

# 观赏凤梨胚性愈伤组织的诱导、高频再生及超微结构研究

张国芳 陆广欣 陈丽闽 毛碧增

(浙江大学生物技术研究所/水稻生物学国家重点实验室,农业部作物病虫害分子生物学重点开放实验室,浙江 杭州 310029)

**摘要:**以观赏凤梨‘名宝剑’的短缩茎为外植体,研究了不同激素及浓度组合对愈伤组织诱导和植株分化的影响,并通过形态学和组织细胞学观察了不同类型愈伤组织的超微结构和胚性愈伤组织的分化过程。结果表明:NAA对愈伤组织诱导的影响达到极显著水平( $P=0.0019$ ),其中0.5mg/L NAA最有利于提高愈伤组织的诱导率和胚性愈伤组织的比例,最佳诱导培养基为MS+2.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+2.0mg/L 2,4-D,诱导率高达80%;6-BA和NAA组合有利于加快胚性愈伤组织的分化和提高不定芽分化频率,胚性愈伤组织在MS+0.5mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA培养基上分化效率达到100%。电镜观察发现:胚性愈伤组织结构紧密,细胞较小,细胞内含物丰富,细胞代谢旺盛;非胚性愈伤组织结构疏松,细胞体积巨大,内含大液泡,基本无内含物;胚性愈伤组织在分化过程中细胞形态存在很大差异。  
**关键词:**观赏凤梨;短缩茎;胚性愈伤组织;再生植株;超微结构

## INDUCTION, HIGH FREQUENCY REGENERATION AND ULTRASTRUCTURE OF EMBRYONIC CALLUS FROM ORNAMENTAL PINEAPPLE

ZHANG Guo-fang LU Guang-xin CHEN Li-min MAO Bi-zeng

(State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Ministry of Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029)

**Abstract:** A system for embryonic callus (EC) induction and plant regeneration of ornamental pineapple (*Vriesea* ‘Tiffany’) using stem as explant was developed. Callus was induced on MS medium supplemented with various concentrations of 6-BA, NAA and 2.0mg/L 2,4-D. Plantlet differentiation was induced on MS medium supplemented with NAA and 6-BA. The results showed that the best treatment in terms of response quality and mean number of EC for explants was 0.5mg/L NAA with 2.0mg/L 6-BA. The best medium for EC induction was MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 2.0mg/L 2,4-D with the induction frequency 80%. The best shooting regeneration of EC was obtained on MS supplemented with 0.1mg/L NAA and 0.5mg/L 6-BA with the maximum reaching 100%. Morphological and ultrastructure differences between EC and Non-embryonic callus (NEC) were observed by electron microscopy during proliferation and differentiation phases. Structural cell organelles are abundant in the EC cells, neither NEC cells. The characteristics of the callus were described in the paper.

**Key words:** ornamental pineapple; stem; embryonic callus; plant regeneration; ultrastructure

收稿日期:2011-11-24 接受日期:2011-09-30

基金项目:浙江省科技厅重大科技专项重点农业项目(2009C12095)

作者简介:张国芳(1985-),女,浙江金华人,硕士,研究方向为植物组培与转基因。Tel:15867297953;E-mail:zhangguofang401@163.com

通讯作者:毛碧增(1972-),女,浙江杭州人,副研究员,硕士生导师,研究方向为植物组培与基因工程育种。Tel:0571-88982678;E-mail:maobz@

zju.edu.cn

观赏凤梨为凤梨科多年生草本植物,原产于中、南美洲的热带、亚热带地区,是集观花、观叶于一体的时尚花卉,常见的种类主要是凤梨科的珊瑚凤梨属(*Aechmea*)、水塔花属(*Billbergia*)、果子蔓属(*Guzmania*)、彩叶凤梨属(*Neoregelia*)、铁兰属(*Tillandsia*)和莺歌属(*Vriesea*)。

上世纪90年代我国华南地区引进观赏凤梨,近年来种植面积逐渐扩大,而传统种子的萌发力弱、吸芽分株繁育系数低,严重阻碍了优良品种的快速推广应用。因此,培育能保持优良种性、品质均一的组培苗已成为观赏凤梨产业的新亮点<sup>[1]</sup>。对于观赏凤梨的组织培养研究,国内已有零星报道<sup>[2]</sup>,但对观赏凤梨胚性愈伤组织的诱导以及显微结构的研究尚未见报道。本研究对不同激素组合所诱导的不同愈伤组织类型进行了组织细胞学观察,旨在探索胚性愈伤组织在增殖、分化过程中的组织细胞结构变化规律,进一步明确外源激素对胚性愈伤诱导及植株高频再生的作用,从而为调控愈伤组织培养再生途径和提高体细胞胚诱导效率提供细胞学依据。所建立的高效再生体系可为观赏凤梨种苗产业化,以及下一步的基因工程育种研究奠定可靠基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

观赏凤梨莺歌属栽培品种‘名宝剑’(*Vriesea* ‘Tiffany’)组培苗,由浙江省农业科学院花卉研究所提供。

### 1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导及继代培养 用解剖刀轻轻剥去组培苗外面的老叶鞘,剥取0.5cm左右的短缩茎(图1-A),接种于诱导培养基中。每培养皿接种10个,重复3次。诱导培养基为MS<sup>[3]</sup>+2mg/L 2,4-D+3%蔗糖+8g/L琼脂+(0、2、3、4mg/L)6-BA+(0、0.5、1.0mg/L)NAA,pH 5.8。培养条件为光照16h,光照强度30~40 μmol/m<sup>2</sup>·s,温度27℃±1℃;暗培养8h,温度21℃±1℃。

诱导培养15d后,统计分析不同激素及浓度组合的培养基对愈伤组织诱导的影响。挑选生长均一、颜色鲜黄、质地紧密的颗粒状愈伤组织(即胚性愈伤组织)(图1-B)和颜色泛白、质地疏松的水渍状愈伤组织(非胚性愈伤组织)(图1-C)接种于MS+2.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+2.0mg/L 2,4-D继代培养。

1.2.2 胚性愈伤组织分化及植株移栽 挑选直径

0.2cm以上的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织分别转入分化培养基。分化培养基为MS添加不同浓度的(0、0.5mg/L)6-BA、(0、0.1、0.5mg/L)NAA,3%蔗糖和8g/L琼脂,pH 5.8。每个处理接种10块愈伤组织,重复3次。培养条件为光照16h,光照强度30~40 μmol/m<sup>2</sup>·s,温度27℃±1℃;暗培养8h,温度21℃±1℃。4周后统计分析不同激素及浓度组合的培养基对愈伤组织开始分化时间、分化效率等的影响。

将株高3cm左右的分化苗转接于生根培养基RM(大量元素减半,微量及铁盐、B5有机含量同MS、蔗糖3%、琼脂8g/L,pH 5.8)中,待苗长到5~6cm,具有发达根系时进行移栽。培养瓶在室温放置2~3d,揭开封口膜,轻轻洗去根部琼脂、晾干,移栽于泥炭和蛭石(3:1)的基质中,保温保湿培养。

1.2.3 愈伤组织的超微结构观察 取继代培养的愈伤组织以及分化培养时刚出现绿点的、全部转绿的和刚分化出不定芽的愈伤组织进行超微结构观察。

环境扫描电镜观察:样品依次以2.5%戊二醛和1%锇酸固定,用一系列浓度梯度的酒精溶液脱水后,用乙醇与醋酸异戊酯的混合液(V/V=1:1)及纯醋酸异戊酯处理,临界点干燥,镀膜,置于环境扫描电镜(XL30-ESEM,PHILIPS)样品台观察。

透射电镜(JEM-1200EX,JEOLLID)超薄切片观察:样品依次以2.5%戊二醛和1%锇酸固定,用一系列浓度梯度的酒精溶液脱水,Spurr树脂包埋,制作超薄切片。醋酸双氧轴及柠檬酸铅溶液染色观察。

1.2.4 数据处理与统计分析 数据处理采用DPS统计分析软件,用Duncan新复极差法进行多重比较<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素组合对愈伤组织诱导率和愈伤组织质量的影响

短缩茎接种于12种不同激素及浓度组合的MS培养基中培养4周,不同组合培养基对愈伤组织诱导的影响见表1。

由表1可见,所有的培养基均能诱导出愈伤组织,但经统计分析发现不同激素组合的培养基对‘名宝剑’短缩茎愈伤组织的诱导能力有显著的差异,含0.5mg/L NAA的培养基诱导出愈伤组织的时间均早于其他组合,且诱导率显著高于其他组合,胚性愈伤组织比例高,其中2.0mg/L 2,4-D与2.0mg/L 6-BA和0.5mg/L NAA组合及与4.0mg/L 6-BA和0.5mg/L NAA组合的诱导培养基诱导愈伤组织能力最强,平均

诱导率高达 80% ,与其他组合均存在极显著差异( $P < 0.01$ )。

6-BA 和 NAA 对愈伤组织诱导作用的方差分析发现 NAA( $P = 0.0019$ )浓度的变化对愈伤组织诱导的影响达到极显著水平;而 6-BA( $P = 0.3046$ )浓度的变化对愈伤诱导没有差异;2 个激素互作的分析发现 NAA 和 6-BA 之间互作不显著( $P = 0.3629$ )。

表 1 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different phytohormone combination on callus induction

激素浓度 phytohormone concentration (mg/L)			愈伤诱导 时间 induced time(d)	愈伤诱导率 callus induction rate(%)	胚性愈伤比例 ratio of EC* per clump calli(in Vol.)(%)
2,4-D	6-BA	NAA			
2.0	0	0	24	43.3 ± 5.8c	29.8 ± 2.6e
2.0	0	0.5	17	60.0 ± 0.0b	53.1 ± 1.7c
2.0	0	1.0	20	53.3 ± 15.2c	35.1 ± 2.9d
2.0	2.0	0	24	50.0 ± 11.5c	32.8 ± 1.0d
2.0	2.0	0.5	17	80.0 ± 10.0a	85.2 ± 5.6a
2.0	2.0	1.0	22	46.7 ± 11.5c	47.1 ± 2.0c
2.0	3.0	0	23	43.3 ± 5.8c	26.2 ± 2.6f
2.0	3.0	0.5	17	73.3 ± 5.8ab	69.8 ± 5.2b
2.0	3.0	1.0	20	40.0 ± 10.0c	39.6 ± 2.1d
2.0	4.0	0	21	53.3 ± 5.8c	30.4 ± 1.9e
2.0	4.0	0.5	16	80.0 ± 10.0a	80.2 ± 2.6a
2.0	4.0	1.0	21	50.0 ± 10.0c	50.1 ± 4.0c

注:EC\*:胚性愈伤组织;表中数值为平均值 ± 标准差。字母不同者表示相互间存在显著性差异( $P < 0.01$ )。

Note: EC\*: embryogenic callus; Data are expressed as means ± standard deviation (SD). Values followed by different letters means there are significant difference at  $P < 0.01$ .

另外还发现激素浓度影响愈伤组织的质量, NAA 浓度为 0mg/L 时,诱导出部分颜色泛白、质地疏松的水渍状非胚性愈伤组织,长时间培养会逐渐褐化(图 1-C);当 NAA 浓度达到 0.5mg/L 时诱导能力最强,且诱导出的愈伤组织多为颜色鲜黄、质地紧密的胚性愈

伤组织(图 1-B)。6-BA 浓度为 0mg/L 时,短缩茎的褐化程度最轻,但诱导出部分非胚性愈伤组织;当 6-BA 浓度大于 2.0mg/L, NAA 浓度为 0.5mg/L 时,胚性愈伤组织的诱导率增加不显著,因此短缩茎的最佳愈伤组织诱导培养基为: MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 2.0mg/L 2,4-D。

将直径 0.1cm 左右的胚性愈伤组织颗粒转接到诱导培养基 (MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 2.0mg/L 2,4-D) 上,生长良好,胚性愈伤组织增殖较快。但在试验中发现,胚性愈伤组织继代生长时间超过 40d,米黄色紧密的胚性愈伤组织慢慢泛白产生粘性物质,愈伤组织逐渐变得疏松,进而呈水渍状即转变为非胚性愈伤组织,这可能是长时间培养产生了不利于胚性愈伤组织生长的代谢产物。因此,为了有效增殖胚性愈伤组织,继代培养时间最好控制在 20d 左右。

## 2.2 不同激素组合对愈伤组织再分化的影响

胚性愈伤组织在 6 组不同激素组合培养基上的分化情况见表 2。

表 2 不同激素组合对胚性愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of different phytohormone combination on differentiation of embryogenic callus

激素浓度 phytohormone concentration (mg/L)		开始出绿 点时间 initial differenti- ation (d)	分化率 differenti- ation rate (%)	生长状况 quality of plantlet
6-BA	NAA			
0	0	15	10	纤弱,黄绿 thin, yellow-green
0	0.1	7	100	纤弱,嫩绿 thin, light green
0	0.5	7	100	纤弱,嫩绿 thin, light green
0.5	0	7	100	粗壮,鲜绿 strong, bright green
0.5	0.1	6	100	粗壮,浓绿 strong, heavy green
0.5	0.5	6	100	纤弱,部分玻璃化 thin, vitreous

由表 2 可见,胚性愈伤组织在所有培养基上均能

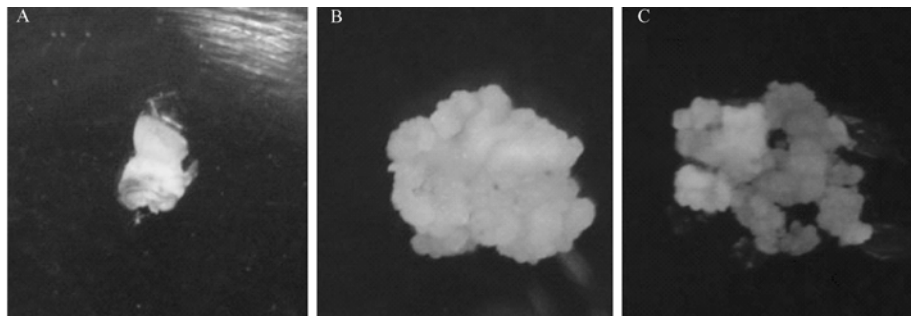


图 1 观赏凤梨的短缩茎及愈伤组织诱导

Fig. 1 Stem and the callus induced from ornamental pineapple

A: 短缩茎; B: 胚性愈伤组织; C: 非胚性愈伤组织

A: stem; B: embryogenic callus (EC); C: non-embryogenic callus (NEC)

转绿并分化出不定芽,其在不同激素组合的培养基上分化率都为 100%,可能是经过诱导产生的胚性愈伤组织含一定的内源激素,在各分化培养基中都能发育为成熟的体细胞胚,而发育成熟的体细胞胚具有胚根、胚轴和胚芽的完整结构,且有独立的维管系统,能发育为完整的植株。但不同激素组合的培养基上愈伤组织的分化时间以及不定芽的质量存在差异。在不添加任何激素的 MS 培养基中有不定芽分化现象,但分化率极低(10%)(图 2-A);在不添加 6-BA 的培养基中分化出的不定芽数量少,即试验中每块愈伤组织分化出的苗数量少,同时也伴随着少量白色根瘤状物的形成。在 0.5mg/L 6-BA 和 0.1mg/L NAA 组合的分化培养基

上,胚性愈伤组织出现绿点的时间最短,每块愈伤组织分化不定芽多而且芽体粗壮,生长势旺(图 2-C),为此最佳分化培养为 MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA。非胚性愈伤组织在所有的分化培养基中均不能分化出不定芽,培养 15d 后开始慢慢褐化,30d 左右逐渐变黑,直至最终死亡(图 2-B,2-D)。

约 3cm 高的小苗在生根培养基 RM 培养 15d 左右根原基发育,40d 后根系发育完全,取 5~6cm 高、具有发达根系的苗进行驯化(图 2-E),移栽于泥炭和蛭石(3:1)的基质中,放置人工气候箱(RXZ)中培养,移栽成活率达 90% 以上(图 2-F)。

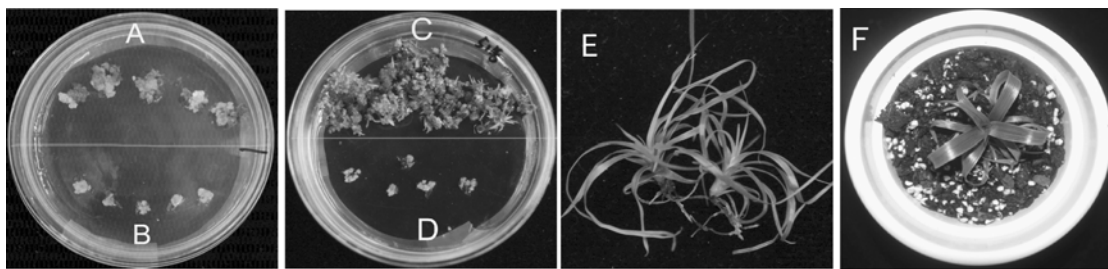


图 2 愈伤组织的分化(培养 4 周)及植株再生

Fig. 2 Differentiation of callus and plant regeneration of ornamental pineapple

A: 胚性愈伤组织在 MS 培养基上的分化;B:非胚性愈伤组织在 MS 培养基上的分化;C:胚性愈伤组织在 MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA 培养基上的分化;D:非胚性愈伤组织在 MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA 培养基上的分化;E: 生根;F: 移栽苗

A: EC developed 4 weeks after plated on MS medium; B: NEC developed 4 weeks after plated on MS medium; C: EC developed 4 weeks after plated on MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA medium; D: NEC developed 4 weeks after plated on MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA medium; E: Cultivated for rooting;

F: Survival plantlet after transplanting

### 2.3 胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织的超微结构观察

观赏凤梨的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在质地和颜色上具有极大的差异,胚性愈伤组织多为生长均一、颜色鲜黄、质地致密(图 1-B),而非胚性愈伤组

织为颜色泛白、质地疏松、水渍状(图 1-C),这种形态上的差异为鉴别胚性愈伤和非胚性组织提供了依据。

经环境扫描电镜观察发现,非胚性愈伤组织和胚性愈伤组织的表面结构有着较大的差异。非胚性愈伤组织表面疏松并向内陷,呈褶皱状,有较多的覆盖物,

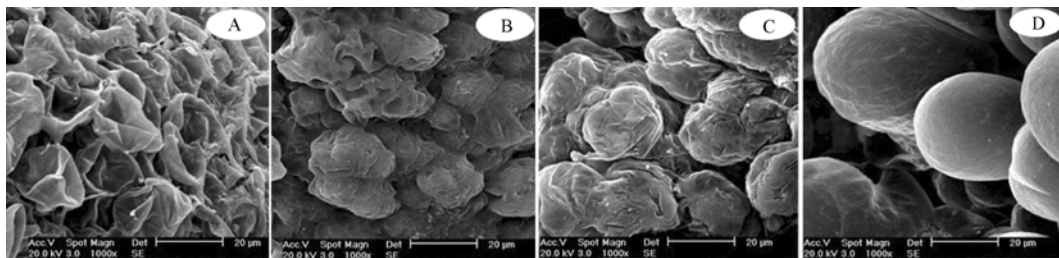


图 3 愈伤组织扫描电镜观察

Fig. 3 Environmental scanning electron micrograph (ESEM) of callus

A: 非胚性愈伤组织;B:胚性愈伤组织;C: 分化培养刚现绿点时的愈伤组织;D: 刚分化出不定芽的愈伤组织

A: NEC; B: EC; C: EC of original differentiation; D: callus of regenerated plantlets

呈片状(图 3-A);胚性愈伤组织结构紧密、可见球形结构,即为发育早期的球形胚(图 3-B)。

胚性愈伤组织在不同的分化阶段,其表面结构也有着较大的变化。刚现绿点的胚性愈伤组织团粒结构更加明显,团粒排列更为紧密,在分化过程中团粒间间隙逐渐扩大,细胞表面逐渐光滑(图 3-C);刚要形成小苗的胚性愈伤组织表面结构差异更大,球形结构更加明显,团粒结构顶部呈球状的指状突起,团粒间间隙形成沟壑状(图 3-D)。

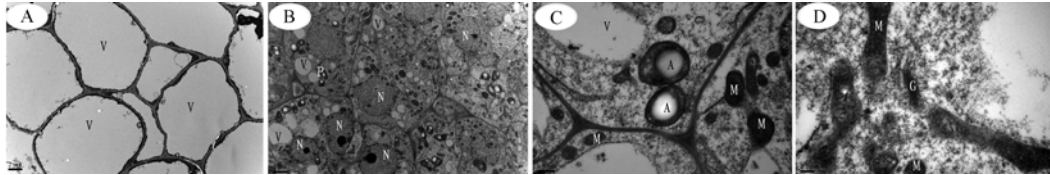


图 4 愈伤组织的透射电镜(TEM)观察

Fig. 4 Ultrastructure of calli

A:非胚性愈伤细胞(5000×);B:胚性愈伤细胞(5000×);C:胚性愈伤细胞(25000×);D:胚性愈伤细胞(50000×)

图中显示 A:淀粉粒;G:高尔基体;M:线粒体;N:核仁;P:质体;V:液泡

A: NEC cell (5000×); B: EC cell (5000×); C: part of EC cell(25000×); D: part of EC cell(50000×)

The figure showed A: amyloplast; G: golgi body; M: mitochondria; N: nuclei; P: plastid; V: vacuole

胚性愈伤组织分化过程中细胞状态各不相同。刚出绿点时小液泡数量有所增加,细胞排列更规则整齐,细胞器的分化更加明显(图 5A-1,5A-2);愈伤全变绿

时,液泡体积变大,质体内部形成了褶皱,出现片层结构,一些质体逐渐发育成叶绿体,线粒体数量增加(图 5B-1,5B-2),图中还明显可见线粒体、质体集中在细胞

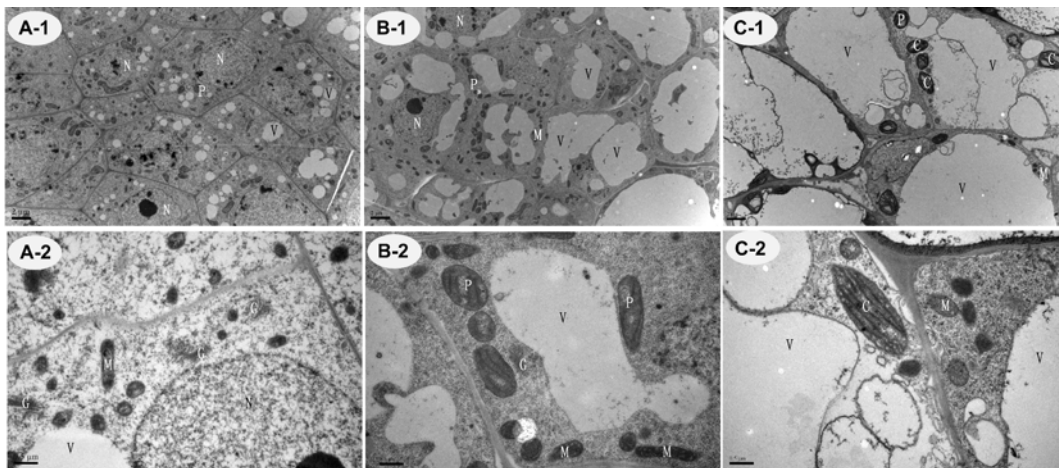


图 5 胚性愈伤组织分化过程的透射电镜(TEM)观察

Fig. 5 Ultrastructure of EC during differentiation

A-1: 开始出绿点时胚性愈伤组织细胞(5000×);A-2: 开始出绿点时胚性愈伤组织细胞(25000×);

B-1: 全变绿的愈伤组织细胞(5000×);B-2: 全变绿的愈伤组织细胞(25000×);C-1: 分化出不定芽

的愈伤细胞(5000×);C-2: 分化出不定芽的愈伤细胞(25000×)

图中显示 C:叶绿体;G:高尔基体;M:线粒体;N:核仁;P:质体;V:液泡

A-1: EC cell of original differentiation (5000×); A-2: part of EC cell of original differentiation (25000×); B-1: EC cell

of differentiation (5000×); B-2: part of EC cell of differentiation(25000×); C-1: callus cell with regenerated

plantlets(5000×); C-2: part of callus cell with regenerated plantlets(25000×)

The figure showed C: chloroplast; G: golgi body; M: mitochondria; N: nuclei; P: plastid; V: vacuole

质的一侧,这可能与分化过程中极性的建立有关;刚分化成小苗的愈伤组织,细胞体积相对变大,质体片层结构清晰,叶绿体正式形成(图 5C-1,5C-2)。

### 3 讨论

从观赏凤梨愈伤组织诱导试验中可见,当诱导培养基中只含 2mg/L 2,4-D 时,也能诱导出愈伤组织,但其诱导率较低,这表明 2,4-D 在植物愈伤组织的诱导中具有重要作用。Sharma 等<sup>[5]</sup>发现 6mg/L 2,4-D 可以高效诱导出大麦(*Hordeum vulgare* L.) 的胚性愈伤组织;Elhiti 等<sup>[6]</sup>在诱导拟南芥的体细胞胚时也发现,0.75 μmol/L 2,4-D 能诱导体细胞胚形成,而 4.5 μmol/L 为最佳诱导浓度;Sané 等<sup>[7]</sup>发现 2mg/L 2,4-D 可以诱导出枣椰子愈伤组织。上述研究还说明不同外植体对 2,4-D 的敏感性有所差异。在本课题组的前期试验中,同样发现 2mg/L 2,4-D 能有效地诱导出观赏凤梨品种‘名宝剑’短缩茎的胚性愈伤组织,这些结果有效证实了 2,4-D 可能具有激发信号级联反应,介导体细胞胚形成的假设<sup>[8]</sup>。在进一步的高效诱导培养基筛选中发现添加 2.0mg/L 6-BA 和 0.5mg/L NAA,能有效提高胚性愈伤组织的诱导率,而且进一步的统计分析表明 NAA 对胚性愈伤的诱导作用有显著差异,0.5mg/L NAA 为最佳浓度,而 6-BA 和 NAA 对胚性愈伤的诱导机理未曾报道,故仍需进一步探索。

胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在形态结构、生理生化和发育上都有明显差异,从而决定着它们具有不同的生理功能,试验中也证明了只有胚性愈伤组织才能在分化培养基中分化出植株,即胚性愈伤组织的诱导是获得再生植株的保证<sup>[9]</sup>。因此用愈伤组织作转基因研究材料必须选用胚性愈伤组织,Shang Hai-Hong 等<sup>[10]</sup>研究了棉花胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织农杆菌介导转化后的区别,表明只有选用胚性愈伤组织才能分化出转基因再生植株。为获得高质量的胚性愈伤组织,本试验采取较高频率的继代培养(20d 左右一个周期),转接时除去表面的非胚性愈伤组织,尽量吸干表面水分,这有助于胚性愈伤组织的快速增殖并减少褐化。胚性愈伤组织在 6-BA 和 NAA 不同浓度组合的培养基以及无激素培养基上都可以分化出植株,只是分化频率以及时间有所差异(表 3),但本试验中也发现部分培养基上根状体先于茎叶分化现象,而在后期的分化中先分化根状体的胚性愈伤组织仍能分化出完整植株,与 Bhaskaran 等<sup>[11]</sup>、崔凯荣等<sup>[12]</sup>的研究结果不同。这表明 6-BA、NAA 等外源激素能有效

调控胚性细胞发育,使其最终发育成植株,因此最佳的激素组合是建立高效的胚性愈伤组织诱导以及再生体系的基础。

电镜观察结果显示,观赏凤梨胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织的外部显微形态和内部结构都存在很大区别,与前人在甜菜<sup>[13]</sup>等物种中观察到的甚为相似。观赏凤梨胚性愈伤组织细胞富含淀粉粒(图 4-C),而丰富的淀粉粒为胚性细胞的分化、发育提供了大量能量和营养。刚现绿点的胚性愈伤组织细胞含有大量内嵴发达的线粒体及小液泡,可见此时细胞代谢十分旺盛(图 5-A)。胚性细胞在分化过程中,细胞体积逐渐变大,小液泡和线粒体数量增多,许多质体转化为叶绿体。分化出植株时,细胞中央出现大液泡,细胞质被挤压到细胞边缘,此时叶绿体正式形成,分化正式完成。

### 4 结论

本研究建立了高效的观赏凤梨品种‘名宝剑’愈伤组织诱导及植株再生体系,即以短缩茎为外植体,在 MS + 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 2.0mg/L 2,4-D 培养基上进行诱导,其愈伤组织诱导率达 80%,胚性愈伤组织在 MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA 上培养,分化效率达 100%。分化苗转入 RM 培养基中进行生根培养,炼苗移栽,成活率为 90%。通过电镜观察胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织及胚性愈伤组织分化过程外部形态和细胞内部结构不同,为显微水平鉴定胚性愈伤组织奠定了基础,根据分化过程中细胞结构的变化,可以在短时间内筛选优化分化培养基,建议高效的再生体系。本研究建立的通过诱导胚性愈伤组织获得高频植株再生的技术体系,不仅为观赏凤梨优质种苗工厂化生产提供了技术保障,也为观赏凤梨的生物技术育种奠定可靠的基础。

致谢:感谢浙江大学分析测试中心黎军英老师和何黎平老师在透射电镜和扫描电镜试验中的细心指导!

### 参考文献:

- [1] 沈晓岚. 观赏凤梨优质品种收集以及遗传转化研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2010
- [2] 张国芳, 毛碧增. 凤梨科植物生物技术研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2009, 38(1): 74-77
- [3] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with to6-BAcco tissue culture[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497

- [ 4 ] Tang Q Y, Feng M G. DPS Data processing system: Experimental design, statistical analysis, and data mining[M]. Beijing: Science Press,2002
- [ 5 ] Sharma V K, Hänsch R, Mendel R R, Schulze J. Mature embryo axis-6-BAsed high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of 6-BArley [J]. J Exp Bot, 2005,56(417): 1913 – 1922
- [ 6 ] Elhiti M, Tahir M, Gulden R H, Khamiss K, Stasolla C. Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of Brassica genes involved in the regulation of the shoot apical meristem[J]. J Exp Bot, 2010,61(14): 4069 – 4085
- [ 7 ] Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia Y K, Sagna M, Trouslot M F, Duval Y, Borgel A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm[J]. Ann Bot, 2006,98(2): 301 – 308
- [ 8 ] Zuo J R, Niu Q W, Frugis G, Chua N H. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis[J]. Plant J, 2002,30: 349 – 359
- [ 9 ] Hoemann C, Richardt S, Krüger K, Zimmer A D, Hohe A, Rensing S A. Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* offers possibilities for improved developmental control in vitro[J]. BMC Plant Biol, 2010,28(10): 77 – 89
- [ 10 ] Shang Hai-hong, Liu Chuanliang, Zhang Chaojun, Li Fenglian, Hong Weidong, Li Fuguang. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between agrobacterium transformed embryogenic and Non-embryogenic calli of cotton Journal of Integrative[J]. Plant Biol, 2009,51(5): 456 – 465
- [ 11 ] Bhaskaran S, Smith R H. Cell biology and molecular genetic: Regeneration in cereal tissue culture review[J]. Crop Sci, 1990, 30: 1328 – 1337
- [ 12 ] 催凯荣,戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社,2000:1-29,48 – 64
- [ 13 ] Moghaddam B E, Taha R M. Cellular behavior in embryogenic and Non-embryogenic sugar beet calluses [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2005,41: 465 – 469

(责任编辑 王媛媛)



(上接第 1076 页)

- [ 16 ] Wang F, Wang G, Li X, Huang J, Zheng J. Heredity, physiology and mapping of a chlorophyll content gene of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Physiol, 2008, 165(3): 324 – 330
- [ 17 ] 单提波, 赵明辉, 陈温福. 超绿水稻色素含量及其光合特性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8944 – 8946, 8952
- [ 18 ] Hörtensteiner S. Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence[J]. Trends in Plant Sci, 2009, 14(3): 155 – 162
- [ 19 ] 朱旭东, 陈红旗, 罗 达, 张建军, 方红民, 闵绍楷. 水稻中花 11 突变体的分离与鉴定[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(3): 205 – 210
- [ 20 ] 刘建丰, 袁隆平. 超高产杂交稻产量性状研究[J]. 湖南农业大学学报, 2002, 28(6): 453 – 456
- [ 21 ] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 130 – 134
- [ 22 ] 王丹英, 钱 前, 徐春梅, 章秀福, 邵国胜. 不同叶色水稻叶片的衰老及对光强的响应[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(1): 77 – 81
- [ 23 ] 张力科, 高用明. 水稻叶色突变体及其基因定位和克隆的研究进展[J]. 作物杂志, 2009, 2: 12 – 16
- [ 24 ] 房贤涛, 马洪丽, 赵福源, 章清杞, 张书标. 水稻白转绿突变体的特性、遗传及其育种应用[J]. 核农学报, 2009, 23(1): 1 – 6
- [ 25 ] 刘彦卓, 黄农荣, 黄秋妹, 陈钊明, 刘斌, 梁祖扬, 邱润恒, 张旭. 晚季不同类型高产水稻品种光合速率和叶绿素含量变化研究初报[J]. 广东农业科学, 2000, 1: 2 – 4
- [ 26 ] Nagata N, Tanaka R, Tanaka A. The major route for chlorophyll synthesis includes [3, 8-divinyl]-chlorophyllide a reduction in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48(12): 1803 – 1808
- [ 27 ] 祁 鲁, 刘 晓, 陈佳颖, 林冬枝, 董彦君, 徐建龙. 一个新的水稻温敏感叶色突变体基因定位分析[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 220 – 224

(责任编辑 王媛媛)