

阳桃胚乳愈伤组织诱导和不定芽发生的研究

刘建福¹ 吴清² 杨道茂¹ 欧阳明安¹

(1. 华侨大学生物工程系, 福建 泉州 362021; 2. 四川省宜宾市园林管理局, 四川 宜宾 644000)

摘要:首次成功建立阳桃胚乳组织培养并获得胚乳再生植株。胚乳愈伤组织诱导以培养基 MS + 2,4-D 2.0 mg L⁻¹ + BA 0.2 mg L⁻¹ 的效果最好, 诱导频率可达 94.7%, 愈伤组织乳白色, 结构致密, 生长旺盛; 将其接种在培养基 MS + ZT 3.0 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ 上, 愈伤组织由乳白色致密型转变为淡绿色致密型, 进而形成绿色芽点, 分化出不定芽, 分化频率可达 73.3%; 胚乳植株在培养基 MS + ZT 2.0-2.5 mg L⁻¹ + NAA 0.05 mg L⁻¹ 上进行壮苗和营养繁殖。

关键词: 阳桃; 胚乳; 离体培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2004) 04-0367-04

Callus Induction and Plant Regeneration from Endosperm of *Averrhoa carambola*

LIU Jian-fu¹ WU Qing² YANG Dao-mao¹ OUYANG Ming-an¹

(1. Department of Biology Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Sichuan Yibin Gardens Bureau, Yibin 644000, China)

Abstract: Explants from endosperm of *Averrhoa carambola* were used to establish culture *in vitro* and regeneration system. The experiments showed that endosperm inoculated on MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.2 mg L⁻¹ BA, gave highest callus induction rate (94.7%). The callus was milk white and compact. When the endosperm derived callus was cultured on MS medium containing 3.0 mg L⁻¹ ZT and 0.2 mg L⁻¹ NAA, the callus became greenish and compact, the shooting frequency being 73.3%. Optimal medium for multiplication of plantlets was MS supplemented with 2.0-2.5 mg L⁻¹ ZT and 0.05 mg L⁻¹ NAA.

Key words: *Averrhoa carambola*; Endosperm; Tissue culture

阳桃 (*Averrhoa carambola*) 又名杨桃、五敛子、三廉子, 为酢酱草科阳桃属植物。阳桃的果实清甜多汁, 酸甜适度, 风味可口, 果形独特美观, 含有人体需要的多种维生素、氨基酸、矿物质及有机酸, 具有较高营养价值和药用价值^[1,2]。但目前我国阳桃品种质量差, 果实小且种子多, 这严重制约阳桃的生产发展, 急需加强优良品种的引种和选育工作, 以培育无籽果实和提高果实品质。

大多数被子植物胚乳为三倍体组织, 三倍体植物具有无籽特性, 人们试图通过胚乳培养获得三倍体植物, 培育无籽品种。这方面在果树上取得了进展^[3-6], 本试验旨在建立阳桃的胚乳愈伤组织诱导分

化培养体系, 为实现阳桃快速繁殖和选育优良品种提供依据。

1 材料和方法

1.1 种子灭菌、胚乳获取

将阳桃成熟饱满的干种子去壳, 在超净工作台上, 先用 75% 乙醇浸泡 10-12 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 0.1% HgCl₂ (加数滴吐温) 进行 10 min 的再次消毒, 无菌水冲洗 4-5 次, 接种于 MS 培养基上萌发。待种子萌发至胚乳开裂但尚未完全脱落时, 在超净工作台上剔除种胚, 再将胚乳分段切取接种在诱导培养基上。

1.2 培养基及培养条件

基本培养基为 MS, 蔗糖浓度 3%, 并依试验目的需要添加不同浓度的 BA、ZT、NAA、2,4-D 等植物生长物质。所有培养基皆以 0.7% 琼脂固化, 在高压灭菌前将 pH 值调至 5.8。每种处理组合中均加入 0.2% 活性炭。培养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照强度 1500–2 000 lx, 光照时间 12–14 h d⁻¹,

1.3 愈伤组织诱导

将获得的无菌胚乳接种在 MS 分别添加 BA 0.1、0.2、0.3 mg L⁻¹ (单位下同), 2,4-D 1.0、2.0、3.0 的诱导培养基中进行筛选。分为光培养和暗培养、胚乳表皮朝向培养基和胚乳表皮背向培养基、萌发前的胚乳和萌发后的胚乳进行愈伤组织诱导效果的比较研究。

1.4 愈伤组织分化、植株再生和倍性检测

将淡绿色致密的愈伤组织剔除褐色部分接入分化培养基中, 分化培养基是 MS 加上 NAA 0.1、0.2 和 ZT 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0, 筛选出适宜的诱导分化和再生植株培养基。取再生植株幼叶和根尖, 采用去壁低渗法进行细胞学鉴定, 随机抽取 20 株, 每株观察 10 个细胞。

2 结果和分析

2.1 不同植物生长物质配比的影响

胚乳愈伤组织诱导培养基的筛选结果表明: 不同植物生长物质配比, 其诱导效果、胚乳愈伤组织的生长速度及其表现都存在明显差异 (表 1)。在无植物生长物质的培养基中, 胚乳局部边缘膨大, 不

能形成愈伤组织; 在 2,4-D 的培养基中, 少数胚乳产生乳白色愈伤组织, 结构疏松, 初始愈伤化时间较早, 生长迟缓, 愈伤量少; 而在 2,4-D 与 BA 的培养基中, 愈伤组织诱导频率较高, 生长旺盛, 结构致密, 但存在褐化现象。由此可见, 培养基必须附加 2,4-D 才能诱导出胚乳愈伤组织。

2,4-D 与 BA 配比结果表明: 高浓度 2,4-D 与低浓度 BA 配比, 愈伤组织呈乳白色, 结构疏松, 愈伤量少; 相反, 高浓度 BA 与低浓度 2,4-D 配比, 愈伤组织呈乳白色, 结构致密, 愈伤量多。两种植物生长物质配比筛选, 结果以 2,4-D 2.0 + BA 0.2 效果最好, 诱导频率达 94.7%, 愈伤组织生长旺盛, 呈乳白色, 结构致密, 褐化程度较轻。

2.2 不同胚乳培养方式的影响

胚乳采用表皮朝向培养基和表皮背向培养基两种方式接入诱导培养基中, 培养 30 d, 观察统计。结果 (表 2) 表明: 以表皮背向培养基方式接种的胚乳, 切口边缘膨大较早, 生长迅速, 诱导效果好, 诱导频率达 100%, 愈伤组织呈乳白色, 愈伤量多且结构致密。

光培养和暗培养下, 多数胚乳都能产生愈伤组织。光培养诱导结果较好, 诱导频率达 96.7%, 愈伤组织生长也较暗培养好, 表现为生长迅速, 愈伤量多, 呈乳白色, 结构致密, 褐化程度较轻。而暗培养的愈伤组织为灰黑色、致密型、生长迟缓、愈伤量少、褐化程度因颜色相近而不能辨别 (表 2)。当暗培养的愈伤组织置于光照下, 多数能转变为乳白色致密型, 恢复正常生长。

表 1 植物生长物质对比对阳桃胚乳愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 2,4-D and BA on callus induction from endosperm of *Averrhoa carambola*

植物生长物质 (mg L ⁻¹) Growth regulators	诱导频率 (%) Induction rate	出现愈伤组织天数 Days for cullusing	褐化程度 Browning	愈伤量 Callus quantity	愈伤组织 Callus character
2,4-D3.0+BA0.1	43.3	16	重 Serious	少 Little	乳白, 疏松 Milk white, friable
2,4-D2.0+BA0.1	52.1	13	重 Serious	少 Little	乳白, 疏松 Milk white, friable
2,4-D1.0+BA0.1	65.4	10	重 Serious	多 Many	乳白, 致密 Milk white, compact
2,4-D3.0+BA0.2	83.6	12	轻 Light	多 Many	乳白, 致密 Milk white, compact
2,4-D2.0+BA0.2	94.7	8	轻 Light	多 Many	乳白, 致密 Milk white, compact
2,4-D1.0+BA0.2	68.2	11	轻 Light	多 Many	乳白, 致密 Milk white, compact
2,4-D3.0+BA0.3	77.8	9	较重 More serious	多 Many	白, 致密 White, compact
2,4-D2.0+BA0.3	69.5	13	较重 More serious	少 Little	白, 致密 White, compact
2,4-D1.0+BA0.3	42.1	11	较重 More serious	多 Many	白, 致密 White, compact
2,4-D1.0+BA0.0	35.6	12	重 Serious	少 Little	乳白, 疏松 Milk white, friable
2,4-D 0.0+BA0.0	0	-	-	-	-

接种数为 30 块 Thirty explants were used for each experiment.

萌发前的胚乳接种到培养基中无膨大现象,也无愈伤组织形成,而萌发后的胚乳能形成生长状态良好的愈伤组织,生长速度也较快,愈伤量多,诱导效果好,诱导频率达100%(表2)。由此可见,阳桃成熟干种子的胚乳诱导愈伤组织需要借助胚的活化作用。

2.3 植物生长物质对愈伤组织分化的影响

将乳白色致密型愈伤组织转接到附加不同配比 ZT 和 NAA 分化培养基上,培养 20 d,多数愈伤组织转变为淡绿色致密型,培养 40 d,愈伤组织出现绿色芽点,进而分化成芽,每块愈伤组织可形成多个芽,有的芽点可形成芽丛。分化的芽多数生长良好,形态正常,但也有畸形苗,表现为茎极度短缩、叶片皱缩扭曲、难于展开、生长势弱。在培养中未发现根的分化。此外,分化培养时间稍长,其褐化现象加剧,部分愈伤组织老化,分化能力也下降,培养 60 d 统计分化频率和平均分化芽数。

从表 3 可见,以 ZT 3.0 + NAA 0.2 的植物生长物质配比,分化频率最高,达 73.3%,分化的芽形态正常,生长旺盛,愈伤组织褐化程度轻。随着细胞分裂素/生长素比值的增大,分化频率降低、褐化程度加剧、愈伤组织老化、分化能力减弱、平均分化芽数降低、畸苗率升高。因此,阳桃胚乳愈伤组织较适宜的分化培养基为 MS + ZT 3.0 + NAA 0.2。同时,培养

20 d 进行继代,能较好地保持愈伤组织的分化能力。

2.4 再生植株的倍性检测和壮苗

对再生植株的幼叶和根尖细胞进行染色体数目检测,结果 $2n=2x=33$ 的细胞数目占 85.2%,证实所得再生植株是来源于胚乳的三倍体而不是胚体组织。刚分化的再生植株比较弱且茎干较短,不宜立即进行生根诱导。在 MS + ZT 2.0-2.5 + NAA 0.05 培养基上进行培养,以获得健壮的胚乳苗;同时,还能分化出不定芽,其增殖系数高,达 5.7。继代培养时可将不定芽连同其基部愈伤组织切下并接入培养基中繁殖。2-5 cm 高的健壮胚乳苗既可继续进行扩繁,又可进行生根培养。

3 讨论

3.1 原位胚在胚乳培养中的作用

原位胚在胚乳愈伤组织诱导过程中的影响,主要取决于接种时胚乳的年龄或生理状态。处于旺盛生长阶段的未成熟胚乳,只要条件合适,无须原位胚的参与就能脱分化而形成愈伤组织,这已在苹果、猕猴桃、柚、橙和核桃等的胚乳培养中得到证实^[7]。而完全成熟的胚乳,尤其是干种子中的胚乳,其生理活性十分微弱,在诱导其脱分化形成愈伤组织之前,必须借助于原位胚的萌发,产生所谓的“胚因子”使其活化^[8]。本试验证明:在适宜培养条件下,

表 2 不同胚乳培养方式对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of culture method on callus induction from endosperm of *Averrhoa carambola*

处理 Treatments	诱导频率(%) Induction rate	出愈时间(d) Days for callusing	褐化程度 Browning	愈伤量 Callus quantity	生长速度 Growth
表皮朝向培养基 With epidermis toward medium	83.3	13	重 Serious	多 Many	缓慢 Slow
表皮背向培养基 With epidermis outward medium	100	8	轻 Light	多 Many	迅速 Rapid
光培养 Culture under light	96.7	10	轻 Light	多 Many	迅速 Rapid
暗培养 Culture in the dark	80	11	-	少 Little	缓慢 Slow
萌发前的胚乳 Endosperm before germination	0	-	-	-	-
萌发后的胚乳 Endosperm after germination	100	9	局部 Dot	多 Many	较快 Rapid

接种数为 30 块 Thirty explants were used for each experiment.

表 3 植物生长物质对胚乳愈伤组织分化的影响

Table 3 Effects of growth regulators on shoot formation from endosperm induced callus of *Averrhoa carambola*

植物生长物质(mg L ⁻¹) Growth regulators	出芽的愈伤组织(块) No. of shooting calluses	愈伤分化频率(%) Shooting frequency	平均每块分化芽数(个) Mean no. of shoots per explant
ZT1.0+NAA0.1	0	0	0
ZT1.0+NAA0.2	4	13.3	0.2
ZT2.0+NAA0.2	15	50.0	1.1
ZT3.0+NAA0.2	22	73.3	1.5
ZT4.0+NAA0.2	14	46.7	0.9
ZT5.0+NAA0.2	6	20.0	0.2

接种数为 30 块 Thirty explants were used for each experiment.

接入处于尚未萌发或萌发初期的胚乳,不能诱导出愈伤组织,而萌发后的胚乳却能形成愈伤组织,而且诱导频率高达 100%,愈伤组织的生长势表现良好。此结果支持 Srivastava 的观点^[9],他认为原位胚的参与之所以能对胚乳产生活化作用,是因为胚在萌发时产生某种物质,即所谓“胚因子”。因此,阳桃成熟干种子的胚乳诱导愈伤组织需要借助原位胚的活化作用。

处于旺盛生长期的胚乳,在离体条件下最容易诱导产生愈伤组织。因此,在胚乳培养中,旺盛生长期是取材的最适期。处于发育早期的胚乳,不仅接种操作不便,而且愈伤组织诱导频率很低,如不同细胞期的红江橙胚乳(核型),前期的愈伤组织诱导频率不到中后期的一半^[10];青果期的枸杞胚乳(细胞型)愈伤组织诱导频率显著低于变色期和红果期^[11]。而接近成熟或完全成熟的胚乳,愈伤组织诱导频率又因材料不同而不同。有些植物如猕猴桃^[12],其诱导频率很低甚至不能产生愈伤组织;而一些大戟科^[9]、檀香科植物^[13],它们的成熟胚乳不仅能产生愈伤组织,而且其中有些还能表现不同程度的器官分化,产生完整的再生植株。

3.2 胚乳培养中植物生长物质的优化

植物生长物质对胚乳愈伤组织的诱导和生长起着十分重要的作用。在没有任何外源植物生长物质的培养基上,柚、苹果、枸杞和橙等胚乳皆不能或极少产生愈伤组织^[9]。在培养基中生长素和细胞分裂素的合理搭配,其效果显著优于使用单一的生长素或细胞分裂素。另外,有些植物对植物生长物质的种类还有特殊要求,如大麦只有在添加一定 2,4-D 的培养基上才能产生愈伤组织;在猕猴桃胚乳培养中,玉米素则是效果最好的^[12];而枣胚乳培养则没有特别的要求^[15]。此外,有机添加物是某些植物愈伤组织诱导和生长所必需的^[14]。本试验证明:高浓度 BA 与低浓度 2,4-D 配比有利于诱导愈伤组织,在没有添加植物生长物质的培养基上,不能产生愈伤组织。

本试验结果表明:随着 ZT/NAA 比值的增大,分化频率降低、褐化程度加剧、愈伤组织老化、分化能力减弱、平均分化芽数降低、畸苗率升高。这说明并不是细胞分裂素/生长素的比值越高越有利于愈伤组织的脱分化。这可能是细胞分裂素的增加,促进了愈伤组织中混倍体及非整倍体细胞比值的增加,导致愈伤组织的分化能力下降或分化植株表现

为畸形。因此,对于植物生长物质在阳桃组织培养中的作用机理还有待更深入的研究。

参考文献

- [1] China Tropical Horticultural Society. South China Fruit Cultural Practice: *Averrhoa carambola* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000. 153-180. (in Chinese)
- [2] Xiao B S (肖邦森), Xie H H (谢红辉), Lei X T (雷新涛). Cultural Practice of *Averrhoa carambola* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001. 166-180. (in Chinese)
- [3] Li J H (李继红), Shao H S (邵寒霜), Huang G X (黄贵修). Rapid regeneration of *in vitro* cultured shoot tip of *Averrhoa carambola* [J]. China Fruit (中国果树), 1999, 4:37. (in Chinese)
- [4] Zhang Q (张琴), Yan Y (闫勇), Liang G L (梁国鲁). Callus induction and triploid plant regeneration from endosperm of *Passiflora edulis* [J]. J Southwest Agri Univ (西南农业大学学报), 2000, 22(5):398-399. (in Chinese)
- [5] Zhuang D H (庄东红), Masashi Ishida. Changes in chromosomal ploidy in regenerated plant obtained from cultured endosperm of *Diospyros kaki* [J]. J Shantou Univ (Nat Sci) (汕头大学学报自然科学版), 1999, 10(1):42-47. (in Chinese)
- [6] Peng X J (彭晓军), Wang Y Q (王永清). Callus induction and regeneration from endosperm of loquat [J]. J Sichuan Agri Univ (四川农业大学学报), 2002, 20(3):228-231. (in Chinese)
- [7] Gmiffer Jr F G, Ling X B, Den X X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro* [J]. Theor Appl Genet, 1990, 80:785-790.
- [8] Zhu D Y (朱登云), Li J M (李俊明). The historical and current status of endosperm culture in angiosperms [J]. J Agri Biotech (农业生物技术学报), 1996, 4(3): 205-216. (in Chinese)
- [9] Srivastava P S, Johri B M. Triploid plants of *Putranjiva roxburghii* from endosperm [J]. Beitr Biol Pflanzen, 1998, 54:381-397.
- [10] Chen R Z (陈如珠), Li G G (李耿光), Zhang L Y (张兰英). Initiation of callus and triploid plant from endosperm of *Citrus sinensis* Osbeck [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1991, 33(11): 848-854. (in Chinese)
- [11] Wang L Y (王立英), Li J (李健), Wang J X (王锦秀), et al. Preliminary study on endosperm culture *in vitro* from different developmental stages of *Lycium barbarum* [J]. Ningxia Agri Scitech (宁夏农业科技), 1999, (4):12-15. (in Chinese)
- [12] Mu S K, Fraser L G, Harrey C F. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrid [J]. Sci Horticul, 1990, 44:104-117.
- [13] Lakshmi Sita G, Raghava Ram N V, Vaidyanathan C S. Triploid plant from endosperm culture of sandalwood by experimental embryogenesis [J]. Plant Sci Lett, 1998, 20:63-69.
- [14] Chikkanaih P S, Gayatri M C. Organogenesis in endosperm tissue culture of *Codiaeum variegatum* Blum [J]. Curr Sci, 1994, 43:23-24.
- [15] Shi Y P, Wang Q S. Studies on biology of endosperm plants in *Zizyphus sativa* [A]. In: International Symposium on Horticultural Germplasm Cultivated and Wild. Part I. Fruit Trees [C]. Beijing: International Academic Publishers, 1988. 398-402.