

# 金花茶子叶在离体培养中胚状体的发生和小植株的形成

庄承纪 梁汉兴

(中国科学院昆明植物研究所)

**摘要** 研究了金花茶 (*Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama) 子叶在离体培养中体细胞胚状体发生的条件。在 MS 基本培养基中附加苄基嘌呤(BA)或苄基嘌呤与萘乙酸(NAA)组合,诱导了胚状体发生。组织学观察表明,胚状体起源于子叶的表皮细胞。在增添细胞分裂素和生长素的 MS 或改良 B<sub>5</sub> 液体培养基里振荡培养,明显地促进了胚状体根的生长和茎的发育。胚状体在继代培养中能保持旺盛的再生能力。已得到两个繁殖率较高的胚状体无性系。在合适的条件下,胚状体能长成正常的小植株。

**关键词** 金花茶; 组织培养; 胚状体

金花茶 (*Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama) 是近年我国发现的珍贵的金黄色山茶花 [2, 9, 24], 花瓣金黄色, 花型秀丽, 因而引起国内外园艺学工作者和茶花育种学家的极大兴趣。但金花茶在我国分布范围很窄, 资源不多。因此, 研究金花茶在离体条件下的植株再生, 对于种质资源保存和快速繁殖都是很有意义的。关于木本植物的胚状体发生已有一些报道 [1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 18], 在茶属植物中, 曾报道过油茶 (*Oil-tea plant*) 的胚状体 [11], Bennett 等 [13] (1982) 从红花茶 (*Camellia japonica*) 子叶离体培养中, 诱导出愈伤组织和无根苗, 金花茶的胚状体发生尚未见报道。我们用金花茶的子叶在离体培养条件下, 诱导体细胞胚状体发生, 并形成大量的完整小植株。现将部分研究结果报道如下。

## 材料与方 法

试验材料按常规的方法消毒后, 取子叶分成不同部位切块, 接种于改良的 MS [20]、B<sub>5</sub> [15] 和 N<sub>6</sub> 基本培养基上, 附加不同生长调节剂, 如 2, 4-D、IAA、NAA、KT、ZT 和 BA 及其各种组合, 置于 27°C 暗培养或光下培养, 诱导胚状体发生。胚状体的继代培养和增殖以及壮苗培养, 仍用改良 MS、B<sub>5</sub> 等培养基, 附加不同种类和浓度的激素, 作固体静止培养或液体振荡培养 (摇床转速为 150 次/分)。另取材料经固定后, 用常规方法作石蜡切片。

## 试 验 结 果

### 1. 胚状体的发生

金花茶子叶切块培养在添加适当激素的 MS 基本培养基上, 一周后切块开始膨大, 2—3 周后可见外植体表面有小突起, 40—50 天逐渐形成肉眼可见的不同发育阶段的胚状体版图(I, 1)。组织学观察表明, 胚状体起源于子叶的表皮细胞(图版 I, 2)。在离体培养条件下, 一些表皮细胞分裂产生胚性细胞团, 这类胚性细胞的体积较相邻的表皮细胞小, 具有较浓的细胞质和较大的细胞核, 其进一步分裂和分化, 形成球形胚(图版 I, 3), 然后由球形胚发育到心形胚(图版 I, 4)、子叶形胚(图版 I, 5)和鱼雷胚。从图版 I, 2—8 可见胚状体发生和发育的过程。由于胚状体形成是不同步的, 在一块外植体上可以看到不同时期和大小不同的胚状体, 在子叶伸展前, 胚状体呈“倒挂钟型”(图版 I, 6), 有时胚状体密集成丛地生长(图版 I, 10), 它们以类胚柄与母体相连, 容易从母体上分离下来。多数胚状体具 2 片子叶(图版 I, 8), 少数具 3 片子叶(图版 I, 7, 这也是金花茶的多子叶特征)或只有 1 片子叶。子叶的大小也不一致, 一般从 0.2 厘米至 1.0 厘米, 有的肥厚肉质化, 其大小可达 1.5 厘米。在适当的培养基上, 胚状体进一步生长发育, 茎端伸长形成茎, 根端伸长形成下胚轴和主根, 长成完整的小植株。

除胚状体以外, 在实验中还观察到由外植体形成一种圆球状的“球状体”(图版 I, 9), 呈乳白色或乳黄色, 表面光滑, 其大小约为 0.2—1.2 厘米。这种“球状体”在培养中未见直接发育成苗, 但将其切块, 用作继代培养, 其表面具有旺盛的形成胚状体的能力。Havráněk 等<sup>[16]</sup>、周云罗等<sup>[5]</sup>和 Button 等<sup>[14]</sup>也曾观察到一种球状体。

### 2. 胚状体发育的控制

用从母体上分离下来的胚状体或子叶作材料, 研究胚状体发育的条件, 比较了激素和培养基等对胚状体形成和发育的影响。

激素的影响: 比较了不同激素和激素组合的影响, 在固体培养基中添加适量的 BA 或 BA 与 NAA 配合, 有 70% 左右的培养物产生新的胚状体。结果表明, 适量的细胞分裂素可诱导胚状体形成和发育。当 BA 的浓度过高时, 诱导发生新的胚状体的频率明显下降, 这时根的生长发育受抑制, 胚状体生长缓慢。三种不同细胞分裂素 BA、KT、ZT, 在较高浓度下, 对胚状体的形成表现出不同程度的抑制作用, 其抑制作用的顺序是  $BA > KT > ZT$ ; 而这三种细胞分裂素在较高浓度下, 都有促进胚状体的茎芽分化的作用, 对于促进产生芽和多芽, 其活性最强的是 BA, 其次是 KT, 再次是 ZT。

比较了不同浓度 2, 4-D 对胚状体发育的影响, 在改良 B<sub>5</sub> 或 MS 基本培养基中, 附加不同浓度的 2, 4-D, 当 2, 4-D 的浓度较低时, 有 30% 左右的培养物产生新的胚状体, 但每块母体上产生的胚状体的数目较少; 当 2, 4-D 浓度增高时, 培养物产生新的胚状体的百分比明显下降, 而产生愈伤组织的比例和数量增加, 这种愈伤组织在进一步的培养中, 未见形成胚状体。

在液体振荡培养中, 当提高生长素对细胞分裂素的比例时, 胚状体的生长被促进,

容易形成肥厚状肉质化的子叶，将这种子叶切块并转到诱导胚状体的固体或液体培养基上，30—40天后，再生出大量的胚状体。

总之，一旦胚状体被诱导发生，其进一步发育所要求的激素条件不是很严格的。

培养基的影响：三种培养基试验表明，对于诱导胚状体，MS培养基优于B<sub>5</sub>培养基，前者比后者诱导率提高15%左右，N<sub>6</sub>培养基介于MS与B<sub>5</sub>之间。关于氨态氮与硝态氮的比例对胚状体发生的影响，已有不少报道<sup>[18, 25]</sup>，本试验也表明，氨态氮与硝态氮的比例为1:2时，对金花茶子叶诱导胚状体是有利的。

### 3. 液体振荡培养对促进胚状体生长和增殖的作用

金花茶胚状体在母体上密集成丛地生长，如继续留在原培养基上，生长缓慢，很难长成完整小植株。把胚状体分离下来转移到含有适量激素的固化培养基上，多数可长成苗，但生长速度较慢。

在液体培养基中作振荡培养，对胚状体的生长和增殖有明显的促进作用。当改良B<sub>5</sub>或MS液体培养基里增添适量的生长素和细胞分裂素，经3—4周，胚状体茎端和根端很快伸长，形成不同形状和大小的胚状体和幼苗（图版Ⅰ，13）。同时，在部份老的胚状体的子叶、下胚轴上又形成新的次级胚状体。液体振荡培养比在固体培养基上，能较快地诱导根和茎的形态发生，到了鱼雷期后，转到固化培养基上生长成苗。总之，液体振荡培养，明显地促进胚状体根的生长和茎的发育。

### 4. 胚状体的继代培养和小植株的产生

通常在固化培养基上作继代培养，用胚状体的子叶，尤其是肥厚肉质化的子叶或“球状体”，将其切块，接种在继代培养基上培养，每40天左右继代一次。目前已选出两个繁殖率较高的胚状体无性系，这两个无性系在含细胞分裂素和生长素的液体培养基里振荡继代培养，经40天左右，每块（大小为0.5—0.7厘米）平均产生70—80个肉眼可见的胚状体。胚状体已继代培养一年，目前仍保持着旺盛的再生能力。由胚状体产生了大量的试管苗（图版Ⅰ，14），金花茶子叶在离体培养中诱导的胚状体，已长成具有正常根、茎、叶的植株（图版Ⅰ，15）。

## 讨 论

由本实验可见，金花茶子叶具有很强的胚状体发生能力，在植物组织培养中，通过体细胞胚状体途径产生植株，频率高，速度快，这为金花茶的快速繁殖和种质资源保存，提供了新途径。

关于诱导胚状体的激素条件，在胡萝卜<sup>[17, 18]</sup>、油茶<sup>[11]</sup>和其他一些植物中，诱导胚状体发生必须有2,4-D，而胚状体发育需在无激素或低浓度生长素条件下。还有报告指出，细胞分裂素抑制胚状体发生，如胡萝卜<sup>[17]</sup>、茄<sup>[19]</sup>、黑种草<sup>[12]</sup>、回回苏<sup>[23]</sup>等。我们用金花茶子叶外植体在含细胞分裂素（或与NAA组合）的培养基上诱导了体细胞胚状体，只是当细胞分裂素的浓度增高时，胚状体的形成才表现出受抑制。也已有报道，红醋栗<sup>[26]</sup>、克劳茨棉<sup>[21]</sup>、山岭麻黄<sup>[22]</sup>等在仅含细胞分裂素的培养基上诱导形成胚状体。本研究表明，由金花茶子叶诱导胚状体，2,4-D不是必须的，高浓度的

2, 4-D对胚状体的形成是不利的。金花茶胚状体的形成, 不但与激素种类有关, 而且与激素的浓度有关。各种植物的胚状体发生, 要求不同的激素条件, 这可能是由于各种材料所含的内源激素不同和材料的生理状态差异所致。

### 参 考 文 献

- [1] 朱激, 1978: 植物组织培养中的胚状体。遗传学报, 5:79—88。
- [2] 张宏达, 1979: 华夏植物区系的金花茶组。中山大学学报(自然科学版), 3:69—74。
- [3] 陈维伦、郭东红, 1981: 酸枣(*Zizyphus jujuba* var. *spinosa* Hu) 组织培养中胚状体的形成。植物生理学报, 7:83—84。
- [4] 罗士韦, 1978: 植物组织与细胞培养研究工作的进展及其应用。植物生理学报, 4:91—112。
- [5] 周云罗、钱迎倩等, 1980: 从大蒜贮存叶诱导愈伤组织及植株再生。植物学报, 22:402—403。
- [6] 周俊彦, 1981: 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体。I. 植物体细胞的胚状体发生。植物生理学报, 7:389—397。
- [7] 周俊彦, 1982: 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体, II. 影响胚状体发生和发育的因素。植物生理学报, 8:91—99。
- [8] 欧阳权, 1981: 桉树愈伤组织发生胚状体的研究。林业科学, 17:1—7。
- [9] 胡先骕, 1965: 中国山茶属新种与新变种(一)。植物分类学报, 10:139。
- [10] 原田宏、驹岭 穆, 1979: 植物细胞组织培养。理工学社, p. 91—130。
- [11] 颜慕勤、陈平, 1980: 油茶体细胞胚状体的发生。实验生物学报, 13:343—347。
- [12] Banerjee, S. and Gupta, S., 1976; Embryogenesis and differentiation in *Nigella sativa* leaf callus in vitro., *Physiol. Plant.* 38:11—120。
- [13] Bennett, W. Y. and Scheibert, P., 1982; In vitro generation of callus and plantlets from cotyledon of *Camellia japonica*, *Camellia J.* 37:12—15。
- [14] Button, J., et al., 1974; Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of Shamouti orange (*Citrus sinensis* Osb)., *J. Exp. Bot.* 25:446—457。
- [15] Gamborg, O. L., et al., 1968; Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells., *Exp. Cell Res.* 50:151—158。
- [16] Havránek, P. and Novák, F. J., 1973; The bud formation in the callus culture of *Allium sativum* L., *Z. Pflanzenphysiol.* 68:308—318。
- [17] Kamada, H. and Harada, H., 1979; Studies on the organogenesis in carrot tissue culture. I. Effect of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation., *Z. Pflanzenphysiol.* 91:255—266。
- [18] Kohlenbach, H. W., 1978; Comparative somatic embryogenesis. In *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978*. Edited by T. A. Thorpe. University of Calgary. pp. 59—66。
- [19] Matsuoka, H. and Hinata, K., 1979; NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L., *J. Exp. Bot.* 30:363—370。
- [20] Murashige, T. and Skoog, F., 1962; A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture., *Physiol. Plant.* 15:473—479。
- [21] Price, H. J. and Smith, R. H., 1979; Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschimum* Andres., *Planta.* 145:305—307。
- [22] Ramawat, K. G. and Arya, H. C., 1976; Growth and morphogenesis in callus cultures of *Ephedra gerardiana*., *Phytomorphol.*, 26:395—403。
- [23] Tanimoto, S. and Harada, H., 1980; Hormonal control of morphogenesis in leaf explants of *Perilla frutescens* Britten var. *crispa* Decaisne f. *viridi-crispa* Kakino., *Ann. Bot.* 45:321—327。

- [24] Tuyama, T., 1975, On *Theopsis chrysantha* Hu., *J. Jap. Bot.* 50:297—299.
- [25] Wetherell, D. F., and Dougall, D. K., 1976, Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in culture wild carrot tissue., *Physiol. Plant.* 37:97—108.
- [26] Zatyko, J. K., et al., 1975, Induction of polyembryony in cultivated ovules of red currant., *Plant. Sci. Lett.* 4:281—283.

## SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANTLETS FORMATION IN COTYLEDON CULTURE OF CAMELLIA CHRYSANTHA

Zhuang Chengji and Liang Hanxing

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

**Abstract** The conditions of somatic embryogenesis in cotyledon culture of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama were studied. The embryoids were occurred on the Murashige and Skoog medium with the addition of 6-benzyladenine or combination with NAA. Histological observations showed that the embryoids originated from the epidermal cells of cotyledon. The root growth and the shoot development of embryoids were promoted markedly in the MS or B<sub>5</sub> liquid medium supplemented with cytokinin and auxin by shake culture. The embryoids maintained normal growth and embryogenesis capacity in the subculture. Two clones of embryogenesis of higher frequency have been obtained. The normal plantlets can be formed from embryoids under suitable conditions.

**Key words:** *Camellia chrysantha*; Tissue culture; embryoid

### EXPLANATION OF FIGURES

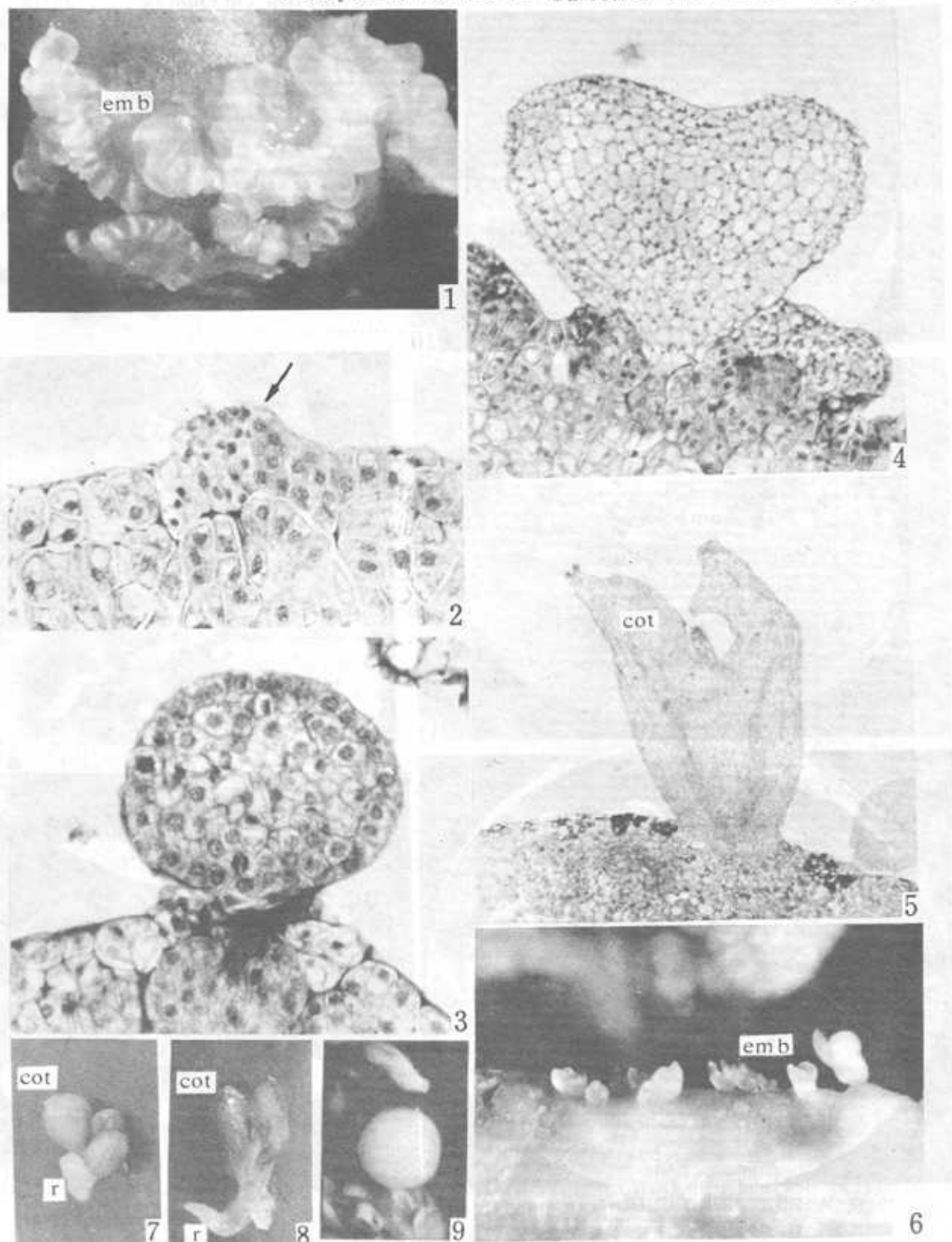
Emb, embryoid; cot, cotyledon; r, root.

#### PLATE I.

Fig 1. Embryoids formed from the cotyledon segment. Fig 2. The mass of embryonic cell originated from the epidermal cell of cotyledon. Fig 3. Globular embryo. Fig 4. Heart-shaped embryo. Fig 5. Cotyledonary embryo. Fig 6. Several developing embryos. Fig 7—8. Plantlets with three or two cotyledons developed from embryoids. Fig 9. Globoid.

#### PLATE II.

Fig 10. Crowded embryoids formed from one cotyledon segment. Fig 11. Embryoids in subculture on agar medium. Fig 12. Growth of embryoids in liquid medium by shake culture. Fig 13. Embryoids and plantlets showing the different shape and size. Fig 14. Plantlets developed from embryoids. Fig 15. Plantlet established in pot.



1. 由子叶诱导形成的胚状体群。 2. 由子叶表皮细胞分裂产生的胚性细胞团。 3. 球形胚。 4. 心形胚。 5. 具维管束的子叶形胚。 6. 在子叶展开前呈“倒挂钟”型的胚状体。 7—8. 由胚状体发育成具3片子叶和2片子叶的幼苗。 9. 球形体。(cot: 子叶; emb: 胚状体; r: 根)



10



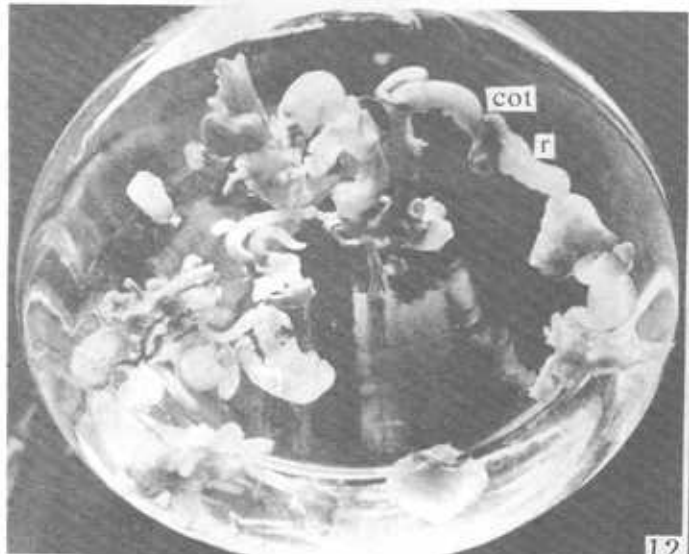
13



11



14



12



15

10. 由一块外植体发生的密集成丛的胚状体群(晚期)。 11. 继代培养产生的胚状体群。 12. 液体振荡培养中的胚状体及其形成的幼苗。 13. 由胚状体产生的各种形状和大小的幼苗。 14. 胚状体发育成的试管苗。 15. 移栽入土中的小植株。