

# 丽格海棠叶片培养胚状体发生和植株再生

达克东 张 松 高东升 米瑞芙 周志文 束怀瑞

(山东农业大学园艺系, 泰安 271018)

**摘 要:** 利用丽格海棠盆栽植株叶片培养, 成功地诱导出胚状体并获得再生植株。具体步骤如下: 在 MS+BA 1 mg/L+NAA 4 mg/L+2,4-D 1 mg/L 培养基上预诱导 10 d; 在 MS+BA 1 mg/L 培养基上胚性细胞发生胚状体; 在 MS+IBA 0.5 mg/L 培养基上小植株生根。组织切片观察表明, 胚状体起源于叶片上表皮细胞。

**关键词:** 秋海棠; 组织培养; 胚状体

**中图分类号:** S 682; Q 813 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 02-0180-02

## 1 目的、材料与方法

丽格海棠 (*Begonia* × *Elatior*) 是雌雄异花多年生草本花卉, 用种子繁殖后代容易发生变异, 特别是重瓣类型, 其种子后代多向单瓣方向转化。利用组织培养方法是快速繁殖秋海棠的有效途径<sup>[1~3]</sup>。本试验的目的在于研究丽格海棠叶片培养胚状体发生、植株再生的适宜条件, 为利用组织培养进行其繁殖提供科学依据。

试材为从美国进口的盆栽丽格海棠品种 'Bellona' 的幼嫩叶片。叶片摘下后用脱脂棉在清水中擦洗干净, 用 70% 酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 用无菌滤纸吸去表面水分, 切割成 1 cm<sup>2</sup> 见方的小块接种于 MS+BA 1 mg/L+NAA 4 mg/L+2,4-D 1 mg/L 的培养基上, 黑暗培养 10 d 后转至 MS+BA 1 mg/L 培养基诱导胚状体发生。培养基均附加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, 灭菌前 pH 调至 5.8, 在 121、1.1 kg/cm<sup>2</sup> 高温高压灭菌 20 min。每处理 5 个培养皿, 接种叶片 30 块, 45 d 后统计分化情况。培养室温度 (25 ± 2)。组织切片取胚状体发生高峰期的材料, 用卡诺氏固定液固定, 石蜡切片法制片, 爱氏苏木精或番红-固绿染色, 用光学显微镜观察。

## 2 结果分析与讨论

2.1 胚性细胞诱导期 2,4-D 浓度对胚状体发生的影响 表 1 显示, 在 MS+BA 1 mg/L+NAA 4 mg/L 培养基暗培养 10 d 的条件下, 2,4-D 浓度低 (0.25~0.5 mg/L) 时叶片胚状体发生率和再生数量都较低, 叶片再生直接类型胚状体; 浓度中等 (1 mg/L) 时有利于增加胚状体发生率和单位面积胚状体数, 发生直接类型的胚状体; 浓度较高 (2 mg/L) 时胚状体发生率和单位面积胚状体数下降, 发生直接类型胚状体的同时伤口及其附近愈伤组织发生量明显增加, 说明 2,4-D 浓度过高。因此认为以 2,4-D 1 mg/L 时效果最好, 此条件下胚状体由叶片近轴面直接发生, 没有观察到胚状体成簇发生和二次胚状体发生 (见插页 1 图版, 1A)。再生的胚状体与发生的愈伤组织有明显区别: 1. 部位不同, 胚状体由叶片近轴面直接发生, 愈伤组织仅在叶片伤口及其附近发生; 2. 形式不同, 胚状体以不定点、单个发生, 愈伤组织以不规则形状、团状发生; 3. 颜色不同, 早期的胚状体表现为淡黄色, 愈伤组织是白色; 4. 表面状态不同, 早期胚状体表面光滑, 愈伤组织表面疏松。

收稿日期: 2000-11-27; 修回日期: 2001-03-06

2.2 胚性细胞诱导期光照对胚状体发生的影响 表 2 显示, 叶片在 MS + BA 1 mg/L + NAA 4 mg/L + 2, 4-D 1 mg/L 培养基、(25 ± 2) °C 培养箱中完全黑暗培养有利于胚状体发生, 黑暗处理以 10 d 为宜。时间太短, 胚状体发生率低, 数量少; 时间太长, 叶片伤口及其附近区域出现愈伤组织, 使得部分具有胚性的细胞失去胚性。由于愈伤组织化主要由 2, 4-D 引起, 2, 4-D 浓度高时, 胚性细胞诱导时间宜短, 浓度较低时, 诱导期可适当延长。

2.3 BA 浓度对胚状体发生的影响 表 3 显示, 经过胚性细胞诱导阶段的叶片, 在诱导胚状体发生阶段单独使用 BA 可以有效诱导胚状体发生。BA 浓度以 1 mg/L 为宜, 太低时胚状体发生率低, 再生量少, 太高时再生胚状体有玻璃化现象。

2.4 形态学组织学观察 胚状体发生诱导培养 20 d 后开始有胚状体发生。胚状体的发生是不同步的, 同一块叶片上可以观察到不同发育阶段的胚状体 (见插页 1 图版, 1A), 35 d 时达到发生高峰 (见插页 1 图版, 2)。组织切片观察表明, 胚状体以不定点方式由叶片近轴面表皮细胞发生 (见插页 1 图版, 1B)。胚状体发生诱导 35 d 后外植体胚状体发生达最高峰, 此时宜将培养物转移至光照条件下进行壮苗培养。

2.5 再生植株生根移栽 将壮苗培养生长至 2 cm 左右的小植株转至 MS + IBA 0.5 mg/L 培养基中诱导生根, 15 d 后 80 % 植株生根。生根植株移栽基质为草炭土, 移栽后注意保持适温 (25 °C) 高湿 (>90 %) 条件, 移栽成活率可达 70 % (见插页 1 图版, 3)。

#### 参考文献:

- 1 达克东, 张 松, 李雅志, 等. 苹果离体叶片培养直接体细胞胚胎发生研究. 园艺学报, 1996, 23 (3): 241 ~ 245
- 2 程家琴. 斑叶竹节海棠的离体快速繁殖研究. 河南大学学报 (自然版), 1996, 26 (2): 71
- 3 李进进, 柯丽婉, 吕丽蓉, 等. 玫瑰海棠离体快速繁殖. 植物生理学通讯, 1997, 33 (5): 358 ~ 359

### Somatic Embryogenesis from Leaves of *Begonia* × *Elatior*

Da Kedong, Zhang Song, Gao Dongsheng, Mi Ruifu, Zhou Zhiwen, and Shu Huairui

(Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

**Abstract:** Somatic embryo formation was induced from leaves of *Begonia* × *Elatior* by a three-step method: 1. Embryonic cells were preliminary induced on MS + BA 1 mg/L + NAA 4 mg/L + 2, 4-D 1 mg/L medium 10 days; 2. Somatic embryo formation was observed on MS + BA 1 mg/L medium; 3. Roots were induced on MS + IBA 0.5 mg/L medium. Histological study showed that the embryoid come from upper epidermal cell of the leaf.

**Key words:** *Begonia* × *Elatior*; Tissue culture; Somatic embryo

表 1 2,4-D 对胚状体发生的影响

Table 1 Effect of 2,4-D on somatic embryogenesis

2,4-D (mg/L)	再 生 率 Regeneration rate (%)	再生胚状体数 No. of somatic embryo regenerated
0	0	0
0.25	32.5	97
0.5	60	213
1	85	403
2	80	299

表 2 黑暗对胚状体发生的影响

Table 2 Effect of dark on somatic embryogenesis

处 理 Treatment	天 数 Days	再 生 率 Regeneration rate (%)	再生胚状体数 No. of somatic embryo regenerated
黑暗 Dark	0	0	0
	2.5	23	56
	5	64	162
	10	85	403
	15	80	220
光照 Light	10	23	47

表 3 BA 浓度对胚状体发生的影响

Table 3 Effect of BA on somatic embryogenesis

BA (mg/L)	再 生 率 Regeneration rate (%)	再生胚状体数 No. of somatic embryo regenerated
0	0	0
0.5	75	315
1	86	403
2	83	367
4	69	102

# 石荫坪等：特早熟胚培杏雌雄蕊发育的研究

Shi Yinping, et al. A Study of Pistil and Stamen Development of Earliest Embryo-cultured Apricot



图版说明：1. 杏雌蕊发育类型；2. 雌高型‘试管甜丰’；3. 等高型‘凯特’；4. 雌退型‘红荷包’。  
Explanation of plates: 1. Pistil development types of apricot, from left to right: pistil higher stamen, pistil equal to stamen, pistil lower stamen and pistil degeneration. 2. Pistil higher stamen, ‘Tube Tianfeng’. 3. Pistil equal to stamen, ‘Katy’. 4. Pistil degeneration, ‘Honghebao’.

## 达克东等：丽格海棠叶片培养胚状体发生和植株再生

Da Kedong, et al. Somatic Embryogenesis from Leaves of *Begonia* × *Elatior*



图版说明：1A. 诱导20d时叶片上不同发育阶段的胚状体 ×15；1B. 胚状体由叶片上表皮细胞发生 ×40；  
2. 诱导35d时达到胚状体发生高峰 ×10；3. 生根植株移栽至草炭基质中成活。

Explanation of plates: 1A. Somatic embryos in different developing stages after 20 days of somatic embryo induction (× 15); 1B. Histological study showed that the embryo come from upper epidermal cell of the leaf (× 40); 2. More somatic embryos differentiated after 35 days of somatic embryo induction (× 10); 3. Well grown little plant when transferred to a pot with turf soil.