

猕猴桃体细胞胚状体的诱导及植株再生

马有会

(轻工业部甜菜糖业科学研究所·哈尔滨市 150086)

摘要:叶片及叶柄在 $NM+2,4-D_{0.5-2.0}+ZT_{0.2-2.0}+3\%$ 蔗糖及 $PH5.8$ 的培养基上诱导产生胚性愈伤组织,并获得了分化胚状体及幼株的能力。胚性愈伤组织在 $NM+ZT_{0.5-2.0}+3\%$ 蔗糖培养基中分化胚状体,胚状体进一步发育并萌发成幼株。 NM 培养基适合壮苗培养。

关键词:猕猴桃;体细胞胚状体;植株再生。

组织培养中植株的再生,以胚状体发生途径较为有利。猕猴桃营养器官的离体再生,以往曾有过大量研究,但均产生不定芽。二倍体体细胞通过胚胎发生途径的植株再生,尚无成功报道。为了给猕猴桃优良单株特别是优良雌株无性系的快速繁殖建立一个理想的再生程序,本文详细研究了猕猴桃经体细胞途径再生植株的培养程序和诱导条件,并对胚状体发生和发育进行了组织及外部形态学观察。

材料和方法

所用材料为狗枣猕猴桃(*Actinidia kolomikta* Maxima),由东北农业大学及黑龙江省植物园提供。剪取水插枝的幼叶和叶柄为外植体,采用常规方法进行表面灭菌。叶片剪成 $3\times 3mm$ 、叶柄切段为 $3mm$ 长,投置接种。基本培养基为 $NM(Nitsch-Nitsch$ 无机盐+ MS 有机物)。诱

导培养基添加 $2,4-D_{0.5-2.0}+ZT_{0.2-2.0}$,分化培养基添加 $ZT_{0.5-2.0}$,壮苗培养基不加任何激素。培养基中均加入蔗糖 $3\%(W/V)$,琼脂 $0.75\%(W/V)$, $PH5.8$ 。诱导培养在散射光下,分化培养白天日光灯补充光照 $8-10hr$,光照强度 $2,000lux$,培养温度 $25\pm 2^{\circ}C$ 。

细胞组织学观察采用石蜡切片法,铁矾苏木精染色,封固后光学显微镜摄影记录。

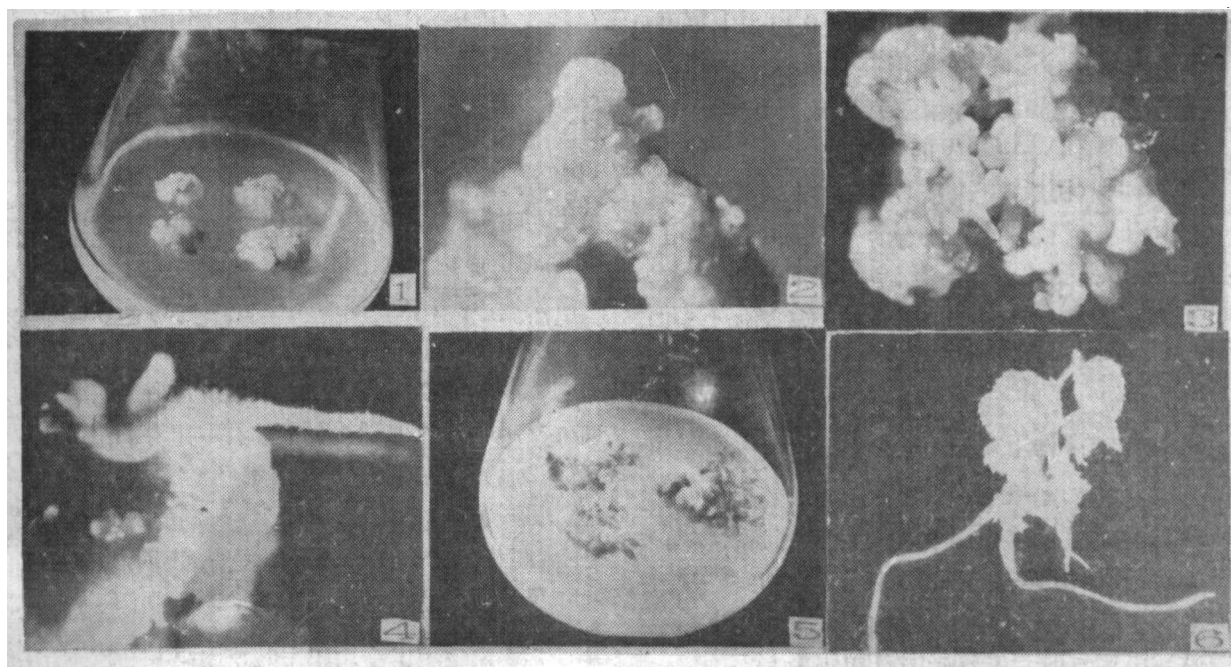
实验结果

一、胚状体与植株形成过程

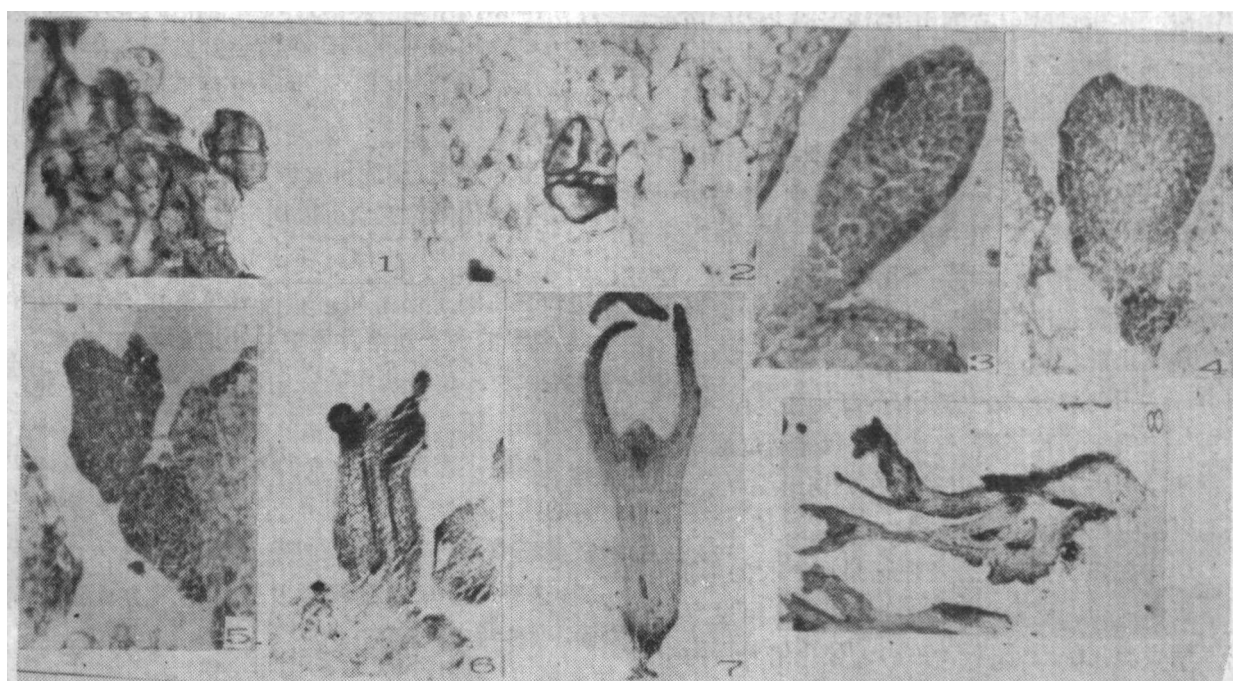
外植体在散射光下培养 $6-8$ 天,开始出现愈伤组织。至 18 天左右,愈伤组织大量增殖(图版 I-1)。4 周时,愈伤组织胚性结构形成,并可观察到球形期胚状体,实体显微镜下可见球形胚成簇在一起(图版 I-2)。

4 周时,选择胚性愈伤组织转移至分化培养

• 此文是作者硕士研究生论文的一部分,曾得到导师吴泽云教授的悉心指导,谨致深深谢意。



图版 I: 图 1. 诱导培养 18 天, 形成颗粒状大块愈伤组织。图 2. 诱导培养 4 周, 形成球形胚丛。图 3. 分化培养后, 形成大量非同步化的胚状体。图 4. 幼株, 示呈“S”型嫩茎。图 5. 分化培养 30 天, 胚状体萌发成苗丛。图 6. 壮苗培养后的小植株, 示正常叶片及发达主根。



图版 I: 图 1. 愈伤组织表层“T”字形了细胞原胚。图 2. 愈伤组织内部“T”字形了细胞原胚。图 3. 条细胞梨形原胚。图 4. 诱导培养 30 天, 早期心形胚。图 5. 心形胚。图 6. 鱼雷形胚, 示“Y”字形独立的维管组织。图 7. 子叶胚, 示发达的子叶与苗端及根端分生组织。图 8. 成熟胚, 示根端与苗端分化。

基上。转移10天时,在同一块愈伤组织上可以见到球形胚、心形胚、鱼雷形胚和成熟子叶胚各不同发育阶段的胚状体,并有少数胚萌发成幼株(图版I—3)。刚萌发的幼株呈“S”形,与种子发芽时相似(图版I—4)。分化培养30天,多数胚状体萌发成苗丛(图版I—5)。然后将幼株分离出来,转移到壮苗培养基上,约5周时间,小苗发育到有3—4片真叶和发达的主根(图版I—6)。

二、胚状体及植株诱导条件

叶片及叶柄在 $NM + 2, 4-D_{0.5-2.0} + ZT_{0.2-2.0}$ 条件下,均能诱导形成胚性愈伤组织,但以添加 $2, 4-D_{2.0} + ZT_{0.2}$ 的处理效果最好,其胚性愈伤组织诱导率及分化培养后胚状体萌发率较高。单用其中一种激素的处理不能形成胚性愈伤组织。在一定浓度范围内, $2, 4-D$ 与 ZT 保持较高比例时产生较好的诱导效果。

诱导培养4周时,将胚性愈伤组织转移到 $NM + ZT_{0.5-2.0}$ 的分化培养基上,胚性愈伤组织继续分化胚状体,胚状体进一步发育并萌发成幼株。在供试浓度范围内,分化效果与 ZT 浓度呈正相关,以 $ZT_{2.0}$ 的处理效果最好,其胚状体数及完成苗数也最多。

在分化培养基上长成的幼株,因其过小,很难移栽成活。所以,在驯化移栽前,需要壮苗培养。分离出幼株,转移到不加任何激素的 NM 液体培养基中,以滤纸作支撑物,培养5周时,便可移栽到花盆中。有些畸形幼株经壮苗培养后可以恢复正常。

三、胚状体发生、发育的细胞组织学观察

组织切片表明,猕猴桃胚状体通过愈伤组织途径产生。它既可以发生在愈伤组织表层,也可以发生在内部(图版I—1,2)。诱导培养15天的切片材料,可观察到多细胞梨形原胚的形成(图版I—3)。诱导培养4周时,胚状体可发育到早期心形胚阶段(图版I—4)。分化培养后的组织切片表明,胚状体继续发育,顺次通过心形、鱼雷形、子叶形和成熟胚状体各发育阶段(图版I—5—8)。组织切片还显示,胚状体有明显的根端与苗端两极结构及独立的维管组织系统,且与母体愈伤组织无任何联系。

植物体细胞胚状体发生,目前还不是完全可以预料的过程。就某种植物来说,需要一组特殊的营养物质,尤其是激素的合理使用,才能引导其走向胚胎发生途径,本实验也证实了这一点。

$2, 4-D$ 在调节胚胎发生方面得到了普遍论证。我们的实验中,在有适当浓度 $2, 4-D$ 存在时,接种物获得了胚胎发生能力,单独使用 ZT 而无 $2, 4-D$ 的处理,仅得到了不定芽,由此肯定了 $2, 4-D$ 在猕猴桃体细胞胚胎发生上的作用。另一方面,只有在去除 $2, 4-D$ 的分化培养基上,胚状体才能得到进一步发育,表明 $2, 4-D$ 的作用是在胚状体的发生阶段,却抑制了胚状体进一步发育走向成熟的过程。

但是,在猕猴桃胚胎发生上,单独使用 $2, 4-D$ 无效,只有在 $2, 4-D$ 与 ZT 同时存在时才有作用。Harada单独使用 $2, 4-D_{0.1-1.0}$ 诱导中华猕猴桃体细胞胚仅发育到球形胚阶段,即很快脱分化。由此推测, ZT 在诱导阶段可能具有解除 $2, 4-D$ 的抑制作用,并可推进早期胚的发育进程。

实验表明,猕猴桃营养器官的叶片、叶柄即可发生胚状体。它们可以周年取材,在无性繁殖方面有很大实用价值。在这点上,与其它成功诱导胚状体的果树不同。如柑桔和葡萄的珠心组织,苹果的种子幼苗及枇杷的幼期种胚等。显然,这些取材部位在从实验室向实用阶段过渡时,将会遇到麻烦。

实验还表明,在激素的作用下,胚状体及幼株的形态发生了一些变异,但从其壮苗培养后可恢复正常这一点来看,似乎并未发生遗传性改变,这有待于来自细胞学及植物学等方面的检验。(参考文献略)

