

三倍体葡萄花药植株的诱导

曹孜义 李唯 张利平

(甘肃农业大学植物生理生化教研室, 兰州 730070)

关键词 葡萄、三倍体、花药培养

三倍体植物可以产生无籽果实,这在果树和瓜类等经济植物上有很高利用价值。近年来利用胚乳培养已从一些经济植物中获得三倍体植株,并开始用于生产,认为是育种工作中一条新途径^[1]。葡萄胚乳培养尚未获得再生植株^[2]。在其它植物中通过花药培养能诱导出单倍体、二倍体、三倍体和多倍体植株已有报道。葡萄花药培养已历时20余年,虽有一例诱导出单倍体植株^[3],其证据尚不能令人信服^[3,4]。不少学者认为葡萄单倍体受致死基因控制,不能再生出单倍体植株^[4,5]。葡萄胚乳培养未获得三倍体植株。我们通过葡萄花药培养成功地诱导出三倍体植株,这对于开展无核葡萄育种、遗传学和细胞学研究均有重要意义。

1 材料和方法

1.1 植物材料

选用欧亚种二倍体 Grenach 为材料。采自中国农业科学院郑州果树研究所的葡萄品种园,于花前7—10天,即小花蕾刚散开,小孢子处于单核期的花序,剪下后置于冰瓶中带回。经0.1%升汞消毒8min,无菌水冲洗后备用。

1.2 培养方法

用小镊子取下花药,接种于诱导培养基上,每瓶接种约40枚花药,置于25—28℃暗培养。在产生花药愈伤组织后,转入分化培养基于2000lx日光灯下培养,以诱导胚状体发生。

1.3 培养基

诱导培养基为改良B₅培养基,大量元素加倍,附加2,4-D 1mg/L, 6-BA 4mg/L,蔗糖6%,琼脂0.4%,pH5.8;用改良B₅培养基附加6-BA 4mg/L, NAA 0.2mg/L,蔗糖2%,琼脂0.4%为分化培养基;用改良B₅培养基附加6-BA 0.5—1.0mg/L, IAA 0.2—0.5mg/L为成苗培养基,或者为促进苗的繁殖,加快小苗生长,亦可用1/2 B₅基本培养基,附加IAA 0.2mg/L和蔗糖1.5%的繁殖培养基^[6]。

1.4 倍性检查

取转接7—10天正在旺盛生长的幼根。于每天上午10—11时取材。先用饱和对氯二苯预处理12—24h后,再用卡诺氏固定液固定。浓盐酸无水酒精(1:1)水解10min,然后用卡宝品红染色,进行压片镜检和照相。同时用原母株插条根尖细胞作对照。

2 结果和分析

2.1 花药愈伤组织的诱导和胚状体的发生

1990年5月从中国农业科学院郑州果树研究所采取的 Grenach 花药,接种于诱导培养基^[6]产生了花药愈伤组织,但经转入分化培养基,未产生胚状体和植株。根据玉米和大麦等禾本科植物培养中,提高蔗糖浓度,能显著提高其花药诱导频率的经验,1991年我们将蔗糖浓度增至 60g。另外,实验表明,葡萄花药培养过程中,在培养基干枯时,花药仍能产生愈伤组织和胚状体,因此将培养基浓度和附加成分升高一倍,配制成加倍成诱导培养基。1991年5月20—26日将格列那什花药接种于诱导培养基,培养3—5天后,花药开始略微膨大、变褐,逐渐愈伤组织化,出现胶状、白色松散和致密的愈伤组织,将产生的愈伤组织每隔10天转入分化培养基上,放在连续光下培养,以诱导胚状体发生。1991年接种格列那什花药520个,产生了156个花药愈伤组织,诱导率为30.0%,先后转入82块愈伤组织在分化培养基,其中4块分化出胚状体,分化率为4.9%。

2.2 胚状体的产生和发育

转入分化培养基的花药愈伤组织,在培养2—3月后,从愈伤组织上产生胚状体,起初肉眼隐约可见,继而长大增多。当胚状体发育到长约3—5mm时,转入成苗培养基上,胚状体即可萌发(图1a),然后成苗(图1b)。胚状体发育不同步,子叶形状变化较大,有单片、双片和多片的,也有子叶联合成筒状,继续培养后,其上部长出真叶,不断长大成苗。

2.3 小苗的长大和移栽

在BA浓度较高的分化培养基上,少数胚状体长大并生根,其根短粗而少,但大多数胚状体仅有芽且生根。当降低6-BA浓度至0.5mg/L,IAA浓度至0.2—0.5mg/L,胚状体不断



图 1

a. 花药胚状体, b. 萌发成小苗的胚状体, c. 移栽或活的三倍体植株

长大、生根和抽茎。待苗长大至瓶口并有 4—5 片叶时进行移栽。部分胚状体有茎无根，可把茎剪成 2—4 节的带叶短枝，转入无 6-BA 的壮苗培养基上，这些短枝即可生根、抽茎成长为一株正常小苗。

把瓶中的小苗置于中等强度的自然光下进行光培炼苗，3 日后去除瓶塞，待上部茎叶伸出瓶口，茎开始变红时，取出小苗洗净根上培养基，栽入营养钵中，上盖塑料薄膜，保持温度在 25—30℃，然后逐渐揭去薄膜，进行炼苗驯化，即可成活和生长(图 1c)。共计移栽三倍体葡萄花药植株 37 株，成活 31 株，成活率 83.8%。说明三倍体花药植株与二倍体花药植株一样都有较高成活率。

2.4 再生小植株倍性的检查

在成苗或繁殖培养上培养 7—10 天的再生小植株，待产生不定根至 0.5—1 cm 时，剪取根尖进行压片镜检。将 38 ± 2 条染色体细胞定为二倍体(图 2a)， 57 ± 2 条染色体定为三倍体(图 2b,c)， 19 ± 2 条为单倍体，其它归为非整倍体细胞，结果见表 1。

表 1 不同来源植株根尖细胞染色体的倍性

来 源		观察细胞数	单倍体 细胞数(%)	二倍体 细胞数(%)	三倍体 细胞数(%)	非整倍体 细胞数(%)
原母株	I	31	0 0	29 93.5	0 0	2 6.5
	II	107	0 0	105 98.0	2 1.9	0 0
花药植株	1	162	0 0	7 4.3	155 95.7	0 0
	2	57	1 1.6	2 3.5	55 96.5	0 0
	3	57	2 3.5	5 8.8	50 87.7	0 0
	4	212	1 0.05	20 9.4	189 89.2	2 0.1
	5	105	1 0.1	20 19	82 78.1	2 0.2
	6	77	0 0.0	7 9.1	69 89.6	1 1.3
	7	64	1 1.6	5 7.8	57 89.1	1 1.6
	8	96	1 0.1	5 5.2	92 95.8	0 0

Grenach 原母株的根尖细胞染色体计数，二倍体细胞占 93.5—98%，表明是二倍体植株(图 2a)，与前人的观察一致。在 Grenach 花药植株中，二倍体细胞仅占 3.5—19.0%，三倍体细胞占 78.1—96.5%(图 2b)，而单倍体细胞和非整倍体细胞极少，仅占 0.1—3.5%。这些花药植株中三倍体细胞占大多数，表明是三倍体植株(图 2c)。

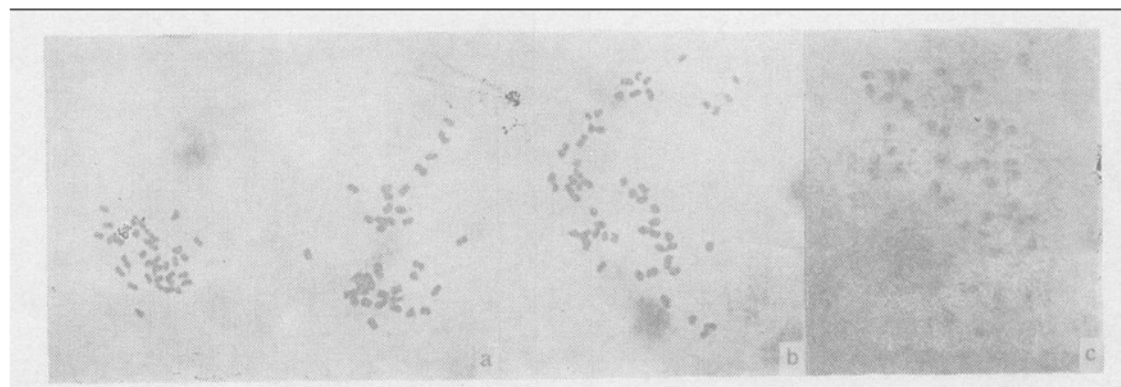


图 2

a. 原母株根尖细胞染色体, $2n = 38$; b, c. 花药三倍体植株根尖细胞染色体, $3n = 57$

与此同时，又对原二倍体母株、四倍体葡萄品种和三倍体 Grenach 花药植株叶片气孔大

小观察和测定,三倍体花药植株气孔长度介于二倍体和四倍体之间,再次证明这些是三倍体植株,这是世界上首次从葡萄组织培养中获得三倍体葡萄。

3 讨 论

葡萄花药培养诱导出的胚状体和小植株一般为二倍体^[4-6]。唯一例外的是邹昌杰和李佩芬从“胜利”葡萄诱导出单倍体植株^[3],但无确切证据表明来自花粉,其原因一是无花粉启动的证明,二是无遗传学纯合证明,故不能令人信服。鉴于自然界未见有葡萄单倍体,一些学者认为葡萄单倍体受致死基因控制,从而不能再生和成活^[4,5]。但在自然界存在三倍体葡萄^[7],表明三倍体细胞是能再生和成活的。Engvild 培养矮牵牛花药,再生植株全为三倍体^[8],与我们从 Grenach 花药诱导出的植株全为三倍体非常相似。从 Grenach 花药培养诱导二倍体胚状体及植株早有报道^[4],多用 MS 和 Nitsch 培养基结合较低浓度的细胞分裂素和生长素。而我们通过增高糖浓度和加倍盐浓度的诱导培养基,从而诱导出三倍体植株。这种培养基可能抑制了体细胞胚的发生,而促进了经核融合后的三倍体花粉的启动,进而分裂发育成三倍体植株。Engvild (1973) 报道蔓陀萝花药培养可产生单倍体、二倍体和三倍体植株,认为植株倍性与花芽分化发育阶段有关,单倍体来自幼年花粉,而二倍体和三倍体来自老的和更老的花粉,三倍体植株是单核与一个二核花粉融合而来的。葡萄花药培养有花粉启动和分裂的报道。但单倍体受致死基因控制,不能再生和成活。推测葡萄三倍体植株可能是经核融合后的三倍体花粉启动分裂和分化成胚状体,进一步再生成苗。是否是花粉启动和融合还有待进一步研究和证实。

参 考 文 献

- [1] Johri, B. M., Bhojwan, S. S., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Springer-Verlag, 1977, 398—411.
- [2] 母锡金等,植物学报,1977,19: 93—94.
- [3] 邹昌杰、李佩芬,植物学报,1981,21: 79—81.
- [4] Monette, P. C., in *Biotechnology of Agriculture and Forestry* (ed. Bajaj, Y. P. S.), Vol 6, Springer, 1988, 1—37.
- [5] Mullins, H. G., *Visis*, Special Issue. 1990, 90—407.
- [6] 曹致义、齐与枢,葡萄组织培养与应用,高等教育出版社,1991.
- [7] 魏文娜,南方葡萄栽培与加工,湖南科技出版社,1984,20—40.
- [8] Engvild, K. C., *Hereditas*, 1974, 74: 144—147.