

长俊木瓜体细胞胚胎诱导的初步研究

程 钰¹, 孟 强^{2,3}, 董丽芬^{1*}, 贾彩霞¹, 范成民¹, 王丽萍¹

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国科学院、水利部 水土保持研究所, 陕西 杨陵 712100;
3. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘 要:以长俊木瓜为材料,研究了其体细胞胚胎诱导过程中各个环节的影响因素。结果表明:愈伤组织诱导的适宜外植体是叶片,培养基为 MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+2,4-D0.2 mg·L⁻¹,黑暗培养;非胚性愈伤组织向胚性愈伤组织转化的适宜培养基是 MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹;胚性愈伤组织的保持与增殖应在黑暗条件下进行,培养基为 MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+2,4-D0.2 mg·L⁻¹;长俊木瓜叶片体胚的发生以加入 ABA2.0 mg·L⁻¹的 MS 培养基最为有利。
关键词:长俊木瓜;愈伤组织;体细胞胚胎

中图分类号:S722.37 文献标识码:A 文章编号:1001-7461(2008)06-0098-03

Research on Somatic Embryogenesis from Leaf Blade of *Chaenomeles speciosa* (sweet) Nakai C. *Lagenaria* (Chang Jun)

CHENG Yu¹, MENG Qiang^{2,3}, DONG Li-fen¹, JIA Cai-xia¹, FAN Cheng-min¹, WANG Li-ping¹

(1 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Soil and Water Conservation, CAS/MWR, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. Graduate School of CAS, Beijing 100049, China)

Abstract: *Chaenomeles speciosa* (sweet) Nakai C. *Lagenaria* (Chang Jun) collected as material, the effects of various factors in the process of somatic embryogenesis from leaf blade were studied. The results indicated that the appropriate medium for callus induction was MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹ with leaves as explants, darkness was useful; The appropriate medium for embryonic callus induction from callus was MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹; Embryonic callus had good multiplication ability in the medium MS with 6-BA1.0 mg·L⁻¹, 2,4-D0.2 mg·L⁻¹ and NAA1.0 mg·L⁻¹, cultured in the darkness. The favorable condition of somatic embryo's occurrence was in the medium MS with ABA2.0 mg·L⁻¹.

Key words: *Chaenomeles speciosa* (sweet) Nakai C. *Lagenaria* (Chang Jun); callus; somatic embryo

长俊木瓜是皱皮木瓜 (*Chaenomeles speciosa*) 中的一个优良品种,其特点是果实大,香气清爽,果肉厚,肉质细腻,汁液丰富,是加工罐头、果脯、果冻与饮料的理想原料,是集观赏、药用及食用于一体的优良品种^[1]。

体细胞胚胎发生是植物体细胞在特定条件下,不经性细胞融合,而通过与合子胚形成类似途径,产生植物新个体的过程。

近年来,虽然对一些植物的体胚发生有研究报道^[2-5],但报道较少。长俊木瓜作为我国重要的经济

林木,市场对木瓜良种的需求较大,研究长俊木瓜良种快繁技术具有一定的经济及科学价值^[6]。关于长俊木瓜的体胚研究还未见任何报道,为了进一步提高长俊木瓜快繁效率,笔者就长俊木瓜体胚发生进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为陕西杨凌银磊公司苗圃长俊木瓜 3a 生植株的萌生枝条。

②) 收稿日期:2008-01-21 修回日期:2008-05-05
作者简介:程钰,女,在读硕士,研究方向为森林培育。
* 通讯作者:董丽芬,女,教授,研究方向为林木种苗繁育。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 将采集的长俊木瓜萌生枝条从叶柄中间剪掉叶子,剪成长 10 cm 的带芽小段,用自来水、洗洁精分别冲洗 3 遍,再浸入 75%乙醇溶液中 30 s,取出后浸入 0.1%的 HgCl₂ 溶液中 6 min,再用无菌水冲洗 3 遍。然后将枝条剪成带芽小段,接种于启动培养基上进行诱导萌发培养,再对已诱导萌发的茎段进行增殖培养。

1.2.2 愈伤组织诱导 愈伤组织诱导所用外植体经预先筛选,以叶片效果较好。具体方法是:在超净工作台上,从“1.2.1”培养获得的无菌苗上剪取长俊木瓜无菌苗叶片,将叶片边缘剪掉,叶片剪成 1 cm² 的小块,并在叶片的中脉部横切 3 刀,然后将背面朝下,接种于愈伤组织诱导培养基上。每瓶接种 2 个叶片。培养基以 MS 为基本培养基,附加经预先筛选的对愈伤组织诱导较好的 2,4-D 0.2 mg · L⁻¹ 和不同浓度的 6-BA (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg · L⁻¹)。培养条件为黑暗与光照 2 种处理。

1.2.3 胚性愈伤组织诱导 将以叶片为外植体在愈伤组织诱导培养基上诱导出的愈伤组织转接到胚性愈伤组织诱导培养基上,此培养基以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg · L⁻¹) 和不同浓度的 NAA (0.05、0.5、1.0 mg · L⁻¹) 组合的培养基上,黑暗培养。

1.2.4 胚性愈伤组织的保持和增殖 把经“1.2.3”诱导及培养的胚性愈伤组织转接到①MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹; ②MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.2 mg · L⁻¹, 分别光照、暗照 2 种条件培养。

1.2.5 体细胞胚胎诱导 把诱导获得的胚性愈伤组织转接到体细胞胚胎诱导培养基上进行培养观察。体细胞诱导培养基以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 ABA (0.5、1.0、2.0、3.0 mg · L⁻¹), ABA 采用空隙直径 0.25 μm 滤膜过滤灭菌。以上各处理均在黑暗条件下进行。

以上培养基蔗糖浓度均为 30 g · L⁻¹,琼脂 6 g · L⁻¹,pH 5.6~5.8。光照培养的光照强度为 1 500~2 500 lx,每日光照 16 h;培养温度为 25℃±2℃;相对湿度 60%~80%。各处理均接种 20 瓶以上。

1.2.6 体细胞形态观察 采用型号为 SZX12 的体视显微镜进行体胚形态观察,观察倍数为 90 倍。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

把长俊木瓜无菌苗叶片接种于 2,4-D 0.2 mg · L⁻¹,不同浓度 6-BA 的愈伤组织诱导培养基上,7~10 d 后,叶片的基部和叶片的中脉首先开始膨大,14 d 后长出米黄色愈伤组织,愈伤组织诱导率平均为 87.5%。不同浓度的 6-BA 对愈伤组织诱导率没有明显作用,但愈伤组织诱导后的增殖速度随 6-BA 浓度的增大而增加。

愈伤组织在含 6-BA 1.5~2.5 mg · L⁻¹ 培养基上增殖迅速,但 1 个月后逐渐褐化,继代培养后大部分愈伤组织褐化死亡,愈伤组织在 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ 的培养基上增殖速度适中,在 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基上增殖较慢。

愈伤组织在光照条件下培养 1 个月,逐渐变成绿色、致密、硬度较大的颗粒状愈伤组织,可以继代培养;在黑暗条件下,愈伤组织保持诱导时的米黄色,状态松软,具有较强的增殖能力。

2.2 胚性愈伤组织诱导

由表 1 知,只有在乳白色较松软的愈伤组织中可以产生体细胞胚胎。当 NAA 浓度大于 0.5 mg · L⁻¹ 时均可以产生胚性愈伤组织,且随 6-BA 浓度的增加,增殖速度逐渐加快,但当 6-BA 浓度为 1.5 mg · L⁻¹ 时,愈伤组织增殖较快,生长 1 个月后发生褐变;继代培养 1 个月后,大部分褐变死亡。在 6-BA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时,愈伤组织增殖较慢,只有在 6-BA 为 1.0 mg · L⁻¹、NAA 1.0 mg · L⁻¹ 时,

表 1 胚性愈伤组织诱导结果

6-BA 浓度 (mg · L ⁻¹)		愈伤组织生长状态		
		NAA 0.05 mg · L ⁻¹	NAA 0.5 mg · L ⁻¹	NAA 1.0 mg · L ⁻¹
0.5	开始诱导出的愈伤组织增殖缓慢,米黄色,1 个月后长成绿色,致密坚硬的愈伤组织。	愈伤组织增殖缓慢,愈伤组织部分是米黄色,生长 1 个月后转变成绿色、致密坚硬的愈伤组织;部分是乳白色、较松软,进一步诱导可以产生体胚	愈伤组织增殖缓慢,乳白色、较松软,进一步诱导可以产生体胚。	
1.0	诱导出的愈伤组织增殖适中,米黄色,1 个月后长成绿色、致密坚硬的愈伤组织。	愈伤组织增殖适中,愈伤组织部分是米黄色,生长 1 个月后变成绿色、致密坚硬的愈伤组织;部分是乳白色、较松软,进一步诱导可以产生体胚。	愈伤组织增殖适中,乳白色、较松软(图 1),进一步的诱导可以产生体胚。	
1.5	诱导出的愈伤组织增殖较快,米黄色,1 个月后长成绿色、致密坚硬的愈伤组织部分愈伤组织褐化,继代培养褐化严重。	愈伤组织增殖较快,愈伤组织部分是米黄色,生长 1 个月后变成绿色、致密坚硬的愈伤组织;部分是乳白色、较松软,进一步的诱导可以产生体胚。继代培养严重褐化。	愈伤组织增殖较快,乳白色、较松软,进一步诱导可以产生体胚。继代培养褐化。	

愈伤组织增殖适中,进一步诱导可以产生体细胞胚胎,继代培养没有褐化。

2.3 胚性愈伤组织的保持与增殖

在黑暗条件下,胚性愈伤组织增殖培养1个月后,在MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹培养基上,胚性愈伤组织的生长势逐渐减弱,转接3次后,部分胚性愈伤组织出现褐化现象,且随转接次数的增加褐化逐渐严重,随后全部褐化死亡。在MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹上生长的胚性愈伤组织增殖能力较好,转接3次后,愈伤组织一直保持乳白色、较松软状态。

在光下培养的胚性愈伤组织,培养1个月后,在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹培养基上的愈伤组织逐渐变成绿色、致密的颗粒状(图1);在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹培养基上愈伤组织表面容易变干,失去活力,不能很好的增殖。

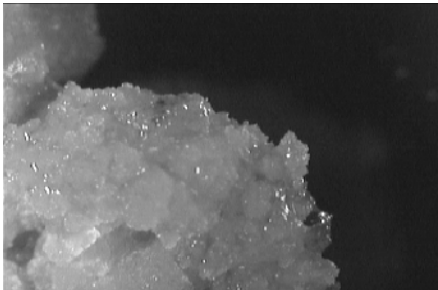


图1 胚性愈伤组织
Fig.1 Embryonic callus

2.4 体细胞胚胎诱导

在含有不同浓度ABA的MS培养基上,1个月后发现灰白色、具有粘性的愈伤组织,随着ABA浓度的增大,愈伤组织的生长量随着增加,在含有ABA2.0 mg·L⁻¹的培养基上,用解剖针拨开愈伤组织,在体视镜下观察到大量的球形体细胞胚胎(图2),用解剖针可以轻易的将各个球形体细胞胚分开。继代培养1个月后,在体视镜下可以观察到梨形的体细胞胚胎(图3)。

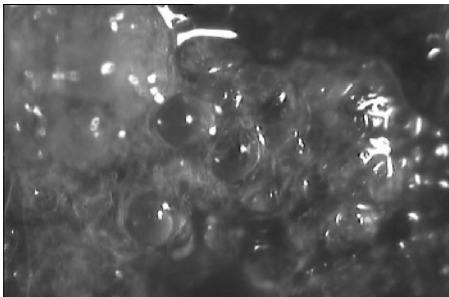


图2 球形体胚
Fig.2 Global somatic embryo

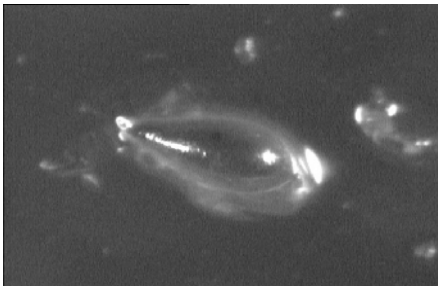


图3 梨形体胚
Fig.3 Pyriform somatic embryo

在含有0.5、1.0、3.0 mg·L⁻¹ ABA的培养基上也可以观察到球形胚,但数量比2.0 mg·L⁻¹ ABA培养基上的少,说明2.0 mg·L⁻¹ ABA培养基对诱导长俊木瓜体胚发生是有利的。

3 结论与讨论

培养条件及生长调节物种类、浓度对比对长俊木瓜愈伤组织的形成有重要影响。长俊木瓜愈伤组织诱导的适宜培养条件是以无菌苗叶片为外植体,培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹,黑暗培养。

长俊木瓜胚性愈伤组织为乳白色松软的状态。适宜的胚性愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹;胚性愈伤组织保持及增殖适宜的培养基为MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹。以上均为黑暗培养。

植物种类不同,体胚诱导对生长调节物质要求的种类及浓度存在差异。长俊木瓜胚性愈伤组织在含ABA的培养基上均诱导出大量的球形体胚和梨形胚,说明ABA对长俊木瓜体胚发生有重要作用,ABA适宜的浓度为2.0 mg·L⁻¹。

长俊木瓜的诱导及发生需要在黑暗条件下培养。

参考文献:

[1] 方建平. 果中新秀——长俊木瓜[J]. 今日科技, 2000(11): 8.
[2] 王蕴株. 葡萄体细胞愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 植物学通报, 1985, 27(6): 661-664.
[3] 何丽君, 慈忠玲. 濒危植物四合木(*Tetmena mongolica* Maxim) 悬浮培养下体细胞胚胎发生[J]. 内蒙古农业大学学报, 2001, 22(2): 16-22.
[4] 汤浩茹, 王永清, 任正隆. 果树体细胞胚胎发生[J]. 四川农业大学学报, 1999, 17(1): 69-79.
[5] 达克东, 张松, 李雅志, 等. 苹果离体叶片直接体细胞胚胎发生研究[J]. 园艺学报, 1996, 23(3): 241-245.
[6] 王嘉祥. 沂州木瓜[J]. 落叶果树, 2003(1): 21-22.