

研究报告

Research Report

冰灯玉露体细胞胚诱导及其形态学和解剖学研究

朱洁琼^{1,2} 赵小梅¹ 林光哲¹ 闫丽¹ 仝德彬³ 廉玉姬^{1*}

1 临沂大学生命科学学院, 临沂, 276000; 2 山东师范大学生命科学学院, 济南, 250014; 3 临沂市仙株生物科技有限公司, 临沂 276000

* 通信作者, lianyuji@lyu.edu.cn

摘要 以多肉冰灯玉露(*Haworthia cooperivar*)叶片为外植体, 诱导、增殖胚性愈伤组织和植株再生; 用 Spurr 树脂包埋组织切片技术对颗粒状的胚性愈伤组织进行形态学和组织结构特征的研究。结果表明, 外植体在改良的 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA 培养基上可诱导出淡黄色、颗粒状的胚性愈伤组织, 其诱导率高达 66.7%。胚性愈伤组织在 MMS+1.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IAA 培养基上增殖效果最佳, 其净增殖量高达 14.73 g。胚性愈伤组织上分化的胚状体为乳白色球形或心形结构, 由细胞核大, 胞质浓密, 内含淀粉颗粒的, 分裂旺盛的细胞构成。内部的胚性愈伤组织呈螺旋状或椭圆形。这些结构在 MMS 添加 0.1~0.2 mg/L IAA 的培养基上进一步发育形成体细胞胚, 并在愈伤组织表面堆积形成完整的丛生小植物体, 体细胞胚在 MMS+0.1 mg/L IAA 培养基上再生形成根系粗壮的小苗。小苗经驯化后移栽, 成活率达 100%。该研究为冰灯玉露快速繁殖与分子育种提供了技术支撑。

关键词 冰灯玉露, 体细胞胚, 组织结构, 植株再生

Morphological and Histological Analysis of Somatic Embryogenesis in *Haworthia Cooperivar*

Zhu Jieqiong^{1,2} Zhao Xiaomei¹ Lin Guangzhe¹ Yan Li¹ Tong Debin³ Lian Yuji^{1*}

1 College of Life Sciences Linyi University, Linyi, 276000; 2 College of Life Sciences Shan dong Normal University, Jinan 250014; 3 Linyi Xianzhu Biotechnology co. LTD, Linyi, 276000

* Corresponding author, lianyuji@lyu.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0015

Abstract The fleshy leaves were used as materials for induction and proliferation somatic embryonic callus and plant regeneration. The morphological and histological characteristics of granular embryonic callus were studied by light microscopy using Spurr resin section. The results showed that the yellowish and granular embryonic callus was induced on modified MS medium were supplemented with 1.5 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L IAA, the highest induction ratio was 66.7%. The highest proliferation net weight (14.73 g) was presented at modified MS medium were added 1.5 mg/L 6-BA and 0.4 mg/L IAA. Milky white globular or heart shape somatic embryo was differentiated from calls that originated from outer or inner-epidermis, the embryonic callus was composed of cells with big nuclear, vigorous division and containing starch granules. The inner embryonic cell clusters showed spiral or oval shapes. These structures were further developed to somatic embryos, which were transformed to complete clumps of small plants from the surface of callus. Healthy developed seedlings rooted on MMS +0.1mg/L IAA. This

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 5 月 31 日; 接受日期: 2020 年 6 月 4 日; 发表日期: 2020 年 6 月 11 日

引用格式: 朱洁琼, 赵小梅, 林光哲, 闫丽, 仝德彬, 廉玉姬, 2020, 冰灯玉露体细胞胚诱导及其形态学和解剖学研究, 分子植物育种(网络版), 18(15): 1-8 (10.5376/mpb.cn.2020.18.0015) (Zhu J.Q., Zhao X.M., Lin G.Z., Yan L., Tong D.B., and Lian Y.J., 2020, Morphological and histological analysis of somatic embryogenesis in *Haworthia cooperivar*, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(15): 1-8 (10.5376/mpb.cn.2020.18.0015))

research provides technical support for the rapid propagation and molecular breeding of *Haworthia cooperivar*.

Keywords *Haworthia cooperivar*, Somatic embryo, Histological analysis, Plant regeneration

冰灯玉露(*Haworthia cooperivar*)隶属百合科(Liliaceae)瓦苇属(*Haworthia*)多年生肉质草本植物,是玉露杂交后选出的优良品种(谢维荪和徐民生, 1994, 中国农业出版社, pp.1-87),其叶片晶莹剔透,形似冰灯,是玉露家族中的极品,观赏价值高(周海成等, 2017)。在自然条件下冰灯玉露主要靠种子繁殖,但结实率比较低,出苗期比较长。目前,人工栽培条件下冰灯玉露主要采用分株、叶插等繁殖方式,但存在分生能力比较差,难以长出侧芽,繁殖系数较低,且生长速度较缓慢等问题,而不能满足市场需求(宋扬, 2014)。植物组织培养技术是一种能快速、有效地获得克隆植株的方法,包括体细胞胚胎发生和器官发生两种途径(Rosa et al., 2015),具有可应用于大规模再生、种质保存、遗传转化等优点(Ogawa et al., 2014; Teixeira et al., 2014; Nguyen et al., 2015)。植物体细胞胚再生方式具有来源于单个的原始胚性细胞,个体间遗传背景一致、胚结构完整、成苗快、繁殖量大、可用于生产人工种子生产等优点(翟彦等, 2011)。目前,冰灯玉露的组织培养研究多以花絮(郭生虎等, 2016)、花枝(朱天华等, 2012)和花茎(张海龙等, 2017; 周海成等, 2017)为外植体,利用不同种类植物生长调节剂诱导不定芽或不定根(张景新等, 2016)。体细胞胚的研究有关其体细胞胚诱导研究仅限于松散型愈伤组织的诱导方法(严小峰等, 2017),尚无冰灯玉露体细胞胚组织结构研究相关报道。本试验以冰灯玉露叶片为外植体利用植物生长调节剂诱导胚性愈伤组织和体细胞胚的发生,用 Spurr 树脂包埋切片技术对胚性愈伤组织进行切片、染色、观察,研究冰灯玉露体细胞胚发生的形态学和细胞学特征组织学特性,旨在探究冰灯玉露体细胞胚的发生,建立冰灯玉露离体高效植株再生体系,为冰灯玉露离体快繁、分子育种提供一定理论依据。

1 结果与分析

1.1 不同细胞分裂素对冰灯玉露胚性愈伤组织诱导的影响

将外植体接种于不同植物生长调节剂组合的 MMS 培养基上培养 56~70 d 后观察结果显示,没有添加植物生长调节剂的培养基上未观察到愈伤组织分化现象,在添加不同种类细胞分裂素的培养基上产生不同颜色和形态的愈伤组织。当外植体在培养

基添加 1.5 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L IAA 的诱导培养基上培养 15 d 时,叶片外植体基部开始膨大,膨大处出现淡黄色愈伤组织,大约培养 42 d 时逐渐转变成表面湿润,质地松软易碎的淡黄色颗粒状愈伤组织,有些愈伤组织上可观察到已分化的小芽点。培养 56 d 左右时淡黄色颗粒状愈伤组织上开始出现表面光滑的乳白色的颗粒状结构,在显微镜下观察到球形(图 1A)、心形(图 1B)等胚状体结构,其愈伤组织诱导率为 66.67% (表 1)。

1.2 胚性愈伤组织增殖

1.2.1 不同浓度 6-BA 对胚性愈伤组织增殖的影响

不同浓度 6-BA 对胚性愈伤组织的颜色、形态、质地和生长速度的影响差异比较大。愈伤组织增殖结果如表 2 所示,6-BA 浓度为 0.5~1.5 mg/L 时,接种 7~14 d 时增殖不明显,培养 21 d 后愈伤组织增殖十分旺盛,到 56 d 时愈伤组织的增殖速度比较快,增殖净重分别为 9.36 g、11.14 g 和 14.73 g,处理之间的差异显著。愈伤组织呈淡黄色、质地微松散易碎的

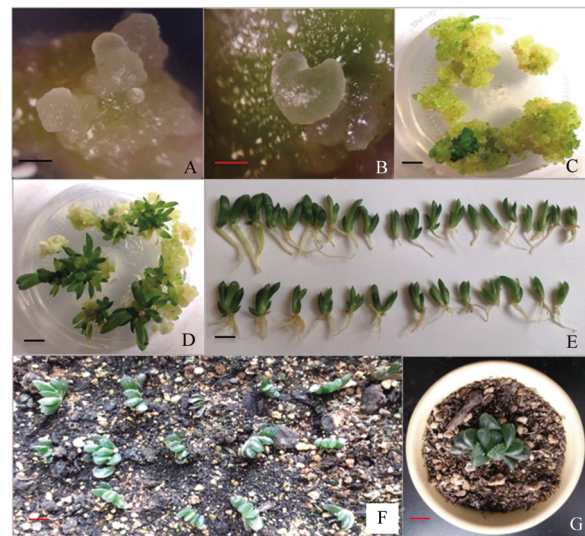


图 1 冰灯玉露体细胞胚诱导及其植株再生

注: A: 球形胚; B: 心形胚; C: 愈伤组织增殖; D: 体细胞胚的成熟与萌发; E: 植株再生; F, G: 驯化移栽的冰灯玉露小苗

Figure 1 Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Haworthia cooperivar*

Note: A: Globular shape somatic embryo; B: Heart shape somatic embryo; C, D: Maturation and germination of somatic embryo; E: Regenerated plantlets; F, G: SE derived plantlets were transplanted after acclimation. A, B: Bars=1 mm; C-D: Bars=0.25 cm

表 1 不同细胞分裂素对冰灯玉露胚性愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different cytokinin treatments on somatic embryonic callus induction of *Haworthia cooperivar*

细胞分裂素 Cytokinin	IAA (mg/L)	外植体数 No. of explants	诱导率(%) Induction ratio (%)	生长状态 Growth state
0	0	30	0	无愈伤组织 Non callus develope
6-BA 1.5	0.5	30	66.67±0.60 ^a	黄白色易碎的颗粒状 Yellowish-white friable callus with granular structures
ZT 1.5	0.5	30	16.67±7.64 ^b	质地较硬的绿色愈伤组织 Compact green callus
KT 1.5	0.5	30	22.86±12.64 ^b	质地较硬的绿色愈伤组织 Compact green callus

注: 不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicate significant differences at $p < 0.05$

表 2 不同浓度 6-BA 对胚性愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effect of different concentration of 6-BA combine d with 0.1 mg/L IAA on proliferation of somatic embryonic callus of *Haworthia cooperivar*

植物生长调节剂(mg/L) Plant growth regulator (mg/L)		胚性愈伤组织增殖量(g) Proliferation weight of somatic embryonic callus (g)				
6-BA	IAA	14 d	28 d	42 d	56 d	70 d
0.5	0.1	1.33±0.12 ^{cd}	4.39±0.38 ^{cd}	9.33±0.32 ^b	9.36±0.46 ^c	7.43±0.26 ^c
1.0	0.1	1.37±0.15 ^c	5.70±0.18 ^a	8.91±0.41 ^{bc}	11.14±0.54 ^b	9.45±0.48 ^b
1.5	0.1	1.98±0.11 ^b	5.36±0.15 ^b	10.63±0.48 ^a	14.73±0.45 ^a	13.52±0.24 ^a
2.0	0.1	2.25±0.37 ^{ab}	4.25±0.26 ^{dc}	6.55±0.35 ^{dc}	6.31±0.48 ^{dc}	4.36±0.32 ^{dc}
2.5	0.1	2.50±0.16 ^a	4.49±0.24 ^c	6.72±0.32 ^d	6.57±0.38 ^d	4.41±0.17 ^d

注: 不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicate significant differences at $p < 0.05$

颗粒状, 愈伤组织表面上可观察小芽(图 1C), 绿色小芽和愈伤组织结合不紧密, 用镊子轻轻一碰, 小芽便从愈伤组织脱落下来。

胚性愈伤组织在 6-BA 浓度为 2.0~2.5 mg/L 的培养基上培养 14 d 左右时增殖比较旺盛, 培养 42 d 左右时增殖量最多, 分别为 6.55 g 和 6.72 g, 之后愈伤组织生长比较缓慢, 逐渐停止生长, 处理间的差异不显著。愈伤组织逐渐呈淡黄色水浸状、质地变得更松软, 无绿色芽点的空心泡状结构, 培养 42 d 后, 愈伤组织的质地粘稠和空心化逐渐加重, 培养 56~60 d 后, 愈伤组织基本停止生长, 开始发生褐化。表明, 6-BA 浓度较低时, 可促进胚性愈伤组织的增殖, 同时也可以维持胚性愈伤组织的特性。而胚性愈伤组织在较高浓度 6-BA 的刺激下易丧失胚性, 也不利于愈伤组织的增殖。

1.2.2 不同浓度 IAA 对胚愈伤组织增殖的影响

不同浓度 IAA 对胚性愈伤组织的颜色、形态和

质地影响差异不大, 但对愈伤组织增殖的影响有一定的差异。IAA 浓度为 0.1~0.2 mg/L 时, 愈伤组织增殖比较旺盛, 当培养至 56 d 时增殖量最多, 分别为 13.37 g 和 14.22 g, 随后慢慢减少。愈伤组织结构和颜色比较均匀, 仍然保持淡黄色、质地松散的、较硬的颗粒状胚性愈伤组织的特性, 表面可观察到分化出的绿色芽点, 多以愈伤组织增殖为主。IAA 浓度为 0.3~0.5 mg/L 时, 愈伤组织的增殖比较缓慢, 56 d 时增殖量分别为 11.97 g、10.96 g 和 11.02 g, 处理之间差异不显著。虽胚性愈伤组织仍保持淡黄色、质地松散的、易碎的颗粒状胚性愈伤组织的特性, 但更趋于胚状体成熟并转变成小植物体。说明 IAA 浓度对胚性愈伤组织的增殖有一定的作用, 低浓度 IAA 处理可促进愈伤组织的增殖, 较高浓度 IAA 虽然可提高初期愈伤组织的增殖量, 但愈伤组织增殖趋向于分化成为不定芽。因此, 适合冰灯玉露胚性愈伤组织的增殖 IAA 浓度为 0.1~0.2 mg/L (表 3)。

表 3 不同浓度 IAA 对胚性愈伤组织增殖的影响

Table 3 Effect different concentration of IAA combined with 1.5 mg/L 6-BA on proliferation of somatic embryonic callus of *Haworthia cooperivar*

植物生长调剂(mg/L)		胚性愈伤组织增殖量(g)				
Plant growth regulator (mg/L)		Proliferation weight of somatic embryonic callus (g)				
6-BA	IAA	14 d	28 d	42 d	42 d	70 d
1.5	0.1	2.00±0.11 ^a	6.02±0.17 ^a	12.63±0.27 ^a	12.63±0.27 ^a	12.03±0.24 ^a
1.5	0.2	1.90±0.02 ^b	5.31±0.12 ^{bc}	10.57±0.47 ^b	10.57±0.47 ^b	13.40±0.31 ^b
1.5	0.3	1.32±0.11 ^{cd}	4.34±0.23 ^d	8.75±0.11 ^d	8.75±0.11 ^d	9.76±0.06 ^c
1.5	0.4	1.39±0.23 ^c	5.22±0.29 ^c	9.00±0.31 ^c	9.00±0.31 ^c	8.93±0.44 ^d
1.5	0.5	1.92±0.23 ^{ab}	5.37±0.29 ^b	8.71±0.31 ^{de}	8.71±0.31 ^{de}	8.23±0.44 ^{de}

注: 不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicate significant differences at $p < 0.05$

1.3 体细胞胚的植株再生

将愈伤组织转接到 MMS 添加 0.1~0.2 mg/L IAA 的培养基时, 体细胞胚再生植株比较明显, 培养 21~28 d 时愈伤组织表面上堆积发生完整的丛生小植物体(图 1D; 图 1E), 培养 42~56 d 时小植物体根系粗壮, 数量多, 生长比较旺盛。每块儿愈伤组织上平均可分离出 21~31 棵小植物体, 大部分胚性愈伤组织均分化形成完整的小植物体(表 4)。胚性愈伤组织在添加 0.3~0.4 mg/L IAA 的培养基上培养 42~56 d 时, 愈伤组织上发生的小植物体的数量较少, 幼根细而短, 有些小苗为根系发育不全的无根苗, 尚未分化成小植物体的愈伤组织比较多, 每块儿愈伤组织上平均可分离出 2~6 棵小植物体。愈伤组织在 MMS 添加 0.5 mg/L IAA 的培养基上培养 10 d 左右, 观察到第一个完整的小植物, 随后未能观察到完整的小植物体的发生, 培养 35 d 左右, 愈伤组织上分化出绿色小芽, 培养 42~56 d 时发现, 愈伤组织上分化的小苗大部分为无根, 小苗粗壮, 数量少, 与愈伤组织结合比较疏松。

表 4 体细胞胚状体的成熟

Table 4 Maturation of somatic embryo

IAA 的浓度	愈伤组织块儿数	成熟小植物体数	生长状态
Concentrations of IAA(mg/L)	No. Callus clumps	No. Mature plantlets	Growth stage
0.1	18	31.30±1.21 ^a	大量小植物体根系粗壮, 生长旺盛
0.2	18	21.67±0.87 ^b	Numerous plantlets roots with strong and vigorously grow
0.3	18	6.67±1.62 ^c	小部分植物体带根系, 幼根细而短
0.4	18	2.33±1.89 ^d	Small amount of plantlets with thin roots
0.5	18	6.67±2.12 ^c	小植物体大, 少部分有根 Big and small amount of plantlets without roots

注: 不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicate significant differences at $p < 0.05$

1.4 试管苗移栽

将小苗从试管中取出, 用自来水洗去培养基, 置于暗处风干 1~2 d, 移栽至基质上, 适量喷水, 保持基质湿润度。早期避免强光直射, 逐步加强光照强度, 保持通风, 2 周后叶片恢复坚挺, 叶色翠绿, 成活率高达 100% (图 1E; 图 1F)。

1.5 组织切片结果与分析

冰灯玉露体细胞胚的发生是外植体叶片在诱导培养基上脱分化形成胚性愈伤组织, 胚性愈伤组织再分化形成体细胞胚的间接发生途径。颗粒结构的纵向切片结果显示, 颗粒状的愈伤组织由具有明显的细胞核、核及核仁较大、细胞质浓密、内部广泛分布着淀粉颗粒的分裂旺盛的细胞来构成。这种颗粒状结构其外层是由排列紧密、形状较规则的一类表皮结构(图 2A)和突出于外表的由 7~8 个细胞构成的胚性细胞团组成(图 2B)。其下方可观察到由一个细胞来源的体细胞胚样中心(图 2C)。这些分裂旺盛的不规则的小细胞团由单细胞经过平周和垂周分裂而

成, 与其他细胞没有明显的连接区, 呈现不规则排列, 分布较为松散, 未发现明显的维管束结构。颗粒状结构的内部是由多个垂周分裂的类表皮环绕的细胞团来构成, 这种细胞团的边界清晰, 细胞大小基本相等, 核质明显, 细胞分裂旺盛。从细胞团的生长轮廓中可看出, 其生长方向是由内而外的旋转生长, 细胞团之间联系比较少, 细胞垂周分裂形成类表皮, 平周分裂增加细胞数量, 为分裂旺盛的分生细胞, 可观察到中期染色体(图 2C; 图 2D; 图 2E)。切片中未能观察到维管束和导管系统等, 分裂比较旺盛的地方也可以观察明显小于周围细胞的进行垂直分裂的前原形成层细胞(图 2F)。

球形颗粒的纵切和横切结构如图(图 2G; 图 2H)所示, 具有明显且排列紧密的表皮细胞, 表皮下方细胞大小基本相等, 大多数细胞有明显的细胞核, 核质明显, 多位于中央, 细胞多进行纵向或横向分裂, 为分生细胞, 并可发现明显的淀粉颗粒, 且数量相对于其他类型的细胞更多。

有些颗粒结构纵切结构显示, 单个颗粒结构与周边组织分离, 其外表面为细胞大小相似, 形状较规则、排列紧密的表皮结构。表皮内侧细胞呈不规则排列, 分布较为松散, 细胞间隙较大, 是液泡化的薄壁细胞, 但未能观察到明显的维管束结构(图 2G), 中间多处可观察到沿垂周方向或平周方向进行细胞分裂的有明显的细胞核、细胞质浓密的前原形成层细胞(图 2H; 图 2I)。

2 讨论

体细胞胚发生是植物植株再生的有效途径之一(翟彦等, 2011), 然而诸多因素影响体细胞胚的发生。植物生长调节剂参与细胞周期调节和细胞分裂, 是诱导体细胞胚的必要因素(Francis and Sorrell, 2001; Fehér et al., 2003; Gaj, 2004)。有报道指出 2,4-D 单独或组合其他植物生长调节剂最广泛应用于体细胞胚诱导(Gumerova et al., 2003; Umehara and Kamada, 2005), NAA 也频繁应用于体细胞胚的诱导研究中, IAA 的应用较少(Hou et al., 2015)。严小峰等(2017)报道冰灯玉露胚性愈伤组织诱导和胚性的变化依赖于 BA/2,4-D 的比值。本试验以冰灯玉露的叶片为外植体, 利用改良的 MS 培养基添加 6-BA 组合 IAA 成功诱导出了胚性愈伤组织, 且其胚性可维持 3 年多。实验结果显示, 6-BA 浓度对胚性愈伤组织的诱导、增殖和胚性维持的影响比较大, 6-BA 浓度为 1~1.5 mg/L 时愈伤组织增殖和胚性维持效果比较好, 提高 6-BA

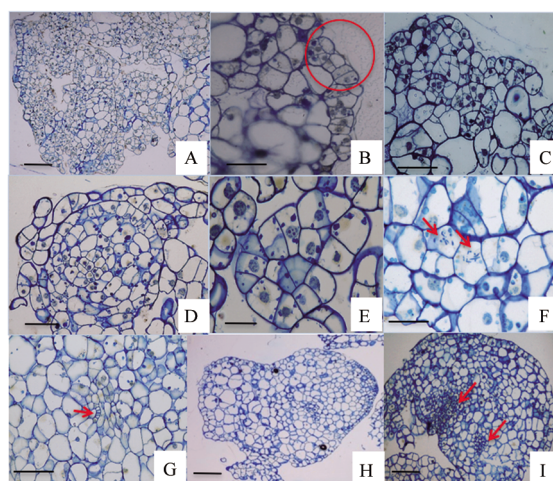


图 2 冰灯玉露愈伤组织组织切片

注: A: 球形颗粒纵切结构; B, C: 发生在表皮外层的分裂旺盛的分生细胞; D, E: 表皮内部发生的螺旋状或球形的分生细胞团; F: 旺盛分裂细胞中的中期染色体(红色箭头); G: 细胞团内部发生的前原形成层细胞(红色箭头); H, I: 非胚性愈伤组织颗粒结构; 比例尺: A, H, I: 200 μm ; D: 150 μm ; B, C, G: 100 μm

Figure 2 Section of somatic embryogenesis in *Haworthia cooperiviar*
Note: A: Section of globular structure; B, C: Meristematic cells that developed from outer epidermis; D, E: Meristematic cells that developed from outer epidermis; F: Metaphase chromosomes in vigorous divided cell mass; G: Pre-procambial cells; H, I: Structure of non-embryonic callus; Scale bar: A, H, I: 200 μm ; D: 150 μm ; B, C, G: 100 μm

浓度时虽然愈伤组织的增殖量较大, 但培养过程中逐渐丧失其胚性。IAA 对胚性愈伤组织的增殖效果显示, 0.1~0.2 mg/L 的浓度适合胚性愈伤组织的增殖和胚性的维持, 提高 IAA 浓度时更趋于体细胞胚的成熟和小植株的转换。

体细胞胚发生主要包含体细胞胚的诱导、胚性的维持和培养、胚分化和体细胞胚的再生的 4 个过程(Ibaraki and Kurata, 2001)。胚性愈伤组织具有致密、淡白色颗粒状、生长比较缓慢或排列较松散易碎的形态学特性(Sun et al., 2003; Yang et al., 2003)。试验中冰灯玉露叶片在 6-BA 和 IAA 组合的培养基上培养两个月之后也有类似变化, 形成生长较缓慢、淡黄色的、排列较疏松的颗粒状愈伤组织, 颗粒状的愈伤组织进一步发育形成典型的球形、心形结构, 随后转变成绿色成熟胚。淡绿色致密的、质地比较硬的, 或乳白色质地松软的水浸状的愈伤组织上, 未能观察到体细胞胚的发生。这与肖望等(2016)、曹雨等(2016)报道的结果一致。

冰灯玉露的胚性愈伤组织的组织切片结果显示, 胚性愈伤组织形成后, 不仅从愈伤组织表面发生

染色深、细胞核大、细胞质浓密、排列紧密的胚性细胞团,而且内部也发生由分裂旺盛、排列紧密的小细胞组成的胚性细胞团,细胞团呈圆形或螺旋形的生长,这种胚性细胞团进而发育成为体细胞胚。除此之外,分裂旺盛的愈伤组织内部观察到了由垂直分裂小细胞组成的前原形成层细胞,前原形成层细胞可作为多能的或全能的干细胞样细胞引起器官分化或体细胞胚发生。这种前形成层细胞很容易对生长素/细胞分裂素比例做出反应,导致器官分化或体细胞胚发育,这种分化通常取决于前形成层细胞分裂方向和细胞位置(Risopatron et al., 2010)。冰灯玉露非胚性愈伤组织的表皮内侧的细胞呈不规则排列,分布较松散,细胞间隙较大,为无明显细胞核结构的细长或大的高度液泡化的大型薄壁细胞团,这与(任海燕等, 2019)报道的结果相似。

另外,体细胞胚发育过程中淀粉颗粒的积累与体细胞胚的分化有一定的联系,在有关椰子(*Cocos nucifera* Lz)树的体细胞胚诱导(Verdeil et al., 2001)、棕榈(*Elaeis guineensis*)树的体细胞胚诱导(Schwendiman et al., 1988; Kanchanapoom and Domyoas, 1999)的研究中报道过体细胞胚发生过程中淀粉颗粒积累的动态变化,并指出了淀粉颗粒的积累与细胞分裂有关,主要集中在细胞分裂旺盛的中心附近,为细胞生长提供能量,其积累是体细胞胚分化和发育的标志(季艳丽等, 2019)。实验中分裂旺盛的胚性愈伤组织细胞团里可观察到分布比较广泛的淀粉颗粒,而非胚性愈伤组织上未能观察到淀粉颗粒,结果表明胚性愈伤组织中淀粉粒的积累可能是保障体细胞胚发生成功的重要因素。

试验以冰灯玉露叶片为外植体成功诱导出了体细胞胚,构建了冰灯玉露体细胞胚植株再生体系,研究了冰灯玉露体细胞胚发生的形态学和解剖学特性。试验结果对为冰灯玉露的快速繁殖、种质保存、育种及大量生产提供一定理论依据。

3 材料与方法

3.1 冰灯玉露材料

2017年,由临沂市仙株生物科技有限公司提供盆栽的冰灯玉露(*Haworthia cooperivar*)。选取健壮完整的叶片,用洗衣粉水轻轻搓洗表面污渍,洗净后用自来水流水冲洗15 min,备用。在超净工作台上,先用加入1滴(约50 μL) Tween-20的0.15%的升汞消毒5 min,然后用无菌水反复冲洗5~6次,放在灭菌

的不锈钢盘子里,无菌滤纸吸干表面水分,备用。

试验所用的培养基为改良的MS (Murashige and Skoog, 1962)。所述的改良的MS培养基(Mo dified MS, MMS)为,在MS基本培养其它成分不变的条件下调整盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸和泛酸钙的浓度,其调整浓度分别为10.0 mg/L、1.0 mg/L、1.0 mg/L和1.0 mg/L。培养基中均添加30 g/L蔗糖和8.0 g/L琼脂粉,pH 5.6~5.8,在104 kPa, 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高压蒸汽灭菌20 min。愈伤组织诱导、体细胞胚的诱导和成熟在(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 温度,光照强度30~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、每天16 h光照,8 h黑暗下进行培养。

3.2 胚性愈伤组织的诱导

将消毒好的叶片用解剖刀纵切并接种于MMS+1.5 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.5 mg/L 吲哚乙酸(IAA);MMS+1.5 mg/L 玉米素(Zeatin, ZT)+0.5 mg/L IAA;MMS+1.5 mg/L 激动素(Kinetin, KT)+0.5 mg/L IAA培养基,以MMS作为对照,筛选诱导胚性愈伤组织的最佳植物生长调节剂组合。每个处理接种10个外植体,设3次重复。观察愈伤组织的生长情况,60 d后统计诱导率并进行分析。

3.3 胚性愈伤组织的增殖

选取1.5 g左右淡黄色、颗粒状的质地松散的胚性愈伤组织分成8~10块儿,转接到增殖培养基中进行培养。胚性愈伤组织增殖培养基为:MMS+(0.5, 1.0, 1.5 2.0、2.5) mg/L 6-BA+0.1 mg/L IAA;MMS+1.5 mg/L 6-BA+(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) mg/L IAA。称重时,在超净工作台上将愈伤组织与培养基分离,然后转入已去掉重量的无菌培养皿进行称量,记录数据后再将愈伤组织重新接种到原来的培养基上。每14天称1次鲜重并观察愈伤组织的生长状态,至愈伤组织生长进入衰退期为止(约两个多月),各处理均重复3次。

3.4 植株再生

选取增殖培养基上生长状态较好的胚性愈伤组织,转接于MMS+(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) mg/L IAA+30 g/L蔗糖+8.0 g/L琼脂。培养56 d后统计成熟率和平均成苗数,筛选最适壮苗培养基。各处理均重复3次。

3.5 驯化移栽

将玻璃培养瓶移到室外阴凉处炼苗1周左右,打开培养瓶瓶盖,再放置3~7 d,待组培苗硬挺后,用清水洗净基部的培养基,并在阴凉处晾晒幼苗3~7 d。

将晾晒的苗移栽到基质上,基质为泥炭土、河沙和珍珠岩的混合基质,其混合体积比例为 5:3:2。

3.6 组织结构观察

选取新鲜的球形愈伤组织颗粒,按照廉玉姬等(2013)的方法进行固定、包埋、修边,切片。包埋的组织利用纳米切片机(莱卡,德国)切成厚度为 1 μm 的半超薄片,染色后将切片置于奥林巴斯光学显微镜(Olympus BX51,日本)下观察,照相并记录。

3.7 数据统计分析

利用以下公式进行数据统计。

愈伤组织诱导率=(发生愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

胚性愈伤组织净增殖量(鲜重)=增殖后的愈伤组织的质量 - 接种的愈伤组织质量。

采用邓肯氏多重分析法进行显著性差异分析,最小显著性差异在 5%水平上显示。

作者贡献

朱洁琼本研究的实验设计和研究的执行人;朱洁琼,赵小梅和闫丽完成冰灯玉露体细胞胚的诱导与组织切片处理;仝德彬和林光哲负责完成驯化移栽和管理;廉玉姬是本研究的构思者和负责人,指导实验设计,数据分析,论文撰写与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由临沂大学委托项目(No.HX160402)资助。

参考文献

- Cao Y., Chen Z.H., Ou D.W., Zhang S.C., and Yang C.W., 2016, The establishment of teosinte tissue culture and callus section observation, *Huanan Shifan Daxue Xuebao (Journal of South China Normal University (Natural Science Edition))*, 48 (6): 19-24 (曹雨, 陈章辉, 区丁文, 张盛春, 阳成伟, 2016, 墨西哥玉米草组培体系的建立及愈伤组织切片观察, 华南师范大学学报(自然科学版), 48(6): 19-24)
- Fehér A., Pasternak T.P., and Dudits D., 2003, Transition of somatic plant cells to an embryogenic state, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 74: 201-228
- Francis D., and Sorrell D.A., 2001, The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review, *Plant Growth Regul.*, 33: 1-12
- Gaj M.D., 2004, Factors influencing somatic embryogenesis in duc-
- tion and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Growth Regul.*, 43: 27-47
- Gumerova E.A., Galeeva E.I., Chuyenkova S.A., and Romyantseva N.I., 2003, Somatic embryogenesis and bud formation on cultured *Fagopyrum esculentum* hypocotyls, *Russian J. Plant Physiol.*, 50: 640-645
- Guo S.H., Zhu Y.X., and Guan Y.J., 2016, Key techniques for rapid propagation of *Haworthia cooperivar pilifera* of *Liliaceae*, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 32(34): 85-89 (郭生虎, 朱永兴, 关雅静, 2016, 百合科十二卷属玉露的组培快繁关键技术研究, 中国农学通报, 32(34): 85-89)
- Hou J.Y., Wu Y., Shen Y.C., Mao Y.J., Liu W.B., Zhao W.W., Mu Y., Li, M.H., Yang M.L., and Wu L.F., 2015, Plant regeneration through somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature zygotic embryos of *Sapium sebiferum* Roxb, *Sci. Hortic.*, 197: 218-225
- Ji Y.L., Chen F.J., Deng W., and Zhang D.C., 2019, Histocytological observation of somatic embryogenesis in *Sorghum bicolor* (L.), *Shengwu Ziyuan (Biotic Resources)*, 41(4): 371-375 (季艳丽, 陈发菊, 邓为, 张德春, 2019, 高粱体胚发生的组织细胞学观察, 生物资源, 41(4): 371-375)
- Kanchanapoom K., and Domyoas P., 1999, The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture, *Sci. Asia*, 25: 195-202
<https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.1999.25.195>
- Ibaraki Y., and Kurata K., 2001, Automation of somatic embryo production, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 65(3): 179-199
- Lian Y.J., Lin G.Z., and Zhao X.M., 2013, Histology and development analysis of meristematic nodules from cultured *Pulsatilla koreana*, *Zhiwu Xuebao (Chinese Bulletin of Botany)*, 48(5): 540-549 (廉玉姬, 林光哲, 赵小梅, 2013, 朝鲜白头翁分生结节的诱导与组织解剖学观察, 植物学报, 48(5): 540-549)
- Murashige T., and Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15(3): 473-497
- Nguyen Q.T., Bandupriya H.D.D., López-Villalobos A., Sisunandar S., Foale M., and Adkins S.W., 2015, Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.), *A Review*, *Planta*, 242 (5): 1059-1076
- Ogawa Y., Shirakawa M., Koumoto Y., Honda M., Asami Y., Kondo Y., and Hara-Nishimura I., 2014, A simple and reliable multigene transformation method for switch grass, *Plant Cell Rep.*, 33(7): 1161-1172
- Ren H.Y., Gong G.H., Wang Y.K., Zhao A.L., Xue X.F., 2019, Somatic embryogenesis and development in *Ziziphus jujuba* Mill.: histological observation, *Nongxue Xuebao (Journal of Agriculture)*, 9(3): 32-35 (任海燕, 弓桂花, 王永康, 赵爱玲,

- 薛晓芳, 2019, 枣幼胚体细胞胚发生发育的组织学观察, 农学学报, 9(3): 32-35
- Risopatron J.P.M., Sun Y., and Jones B.J., 2010, The vascular cambium, molecular control of cellular structure, Protoplasma, 247(3-4): 145-161
- Rosa Y.B.C.J., Bello C.C.M., and Dornelas M.C., 2015, Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 20: 69-77 <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0580-7>
- Schwendiman J., Pannetier C., and Michaux-Ferriere N., 1988, Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*, Ann. Bot., 62(1): 43-52
- Song Y., 2014, Study on tissue culture and rapid propagation technology of *Haworthia cooperivar*, Xiandai Nongye Keji (Modern Agricultural Science and Technology), (18): 164-164 (宋扬, 2014, 冰灯玉露的组织培养与快速繁殖技术研究, 现代农业科技, (18): 164-164)
- Sun Y., Zhang X., Jin S., Liang S., and Nie Y., 2003, Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*), Plant Cell Tiss. Org. Cult., 75(3): 247-253
- Teixeira da Silva J.A., Zeng S., Galdiano R.F., Dobrnszki J., Cardoso J.C., and Vendrame W.A., 2014, In vitro conservation of *Dendrobium* germplasm, Plant Cell Rep., 33(9): 1413-1423
- Umehara M., and Kamada H., 2005, Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis, Plant Biotechnol., 22: 253-260
- Verdeil J.L., Hocher V., Huet C., Gros demange F., Escoute J., and Ferriere N.M., 2001, Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence, Ann. Bot., 88: 9-18
- Xiao W., Tu H.Y., and Zhang A.L., 2016, Embryogenic callus induction and plant regeneration from *Hedychium coronarium* via somatic embryogenesis, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 43(8): 1605-1612 (肖望, 涂红艳, 张爱玲, 2016, 白姜花胚性愈伤组织的诱导与植株再生体系的建立, 园艺学报, 43(8): 1605-1612)
- Yan X.F., Liu Y.J., Huang J.X., Yang J.H., Li J.K., and Wu C.X., 2017, Induction method of loose embryogenic callus of *Haworthia cooperivar*, Tianjin Nongye Kexue (Tianjin Agricultural Sciences), 23(7): 21-24, 36 (严小峰, 刘艳军, 黄俊轩, 杨静慧, 李建科, 武春霞, 2017, 冰灯玉露松散型胚性愈伤组织的诱导, 天津农业科学, 23(7): 21-24, 36)
- Yang Y.G., Guo Y.M., Guo Y., Guo Z.C., and Lin J.X., 2003, Regeneration and large-scale propagation of *Phragmites communis* through somatic embryogenesis, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 75(3): 287-290
- Zhai Y., Zhang Z.Q., Jia M., Wang Y., Song X.D., and Zhou L., 2011, Plant regeneration and somatic embryogenesis of *Lilium* spp, Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 31(4): 834-841 (翟彦, 张宗勤, 贾敏, 王岩, 宋西德, 周雷, 2011, 百合体细胞胚胎发生和植株再生, 西北植物学报, 31(4): 834-841)
- Zhang H.L., Liu Y.J., Huang J.X., Yang J.H., Li J.K., and Yan X.F., 2017, Study on the influence factors of morphogenesis of *Haworthia cooperivar* tissue culture seedling, Tianjin Nongye Kexue (Tianjin Agricultural Sciences), 23(7): 17-20 (张海龙, 刘艳军, 黄俊轩, 杨静慧, 李建科, 严小峰, 2017, 影响冰灯玉露组培苗形态建成因子的研究, 天津农业科学, 23(7): 17-20)
- Zhang J.X., Liu Y.J., Yang J.H., Qin Y.J., Zhang C., and Li J.L., 2016, Effects of hormones on differentiation of adventitious bud and adventitious root of *Haworthia cooperivar*, Tianjin Nonglin Kexue (Tianjin Agriculture and Forestry Science and Technology), 252 (4): 4-6 (张景新, 刘艳军, 杨静慧, 秦艳筠, 张超, 李金龙, 2016, 激素对冰灯玉露不定芽和不定根分化的影响, 天津农林科技, 252(4): 4-6)
- Zhou H.C., Liu Y.J., Huang J.X., Yang J.H., Li J.K., and Wu C.X., 2017, Study on in vitro mutagenesis of *Haworthia cooperivar*, Tianjin Nongye Kexue (Tianjin Agricultural Sciences), 23(7): 25-28 (周海成, 刘艳军, 黄俊轩, 杨静慧, 李建科, 武春霞, 2017, 冰灯玉露离体诱变技术, 天津农业科学, 23(7): 25-28)
- Zhu T.H., Lu J.M., Sun Q., Wang S.Y., Yao D.B., Gu J.P., and Tang G.J., 2012, Study on the culture of *Haworthia fasciata in vitro*, Shanghai Jiaotong Daxue Xuebao (Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)), 30(3): 45-48 (朱天华, 陆锦明, 孙清, 王水燕, 姚德彪, 顾建平, 汤桂钧, 2012, 十二卷类植物的离体培养技术研究, 上海交通大学学报(农业科学版), 30(3): 45-48)