

# 苹果胚乳愈伤组织的诱导和植株的分化

毋锡金 刘淑琼 周月坤 钱南芬  
张 鹏 谢鸿勋 张福寿 阎振龙

(中国科学院北京植物研究所)

## 摘 要

近年来,植物的胚乳培养,引起了一些研究者的注意.我们认为更有意义的是培养胚乳和胚乳植株的诱导,有可能为农、林、果树等育种工作提供三倍体和多倍体的育种方法和原始材料.本文成功地使用苹果未成熟种子的幼嫩胚乳建立起愈伤组织,并诱导分化出根、叶和植株.研究结果表明:1. 幼嫩胚乳比之目前一般采用成熟的胚乳产生愈伤组织的频率高;2. 胚乳产生愈伤组织,和由此愈伤组织分化器官或植株无需胚的参加.

胚乳是被子植物双受精产物之一,一直被视为一种贮藏组织.由于组织培养技术的发展,从30年代起即开始了玉米胚乳的培养研究.迄今已从16种植物的胚乳得到了愈伤组织,而仅有少数植物的胚乳愈伤组织分化了植株或其它器官<sup>[1-6]</sup>.

同植物花药、茎尖和幼胚培养相比较,胚乳培养的进展十分缓慢.我们培养植物胚乳和诱导胚乳植株的目的,是为我国社会主义的农、林、果树等育种工作,探索培育三倍体和多倍体植株的育种方法,并提供育种的原始材料.本文扼要报道苹果幼嫩胚乳愈伤组织的诱导和胚乳植株(金冠)、根(金冠、国光、白粉皮)及叶(金冠)的分化.同时,对胚乳培养中的一些问题进行了讨论.

## 一、实验材料和培养条件

研究材料是苹果属大果型的金冠、国光、祝光、红星、白粉皮、甜黄葵等六个栽培品种;小果型的花红、海棠等两个种.根据种子发育的解剖观察,苹果的成熟种子是无胚乳的.从早期的幼嫩种子中见到胚乳为核型,胚胎发育图型十分一致.因此,本文以金冠品种为例,将胚乳和胚的发育过程划分为三个阶段:(1)4月底到5月中旬,胚乳处在发育的游离核时期,幼胚是多细胞球形(图1a);(2)5月下旬到6月中旬,胚乳成为细胞组织,并充分生长,但吸器部分仍保持游离核结构,这时幼胚的各种器官分化已经完成,但生长缓慢(图1b);(3)往后,胚乳急骤解体,幼胚迅速达到成熟时的大小(图1c).培养使用了上述三个发育时期的胚乳,其中以第二阶段的接种最多.

接种时先切除果肉的外面部分,然后按一般方法消毒灭菌,在无菌条件下解剖出胚乳和

胚,将胚乳进行单独培养,少量种子的胚乳连同幼胚一起种植。

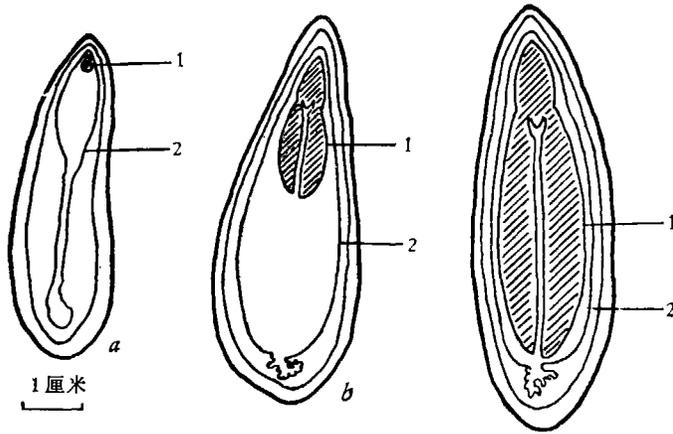


图1 苹果(金冠)胚乳和胚发育的三个阶段。a 胚乳发育的游离核阶段(1975年5月初), b 表示第二阶段充分发育的细胞组织的胚乳和已经分化的胚(1976年6月), c 表示第三阶段接近成熟的种子的胚乳和胚  
(1—胚, 2—胚乳)

表1 在含有各种浓度的动力精(K)和2,4-D的培养基上,胚乳愈伤组织的诱导

培养基编号	激素浓度(ppm)		胚乳的变化及愈伤组织的诱导
	K	2,4-D	
I	0	0	胚乳膨大,极个别的形成少许愈伤组织,但不能继续增殖
II	0	0.1—0.5	少数胚乳形成白色、结构疏松的愈伤组织
III	1	0.5	大部分胚乳产生的愈伤组织为米黄色,结构致密。少数胚乳的愈伤组织同于II
IV	1	1	胚乳愈伤组织米黄色,结构致密
V	1	2	胚乳愈伤组织黄绿色,结构坚实

表2 在含有各种浓度的6-苄基嘌呤(BAP)和萘乙酸(NAA)的培养基上胚乳愈伤组织的诱导

培养基编号	激素浓度(ppm)		胚乳的变化及愈伤组织的诱导
	BAP	NAA	
I	0	0	胚乳膨大,极个别的产生少许愈伤组织,但不能继续生长
II	0.01—0.1	0.01—0.5	多数胚乳发生不规则膨大,所产生的愈伤组织不能正常生长。少数胚乳的愈伤组织为灰白色,结构疏松
III	0.25—1	0.5	大部分胚乳的愈伤组织为米黄色,致密,个别胚乳产生的愈伤组织同于II
IV	2—3	0.5	胚乳愈伤组织为米黄色或绿色,结构坚实

采用 MS<sup>71</sup> 作为基本培养基, 附加的细胞分裂素物质是 6-苄基嘌呤 (BAP), 动力精 (K); 生长素是萘乙酸 (NAA), 2,4-D. 分别将不同浓度的 BAP 和 NAA; K 和 2,4-D 组成表 1, 2 所示的两个培养基系列. 此外, 附加的成分有酪朊水解物 (CH) 200—500ppm, 蔗糖 3—5%, 琼脂 0.6—0.7%, pH6.0—6.2 (消毒前), 在 1.2 公斤压力下, 消毒 15 分钟. 培养期间, 温度保持 25—27℃. 光照分两个阶段进行, 诱导愈伤组织时期, 材料置于实验室散射光下, 诱导愈伤组织分化时期, 在 2 支 40 瓦荧光灯下进行每天 10—12 小时光照培养.

## 二、胚乳愈伤组织的诱导

在表 1, 2 中的各种培养基上, 苹果的游离核胚乳, 无论是单独的或带胚的均未培养成活. 处在发育第二阶段的胚乳 (图版 I, 1), 接种后 15—20 天, 产生了生长旺盛的愈伤组织 (图版 I, 2). 其频率高达 90% 以上. 第三阶段的, 除个别的产生少许愈伤组织外, 其余均萎缩死亡.

处在发育第二阶段的胚乳, 对于各种培养基中, 细胞分裂素和生长素的反应表现在产生愈伤组织的能力和愈伤组织的质地有着明显的不同 (表 1, 2). 根据表 1, 2 所列实验结果, 可以初步得出以下结论: 1. 苹果的幼嫩胚乳在对照培养基上 (表 1, I; 表 2, I), 个别的虽能产生少许愈伤组织, 但不能继续生长. 必须在培养基中加入适量的单一的生长素, 或生长素与细胞分裂素同时存在时, 才有可能正常发生和生长. 2. 低浓度 NAA (0.5ppm) 引起胚乳膨大, 仅有少量胚乳产生愈伤组织; 2,4-D (0.1—0.5ppm) 足以引起绝大多数的胚乳产生愈伤组织. 3. 在含有高浓度 NAA 和低浓度 BAP 的培养基上, 产生的愈伤组织生长旺盛, 结构疏松. 相反, 高浓度的 BAP 同低浓度的 NAA 联合使用时, 诱导的愈伤组织外观呈米黄色, 或黄绿色, 结构坚实. 4. 如表 1 所示, 在 III, IV, V 号培养基中, 由于添加 1ppm K, 并提高 2,4-D 的浓度时, 产生的愈伤组织同含有高浓度 BAP 和低浓度 NAA 的培养基上的愈伤组织相似.

新鲜愈伤组织细胞的染色体检查表明多数细胞为 50—52 个 (图版 I, 3). 继代培养多次后, 愈伤组织生长正常, 但愈伤组织细胞染色体数目变化在 43—80 之间, 其中仅有少数细胞仍保持 50—52 个染色体.

## 三、胚乳植株的分化

取表 1, 2 所列各种培养基上的愈伤组织分别诱导分化. 分化培养基由 MS + 0.1—1ppm BAP + 500ppm CH + 蔗糖 3%, 或者与低浓度的 NAA (0.01—0.5ppm) 联合组成. 少数培养基中附加 200—400ppm 双丁酰 3',5'-环化腺苷酸 (CAMP). 结果, 个别培养基上的少数愈伤组织表现了形态建成的能力和多样性, 产生了植株、根和叶等器官.

将表 1, III 号培养基上的愈伤组织移入分化培养基上 20 天左右, 产生一小芽, 在同一块愈伤组织上长出一条根 (图版 I, 4). 约 40—60 天内, 芽生长为具 5 小叶片的植株. 根较芽伸长的快. 有意思的是, 当芽的生长变得缓慢时, 由它的基部直接产生了一个小芽. 小芽生长到具 3—4 片簇生的小叶时, 在第一个芽的基部再生出第二个小芽 (图版 I, 6), 45 天后, 第二个小芽长出三片直立簇生的小叶. 试图诱发第二个芽生根的实验尚未成功.

国光、甜黄葵的胚乳愈伤组织亦分化了根.

表 2, III 号培养基上的金冠胚乳愈伤组织, 在上述分化培养基上产生了许多绿色“芽点”, 其中少数分化形成了长椭圆形的叶片 (图版 I, 5), 而后停止了继续分化.

表 1, 2 中的其他各种培养基上的愈伤组织, 在上述各种分化培养基上未发现器官的形成。

## 四、讨论与结论

### 1. 幼嫩胚乳愈伤组织的诱导

迄今关于胚乳愈伤组织的建立, 在双子叶植物中还只限于成熟种子的胚乳。本文首次由六个大果型和二个小果型的苹果的幼嫩胚乳建立了愈伤组织, 并经过一年多的继代培养。

幼嫩胚乳产生愈伤组织较合适的时期是开花后大约一个月, 从胚胎发育上来看, 这时的胚乳已成为细胞组织, 且充分发展。早期游离核胚乳的培养条件尚待进一步研究。而种子发育后期, 处在消失中的胚乳产生愈伤组织的频率极低。

幼嫩胚乳产生愈伤组织的条件大致可归结为: 1) 以 MS 作为基本培养基, 如果不添加任何生长调节物质, 或者仅仅加入低浓度 NAA(0.1—0.2ppm) 时, 绝大多数的胚乳不能正常产生愈伤组织, 极个别的虽然发生了细胞增殖, 但亦不能继续生长。2) 适量的单一的生长素(0.1—0.5 ppm 2, 4-D; 0.5ppm NAA), 或同前述的各种浓度的细胞分裂素(BAP, K) 联合作用下, 胚乳普遍地产生了生长旺盛的愈伤组织。3) 愈伤组织的质地和表现, 随着生长调节物质的浓度而有不同, 这些因素对愈伤组织的再分化及其影响如何, 尚待进一步研究。

### 2. 胚乳组织分化为植株的条件

根据我们对葡萄<sup>[1]</sup>、苹果的胚乳培养和其他作者的报道可以认为: 植物胚乳细胞(包括幼嫩的和成熟的胚乳)在一定的条件下, 能够转化为胚性细胞, 这些细胞表现了和受精卵相似的形态建成的能力。对于苹果的幼嫩胚乳来说, 实现分化为植株的条件可综括为: 1) 植株、根和叶等器官的形成需要细胞分裂素(BAP)和生长素(NAA)在一定水平上的配合作用, 2) 来源于表 1, III 和表 2, III 号培养基上的金冠、国光等材料的胚乳愈伤组织, 在相同的分化培养基上, 表现了形态建成的多样性, 这可能与品种、诱导愈伤组织时所使用的生长调节物质的类别和愈伤组织的年龄有关。我们认为这方面的工作有待进一步深入研究。

### 3. 胚乳愈伤组织的诱导、分化和胚的关系

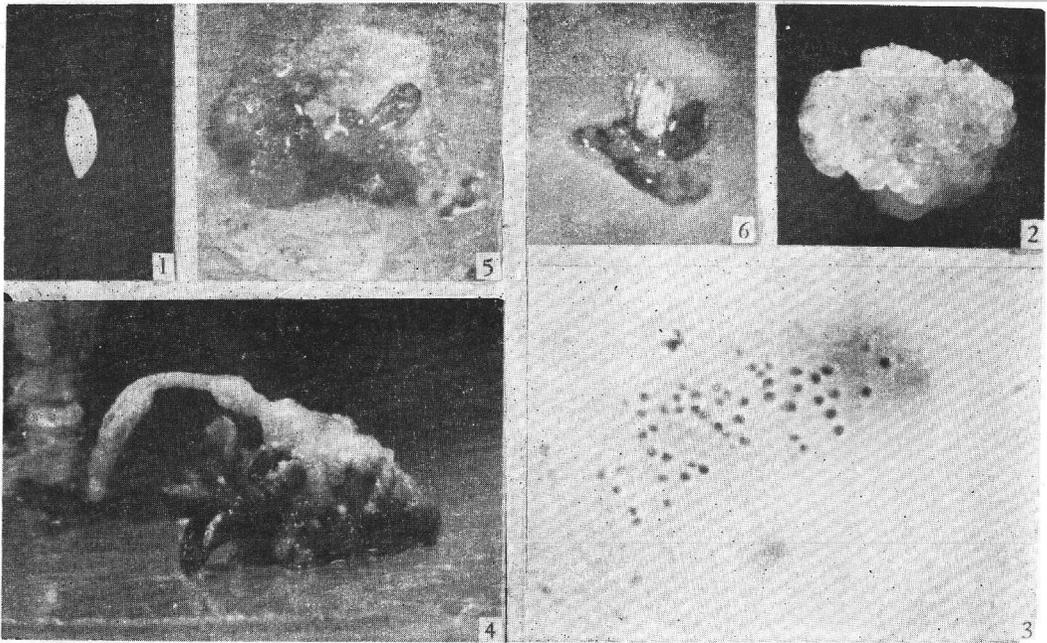
Srivastava<sup>[6]</sup>在植物胚乳培养的研究方面做了不少工作, 最先从成熟胚乳的愈伤组织得到了植株。他认为诱导成熟胚乳产生愈伤组织和植株必须有胚的参加。但是, 这一结论同下述实验结果相矛盾。1) Huang<sup>[8]</sup>发现蓖麻种子萌发时, 在除去了胚的胚乳组织中, 脂肪酸的代谢、糖的累积、几种酶的活性及细胞质体的形成等生化和细胞学过程均不依赖于胚的存在而单独进行。即使如许多人报道的禾本科种子萌发时, 胚向胚乳提供了赤霉素物质, 但是, 这些过程最终将导致胚乳的解体, 而不是再生。2) 我们在葡萄胚乳培养中观察到带胚培养的胚乳, 在其胚乳产生愈伤组织期间, 幼胚处于不活动或趋于解体的状态<sup>[1]</sup>。最近已有报道, 小麦等禾本科植物不带胚的幼嫩胚乳也得到了愈伤组织<sup>[5]</sup>。3) 本文得到的结果, 以及 Nakano<sup>[3]</sup>等人由水稻胚乳愈伤组织得到了小植株的报道, 都说明了胚乳细胞的全能性。因此, 综上所述, 我们认为诱导胚乳组织产生愈伤组织, 和分化植株, 无需胚的参加。而胚乳愈伤组织的产生, 以及形态建成能力的调节因素, 主要是胚乳自身的内源及外加的生长调节物质作用的结果。

## 参 考 资 料

[1] 毋锡金等, 植物学报, 19 (1977), 1. 93—94.

[2] Johri, B. N., & Srivastava, P. S., Z. Pflanzenphysiol., 70 (1973), 285—304.

- 
- [ 3 ] Nakano, T., T. Tashiro & Maeda, E., *Z. Pflanzenphysiol.*, **76** (1975), 444—449.
  - [ 4 ] Bangaswamy, N. S., *Current Science*, **45** (1976), 109—111.
  - [ 5 ] Sehgal, C. B., *Current Science*, **43** (1974), 38—40.
  - [ 6 ] Srivastava, P. S., *Z. Pflanzenphysiol.*, **69** (1973), 270—273.
  - [ 7 ] Murashige, T. & Skoog, F., *Plant. Physiol.*, **15** (1962), 473—497.
  - [ 8 ] Huang, C. H., Beever, H., *Plant Physiol.*, **54** (1974), 277—279.



图版 I 说明：

1. 接种时处在发育第二阶段的胚乳  $\times 2.5$ ，2. 胚乳愈伤组织  $\times 2$ ，3. 胚乳愈伤组织细胞的染色体数目 52 个  $\times 1400$ ，4. 胚乳愈伤组织分化的植株和根  $\times 1.5$ ，5. 愈伤组织分化的叶片  $\times 1.5$ ，6. 第一个芽基部的第二个小芽  $\times 1.5$