

枣 幼 胚 愈 伤 组 织 诱 导 和 胚 状 体 发 生

张 存 智

(宁夏职业技术学院,宁夏 银川 750002)

摘 要:以陇东马牙枣盛花后 50~60 d 的幼胚为试材,采用三步培养法诱导胚状体。结果表明:诱导愈伤组织适宜的培养基为 Nitsch 培养基上附加 BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 4.0 g/L。诱导胚状体培养基宜选用,MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+LH 0.5 mg/L+VC 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 4.0 g/L,并获得完整植株。

关键词:枣;愈伤组织;胚状体

中图分类号:S 665.103.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)13-0125-03

枣的胚败育问题严重制约着枣杂交育种进程,以幼胚为外植体诱导愈伤组织获得再生植株可以解决胚败育问题,并且愈伤组织再生系统的建立是细胞培养、原生质体培养、细胞融合及遗传转化等研究获得成功和应用的基础^[1]。由愈伤组织诱导胚状体可以培育人工种子、简化育种程序及其与基因工程、脱病毒等生物技术相结合诸方面,具有诱人的前景^[2]。关于枣体细胞胚胎途径诱导再生植株的报道较少,以陇东马牙枣幼胚为外植体进行体细胞胚胎诱导还未见报道。该研究以陇东马牙枣盛花后 50~60 d 的幼胚为试材,进行愈伤组织和胚状体的诱导,最终获得再生植株,为枣新品种的选育提供育种基础。

1 材料与方法

试验于 2005~2008 年在甘肃省农业科学院果树研究所进行。陇东马牙枣取自甘肃省农科院果树所枣品种园,外植体为陇东马牙枣盛花后 50~60 d 的枣果(果核没有达到硬核期,70%发育至心形胚时期,陇东马牙枣自然含仁率为 60%)。采用三步培养法。培养条件为:室温 22℃。培养间温度 26~28℃,光照度 2 000~3 000 lx,光照时间 12 h/d。

第一步从枣果的果核中剥出种子(图 1)消毒处理后,剥去种皮(图 2)接种于幼胚萌发培养基中,其中 MS-H^[3]+ZT 0.5 mg/L+IAA 0.6 mg/L+蔗糖 50 g/L+LH 0.5 g/L+琼脂 4.0 g/L+PVP 0.2 g/L 获得了 47.62%的幼胚萌发率^[4],外植体接种 10 d 后胚陆续变绿,有些外植体 20 d 后胚乳开始肿胀,长出乳白色(有的略带淡黄色)初生愈伤组织(图 3),30 d 后愈伤组织增生,幼胚逐渐长大变绿,发育至子叶胚时期。

第二步将发育至子叶胚期的胚从胚乳中或愈伤组织中剥离转至无激素的 MS 培养基,培养 30 d 后,子叶



图 1 切开刺果取出种仁



图 2 去皮种子



图 3 幼胚接种 30 d 后



图 4 剥离出的胚

展开、增大,长出胚根的子叶胚(图 4),但不能继续发育成叶色浓绿、根、茎齐全的正常的幼苗。将子叶展开、增大,长出胚根的子叶胚分别转移至 MS(改良)即大量元素减半和在 Nitsch^[3]基本培养基上,都附加了 BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 4.0 g/L 诱导愈伤组织培养基上,诱导愈伤组织;接种 30 d 后,统计出愈率,愈伤组织黄绿率和黑褐率(出愈率=愈伤组织块数/接种个数;黄绿率=黄绿色的愈伤组织块数/愈伤组织块数;黑褐率=黑褐色的愈伤组织块数/愈伤组织块数)。

第三步由愈伤组织诱导胚状体成苗(培养基设计见表 1)。统计胚状体诱导率,胚状体成苗率(胚状体诱导率=胚状体块数/愈伤组织快数)。

作者简介:张存智(1975-),女,硕士,副教授,研究方向为果树生物技术。E-mail:zhangcunzhi72@126.com。
收稿日期:2011-04-11

表 1 愈伤组织诱导胚状体培养基

组合	基本培养基	IBA/mg · L ⁻¹	BA/mg · L ⁻¹
1	MS	0.5	0
2	MS	0.2	1.0
3	MS 改良	0.5	1.0
4	MS 改良	0.2	0

2 结果与分析

2.1 枣幼胚诱导愈伤组织

将子叶胚分别接种在愈伤组织诱导培养基 30 d 后,2 种培养基上都诱导出大量的愈伤组织,诱导率在 95% 以上。2 种培养基上都诱导出 2 种类型的愈伤组织,I 型愈伤组织呈黄绿色,组织致密,(图 5);II 型愈伤组织黄褐色、黑褐色(图 6)。但不同类型的愈伤组织在不同培养基上产生的比例不同,Nitsch 黑褐率较高,而 MS(改良)培养基黄绿色率较高(表 2)。2 种培养基的愈伤组织的生长都非常旺盛。

表 2 基本培养基诱导愈伤组织的效果

基本培养基	接种个数	愈伤诱导率/%	愈伤生长量	愈伤质地	愈伤颜色	
					黄绿率/%	黑褐率/%
MS(改良)	42	95	++++	**	83	17
Nitsch	38	97	++++	**	50	50

注:++++为生长旺盛;**为生长致密。

2.2 胚状体诱导

将愈伤组织转移到 1~4 号(表 1)培养基中,每种培养基上接种 30~40 个外植体,每 45 d 继代 1 次,2 次后可见大量的胚状体发生(图 7)。胚状体在 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+LH 0.5 mg/L+VC 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L 上继代 2 次,可直接成苗,发育成具有根、茎、叶的正常植株(图 9),具有子叶和胚根。胚状体诱导及再生情况统计见表 3。MS 培养基胚状体的生长量旺盛(表 3),诱导率在 80% 以上,MS(改良)胚状体生长量一般,MS 培养基上的胚状体可发育成正常植株,在 MS(改良)的胚状体不能发育成正常植株。胚状体为黄绿色半透明状,易于分离,有的能清晰的看到胚根和子叶;胚状体的发生是不同步的(图 8)。在继代培养中,大多数胚状体不能发育成完整植株,而是大量增殖;少数胚状体上部子叶发育成杯形、喇叭形或片状结构,这些结构可以不停地发育、生长,

但不能萌发出嫩叶及发育成完整植株(图 10)。而且培养的条件不适合,发育早期的体胚又重新变为无序结构,形成新的胚性细胞团,而不能进入成熟发育。

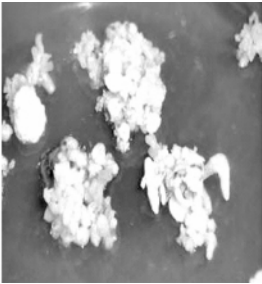


图 7 诱导出胚状体

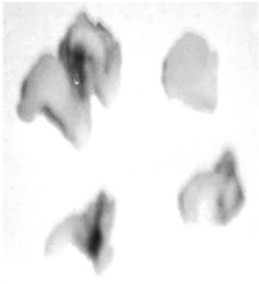


图 8 发育不同时期的胚状体

表 3 培养基对诱导胚状体的影响

组合	基本培养基	IBA/mg · L ⁻¹	BA/mg · L ⁻¹	胚状体诱导率/%	胚状体生长量	成苗
1	MS	0.5	0	86	++++	N
2	MS	0.2	1.0	87	++++	Y
3	MS 改良	0.5	1.0	75	++	N
4	MS 改良	0.2	0	72	++	N

注:++为生长一般;++++为生长旺盛;N 为否;Y 为是。



图 9 胚状体成苗

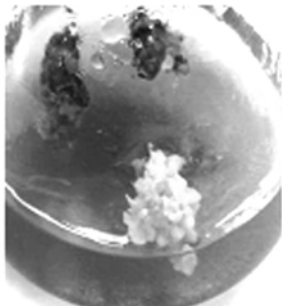
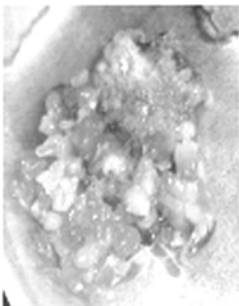


图 10 胚状体不能发育成正常植株

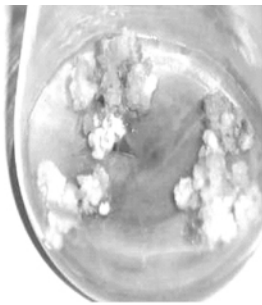


图 5 I 型愈伤组织

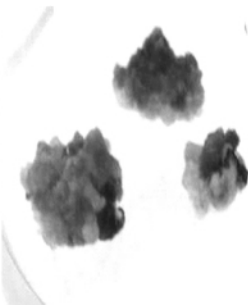


图 6 II 型愈伤组织图

3 讨论与结论

一般而言,对于同一基因型,处于幼态型或幼嫩期的组织或器官,其细胞的分裂与分化活性强,易于响应培养因素的反应而变化,即越幼嫩的部位愈伤组织诱导率越高,该试验培养枣幼胚,获得子叶胚,再诱导子叶胚愈伤组织,也得出这样的结论,获得 95% 以上的出

愈率,这与何业华等^[5]、李登科等^[6]研究结论一致。

2,4-D 是诱导多种植物离体培养的体细胞转变为胚性细胞的重要激素,该试验添加 2,4-D 1.5 mg/L 高效诱导愈伤组织,且在胚性愈伤的诱导中添加一定浓度的 BA 是必要的,这和陈超等^[7]的结论是一致的。

基本培养基的不同,实际上就是营养物质间的供应比率不同。细胞、组织、器官的发育是一个动态过程,从而影响到细胞、组织和器官生长发育过程中对营养条件的需求也不断变化。该试验的研究表明,在幼胚萌发培养基 MS-H 获得 47.62% 的幼胚萌发率^[4],陇东马牙枣幼胚培养需要高的无机盐浓度,丰富的有机成分,且胚龄越小对培养基的要求越严格^[8-9]。子叶胚在愈伤组织诱导过程中,在 Nitsch、MS(改良)即 MS 培养基大量素减半培养基上获得 95% 以上的出愈率,2 种培养基都属于低盐培养基,并且二者的硝酸盐浓度都较低,可见适当降低盐的浓度,特别是硝酸盐的浓度,对愈伤组织生长分化有利^[1]。在胚状体诱导过程中,MS 培养基较 MS(改良)即 MS 培养基大量素减半培养基胚状体的生长量旺盛,诱导率高出 10%,且获得正常植株,说明胚状体的诱导需要高的细胞渗透压,高无机盐浓度,BA 的有无对胚状体的生长量影响不大,但 BA 是胚状体成苗所必须有的。

该试验获得高频率(72%~87%)、生长旺盛的胚状体,但成苗率较低,大多数胚状体不断增殖,不能发育成完整的植株。体胚的成熟发育需要适宜的培养基的成分,合理的外源激素配比,及额外添加的有机附加物等^[10];王娜将枣叶片愈伤组织分化出的胚状体可在 MS+蔗糖 40 g/L+CH 500 mg/L 的无激素培养基上发育成熟,在 1/2MS+蔗糖 20 g/L+IBA 2.0 mg/L 的

培养基上诱导生根,获得了叶片胚状体完整的再生植株^[11]。李登科等将幼胚和子叶分别接入 MS+BA 0.5 mg/L+1AA 0.1 mg/L+蔗糖 5% 和 MS+BA 0.5 mg/L+1AA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L+蔗糖 5% 的培养基中可诱导出胚状体,但不能发育成熟,在 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.08 mg/L+GA₃ 5 mg/L+CH 100 mg/L+蔗糖 5% 的培养基上可发育成苗^[6]。

参考文献

- [1] 何业华,伍成厚,胡中沂,等. 枣树愈伤组织培养时不定芽的分化[J]. 中南林学院学报,1998,18(3):44-49.
- [2] 王雅梅,刘媛,马绍英,等. 神索葡萄体细胞胚干化保存的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2008,43(4):59-63.
- [3] 曹致义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002.
- [4] 张存智,王发林,牛彩霞,等. 陇东马牙枣幼胚培养[J]. 果树学报,2008,25(3):418-421.
- [5] 何业华,熊细满,谢壁霞,等. 枣树组织培养愈伤组织诱导的研究[J]. 中南林学院学报,1997,17(1):13-18.
- [6] 李登科,杜学梅,王永康,等. 六月鲜枣愈伤组织诱导及胚状体发生[J]. 果树学报,2004,21(5):414-418.
- [7] 陈超,王桂兰,田立民,等. 长寿花胚性愈伤组织的诱导及胚状体再生[J]. 园艺学报,2004,31(2):249-252.
- [8] 祁业凤,刘孟军. 枣胚培养影响因素研究[J]. 果树学报,2004,21(4):205-28.
- [9] 祁业凤,刘孟军. 枣的胚败育及幼胚培养研究[J]. 园艺学报,2004,31(1):71-78.
- [10] 王立忱. 影响植物体细胞胚成熟因素的研究进展[J]. 防护林科技,2009(1):39-41.
- [11] 王娜. 枣体细胞胚胎发生及倍性种质创新[D]. 保定:河北农业大学,2007.

Callus Induction and Embryogenesis of *Zizyphus jujuba*

ZHANG Cun-zhi

(Ningxia College of Technology, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Young embryos of the cultivar 'Longdongmayazao' (*Zizyphus jujuba*) of 50~60 days after bilossom was induced to ptoduced somatic embryos by three-step. The results showed that the proper medium of producing callus was Nitsch+BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 4.0 g/L, the proper medium of producing somatic embryo form callus was MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+LH 0.5 mg/L+vitamin C 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L+LH 0.5 mg/L+vitamin C 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 4.0 g/L. The medium of plantlet formation from somatice embryo was MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+LH 0.5 mg/L+vitamin C 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 4.0 g/L.

Key words: *Zizyphus jujube*; callus; somatic embryo