生以及基层技术人员、行政管理人员参考。

定价: 200.00 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。