



· 技术方法 ·

早花百子莲叶片器官发生和胚胎发生再生体系的建立

岳建华^{1,3}, 董艳², 王小画¹, 孙佩霞¹, 王思颖¹, 张新年¹, 张琰^{1,3*}

¹信阳农林学院园艺学院, 信阳 464100; ²信阳农林学院林学院, 信阳 464100

³信阳市大别山区园艺植物遗传改良重点实验室, 信阳 464100

摘要 以早花百子莲(*Agapanthus praecox*)叶片为外植体, 建立了器官发生和胚胎发生离体再生体系, 并对移栽驯化基质进行了初步筛选。结果表明, 毒莠定(PIC)对叶片愈伤组织诱导效果良好, 最适培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ PIC; 叶片组织分生能力决定愈伤组织诱导效果, 1–2片新叶基部愈伤组织诱导率可达85.71%, 叶片分生区0–0.5 cm愈伤组织诱导率为66.48%, 叶片横切面中部诱导效果优于边缘。不定芽诱导最适培养基为MS+1.5 mg·L⁻¹ PIC+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA, 诱导率达80.27%。体细胞胚诱导培养基为MS, 0.05 mg·L⁻¹多效唑或1.0 mg·L⁻¹ ABA均对体胚诱导具有显著促进作用。1.0 mg·L⁻¹ 6-BA对幼苗增殖有利, 器官发生和胚胎发生途径幼苗增殖系数分别为2.23和2.93。草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1 (v/v/v)为早花百子莲移栽驯化的最佳基质, 成活率达100%。该研究建立了早花百子莲叶片外植体再生体系, 丰富了百子莲快繁技术体系, 可为其它单子叶植物离体再生体系建立提供参考。

关键词 早花百子莲, 分生能力, 器官发生, 体细胞胚胎发生, 毒莠定

岳建华, 董艳, 王小画, 孙佩霞, 王思颖, 张新年, 张琰 (2020). 早花百子莲叶片器官发生和胚胎发生再生体系的建立. 植物学报 55, 588–595.

早花百子莲(*Agapanthus praecox*)为石蒜科(Amaryllidaceae)百子莲属(*Agapanthus*)多年生单子叶草本花卉, 1997年由南非引入我国, 其观赏价值高, 抗性极强, 已广泛应用于切花、花境、地被及庭院栽培(陈香波等, 2016)。早花百子莲应用潜力大, 但繁殖速度慢, 实生苗首次开花需3–4年。植物组织培养中的器官发生(organogenesis)及体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis, SE)途径是实现良种快繁的有效途径, 包括直接和间接发生两种方式, 其中间接发生最为常见(Rao et al., 2011)。目前, 百子莲器官发生技术体系已经应用于小范围的产业化生产(陈香波等, 2016), 而体胚发生体系研究相对滞后。百子莲离体再生体系常用的外植体有花蕾(胡仲义和何月秋, 2011)、小花梗及花丝(何叶等, 2014)等, 但以叶片为外植体的报道较少。以小花梗为外植体、毒莠定(picloram, PIC)作为激素类物质, 愈伤组织诱导率可达100%, 但小花梗每年仅能在花期取材1次(何叶等,

2014)。叶片数量多、取材容易且不受季节限制, 是多数植物尤其是双子叶植物离体再生的理想外植体, 但百子莲等单子叶植物叶片离体再生的案例相对较少。以2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)和6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)作为主要激素类物质, 百子莲叶片为外植体, 愈伤组织诱导率为0.0% (康玲, 2009; 胡仲义和何月秋, 2011; 刘芳伊, 2013)。综上, 以百子莲叶片作为外植体进行植株再生难度相对较大。PIC是一种人工合成激素, 具有类似2,4-D和萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)等生长素的生理效应, 通过生长素信号调控植物生长发育, 是诱导地中海气候型花卉愈伤组织形成的特异性激素类物质, 在郁金香(*Tulipa gesneriana*) (Ptak and Bach, 2007)和水仙(*Narcissus pseudo-narcissus*) (Malik, 2008)中具有高度的特异性, 使用浓度一般为1.0–2.0 mg·L⁻¹。本研究以PIC为外源激素类物质, 建立早花百子莲叶片外植体离体再生体系,

收稿日期: 2020-02-10; 接受日期: 2020-05-08

基金项目: 河南省科技攻关计划(No.172102110263)、河南省基础与前沿研究计划(No.162300410181)、信阳农林学院青年教师科研基金(No.201701014)和信阳农林学院园艺专业综合改革试点建设(No.ZYZHGG201803)

* 通讯作者。E-mail: zhy8010878@163.com

突破了外植体取材瓶颈, 为促进百子莲等单子叶植物离体再生技术应用奠定基础。

1 植物材料

早花百子莲(*Agapanthus praecox* Willd.)种苗购自南京市彩虹花卉公司, 栽植于信阳农林学院校内实验基地。选取生长健壮且长势良好的2年生植株为实验材料。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体消毒

取2年生植株, 切除根系及上部叶片, 留取块茎及叶基部3.0 cm, 用流水冲洗120分钟后置于超净工作台上。用75%乙醇处理60秒, 无菌水冲洗4次, 然后用5% NaClO溶液浸泡6分钟, 无菌水冲洗4次, 再用75%乙醇处理60秒, 最后用无菌水冲洗4次。

2.2 外植体取材

切取不同成熟度(1–2、3–4和5–6片新叶)的叶片、1–6片新叶不同分生区(0.0–0.5、0.5–1.0和1.0–1.5 cm)以及1–6片新叶0.0–1.5 cm区间叶片横切面不同位置(中部、边缘), 比较不同外植体愈伤组织的诱导效果。

2.3 培养基配方

愈伤组织、不定芽和胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC)诱导阶段培养基为MS+30 g·L⁻¹蔗糖+7.5 g·L⁻¹琼脂, pH5.8; 其中愈伤组织诱导加入不同浓度(1.5和2.0 mg·L⁻¹) PIC; 不定芽诱导加入1.5 mg·L⁻¹ PIC和6-BA (0.1、0.3和0.5 mg·L⁻¹)或激动素(kinetin, KT) (0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹); 胚性愈伤组织诱导加入1.5 mg·L⁻¹ PIC。体细胞胚诱导及幼苗增殖培养基为MS+2.0 g·L⁻¹活性炭, pH6.0; 其中体细胞胚诱导加入30 g·L⁻¹蔗糖、7.5 g·L⁻¹琼脂以及外源激素类物质; 无菌苗增殖加入20 g·L⁻¹蔗糖、7.0 g·L⁻¹琼脂以及6-BA (1.0、2.0和3.0 mg·L⁻¹)。培养基经121°C高压灭菌20分钟, 降温至60°C时于超净工作台上分装至90 mm×16 mm玻璃培养皿或培养瓶, 每皿25 mL, 每瓶30 mL, 冷却至室温后接种。

2.4 外植体接种

用灭菌后的吸水纸吸干叶片表面水分, 将叶片切成

0.5–0.7 cm小块, 接种于培养基平板。每培养皿接种9个外植体, 按3×3均匀分布。每处理接种5皿, 设3次重复。

不定芽和胚性愈伤组织诱导接种材料为继代后得到的愈伤组织, 体细胞胚诱导接种材料为胚性愈伤组织。取1.0 g愈伤组织平均分为7块, 在培养皿中以米字形均匀排列。幼苗增殖无菌苗接种数量为5株, 在组培瓶内按十字形排列。每处理3皿(瓶), 不定芽诱导和幼苗增殖设3次重复, 体细胞胚诱导设4次重复。

2.5 培养条件

培养室温度为(25±1)°C。愈伤组织、胚性愈伤组织、不定芽和体细胞胚诱导为暗培养。无菌苗增殖为光照培养, 光照强度为20 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为14小时光照/10小时黑暗。

2.6 炼苗与移栽

驯化室温度为(22±1)°C, 相对湿度为65%。光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为14小时光照/10小时黑暗。每穴盘栽植6株, 设3次重复。

2.7 观察及计数

分别于无菌培养30天及炼苗移栽60天后统计数据。用直尺测量愈伤组织长轴及短轴长度, 取平均值。用直尺测量不定芽长度。以长轴≥1 mm、不透明、乳白色的胚胎计数, 数据为每团胚性愈伤组织诱导出的体细胞胚数量。幼苗数量以具有完整根、叶结构的独立植株计数, 其中叶片长度≥5 cm。

愈伤组织诱导率(%)=(产生愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100;

不定芽诱导率(%)=(产生不定芽愈伤组织数/接种愈伤组织数)×100。

2.8 数据处理

用Excel 2016和SPSS 20软件进行数据处理、方差分析和多重比较(LSD和Duncan法, $P<0.05$)。

3 结果与讨论

3.1 外植体取材与愈伤组织诱导

3.1.1 叶片成熟度

以2年生植株为试材, 不同叶片成熟度对愈伤组织的

诱导效果存在显著差异(表1), 2.0 mg·L⁻¹ PIC处理的愈伤组织诱导率和细胞团大小高于1.5 mg·L⁻¹ PIC处理。当PIC浓度为1.5 mg·L⁻¹时, 1-2、3-4和5-6片新叶的诱导率分别为52.38%、42.86%及38.10%; 而PIC浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 诱导率分别为85.71%、57.14%和38.10%。随着叶片成熟度的增加, 愈伤组织诱导率逐渐降低。愈伤组织细胞团大小与诱导率趋势相似, 随着叶片成熟度的增加, 愈伤组织变小, 其中1-2片新叶诱导愈伤组织大小显著高于3-4和5-6片新叶。综上, 早花百子莲1-2片新叶, PIC浓度为2.0 mg·L⁻¹愈伤组织的诱导效果较好。

3.1.2 叶片分生区

不同分生区位置对愈伤组织诱导效果存在显著差异。随着分生区位置的上移, 愈伤组织诱导率降低、细胞团大小逐渐变小(表2)。在不区分叶片成熟度的情况下, 1.5和2.0 mg·L⁻¹ PIC在分生区0.0-0.5 cm的诱导率较高, 分别为61.90%和66.48%, 细胞团大小分别为0.67和0.73 cm。综上, 叶片分生区0.0-0.5 cm叶基部的诱导效果较好, PIC浓度为2.0 mg·L⁻¹的诱导效果优于1.5 mg·L⁻¹。

3.1.3 叶片横切面部位

不同叶片横切面位置愈伤组织诱导效果有一定差异, 中部愈伤组织诱导率及大小优于边缘(表3)。不同浓度PIC处理诱导率差异不显著, 其中横切面中部诱导率相对较高, 1.5 mg·L⁻¹ PIC处理的诱导率为80.95%。同一浓度PIC处理下, 叶片横切面中部诱导的愈伤组织相对较大, 状态也较好。综上, 早花百子莲叶片横切面中部的诱导效果优于边缘。

3.2 器官发生与胚胎发生途径

3.2.1 器官发生途径

6-BA和KT对不定芽诱导均有影响(表4)。在不添加外源细胞分裂素类物质的情况下, 不定芽诱导率为12.93%。6-BA和KT可显著提高不定芽诱导率, 且6-BA诱导效果优于KT, 其中0.3 mg·L⁻¹ 6-BA处理下, 不定芽诱导率高达80.27%。CK (对照)不定芽最长, 为1.69 cm, 6-BA处理的不定芽长度大于KT处理。

3.2.2 胚胎发生途径

在不含PIC的培养基上, 早花百子莲胚性愈伤组织即

表1 叶片成熟度对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of leaf maturity on callus induction

PIC concentration (mg·L ⁻¹)	Leaf maturity	Induction rate (%)	Callus size (cm)
1.5	1-2	52.38 ab	0.93 b
	3-4	42.86 ab	0.67 cd
	5-6	38.10 b	0.63 de
2.0	1-2	85.71 a	1.07 a
	3-4	57.14 ab	0.77 c
	5-6	38.10 b	0.53 e

诱导率和愈伤组织大小数据为平均值($n=3$)。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。PIC: 毒莠定

Induction rate and callus size are means ($n=3$). Different lower-case letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). PIC: Picloram

表2 叶片分生区位置对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different leaf meristematic zones on callus induction

PIC concentration (mg·L ⁻¹)	Leaf meristematic position (cm)	Induction rate (%)	Callus size (cm)
1.5	0.0-0.5	61.90 a	0.67 ab
	0.5-1.0	42.86 ab	0.57 b
	1.0-1.5	38.09 ab	0.57 b
2.0	0.0-0.5	66.48 a	0.73 a
	0.5-1.0	47.62 ab	0.70 ab
	1.0-1.5	19.05 b	0.60 ab

诱导率和愈伤组织大小数据为平均值($n=3$)。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。PIC: 毒莠定

Induction rate and callus size are means ($n=3$). Different lower-case letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). PIC: Picloram

表3 叶片横切面部位对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of leaf transection on callus induction

PIC concentration (mg·L ⁻¹)	Leaf transection	Induction rate (%)	Callus size (cm)
1.5	Middle	80.95 a	0.77 a
	Edge	76.19 a	0.67 ab
2.0	Middle	57.14 a	0.67 ab
	Edge	42.86 a	0.57 b

诱导率和愈伤组织大小数据为平均值($n=3$)。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。PIC: 毒莠定

Induction rate and callus size are means ($n=3$). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). PIC: Picloram

表4 6-BA和KT对不定芽诱导的影响**Table 4** Effects of 6-BA and KT on adventitious bud induction

Type	Concentration (mg·L ⁻¹)	Induction rate (%)	Adventitious bud length (cm)
CK	0.0	12.93 e	1.69 a
6-BA	0.1	55.78 bc	1.42 c
	0.3	80.27 a	1.53 bc
	0.5	73.47 ab	1.59 ab
KT	0.5	53.74 c	1.49 bc
	1.0	44.22 cd	1.52 bc
	2.0	33.33 d	1.19 c

诱导率和不定芽长度数据为平均值($n=3$)。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。CK: 对照; KT: 激动素

Induction rate and adventitious bud length are means ($n=3$). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). CK: Control; KT: Kinetin

可诱导出体细胞胚, 而植物生长调节物质(PGRs)对体细胞胚诱导效果有显著影响(表5)。添加1.0 mg·L⁻¹ PIC的胚性愈伤组织基本保持为继代状态, 成胚数极少; 而生长素运输抑制剂N-(1-萘基)邻苯二甲酸(N-(1-naphthyl) phthalamic acid, NPA)导致成胚数量减少。外源GA₄₊₇小幅降低成胚数, 体细胞胚发育同步化较差; 而添加GA合成抑制剂多效唑(paclobutrazol, PBZ)抑制GA信号, 使体细胞胚数量显著增加(53.95%)。ABA对体细胞胚诱导具有显著促进作用, 成胚数量显著增加(115.61%)。综上, 生长素、GA和ABA等相关的PGRs对早花百子莲体胚发生有显著影响。

3.3 再生植株的扩繁

早花百子莲经器官发生、胚胎发生途径再生的幼苗在不添加PGRs的情况下均可长出根系, 且发育良好。我们比较了不同浓度6-BA对幼苗增殖的效果。结果表明, 体胚发生途径幼苗的增殖效率高于器官发生途径, 高浓度6-BA不利于幼苗增殖(表6)。在1.0 mg·L⁻¹ 6-BA处理下, 器官发生和体胚发生的产苗数量分别为每瓶11.17和14.67株, 增殖系数分别为2.23和2.93; 随着6-BA浓度的升高, 产苗数量下降。胚胎发生途径中, 6-BA对生根数的影响与增殖情况一致, 即随着6-BA浓度的升高生根数降低, 而6-BA对器官发生途径幼苗生根数的影响不显著(表6)。

3.4 移栽及驯化

不同栽培基质对组培苗成活率及生长有影响(表7),

表5 植物生长调节物质(PGRs)对细胞胚诱导的影响**Table 5** Effects of plant growth regulators (PGRs) on somatic embryo induction

Treatment	Concentration (mg·L ⁻¹)	Induction number
CK	0.00	19.00 bc
PIC	1.00	1.63 e
NPA	1.00	11.13 cd
GA ₄₊₇	0.05	15.00 c
PBZ	0.05	29.25 ab
ABA	1.00	40.97 a

体细胞胚数量为平均值($n=4$)。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。CK: 对照; PIC: 毒莠定; NPA: N-(1-萘基)邻苯二甲酸; PBZ: 多效唑

Somatic embryo induction number are means ($n=4$). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). CK: Control. PIC: Picloram; NPA: N-(1-naphthyl) phthalamic acid; PBZ: Paclobutrazol

表6 6-BA对幼苗增殖的影响**Table 6** Effects of 6-BA on plantlets proliferation

Type	6-BA concentration (mg·L ⁻¹)	Plantlets number	Root number
Organogenetic plantlets	1.0	11.17 a	4.67 c
	2.0	10.50 ab	5.67 bc
	3.0	7.08 b	5.33 bc
Somatic plantlets	1.0	14.67 a	9.33 a
	2.0	12.33 a	7.67 ab
	3.0	11.33 a	5.33 bc

幼苗数和生根数为平均值($n=3$)。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Plantlets and root number are means ($n=3$). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

表7 不同基质对幼苗移栽的影响**Table 7** Effects of cultivation medium on plantlets transplanting

Cultivation medium	Survival rate (%)	Leaf number	Plant height (cm)
Commercial substrate	100.00	4.61	9.04
Peat:sand=1:3 (v/v)	88.89	5.38	10.30
Peat:vermiculite=1:2 (v/v)	94.44	4.51	8.07
Perlite:vermiculite=1:1 (v/v)	100.00	5.28	8.56
Peat:perlite:vermiculite=1:1:1 (v/v/v)	100.00	5.56	11.77

成活率、叶片数及株高均为平均值($n=3$)。

Survival rate, leaf number and plant height are means ($n=3$).

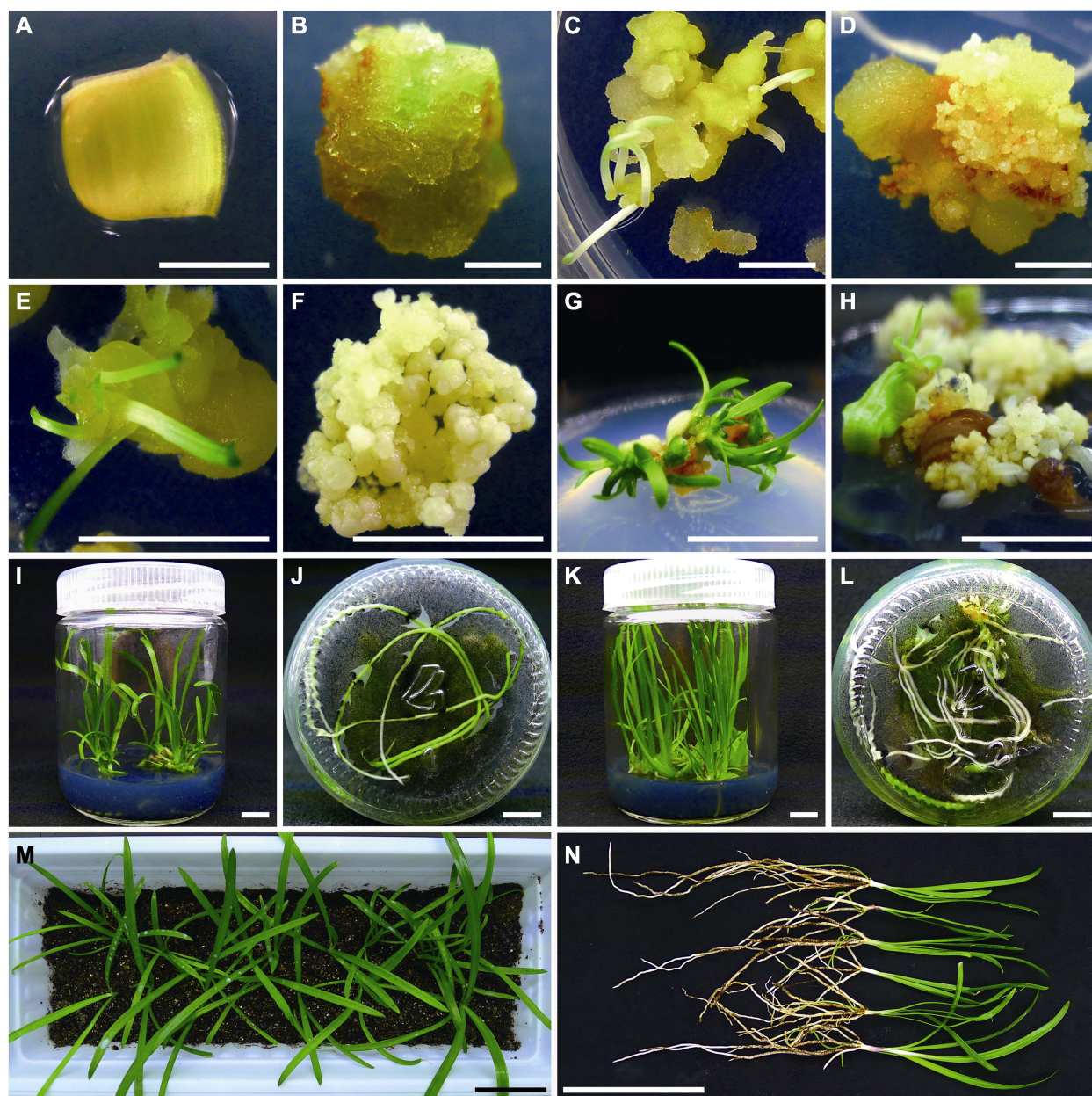


图1 早花百子莲以叶片为外植体诱导植株再生

(A) 叶片外植体; (B) 愈伤组织; (C) 不定芽诱导; (D) 胚性愈伤组织诱导; (E) 不定芽见光后转绿; (F) 球形胚; (G) 器官途径植株再生; (H) 胚胎途径经棒状胚阶段的植株再生; (I) 器官苗增殖; (J) 器官苗根系; (K) 体胚苗增殖; (L) 体胚苗根系; (M) 再生幼苗移栽与驯化; (N) 移栽苗根系。(A)–(D) Bars=0.5 cm; (E)–(L) Bars=1 cm; (M) Bar=5 cm; (N) Bar=10 cm

Figure 1 Plant regeneration of *Agapanthus praecox* via leaf explants

(A) Leaf explants; (B) Callus; (C) Adventitious bud induction; (D) Embryogenic callus induction; (E) Adventitious bud turns green when exposure to light; (F) Globular embryos; (G) Plant regeneration via organogenesis; (H) Plant regeneration via club-shaped embryo in somatic embryogenesis; (I) Proliferation of plantlets via organogenesis; (J) The root system of plantlets via organogenesis; (K) Proliferation of plantlets via somatic embryogenesis; (L) The root system of plantlets via somatic embryogenesis; (M) Transplanting and acclimatization of regenerated plantlets; (N) The root system of transplanted plantlets. (A)–(D) Bars=0.5 cm; (E)–(L) Bars=1 cm; (M) Bar=5 cm; (N) Bar=10 cm

但由于早花百子莲幼苗生长缓慢, 移栽60天后各处理差异不显著。商业基质(济南鲁青)处理的组培苗综合性状在5个处理中为中等水平, 成活率为100%, 叶片数量为4.61, 株高为9.04 cm; 草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1 (v/v/v)基质在5个处理中效果最好, 成活率为100%, 叶片数量为5.56, 株高为11.77 cm; 草炭:河沙=1:3 (v/v)基质各处理成活率相对较低, 但后期生长健壮, 叶片数量以及株高仅次于草炭:珍珠岩:蛭石=1:1:1 (v/v/v)处理。

经过叶片外植体愈伤组织诱导、器官发生及体细胞胚胎发生途径再生、幼苗增殖、移栽及驯化, 本研究建立了完整的早花百子莲叶片离体再生体系(图1A-N)。

3.5 讨论

不同植物愈伤组织诱导难度不同, 单子叶和双子叶植物间存在较大差异(Hu et al., 2017; Guo et al., 2018)。双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)几乎所有器官均能在整个生命期中产生愈伤组织(Sugimoto et al., 2010; Hu et al., 2017)。单子叶植物叶片愈伤组织诱导相对困难, 多数未获成功, 许多单子叶植物成熟器官对体外培养不敏感。例如, 水稻(*Oryza sativa*)成熟叶片仅基部2 mm区域能够形成愈伤组织(Hu et al., 2017)。经对比发现, 双子叶植物愈伤组织起源于原形形成层和维管薄壁细胞, 而单子叶植物愈伤组织起源于维管束鞘及未成熟的维管细胞(Hu et al., 2017)。本研究表明, 幼嫩组织和维管组织的分生能力对愈伤组织诱导效果起决定性作用, 这一规律在仙茅(*Curculigo orchoides*) (彭海峰等, 2007)、红金银花(*Lonicera japonica*) (王文静等, 2012)和蓝靛果忍冬(*Lonicera caerulea*) (李黎和张悦, 2014)等不同外植体类型愈伤组织诱导的研究中均有体现。

PIC对单子叶植物离体培养的特异效果因物种和外植体类型而存在显著差异。欧洲百合(*Lilium martagon*)再生体系中, 1.0和2.0 mg·L⁻¹ PIC可使鳞片外植体形成的愈伤组织和芽畸形, 而0.1和0.01 mg·L⁻¹ PIC则显著改善愈伤组织和芽的诱导质量(张旭红等, 2018)。本研究中1.5和2.0 mg·L⁻¹ PIC对叶片外植体取材部位愈伤组织的诱导效果存在显著差异, 表明PIC对早花百子莲叶片愈伤组织的诱导效果特异, 但

对特定外植体适用浓度范围较窄。PIC能快速诱导百子莲愈伤组织, 并保持其长势良好, 对愈伤组织诱导及胚性能力保持均具有重要影响(邹梦雯, 2015)。百子莲愈伤组织继代培养过程中, PIC使用浓度与愈伤组织内源IAA含量呈相反的梯度变化规律, 表明外源PIC可以显著影响内源IAA含量(杨舟等, 2019), 而内源IAA通过影响细胞极性建立胚性(Fehér et al., 2003)。

植物的离体再生途径有器官发生及胚胎发生2种, 但方法、效率及机制不同。2种途径在一些植物中共存, 如版纳甜龙竹(*Dendrocalamus hamiltonii*) (Zhang et al., 2010)、大麦(*Hordeum vulgare*) (Bouamama et al., 2011)以及羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*) (Banjac et al., 2019)。版纳甜龙竹愈伤组织诱导的关键激素类物质是2,4-D, 器官发生途径的主要调节物质是6-BA (Zhang et al., 2010)。大麦离体再生途径中, 2,4-D用于器官发生途径, 而4-对氯苯氧乙酸(4-chlorophenoxyacetic acid, 4-CPA)用于调节体细胞胚胎发生途径(Bouamama et al., 2011)。本研究中愈伤组织诱导的特异性激素类物质为PIC, 调节2种途径的有效激素类物质分别为6-BA和PIC, 即细胞分裂素和生长素类。相对于器官发生, 植物体细胞胚胎发生的机制仍为未解之谜, 目前还无法高效精准地调控体细胞胚性分化与植株再生过程(Guo et al., 2019)。早花百子莲器官发生途径周期相对较短, 从外植体取材到不定芽诱导约为4个月, 而胚胎发生途径仅胚性愈伤组织的获取就需6~7个月, 且胚性愈伤组织诱导率、体胚的诱导和发育效果不稳定。虽然ABA和PBZ等外源激素类物质对体胚诱导具有显著促进作用, 但距离精细化调控和产业化生产仍有较大差距, 而碳源(Manchanda and Gosal, 2012)、氮源(Menke-Milczarek and Zimny, 2001)、DNA甲基化(DNA methylation) (Pedrali-Noy et al., 2003)及细胞程序性死亡(programmed cell death) (Yang et al., 2019)等因素对体细胞胚胎发生的特定调节作用及机制尚未被揭示。

本研究以早花百子莲叶片为外植体诱导出愈伤组织, 获得了器官发生和胚胎发生2种途径的再生植株, 并对育苗基质进行了初步筛选。研究结果完善了百子莲快繁技术体系, 并为后续遗传转化奠定了基础。

参考文献

- 陈香波, 陆亮, 钱又宇, 范宇婷 (2016). 百子莲属种质资源及园林开发应用. 中国园林 32(8), 99–105.
- 何叶, 任丽, 孙海龙, 张洁, 邹梦雯, 张获 (2014). 百子莲愈伤组织诱导体系的优化. 西南农业学报 27, 1237–1242.
- 胡仲义, 何月秋 (2011). 百子莲组织培养及植株再生研究. 北方园艺 (10), 118–120.
- 康玲 (2009). 百子莲的再生体系试验初报. 现代园艺 (12), 7–8, 25.
- 李黎, 张悦 (2014). 外植体类型及年龄对蓝靛果忍冬诱导分化的影响. 林业科技 39(4), 14–15.
- 刘芳伊 (2013). 单叶刺槐和百子莲组培快繁体系建立. 硕士论文. 保定: 河北农业大学. pp. 17–19.
- 彭海峰, 曹友培, 俞新华, 赵晟, 黄晓柯 (2007). 仙茅叶片的组织培养及其细胞学观察. 中草药 38, 265–269.
- 王文静, 王鹏, 李伟强 (2012). 外植体类型和植物生长调节剂浓度对红金银花愈伤组织诱导的影响. 湖北农业科学 51, 4391–4393.
- 杨舟, 吕可, 吕珊, 王俊杰, 张获 (2019). 百子莲2个ARF基因与2个Aux/IAA基因的全长克隆与序列分析. 浙江农业学报 31, 86–97.
- 张旭红, 王嶝, 梁振旭, 孙美玉, 张金政, 石雷 (2018). 欧洲百合愈伤组织诱导及植株再生体系的建立. 植物学报 53, 840–847.
- 邹梦雯 (2015). 毒莠定(PIC)调控百子莲愈伤组织胚性诱导与保持生理生化基础的研究. 硕士论文. 上海: 上海交通大学. pp. 64–66.
- Banjac N, Vinterhalter B, Krstić-Milošević D, Milojević J, Tubić L, Ghalawenji N, Zdravković-Korać S (2019). Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from the hypocotyl slices and free radical scavenging activity of regenerants of collard greens (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 137, 613–626.
- Bouamama B, Ben Salem A, Ben Youssef F, Chaieb S, Jaafoura MH, Mliki A, Ghorbel A (2011). Somatic embryogenesis and organogenesis from mature caryopses of North African barley accession “Kerkeni” (*Hordeum vulgare* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47, 321–327.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74, 201–228.
- Guo F, Zhang HD, Liu W, Hu XM, Han N, Qian Q, Xu L, Bian HW (2018). Callus initiation from root explants employs different strategies in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 59, 1782–1789.
- Guo HH, Guo HX, Zhang L, Fan YJ, Fan YP, Zeng FC (2019). SELTP-assembled battery drives totipotency of somatic plant cell. *Plant Biotechnol J* 17, 1188–1190.
- Hu B, Zhang GF, Liu W, Shi JM, Wang H, Qi MF, Li JQ, Qin P, Ruan Y, Huang H, Zhang YJ, Xu L (2017). Divergent regeneration-competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. *Regeneration* 4, 132–139.
- Malik MG (2008). Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 94, 337–345.
- Manchanda P, Gosal SS (2012). Effect of activated charcoal, carbon sources and gelling agents on direct somatic embryogenesis and regeneration in sugarcane via leaf roll segments. *Sugar Tech* 14, 168–173.
- Menke-Milczarek I, Zimny J (2001). NH_4^+ and NO_3^- requirement for wheat somatic embryogenesis. *Acta Phytiol Plant* 23, 37–42.
- Pedrali-Noy G, Bernacchia G, do Rosario Alvelos M, Cella R (2003). *Daucus carota* cells contain specific DNA methyltransferase inhibitors that interfere with somatic embryogenesis. *Plant Biol* 5, 383–392.
- Ptak A, Bach A (2007). Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43, 35–39.
- Rao K, Chodiseti B, Gandi S, Mangamoori LN, Giri A (2011). Direct and indirect organogenesis of *Alpinia galanga* and the phytochemical analysis. *Appl Biochem Biotechnol* 165, 1366–1378.
- Sugimoto K, Jiao YL, Meyerowitz EM (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* 18, 463–471.
- Yang L, Wei C, Huang C, Liu HN, Zhang DY, Shen HL, Li YH (2019). Role of hydrogen peroxide in stress-induced programmed cell death during somatic embryogenesis in *Fraxinus mandshurica*. *J For Res* 30, 767–777.
- Zhang N, Fang W, Shi Y, Liu QQ, Yang HY, Gui RY, Lin XC (2010). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103, 325–332.

A Regeneration System for Organogenesis and Somatic Embryogenesis Using Leaves of *Agapanthus praecox* as Explants

Jianhua Yue^{1,3}, Yan Dong², Xiaohua Wang¹, Peixia Sun¹, Siying Wang¹
Xinnian Zhang¹, Yan Zhang^{1,3*}

¹College of Horticulture, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464100, China; ²College of Forestry, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464100, China; ³Key Laboratory of Horticultural Plants Genetic Improvement of Dabie Mountain, Xinyang City, Xinyang 464100, China

Abstract A regeneration system for organogenesis and somatic embryogenesis *in vitro* was established by using leaves of *Agapanthus praecox* as explants, and different cultivation media for transplanting were selected for the best effect. The results showed that picloram (PIC) was effective in callus induction of leaves, and the optimal medium was MS+2.0 mg·L⁻¹ PIC. The callus induction rate was determined by the meristematic activity of leaf segments. The callus induction rate of the basal tissues on the 1st–2nd euphyll was 85.71%, and the callus induction rate was 66.48% in meristematic zone of 0–0.5 cm of the same leaf. The results also showed that the callus induction efficiency was higher in the middle of leaf transection compared with that at the edge. The optimal medium for adventitious bud induction was MS+1.5 mg·L⁻¹ PIC+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA, and the induction rate was 80.27%. The basic MS medium was suitable for somatic embryo induction, but the induction rate would be significantly increased if 0.05 mg·L⁻¹ paclobutrazol and 1.0 mg·L⁻¹ abscisic acid were added. Plantlets proliferation was promoted by 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, and the proliferation coefficients of organogenesis and somatic embryogenesis pathway were 2.23 and 2.93, respectively. The combination of peat:perlite:vermiculite=1:1:1 (v/v/v) was proved the suitable substrate for transplanting and acclimatization of plantlets, with a survival rate of 100%. This regeneration system provides a rapid and efficient propagation technology for *A. praecox*, and also provides a reference for the regeneration of monocotyledon explants *in vitro*.

Key words *Agapanthus praecox*, meristematic activity, organogenesis, somatic embryogenesis, picloram

Yue JH, Dong Y, Wang XH, Sun PX, Wang SY, Zhang XN, Zhang Y (2020). A regeneration system for organogenesis and somatic embryogenesis using leaves of *Agapanthus praecox* as explants. *Chin Bull Bot* **55**, 588–595.

* Author for correspondence. E-mail: zhy8010878@163.com

(责任编辑: 白羽红)