

唐菖蒲体细胞胚发生和植株再生

师素恩 (译)

一、概述

在 MS 培养基上获得了 4 个品种的唐菖蒲的松脆胚性愈伤组织和体细胞胚。培养基附加不同浓度的生长素, 外植体如下: 球茎切片、幼叶基部和整叶, 完整的小植株。体细胞胚转移到无激素的 MS 培养基上后再形成小植株。所有体细胞胚发生的小植株在表型上与母株没有什么不同。胚性松脆愈伤组织已保存 3 年之久且仍具有很高再生能力。

二、简述:

对球茎花卉的离体增殖而言, 在离体组织上形成不定植株的过程是首要的。这种从供体植株上分化小植株的方法的风险性并不比在严格的温室内增殖的技术大 (Debergh 等 1990; Capellades Queralt 等, 1993)。在几个唐菖蒲品种上已有快速离体增殖的报道 (Zir 等, 1970; Simonsen 和 Hildebrandt 1971; Wilfret 1971; Hussey 1977a, b; Logan 和 Zettler 1985; De Bruyn 和 Ferreira 1992)。体细胞胚发生是最有希望的植物繁殖技术, 因为它具有高的增殖潜力且这种情况下嵌合体的发育被缩小或消除。体细胞胚发生已在多种植物上有过报道 (Ammirato 1983; Tisserat 1985; Williams 和 Maheswaran 1986)。最近, 在唐菖蒲上只有一篇类似的报道 (Kamo 等, 1990)。本文描述了一种对 4 个唐菖蒲品种通过体细胞胚发生途径进行无性繁殖的一种很有效且可重复的技术, 包括全部的体细胞胚发生及植株再生的组织学分析。这是在唐菖蒲上首次对这一过程的组织学证明。

三、材料和方法:

外植体由下列唐菖蒲品种得到: Blue Isle (BI), Jenny Lee (JL), Peter Pears (PP) 和 Rosa Supreme (RS)。植株在附加 2mg/L 激动素的 MS 培养基上无性繁殖。植株由美国佛罗里达州的 Oglesby 植物实验室提供。

1. 愈伤组织诱导。利用下列外植体: (1) 整株, 完整植株 (3~4cm 长, 无根); (2) 球茎切片 (2mm 横

切, 直接将切面放于培养基上); (3) 幼叶基部 (5mm²)。培养基组成如下: MS 基本盐和维生素, 附加 3% 蔗糖, 0.2% Phytagel 和不同的生长素, 如表 1。高压灭菌以前培养基的 PH 值调到 5.7, 每试管装 10ml 培养基, 接种一个外植体, 在 23℃ 下黑暗培养。

2. 愈伤组织保存和体细胞胚形成。由外植体上分离的愈伤组织保存在含 2.4-D 2mg/L 或 NAA 10mg/L, 3% 蔗糖, 0.2% Phytagel 的 MS 培养基上, 选择松脆的 (胚性的一 E) 和致密的 (非胚性的一 NE) 愈伤组织每 4 周转接在新的培养基上。胚性愈伤表面上形成的体细胞胚保存在同样的培养基上 (如上所述), 直到它们萌发为止。培养条件为 23℃, 白炽灯照光 16h/d ($40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)。

3. 植株再生、繁殖和生根。为使其进一步成熟, 已萌发的体细胞胚转移到不含激素的 MS 培养基上。为迅速繁殖和生根, 把由体细胞胚发生而来的小植株根据 Logan 和 Zettler (1985) 所述的方法——步骤 II 和 III 进行处理。培养物在 23℃, 16h/d ($40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 条件下生长。然后, 把小植株移栽到温室内土壤中。

4. 组织学分析。愈伤组织和体细胞胚固定在醋酸——酒精中, 用系列梯度的乙醇脱水, 石蜡包埋, 用旋转切片机切成 10 μm 厚的连续切片。切片用番红染色, 快绿对染。

四、结果

1. 激素的影响。把所有唐菖蒲品种在 MS 培养基上对不同浓度激素的实验效应总结在表 1 中。在培养基上常看到两类愈伤组织: (1) 致密的 (NE) — 黄白色的、柔软没有形态发生的愈伤组织; (2) 松脆的 (E) — 白色的、易碎的由许多球状结构组成的愈伤组织。对 BI, IL 和 RS 三个品种而言, 最好的用于诱导胚性愈伤组织和愈伤组织进一步发育及分化的培养基是含 2mg/L 2.4-D 的 MS 培养基。在高浓度 2.4-D 培养基上 (6~20mg/L), 只有致密的愈伤组织产生, 或在某些情况下由完整植株上形成根。在含 NAA 的培

培养基上培养 BI和 RS时,也只产生致密的愈伤组织,但 JL没有产生愈伤组织,相反, PP品种在附加 10mg/LNAA 的培养基上只形成一种类型的愈伤组织,即松脆的 (E) — 白色的,柔软且富含水由许多小球状物组成的愈伤组织。

表 1 唐菖蒲品种在 MS培养基上对不同浓度 (mg/L) 激素的反应

激素浓度	BI	IL	PP	RS
2.4- D	2 E, SE	E, SE		E, SE
	6 NE	NE		NE
	10 NE	NE		NE
NAA	2			
	6			
	10 NE		E, SE	NE

注: E— 松脆的胚性愈伤组织 SE—— 体细胞胚
NE— 致密的非胚性愈伤组织

表 2 产生能再生植株的胚性愈伤组织的外植体数

品种	外植体类型	外植体数目	产生胚性愈伤组织外植体百分数
BI	1	360	83
	2	240	27
	3	120	44
IL	1	360	91
	2	240	31
	3	120	49
PP	1	360	69
	2	240	22
	3	120	36
RS	1	360	100
	2	240	35
	3	120	47

注: 1— 球茎切片 2— 幼叶基部 3— 完整植株

2. 外植体的影响. 外植体产生胚性愈伤组织和植株再生的数目列于表 2 接种后一个月,所有试验品种的三种外植体都形成愈伤组织,幼叶只在切面表面上形成少量愈伤组织,叶基部较顶部形成的愈伤组织多。然而,这些外植体形成的愈伤组织主要是致密型的。完整植株从球茎基部形成愈伤组织。大多有 10~ 25% 的幼叶基部和完整植株没有形成愈伤组织。已证明形成愈伤组织反应最好的是球茎切片。接种后一个月,100% 的球茎切片外植体被生长快,发育好的松脆愈伤组织所覆盖。

3. 体细胞胚发生. 所有唐菖蒲品种的松脆胚性愈伤组织生长很快。在第二次培养中,球状结构的愈伤组织膨胀并增大很多。一周以后,它们双向分化出根和茎。在以后的两周里,大多数这种结构开始萌发成小植株。松脆的胚性愈伤组织已培养保存两年多,仍然具有很高的胚胎发生能力。

4. 植株再生. 当转移到无激素的 MS培养基,萌发了体细胞胚迅速发育成绿色的芽,几天以后形成初生根。然后,把这些小植株 (0.5cm) 按 Logan和 Zellter (1985) 所描述的方法进行处理,尔后把丛生苗转移到温室土壤中。这样,99% 以上的再生株存活下来。所有通过体细胞胚得到植株与亲本类型相同,任何培养阶段都没有白叶和白化苗出现。

5. 组织学调查. 光学显微镜下对松脆愈伤组织的研究揭示了不同发育阶段体细胞胚的存在。培养 10天以后,在愈伤组织的外围就可以看到多细胞的原胚。在不同时期,体细胞胚在胚胎发生的进一步发育中出现。在培养的第三周已出现了最早的球型胚。体细胞胚可在第二次培养中观察到,它是由浓厚细胞质和原表皮层发育良好细胞组成。成熟胚具有明显子叶、茎尖和一个伸长的胚根,维管束连接根和茎分生组织,但与胚发育无关。没有发现胚和母体组织之间有维管组织。

五、 讨论

这是第二篇描述唐菖蒲体细胞胚胎发生的报导。本研究的目的是探索一种有效的,可重复的,且能分化植株的体细胞胚发生体系。Kamo等 (1990)通过体细胞胚发生途径成功地从不同的外植体得到了植株,这些外植体来自温室植株和离体植株。作者们描述了如:来自离体繁殖株的茎尖分生组织和球茎切片的松脆愈伤组织在含 2.4- D 的 MS培养基上的发育过程。我们的工作表明,培养基中加 2.4- D对诱导胚性是必要的,但这仅对三个品种而言,即: BI JL和 RS(表 1中)。与 Kamo等 (1990)的结果相反, PP品种仅在有 NAA 而不是 2.4- D的 MS培养基上产生体细胞胚 (表 1)。本试验结果报导了对 4个唐菖蒲品种通过体细胞胚发生途径从球茎切片、完整植株获得松脆胚性愈伤组织和再生植株的可能性。此外,这些体细胞胚也可以从幼叶基部的松脆愈伤组织发育而来。值得一提的是,在我们所试的外植体类型中,球茎具有高的产生松脆愈伤组织和胚的能力 (100%)。许多作者认为,从未成熟的外植体要比从成熟的外植体获得胚性愈伤组织容易。根据 Kamo等 (1990)和我们的结果,从实用的角度看,由唐菖蒲的成熟株发育成胚性愈伤是很重要的,因为这些成熟株可全年得到。我们的试验结果还表明,从所有外植体发育而来的松脆愈伤组织在培养的 2年内都保持有胚胎发生能力。此外,由体细胞胚发育来的植株与供体株没有什么不同。长期培养中胚性培养物的稳定性及它的产生植株的能力使这里所述的过程对唐菖蒲的大量繁殖很有吸引力。(译自 Plant Cell Reports 译者单位:河北农林科学院蔬菜花卉研究所)