

苹果胚乳培养成完整植株的研究

黑龙江省农业科学院园艺研究所

李桂珍 黄定球

采用苹果胚乳离体培养,获得胚乳试管幼苗一千余株,具根完整植株二百余株,移入花盆成活五十余株,经细胞学鉴定观察根尖染色体计数为 $3N=51$,证明是由胚乳发育而来的三倍体植株。

1. 在MS (1962) 基本培养基中,附加K (0.5—1) (下面所有小括号内单位都是PPM)、2.4—D (0.05—1)、LH (500) 十糖 2~3% 的培养基上,均可将发育到细胞时期的幼嫩胚乳诱导成愈伤组织。

2. 在MS大量元素减半,其中包含有6—BA (1—2)、NAA (0.05—0.5)、LH (500)、蔗糖1.5~3% 的培养基上,均能促进愈伤组织再分化,产生根、茎、叶等器官和小植株。

3. 在 $\frac{1}{2}$ MS基本培养基里,附加NAA (0.2) + IBA (1.5) 或在WM基本培养基里附加IBA (0.2) + IAA (1) 的培养基上,胚乳植株经30~40天后均能促进根的发生和生长,产生完整植株,根的诱导率高达80%以上。

4. 适宜的温度和光照是移栽试管苗提高成活率的关键,在15—20℃日光照条件下移入花盆成活率可达80%以上。

前 言

三倍体果树的果实具有个大、含糖量高、耐贮、抗病力强、丰产以及能形成珍贵的无籽果实等优良特性 (1—2)。

胚乳是被子植物双受精产物之一,具有双亲遗传物质的三倍染色体。通过胚乳培养可能获得三倍体的胚乳再生植株。关于苹果胚乳的培养据报导,中国科学院北京植物研究所和山东农学院在同一品种“金冠”,上获了胚乳植株 (4—5),但获得大量胚乳幼苗和具根完整植株仍很少,而获得大量的中小型苹果胚乳植株,并鉴定染色体为三倍体现未见有报导。

从1978年,我所开始对中、小型苹果的胚乳进行离体培养,目的是探索培育三倍体植株的育种新方法,并提供培育三倍体品种的原始材料。经过两年的实验,于80年获得了胚乳试管幼苗。本文主要将几年来采用中、小型苹果胚乳离体培养,促进愈伤组织建成、植株分化及胚乳幼苗形成的初步结果和培养条件进行了总结,同时对胚乳培养中的一些问题进行了讨论。

一、试材和方法:

取苹果属中、小型苹果龙光、1557、金红三品种。根据种子发育期的解剖观察,以龙光为例,六月上旬至中旬胚乳处于游离核时期外观呈水晶状无弹性,我们以下称它为胚乳发育第一阶段;六月下旬胚乳形成充分生长的细胞组织,外观呈半透明乳白色,稍有弹性,顶端可见白色幼胚,我们以下称它为胚乳发育第二阶段;七月下旬胚乳迅速解体只剩下一个薄壳,这时迅速增殖以达到成熟时大小,我们以下称它为胚乳发育第三阶段。接种时我们主要取第二阶段的胚乳作试材,同时对第一、三两阶段的胚乳也少量的进行了试验观察。

接种前先将果实在75%酒精中浸泡3分钟,然后切除果肉外部,再将试材浸入饱和漂白粉上清液中10~15分钟,再用无菌水冲洗三次,最后在无菌条件下取出胚乳和胚。接种时将除去胚的胚乳作主要试材进行单独培养。少数带胚的胚乳接种后供观察用,待胚乳建成愈伤组织后再去掉胚。

采用基本培养基为MS(1962)、WM在培养基中综合或单独加入各种浓度的动力精(K)、六一苯基吡啶(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、 α -萘乙酸(NAA)吲哚乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)水解乳蛋白(LH)等有机物,蔗糖浓度1—4%,琼脂0.75~0.8%,PH5.4~5.8之间。

11公斤/厘米²高压灭菌15分钟。愈伤组织的诱导在散光下进行,愈伤组织的分化在2支40瓦日光灯下进行,每日光照10~12小时,培养室温度保持在26±2度。

二、试验结果:

(一)胚乳愈伤组织的诱导(表1):

在表1中的各种培养基上,对三个发育阶段的胚乳进行了试验,结果处于发育第一阶段的胚乳,无论是带胚或不带胚的胚乳均未培养成活;第二阶段的乳胚接种后10~15天产生了旺盛的愈伤组织,频率最高达90%以上;第三阶段的胚乳除个别产生愈伤组织外,其余均萎缩死亡。

处在第二发育阶段的胚乳,在表1各培养基上虽均能产生愈伤组织,但对不同浓度的激素反应不同,其表现在产生愈伤组织的能力和质地上有着明显的不同,从表1可初步得出以下结论:1.胚乳在不加任何激素和生长素的培养基上,个别胚乳虽能产生愈伤组织,但不能继续生长,必须在培养基中加入适量的激素,胚乳愈伤组织才有可能正常发生和生长;2.高浓度的动力精(K、PPM),虽能启动胚乳细胞活化,但愈伤组织多为白色,结构松软;3.K(0.5)和低浓度的2,4-D(0.05)配合下,启动细胞分裂的能力较差,而在含有K(0.5)、2,4-D(1.0)配合下胚乳愈伤组织生长旺盛,外观呈米黄色,结构充实,诱导频率最高达91.7%。

(二)胚乳愈伤组织的分化:

1. 1979年我们采用MS为基本培养基,附加6-BA(0.5—4)、NAA(0.01—0.5),共设计40种培养基,结果1557品系的胚乳愈伤组织在MS+6-BA(2)+NAA(0.2)+LH(500)+蔗糖2%的培养基上,经三个多月的培养,在同一块愈伤组织上出现了六个绿色芽点,继续培养40天后,芽点发育为具有4—5片叶的小植株将小植株基部切下的愈伤组织转移到MS大量元素减半,6-BA降低到1.5PPM、

NAA降到0.2PPM、蔗糖降到1.5%的培养基上,经半月后愈伤组织继续分化,而且分化能力很旺盛,有趣的是在这个培养基里愈伤组织经过二年多的继代培养分化能力仍很旺盛,现已分化一千余株试管幼苗,看来这是一组理想的分化培养基。

2.80年我们仍然采用MS为基本培养基,在前两年的基础上,将激素浓度范围缩小到6-BA(1—2)、NAA(0.05—0.5)共设计8种培养基如表2,取表1所列各种培养基上的愈伤组织分别转入表2各培养基上,培养1—2月后在1、2、3、5、8等5种培养基中的愈伤组织,开始出现了形态建成的能力和多样性,产生了植株、根、叶等器官,有意思的是在2号和3号分化培养基里,有些愈伤组织的四面八方长满了绿芽和小植株,呈一堆丛生小植株团,但生长较缓慢,而在另一并2号培养基上直接长出一株带根完正植株,根是在小植株出现后36天长出来的,植株生长正常。在4、6、7号分化培养基里尚未发现器官建成,由于本试验正在进行中故不能得到最后结果。

(三)胚乳植株根的诱导:

采用 $\frac{1}{2}$ MS、WM为基本培养基,将NAA(0.2—0.5)或IAA(0.5—1.5)、NAA(0.2—0.4)或IAA(0.5—1)、IBA(0.2—0.4)或NAA(0.2—0.5)、IBA(0.2—0.5)共设计38种培养基。试验结果见表3。1.单一加入NAA(0.2—0.5)的培养基上,在15—30天内产生了根,但频率较低,并且随着NAA浓度升高植株基部愈伤组织分裂愈旺,同时植株的生长也受到抑制;2. IAA和NAA混合作用下IAA浓度超过1PPM时大部根呈褐色易老化,同时根的生长也受到抑制。3.在WM培养基里低浓度的IBA(0.2)和高浓度的IAA(1)配合下或在 $\frac{1}{2}$ MS基本培养基里高浓度IBA(1、5)和低浓度的NAA(0.2)配合下,根的诱导频率最高达80%以上,特别是后一种培养基组合,试材转入10天左右就开始长根,在本试验里是一组较适宜的诱根培养基。

(四)移入花盆内:

移栽前必须预先摘掉棉塞,让植株暴露在空气中锻炼4~6天方可转入花盆,填土为温床用土,移入盆内立即罩上烧杯以防水分蒸发,7~10天方可摘除,共移入花盆成活50余株。移栽时进行两处理:(1)移入花盆250株,置于培养室20—28℃日光照条件下经30天后成活6株,成活率仅2.4%;(2)移栽80株置于洗涤室窗台上,在15—20℃条件下经30天后成活68株,成活率84%。

三、讨论与结论:

(一)幼嫩胚乳建成愈伤组织的条件:

1 中、小型苹果胚乳产生愈伤组织最适时期是花后一月左右。从胚乳发育上看,这时期的胚乳已发育成充分生长的细胞组织,外观呈半透明乳白色而稍具有弹性。早期游离核胚乳或后期消失中的胚乳均不适于愈伤组织的诱导:

2. 幼嫩胚乳产生愈伤组织的条件,大致可归结为:(1)以MS为基本培养基,如果不添加任何生长调节剂,绝大部分胚乳不产生愈伤组织,极个别虽能发生细胞分裂,但均不能继续生长;(2)在适量的动力精(K0.5—1)和生长素(2.4—D0.1—1)混合作用下,胚乳均能产生旺盛的愈伤组织;(3)关于愈伤组织的结构和表现

随着激素浓度而有不同, 这些因素对以后愈伤组织再分化及其影响如何, 有待进一步研究。

(二) 愈伤组织再分化的条件:

根据我们两年多的试验表明, 苹果幼嫩胚乳在适宜培养条件下均能转化为胚性细胞, 这些细胞同样表现了和受精卵相同的形态建成的能力。愈伤组织分化为植株的条件可综合为: 高浓度细胞分裂素(6-BA)和低浓度的生长素(NAA)在一定水平上的配合作用, 是促进胚乳愈伤组织建成植株器官的主要因素, 其它附加物质只是起辅助作用; 关于来源于表1培养基上的龙光、1557、金红等试材的胚乳愈伤组织, 在相同的分化培养基上表现了形态建成的多样性和分化能力的差异等现象, 可能与品种、诱导愈伤组织的激素种类、愈伤组织的年令等方面有关, 这些问题还待进一步研究。

(三) 根的诱导:

低浓度的NAA和高浓度的IBA或低浓度的IBA和高浓度的IAA在一定条件下的配合, 均能诱导根的发生; 关于根的产生与温度、光照的关系尚待进一步研究。

(四) 关于对胚乳培养的影响, 目前存在两种看法, 一种是 Srivastava等(6-7)认为胚乳愈伤组织的诱导和植株的分化, 必须要有胚参加才能完成; 另一种观点是毋锡金等认为勿需胚的参加也能完成(4)。几年来我们从不带胚的胚乳愈伤组织获得了胚状体及胚乳植株, 结果与毋锡金等相似, 但我们发现带胚的胚乳诱导愈伤组织“速度与质地均优于不带胚的胚乳,”因此我们认为胚对胚乳培养的作用仍是不能忽视的一个重要问题, 需进一步研究。

(五) 适宜的温度和光照是提高移栽试管苗成活的关键。在20~25度散光条件下, 移栽250株, 仅成活6株, 成活率2.4%; 在15~20度阳光充足条件下, 移栽80株, 成活68株, 成活率达84%。看来低温和强光有利于移栽试管苗根的生长。

参 考 文 献

(1) S, Mohammad Hussain shah M. S, Roghawi著(江亦行译): “Yar mohammadi” — 巴基斯坦无籽苹果的品种。国外农业科技文摘14(1979)23~24。北京市农业科学院情报资料室。

(2) 李树贤, 石河子科技1(1979)48~55。

(3) 王大元等中国科学4(1978)355~359。

(4) 毋锡金等中国科学4(1977)356~357。

(5) 石荫平等山东农学院科研资料选编6(1977)40~41。

(6) 毋锡金: 植物学报19(1977)1, 93~94。

(7) 植物细胞和细胞培养, 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译230页。

第二发育阶段的胚乳在含有各种浓度的动力精 (K) 和2.4—D
的培养基上, 愈伤组织的诱导

表 1

培养基 编号	基本 培养基	激素浓度 (PPm)		胚乳块数			愈伤组织数			诱导愈伤组织 %			胚乳的变化及愈 伤组织的质地
		K	2.4 —D	龙光	1557	123	龙光	1557	123	龙光	1557	123	
1	MS	1	1	40	40	70	30	20	61	82.2	50	87.1	10天后开始膨大, 多为白色, 质地松 软。
2		1	0.5	30	0	80	20	0	66	66.6	0	82.5	同 1
3		0.5	0.3	30	40	40	18	12	26	60	30	65	10天后开始膨大, 多数结构较紧呈米黄 色或黄绿色少数同1。
4		0.5	0.05	25	70	60	20	9	28	80	12.9	46.6	10天后开始膨大, 大部分未活动, 结构 较松, 少部分同 3。
5		0.5	1	40	50	60	30	29	55	75	58	91.7	10天后开始活动, 愈伤组织米黄色, 结 构紧密。
6		0.5	0.5	40	50	50	18	19	21	45	38	42.0	10天后开始膨大, 大部分愈伤组织黄绿 色结构坚实
7		1	0.1		50	50		20	23		40	46	同 1
8		0.5	0.1		80	60		30	22		37.5	36.6	大部分愈伤组织为 米黄色结构紧, 少数 同 1。
9		0	0	40	40	40	3	1	5	7.5	2.5	12.5	少数愈伤组织能膨 大呈白色, 但不能继 续增殖, 最后死亡。

愈伤组织在不同浓度 6-BA 和 NAA 的配合下植株、芽
等器官的形成及其多样性

表 2

培养基 编号	基本培 养基	激素浓度 (PPm)		愈伤组织的分化及其多样性		
		6-BA	NAA	龙 光	1 5 5 7	1 2 3
1	MS	1	0.5	转入 6 9 天后出 现 2 株子叶状小苗	经 3 9 天后出现 一株芽状苗	
2		1	0.05	转入 4 3 天后出 现 3 个绿芽点	经 5 4 7 天后在 同一块愈伤组织上 出现 3 株小苗, 在 另一瓶中出现一株 丛状苗	经 3 1 天出现一 株小苗再经 3 6 天 后从基部长出了 根, 根系粗状
3		2	0.5			经 5 4 天后出现 多团丛状苗
4		1.5	0.2			
5		3	0.3		株经 3 5 天后发 现一个绿芽	经 3 1 天后出现 两株小苗
6		1	0.2			
7		2	0.5			
8		1.5	0.1		经 6 2 天后出现 一个芽状苗	

表 3 在含有各种浓度的 NAA、IBA、IAA 的培养基里胚乳植株根的诱导

培养基基 本	生长素浓度 (PPm)	试验生根			生根率 %	备 注
		NAA	IBA	IAA		
编 号	培养基	NAA	IBA	IAA	株数	株数
1	1/2 MS	0.2			27	15
2	"	0.4			31	17
3	"	0.4		1.0	29	12
4	"	0.2	1.5		56	47
5	WM	0.2	0.5		20	5
6	"	0.2		1.5	25	11
7	"	0.4		1.0	27	18
8	"		0.2	1.0	30	24