猕猴桃胚乳培养获得三倍体植株

黄贞光 皇甫幼丽 徐乐茵

(中国农业科学院郑州果树研究所)

绝大多数被子植物的胚乳是胚囊的两个极核和一个精子融合的产物,是三倍体组织。自从植物细胞全能性得到证实之后,人们自然希望从胚乳培养出无籽的大果型的瓜果。胚乳组织培养与植物其他组织培养相比,难以分化,迄今,自养植物只有很少几种培养出胚乳植株^[1-5]。猕猴桃果实有很高的营养价值,但果实一般较小,且有大量种籽,如果能通过胚乳培养获得三倍体的无籽大果的植株,这对提高猕猴桃品质有很大意义。本文报道了我们从猕猴桃胚乳培养的研究结果。

一、材料与方 法

1980年8月采自河南鸡公山野生的中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis* C. F. Liang)果实,于5—10℃冰箱中存放4—6天,果实用1:30的新洁尔灭的水稀释液表面消毒15分钟,在无菌条件下切开果实,取种脊稍微变褐的白色种子,剥去种子硬壳,挤除针状的幼胚,余下的胚乳接种于3%的蔗糖、附加有不同浓度的玉米素、NAA和2,4-D的MS培养基上诱导愈伤组织。接种物置于25—32℃的培养室中。25天后每天给予12小时人工光照,光照强度为850—1200Lux。接种后约一个月把长出的愈伤组织转移到含有1ppm玉米素而不含NAA和2,4-D的MS分化培养基上。在此培养基上愈伤组织分化出不定芽、根和胚状体。胚状体经多代转移长成完整植株。为了促进不定芽生根和使胚状体植株形成更发达的根系,把长出的芽和胚状体植株在基部2—3片真叶处切下后,将芽基部浸入50ppm IBA溶液中3—3.5小时,然后转入1%蔗糖、附加有0.5%活性炭而大量元素浓度减半的MS培养基上,25天左右形成良好的根系。将根系发育良好的苗移栽于盛有细沙的花盆中,用烧杯把小苗罩住,以保持高的空气湿度,同时土壤必须保持较大的含水量。七天后烧杯逐渐揭开,浇水逐渐减少。两星期后去掉烧杯,小苗已经成活。

清晨六时左右,取胚乳植株的根尖和胚状体的胚根,在饱和的溴代萘水溶液中预处理3小时,根尖转入卡诺液中固定,苏木精染色,进行染色体倍性鉴定。

二、实 验 结 果

接种后约20天,在各种诱导愈伤组织的培养基上都长出了愈伤组织。来自不同单株的胚乳,愈伤组织的生长速度有明显差异,有两株的愈伤组织生长较快。对不同的培养基生长反应也不相同。接种后一个月,调查了不同培养基上愈伤组织的生长情况,以及它们对后来分化的影响,结果列于表1。

本文1981年7月17日收到。

加有 0.1—1ppm NAA 的培养基上的胚乳,接种后约 20 天就由黄白色变为淡绿色或绿色,其愈伤组织的诱导率最高,达 80%;加有 1—2ppm 2, 4-D 的培养基也有较高的诱导率,但其愈伤组织较长时间不转绿;无生长素的培养基愈伤组织诱导率最低,为 20—30%,且生长缓慢,但胚乳却较早地转为淡绿色。

表 1 不同培养基上愈伤组织的生长情况

培养基 编号	玉米素 (ppm)	NAA (ppm)	2, 4-D (ppm)	接种胚 乳数	愈 伤 组 织				
					块数	诱导率 (%)	生长 速度	颜 色	分 化 结 果
1	1			19	5	26	慢	白或绿	出现叶片和小芽
2	2			10	3	30	慢	白	同 1
3	3			10	2	20	慢	白或淡绿	同 1
4	5			10	2	20	慢	白	出现叶片、长成 1 株完整植株
5	3	0.1		15	12	80	较快	淡 绿	同 4
6	3	0.5		15	12	80	较快	淡绿或绿	出现叶片,长成 8 株完整植株
7	3	1		10	8	80	中等	淡 绿	出现叶片和小芽
8	3	2		5	2	40	中等	淡 绿	同 7
9	3		1	20	13	65	较快	白	出现多量胚状体、长成完整植株
10	3		2	20	4	20	较快	白	同 9
合计				134	63	47			

转移后约 20 天,来自无生长素或含有 NAA 的培养基的愈伤组织开始出现小叶、根和小芽,其中来自 4、5、6 号三种培养基的愈伤组织分别有 1、1 和 4 块长出茎高于 1 厘米的芽苗。切下这些芽苗诱导生根,长成 6 株完整植株。切去芽的愈伤组织又继续长出芽。这些芽如果 2—3 个月不转移,茎基部也可直接生根,由这样的发育途径长成四株完整植株。这些处理长出的植株叶较细长,颜色较浅,绒毛较少(见图 3)。

9 号培养基上的 13 块愈伤组织转移后约 40 天有两块分化出大量的球形胚状体,并进一步分化形成完整的胚。10 号培养基上的 4 块愈伤组织也有一块分化出大量胚状体。这些胚状体转移到 0.5—1ppm 玉米素的无生长素的 MS 培养基上,其子叶和下胚轴的细胞继续增生,变得肥大,且长出新的胚状体。图 1 显示了各种形态的胚状体。为了使胚状体长成完整植株,我们设计了五种成苗培养基:无生长素的 MS 培养基中附加有 0—1ppm 的玉米素。经 2—3 代的转移,这些胚状体在这些培养基中的生长反应显示出明显的差异,兹将结果列于表 2。根据生长情况看来,猕猴桃胚乳的胚状体其成苗培养基的玉米素浓度以 0.4ppm 为宜。

10 号培养基的愈伤组织长成的胚状体,在转移后下胚轴形成愈伤组织,其愈伤组织往往强烈生长,虽经 3—4 代的转移仍表现出 2ppm 2,4-D 的强烈刺激作用,由于愈伤组织强烈增生,故胚状体较难以长成完整植株。这一处理的材料共获得三株完整植株。来自 9 号培养基的愈伤组织长成的胚状体,转移后其下胚轴也形成愈伤组织,但其愈伤组织生长较缓慢,这样有利于胚状体长成完整植株。9 号培养基共获得 18 株完整植株。根据实验结果看来,猕猴桃胚乳的去分化培养基的 2, 4-D 浓度不宜超过 1ppm。

表2 猕猴桃胚状体在成苗培养基中的生长情况

处 理	玉米素 (ppm)	生 长 情 况
1	0	胚状体转为愈伤组织,愈伤组织强烈增生,质地疏松,黄白色间淡绿色
2	0.1	下胚轴长成愈伤组织,有的愈伤组织强烈增生,淡绿色;有的愈伤组织增生较慢的胚状体长出真叶、茎抽高、胚根伸长,长成5株完整植株
3	0.2	下胚轴形成愈伤组织,愈伤组织绿色,质地致密,经2—3次转移胚状体或变褐丧失生活力;或长出真叶、茎抽高、胚根伸长,共长成6株完整植株
4	0.4	下胚轴少许愈伤组织分化后又长出新的多量的胚状体;或下轴胚长成愈伤组织,而胚芽长出真叶、茎抽高、胚根伸长,长成10株完整植株;或形成的愈伤组织长出丛状不定芽
5	1	下胚轴和子叶长成愈伤组织,愈伤组织绿色、质地致密,从愈伤组织长出小芽

由胚状体长成的完整植株只有2—3条肥大的根。根和茎之间隔着由下胚轴形成的1—2厘米长的愈伤组织。我们估计这样的苗移栽难以成活,故我们把这些苗基部第二片真叶以上的部分切下来,诱导生根,形成良好的根系(图5)。我们移栽的这种小苗已成活(图6)。

由胚状体长成的完整植株茎粗壮、叶肥大且浓绿、缺刻深、绒毛多;这与加有NAA的培养基的材料从不定芽长成的植株在形态上有显著差异(图2、3)。来自6号培养基(含有3ppm玉米素 0.5ppm NAA)的愈伤组织长成的完整植株,根尖染色体鉴定为二倍体, $2n = 58$ 。而

图1—6 猕猴桃胚乳培养获得三倍体植株

1. 加有2,4-D的去分化培养基的愈伤组织分化出的各种形态的胚状体;
2. 胚状体长成的三倍体完整植株;
3. 加有NAA的去分化培养基长出的愈伤组织,由不定芽长成二倍体完整植株;
4. 胚状体长成的完整植株的根尖染色体, $2n = 3x = 87$;
5. 根系着生于基部的三倍体植株;
6. 三倍体植株移栽于花盆已经成活

来自9号培养基(含有3ppm玉米素,1ppm 2,4-D)的材料长成的完整植株的根及来自10号

培养基(含有 3ppm 玉米素, 2ppm 2, 4-D)的胚状体的胚根, 染色体倍性鉴定为三倍体, $2n = 3x = 87$ (图 4)。

三、讨 论

胚乳组织在胚胎发育过程中是一种高度多倍化的组织, 在长期组织培养条件下更容易出现不正常的有丝分裂, 导致染色体的变异^[6]。

根据我们的实验, 接种于附加有 NAA 的培养基上的胚乳都经由愈伤组织形成不定芽的分化途径, 再由不定芽长成二倍体完整植株。而接种于加有 2, 4-D 的培养基上的胚乳则经由愈伤组织形成胚状体的分化途径, 进而发育成三倍体完整植株。去分化培养基中的这两种生长素具有如此不同的诱导效应, 作用强烈的 2, 4-D 1—2ppm 启动了猕猴桃胚乳的三倍体细胞, 而作用比较温和的 NAA 则启动了二倍体细胞, 或者使愈伤组织在生长过程中出现的二倍体细胞获得了生长优势。在自养植物的胚乳培养中, 获得胚乳植株的多数实验的培养基附加有 2, 4-D^[1,2,7], 但也有的附加了 IAA^[5] 和 NAA^[3]。由于胚乳培养获得成功的例子很少, 且有的作者还未对所获得的胚乳植株进行染色体的倍性鉴定, 所以还不便对所采用的不同的生长素的作用进行比较分析。看来, 胚乳的内部结构和培养基的激素成分的适当结合, 可能影响到某一类细胞的增生和分化, 培养的结果就有可能得到某一倍性的植株。

迄今获得自养植物胚乳完整植株的所有实验^[1-3,5,7], 其培养基都附加有酵母提取物或酪朊水解物, 但在我们的实验中并没有加入这两种物质, 说明有机态氮对某些植物的胚乳培养也不是绝对必需的。我们的实验表明, 猕猴桃胚乳培养基中附加一定浓度的玉米素是很重要的分化条件, 甚至分化出来的胚状体置于无玉米素的培养基上, 还会使胚状体变成无分化能力的愈伤组织。在猕猴桃茎段组织培养中提供 1ppm 的玉米素是愈伤组织分化的重要条件^[4,8]。

Stivastava 等^[5]在 *Putranjiva roxburghii* 成熟胚乳的培养中强调必须有胚的参加, 即所谓“胚因子”的作用。苹果^[1]和猕猴桃未成熟胚乳的培养都无需“胚因子”的参加。不过充分评述“胚因子”在胚乳培养中的作用还有待今后更深入的研究。

致谢: 本文蒙中国科学院遗传研究所景健康和郝子英同志帮助拍摄显微照片, 特致谢意。

参 考 文 献

- [1] 毋锡金等, 中国科学, 1977, 4: 355—359.
- [2] 王大元等, 中国科学, 1978, 4: 452—455.
- [3] 刘淑琼等, 植物学报, 23 (1981), 72—74.
- [4] Hiroshi Harada, *The Journal of Horticultural Science*, 50 (1975), 81—83.
- [5] Srivastava, P. S., *Z. Pflanzenphysiol.*, 69 (1973), 270—273.
- [6] Johri, B. M. & Bhojwani, S. S., in *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Eds. Reinert. J. & Bajaj, Y. P. S.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977 398—411.
- [7] Nakano, T. et al., *Z. Pflanzenphysiol.*, 76 (1975), 444—449.
- [8] 桂耀林等, 科学通报, 24 (1979), 4: 188—190.