

小枣发育枝愈伤组织类型及细胞学观察

张 磊 王震星 刘贵仁

(天津农学院园艺系, 天津 300381)

摘 要 在金丝小枣发育枝离体培养过程中, 不同种类和浓度的激素及光照条件对诱导愈伤组织的质量有明显影响。2, 4-D 和暗培养易诱导出疏松的Ⅱ型愈伤组织, IBA 及光照培养则有利于致密的Ⅰ型愈伤组织形成。Ⅱ型愈伤组织未分化出芽, 而Ⅰ型具有较强的再分化能力。继代繁殖时, 2, 4-D 浓度超过 1mg/L 将导致Ⅰ型愈伤组织大量转化为Ⅱ型。不同类型愈伤组织的染色体倍性变异明显不同, 再生植株无性系根尖细胞染色体倍性则相对稳定。

关键词 金丝小枣 组织培养 愈伤组织 染色体 激素 光照条件

金丝小枣是枣属 (*Zizyphus Mill*) 中的珍贵栽培品种, 而生产中主要采用嫁接和根蘖苗进行繁殖, 繁殖系数较低, 因此, 快速繁殖优良单株是发展金丝小枣生产的关键。目前, 国内一些研究单位采取茎段离体培养的方式, 成功地获得枣树再生植株^[1, 3], 组培快繁技术渐趋完善, 但在培养过程中, 外源激素和光照条件对愈伤组织类型的影响, 以及愈伤组织和再生植株的细胞学研究均未见报道。本研究就此进行了探讨, 旨在为完善金丝小枣的快速繁殖技术提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

离体材料采自河北省沧州及天津市静海县优质高产金丝小枣单株。取成年枣头消毒后将其剪成 2cm 长的外植体进行接种。

1.2 方法

以改良 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 2, 4-D 和 IBA, 3% 蔗糖, 0.7% 琼脂, pH 5.8 温度 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, 黑暗或光照下进行愈伤组织诱导, 有光处理的光照度 2500lx, 每日光照 12h。

愈伤组织生长 10d 后切下进行继代培养, 每 30d 继代繁殖一次。不同世代的愈伤组织转至诱导生芽的分化培养基中, 分别附加不同浓度的 2, 4-D、IBA、6-BA。

1.3 愈伤组织和再生植株染色体观察

1.3.1 愈伤组织继代培养 10d 时进行制片, 疏松型愈伤组织用 3:1 卡诺液固定 10min, 致密

型愈伤组织先切成 1mm 厚的薄片后固定 60min 改良卡宝品红染色压片观察。

1.3.2 试管苗和再生植株的染色体标本制备,上午 9:00 取 2~3mm 的小植株的茎尖和根尖,用 0.1%秋水仙素处理 2h,1mg/L HCl 60℃水解 15min,改良卡宝品红染色压片观察。

1.3.3 去壁低渗制备染色体^[2],上午 9:00~10:00 取试管苗根尖,用 0.1%秋水仙素预处理 2h,0.075mg/L 的 KCl 水溶液前低渗 30min,4%纤维素酶和果胶酶混合酶 26℃下酶解 4h,后低渗 30min,3:1 的卡诺液固定 30min,然后在冷冻过的清洁载玻片上涂片,火焰干燥,20:1 的 Giemsa 染色液染色 2h,镜检观察照相。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

2.1.1 外源激素对出愈率及愈伤组织类型的影响 从表 1 可以看出,附加 2,4-D 和 IBA 的培养基都能诱导外植体产生愈伤组织,在供试浓度范围内,随使用浓度增加出愈率提高。不同

表 1 外源激素对出愈率及愈伤组织类型的影响

2,4-D	IBA	外植体数	I 型愈伤组织		II 型愈伤组织		出愈率 (%)
			块数	出愈率 (%)	块数	出愈率 (%)	
0.5	0	41	18	43.9	6	14.6	58.5
1	0	30	20	66.7	10	33.3	100
0	0.8	32	26	81.2	0	0	81.2
0	1	30	30	100	0	0	100

激素则对诱导的愈伤组织质量有较大差别,附加 2,4-D 培养基分别诱导出 I 型和 II 型两种愈伤组织,而且用量加大,质量较差的 II 型愈伤所占比例提高,如用量为 0.5mg/L 时 I 型与 II 型之比为 3:1 当用量增加到 1mg/L 其比例为 2:1 附加 IBA 的培养基不但出愈率高,而且只诱导出 I 型愈伤组织。根据我们的观察,I 型愈伤组织呈乳白色,组织致密,细胞整齐一致,联系紧密,具有浓密的细胞核(图 1-A)。此类愈伤组织质量较好;II 型愈伤组织外观浅灰色,组织

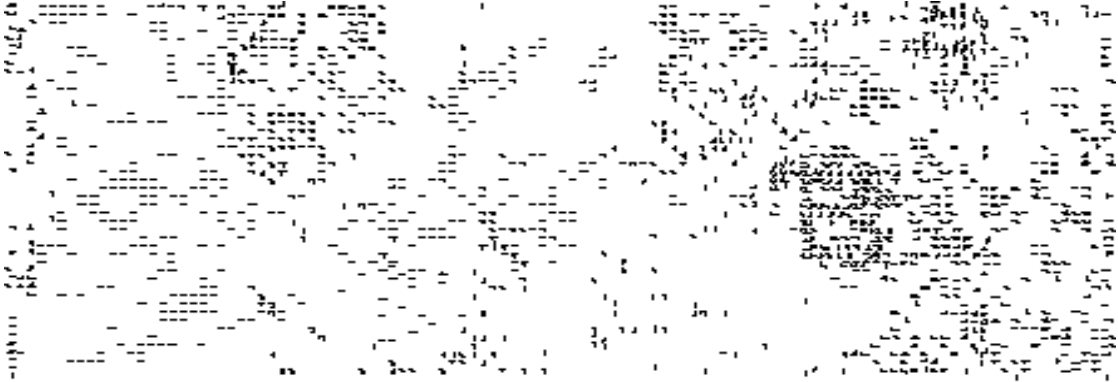


图 1 愈伤组织细胞形态
A. I 型愈伤组织 B. II 型愈伤组织

松散, 细胞显著拉长呈畸形管状, 形态不规则, 细胞间缺少联系, 多数处于游离状态 (图 1-B), 这种愈伤组织在分化能力及方向上都不理想, 是组织培养工作应避免的一种类型。上述结果表明, 外源激素是影响出愈率和愈伤组织类型的一个重要因素, 在进行小枣外植体诱导时, 必须慎重选择激素品种和用量。

2 2 1 光照条件对愈伤组织类型的影响

表 2 光照条件对愈伤组织类型的影响 (%)

2, 4-D (mg/L)	IBA (mg/L)	光照培养			黑暗培养		
		总出愈率	I 型	II 型	总出愈率	I 型	II 型
0.5	0	30.0	30.0	0	63.5	45.8	17.7
1	0	70.0	70.0	0	100	64.5	35.5
0	0.8	25.0	25.0	0	79.8	79.8	0
0	1	54.5	54.5	0	100	100	0

及所产生的类型均有显著影响。黑暗培养时愈伤组织诱导频率明显高于有光培养的处理, 在附加不同激素培养基上呈现同样趋势, 附加 IBA 的处理则更明显。而光照则有利于愈伤组织正常生长, 能抑制 II 型愈伤组织的产生。从表 2 可以看出, 光照培养条件下各处理的愈伤组织均为 I 型, 尤其是 2, 4-D 处理不但没有产生 II 型愈伤组织, 而且出愈率高于 IBA 处理。但附加 IBA 黑暗培养时, 无论出愈率还是愈伤组织质量均较有光培养更好, 可见光照条件的影响又受外源激素所左右。因此, 光因子及光因子与外源激素综合作用影响枣头出愈效果的机制有待进一步研究。

2 1 3 继代培养过程中愈伤组织类型的转化

愈伤组织继代培养过程中, 2, 4-D 的浓度直接影响继代愈伤组织类型 (表 3), 如 I 型愈伤组织在继代培养时, 随着 2, 4-D 浓度的增高, 向 II

表 3 2, 4-D 浓度对 I、II 型愈伤组织转化的影响

2, 4-D mg/L	I 型愈伤组织				II 型愈伤组织			
	接种 块数	I 型愈伤 组织块数	II 型愈伤 组织块数	I 型转化 频率 (%)	接种 块数	I 型愈伤 组织块数	II 型愈伤 组织块数	II 型转化 频率 (%)
0.5	44	43	1	2.3	33	0	33	0
1	56	40	16	28.6	30	0	30	0
1.5	42	21	21	50.0	36	0	36	0
2	39	23	16	41.0	36	0	36	0

型转化的比例提高。2, 4-D 0.5mg/L 时转化频率最低, 仅有 2%, 当超过 1.5mg/L 时转化频率达 50%。因此, 继代培养愈伤组织时 2, 4-D 浓度应降低。而 II 型愈伤组织则不论继代培养基加入多少, 2, 4-D 均没有 I 型愈伤组织出现。

2 2 愈伤组织再分化

2 2 1 激素对比对再分化的影响

I 型愈伤组织在不同激素配比的培养基上分化芽的能力有明显差异 (表 4)。2, 4-D 和 IBA 对愈伤组织分化均无效。6-BA 对愈伤组织分化的作用比较明显, 而且随着 6-BA 的浓度增加, 分化率也增加, 6-BA 增至 4mg/L 时分化率最高并形成芽丛。从表 4 还看出, 同时附加 6-BA 和 IBA 时将极大削弱 6-BA 促进芽分化的作用, 如 6-BA 1mg/L + IBA 0.5mg/L 的处理愈伤组织没有分化, 当 6-BA 浓度提高到 2mg/L 时, 分化频率才达到 51%, 比单独附加相同浓度 6-BA 的处理降低了 19 个百分点, 降低 IBA 用量后分化频率又稍提高。试验结果说明 IBA 对愈伤组织的分化不起作用甚至抑制分化。

II 型愈伤组织在上述各种培养基上均未分化出芽。在 IBA 1mg/L 时分化出大量不定根,可见II 型愈伤组织再生植株的能力极低。在愈伤组织的诱导和继代繁殖中都应避免此类愈伤组织的出现。

2.2.2 愈伤组织及再生植株染色体数目变异 I 型和II 型愈伤组织细胞中染色体数目变异有差异(表 5),I 型变异细胞频率 37.8%,而 II 型高达 59.2%。说明愈伤组织类型不同,其细胞中染色体数目变异情况亦不同。对 30 个再生植株根尖细胞染色体数目检查,发现其中有 1 个为四倍体 ($2n=4x=48$),其余为二倍体植株 ($2n=24$) (图 2),变异频率为 3.33%,说明再生植株的染色体倍性稳定,能形成再生植株的愈伤组织大部分为二倍体细胞。

其它非整倍体细胞是处于一个在选择上不利于细胞分裂的位置上,因而很难分化出再生植株。

3 讨论

3.1 2,4-D 浓度对产生 I、II 型愈伤组织的作用

Yamada^[4]等人推测,2,4-D 与染色质的组蛋白结合,使其脱离 DNA 链,从而活化 DNA 链,导致大量的 DNA 复制,其结果是细胞迅速分裂产生愈伤组织。在正常植物细胞中,DNA 合成——细胞核分裂——细胞质分裂是相互关联并受到严格的整体控制的。愈伤组织细胞是在加入外源激素的情况下产生的,这种细胞由于脱离了植物整体调节,使该过程的调节机制可能失常,因而在愈伤组织诱导和继代培养过程中,随着 2,4-D 浓度的增加,细胞核和细胞质都迅速增加,但其细胞分裂的速度与核复制的速度不同步,这样就出现了巨型、多倍化的细胞即愈伤组织向 II 型细胞发展。

3.2 愈伤组织和再生植株的染色体变异

愈伤组织在培养过程中,由于外源激素的加入,细胞中染色体的多倍化现象是普遍存在

表 4 激素对比对 I 型愈伤组织分化的影响

2,4-D	6-BA	IBA	接种块数	分化块数	分化频率 (%)
0.1			78	0	0
0.5			72	0	0
	0.5		34	3	8.8
	1		36	5	13.9
	2		54	13	24.0
	4		33	27	81.8
	0.5	0.2	33	0	0
	2	0.2	36	2	5.6
	0.5	0.5	39	0	0
	1	0.5	37	0	0
	2	0.5	39	2	5.1
		0.5	30	0	0
		1	30	0	0

表 5 I、II 型愈伤组织中染色体数目变异

染色体数目	I 型愈伤组织 (%)			II 型愈伤组织 (%)		
	细胞数	频率	变异频率	细胞数	频率	变异频率
< 24	135	13.6		153	13.3	
= 24	654	61.6	38.2	364	30.1	69.9
> 24	263	24.7		350	56.6	



图 2 再生植株的染色体数目

A. 二倍体 ($2n=24$) B. 四倍体 ($2n=4x=48$)

的。在对 30株再生植株中的染色体进行观察,发现只有 1株为四倍体。说明染色体异常的细胞在一定条件下也可分化出再生植株,其表现可能与原品种不同,但出现这种变异的频率较低。因而通过离体器官脱分化形成愈伤组织再分化大量芽丛,进而再生成完整植株,仍然是优良品种快速繁殖的较好途径。本试验结果认为,愈伤组织细胞中染色体变异程度可以通过外源激素的调节得到控制

参 考 文 献

- 1 张福泉. 枣茎段离体培养初报. 中国果树, 1993(3): 46~ 47
- 2 陈端阳. 植物有丝分裂染色体标本制备的新方法. 植物学报, 1979 21(3): 297~ 298
- 3 刘贵仁, 严仁玲, 王震星, 等. 金丝小枣茎段离体培养及胚培养的研究. 华北农学报, 1988 3(4): 116~ 119
- 4 Yamada Y, Yasuda. Biochem Biophys Res Commun, 1971(43): 488

Studies on the Callus Type and Cytology of the Growing Branch of the “Xiao Zao” Jujube

Zhang Lei Wang Zhenxing Liu Guiren

(Tianjin Agricultural College, Tianjin 300381)

Abstract It was found in the *in vitro* culture of the callus from the growing branch of the “Jinsixiaozao” jujube, that stimulants at different concentration and lighting significantly affected the quality of the callus. The use of 2, 4-D in dark culture helped the induction of loose type II calli, while IBA and lighting helped the formation of compact type I calli. The type I calli showed no capacity of differentiation, while the type II calli was found stronger in differentiation. During propagation 2, 4-D at a concentration higher than 1 mg/L resulted in the massive conversion of type I into type II calli. Calli were found different in the variability of chromosome ploidy. The cells from the root tip of the regenerated plantlets were found relatively stable in their chromosome ploidy.

Key words “Jinsixiaozao” jujube; Tissue culture; Callus; Chromosome; Hormone; Light condition