

# 莴苣 (*Lactuca sativa* L. cv. Crispy) 的愈伤组织 诱导及其体细胞胚胎发生的研究 (简报)

黄学林 卢 静 李筱菊 徐华松

(中山大学生命科学院生物学系, 广州 510275)

## STUDIES ON CALLUS INDUCTION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *LACTUCA SATIVA* L. CV. CRISPY

Huang Xuelin Lu Jing Li Xiaojun Xu Huasong

(Department of Biology, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

莴苣是一种颇受欢迎的蔬菜, 在南方生产实践上结球莴苣的留种播种期与蔬用播种期不一致, 留种播种期在7月下旬至8月上旬, 过早过迟均不易采收到种子, 此时的气温高、不结球、小株开花, 无从选择理想的种株。蔬用播种期在10月到11月, 于春节前后上市, 此时虽然植株能正常生长, 其优良经济性状也一目了然, 但留种适期已过, 对优株无法采收种子传代<sup>[1]</sup>。因此采用组织培养方法解决上述问题已引起重视。国内已有不少莴苣组织培养研究的报道<sup>[1-5]</sup>。国外已有用生物反应器进行优良莴苣品种不定芽繁殖及其人工种子的研究<sup>[6]</sup>。本文研究了莴苣品种 (*Lactuca sativa* L. cv. Crispy) 的愈伤组织的诱导及其体细胞胚胎发生。

### 1 材料和方法

取莴苣 (*Lactuca sativa* L. cv. Crispy) 的种子用75%乙醇表面消毒1 min, 然后在0.2%升汞溶液中浸泡6 min, 再用无菌水冲洗4次, 接种于固化的琼脂(3%)介质中使种子萌发(25±2℃), 5 d后, 取幼苗的子叶作外植体, 以MS加适当的生长调节物质为基本培养基, 在无光照的条件下培养2周诱导其愈伤组织。然后将愈伤组织转至新鲜的培养基上, 每天3 000 Lux照光16 h诱导体胚的发生。当愈伤组织表面分化出“小绿点”时, 将“小绿点”逐个分离转移到不含生长调节剂的1/2 MS培养基上, 进一步观察它们的生长和分化。

另取一些带“绿点”的愈伤组织在FAA固定液中固定, 用石蜡切片法制片, 进行显微镜观察“绿点”的细胞和组织结构。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 NAA浓度对愈伤组织形成及其进一步分化的影响

在MS基本培养基上用NAA和6BA, 或单独使用2,4-D均能诱导莴苣子叶外植体形成愈伤

国家自然科学基金资助课题

1995-06-28 收稿; 1996-10-21 修回

组织,当培养基的BA浓度固定在 $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ 时,NAA浓度变化对愈伤组织生长量的影响见表1。

低浓度的NAA( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ )对愈伤组织生长有利,但当NAA浓度提高一倍( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ )将诱导的愈伤组织转移到光下培养时可分化出较多的“绿点”,平均每块愈伤组织可分化出18.6个“绿点”,这些“绿点”转到 $1/2 \text{ MS}$ 培养基时,可再生出完整的小植株。

表1 NAA浓度对莴苣子叶外植体愈伤组织诱导及其生长量的影响  
Table 1 Effect of NAA concentration on induction and growth of the callus from lettuce cotyledon

实验序号 Test No. (g/piece)	NAA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	外植体数 No. of explant	愈伤组织发生率 Callus forming rate (%)	愈伤组织生长量 Callus growth (g/piece)
1	0.1	12	100	1.72
2	0.2	12	100	1.20
3	0.3	12	100	0.82

实验还发现,当愈伤组织诱导的培养基中只含细胞分裂素(BA或KT)时,虽然也能形成愈伤组织,但该组织转移到光下培养时不能分化出“绿点”,而且这些愈伤组织在原培养基上逐渐褐化死亡。

## 2.2 BA浓度对愈伤组织形成及其分化的影响

当NAA浓度为 $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ 时,BA浓度对愈伤组织的大小及其质地有明显的影响。培养基中含较高浓度的BA( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ),其愈伤组织形成的体积较大,并且质地松软透明,但“绿点”分化频率不高。当BA浓度降低时(如 $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ),愈伤组织的体积缩小,质地变紧密,而且“绿点”分化的频率也增加。由于 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ BA产生的愈伤组织过于紧密,分离“绿点”时易受损伤。对“绿点”进一步分化的观察表明,BA的浓度以 $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ 较为理想。

## 2.3 2,4-D浓度对愈伤组织的形成及其分化的影响

在MS基本培养基中加入 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 或 $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ 的2,4-D代替NAA时,外植体在培养过程中逐渐褐化死亡。若将2,4-D浓度降低到 $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ 或 $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ,经一次继代培养9周之后,外植体可形成棕黑色半透明状的愈伤组织,用涂片法在显微镜下观察,可见愈伤组织中含有许多类似分生组织细胞存在(细胞小而圆),但外观上不能表现任何形态的分化。

## 2.4 愈伤组织的体细胞胚胎发生

五天苗龄的子叶外植体在MS附加NAA( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ),BA( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ),无光照, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养2周,外植体切口边缘开始长出白色愈伤组织。将该愈伤组织转至每天3000 Lux光照16 h ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )继续培养,愈伤组织不断长大,2-3周后愈伤组织上开始出现“绿点”。把“绿点”用FAA固定,切片观察,发现分化的“绿点”具典型的体细胞胚结构。同时在愈伤组织中还可以发现分生细胞团结构及鱼雷形胚状体,这在一定程度上反映了体细胞胚形成的若干阶段。成熟的体细胞胚可见有明显的芽端和根端的分化。它与愈伤组织之间无维管束的直接联系,很容易从愈伤组织分离出来。这种体细胞胚转移到 $1/2 \text{ MS}$ 激素培养基上(3000 Lux16 h光照, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )培养一段时间后,可发育出完整的小植株。

这种体细胞胚胎发生方式并不象胡萝卜体细胞胚胎发生过程那样典型地分为胚性愈伤组织形成、体胚发生的诱导(悬浮培养)和成熟阶段。该莴苣品种的体细胞胚胎发生是从愈伤组织的细胞脱分化而直接再分化出来的。在以美国亚尔盘黑核包心生菜的幼叶为外植体所诱导的愈伤组织中也观察到这一类似的体细胞胚胎发生方式<sup>[5]</sup>。

对体细胞胚的形成除上述的生长调节物质起作用外,前期一段的暗培养以及待愈伤组织诱发之后再转移到光下培养,也是重要的条件之一。一直在光下培养的外植体(子叶)呈绿色,其面积也不断扩大,愈伤组织形成时间推迟,形成的频率也降低,所得的愈伤组织易进行器官(芽)的分化。外植体诱导愈伤组织需要一段暗培养然后再转入光下培养才能形成体细胞胚胎的例子还见于 *Paspalum notatum*<sup>[7]</sup>, *Cucumis melo* L.<sup>[8]</sup>, *Camellia japonica* L. 和 *Camellia reticulata* L.<sup>[9]</sup>, *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre<sup>[10]</sup>, 但具体机制尚缺乏研究。

### 参考文献

- 1 李鹏飞等. 结球莴苣顶芽与叶片组织培养. 华南农学院学报, 1980, (3):39
- 2 钱仲贤. 结球生菜的组织培养. 植物生理学通讯, 1988, (4):37
- 3 韩阳, 奚惕. 莴苣通过胚状体途径的快速繁殖. 植物生理学通讯, 1989, (2):17
- 4 周晓丽, 奚惕. 莴苣子叶培养中 RNA、蛋白质及过氧化物酶的变化. 植物生理学通讯, 1990, (6):14
- 5 刘选明. 结球生菜叶片组织培养与器官发生的研究. 湖南农学院学报, 1990, 16(3):232
- 6 Teng W L, Lin C P, Liu Y J. Regeneration lettuce from suspension culture in a 2-liter bioreactor. Hort Science, 1992, 28(6):669-671
- 7 Shatters R G-Jr, Wheeler R A, West S H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of 'Tifton 9' Bahiagrass. Crop Science, 1994, 34(5):1378-1384
- 8 Gray J P, Meolley D W, Compton M E. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. J Amer Soci Hort Sci, 1993, 118(3):425-432
- 9 San Jose M C, Veitez A M. Regeneration of *Camellia* plantlets from leaf explant cultures by embryogenesis and caulogenesis. Scientia Horticulture, 1993, 54(4):303-315
- 10 Kuehnle A R, Chen F C, Sugli N. Somatic embryogenesis and regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. Plant Cell Rep, 1992, 11(9):428-442