

脱水对番木瓜体细胞胚贮藏 和萌发的影响*

叶克难 余迪求 黄俊潮 李宝健

(中山大学生物工程研究中心)

摘要 由悬浮培养获得的番木瓜体细胞胚含水量高达90%以上,成苗率低,不能贮藏。经脱水,含水量为50%~70%的干燥体细胞胚在MSO培养基上的成苗率为82%,在室温(25℃)下贮藏60天后存活率为83%。贮藏期间体细胞胚无一萌发,但含水量小于30%的干燥体细胞胚存活率低。扫描电镜观察表明,新鲜体细胞胚表面存在很多突出细胞,当体细胞胚萌发时,这些细胞进一步分裂,形成愈伤组织或次级体细胞胚,妨碍体细胞胚的正常萌发。而含水量50%~70%的干燥体细胞胚表面细胞枯死,但生长点却完好无损。

关键词 番木瓜,体细胞胚胎发生,脱水,体细胞胚,贮藏,萌发

植物体细胞胚胎发生在植物组织细胞培养中已成为一种较为常见的现象。由于被子植物的胚胎埋藏在胚珠内,对其研究存在方法上的困难,因而离体体细胞胚胎发生作为一种新的研究植物胚胎发育的理想系统,受到国内外学者的广泛重视^[1,2]。但迄今为止,除少数经典材料如胡萝卜、苜蓿、芹菜等植物外,一般的植物体细胞胚胎发生系统都存在成苗率偏低的缺点^[3],其主要原因之一是体细胞胚萌发再生时都不同程度地存在愈伤化或次级体细胞胚胎化的问题。此外,由于新鲜的体细胞胚含水量高,故其贮藏十分困难^[3]。近年来,国外陆续有一些关于干燥体细胞胚利于贮藏和萌发再生的报道^[4,5]。本文以悬浮培养的番木瓜(*Carica papaya* L.)体细胞胚为材料,研究了体细胞胚对脱水的忍耐程度及干燥体细胞胚的贮藏与萌发再生情况。

1 材料与方 法

1.1 体细胞胚胎发生的诱导

杂种番木瓜(*Carica papaya* L.)种子园优一号由广州岭南园艺场提供。以萌发7~10天的无菌苗根、茎切段为外植体,接种在固体的改良MS培养基上^[6],其中附加有萘乙酸2.0mg/L和激动素1.0mg/L。培养温度为25±2℃,每天辅以光照12h(600lux)。

本文1991年12月5日收到

• 国家高技术发展计划(863)资助项目

4周后,将胚性愈伤组织转入相同的液体培养基中,另加赤霉素2.0mg/L,活性炭0.3%(w/v),振荡培养,摇床转速为100rpm。2天后,用100目滤网除去大块愈伤组织,以后每周继代培养1次。

1.2 体细胞胚的脱水

具子叶成熟体细胞胚经无菌水冲洗后进行脱水,方法如下:①快速脱水:将体细胞胚放在无菌的培养皿中,在超净台上打开皿盖,吹风5~30min。②自然脱水:将体细胞胚放在垫有一层滤纸的无菌养皿中,封口胶(sealing film)封口后置培养室暗处1~14天。

体细胞胚含水量测定采用称重法。

$$\text{体细胞胚含水量}(\%) = (\text{体细胞胚鲜重} - \text{体细胞胚干重}) / \text{体细胞胚鲜重} \times 100\%$$

1.3 体细胞胚的贮藏、萌发与再生

把体细胞胚放在相对湿度(RH)80%左右的培养皿中,封口胶封口后置暗处常温(25℃)下贮藏。萌发时将体细胞胚置于无激素的MS固体培养基上,加强光照(1500lux)。

1.4 扫描电镜观察

将体细胞胚用2.5%戊二醛溶液固定4h以上,用0.2mol/L二甲胍酸缓冲液充分洗涤后,乙醇逐级脱水,临界点干燥,真空喷镀后在日立S-520型扫描电镜下观察和拍照。

2 结果与讨论

番木瓜小苗的根、茎外植体接种在固体改良MS培养基上4~5天后开始形成愈伤组织。4周后,将淡黄色胚性愈伤组织转入液体培养基振荡培养20天左右获得大量体细胞胚(图版I-1)。预备实验中发现长度小于1.0mm的体细胞胚尚未完全成熟,耐脱水能力差。因此,挑选长度在1.0mm以上的具子叶成熟期体细胞胚(图版I-2)进行脱水实验,每一实验取20~30个体胚并有3次以上重复。

由悬浮培养获得的体细胞胚含水量高达90%以上。从图1中可以看出,快速脱水时,25min内体细胞胚的含水量即降至30%左右。而自然脱水时,含水量下降缓慢,14天后降至30%左右。应指出的是,这一实验在广州的潮湿季节进行,空气的相对湿度为90%左右。在天气干燥的季节,体细胞胚的含水量下降更快一些。在脱水过程中,体细胞胚的颜色由浅黄逐渐变为黄褐色,其体积在含水量降至30%左右时缩小1/3到1/2。但当存活的干燥体细胞胚在培养基上培养24小时后,其体积可以恢复到原来的90%以上,这与正常种子萌发时的吸胀现象极为相似。不同含水量体细胞胚的萌发与再生情况列入表1。由表1中可以看出,含水量50%~80%的干燥体细胞胚不仅萌发率高,而且比未经脱水的体细胞胚萌发得更加整齐一致。其中含水量50%~70%的体细胞胚成苗率最高,达82.1%。未经脱水的体细胞胚虽然萌发率也高,但成苗率仅为61.7%。扫描电镜观察表明,新鲜的体细胞胚表面存在很多突出细胞(图版I-3)。当体细胞胚在培养基上萌发

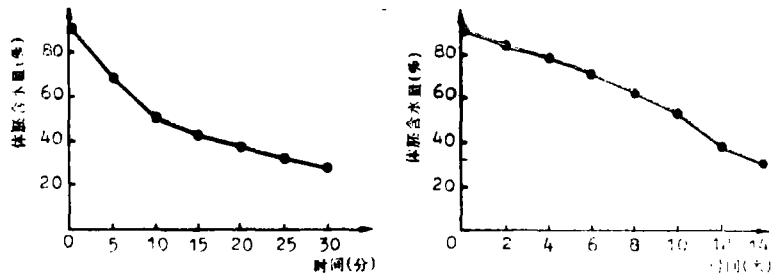


图1 不同条件下体胚的脱水效果

Fig.1 Results of desiccation at different conditons

A. 快速脱水法

B. 自然脱水法

时, 这些突出细胞进一步分裂, 形成愈伤组织(图版 I -4)或次级体细胞胚(图版 II -5)。这种体细胞胚萌发时的愈伤化或次级体细胞胚发生严重地妨碍了体细胞胚的正常萌发, 并使体细胞胚的成苗率不稳定。有时体细胞胚的愈伤化或次级体细胞胚发生率竟高达 50%。用扫描电镜观察含水量 50%~70% 的干燥体细胞胚表明, 其表层细胞均已脱水枯死(图版 II -6), 而生长点细胞致密, 完好无损(图版 II -7)。因此, 干燥体细胞胚在萌发时其表面不会产生愈伤化或次级体细胞胚发生, 体细胞胚萌发一致, 成苗率高, 生长正常(图版 II -8,9)。国外的一些学者认为, 适当的脱水有利于植物体细胞胚的萌发与再生^(4,5,7,8), 我们的结果也证明了这一点。此外, 由表 1 也可以看出, 番木瓜体细胞胚

表 1 不同含水量的体细胞胚在MSO培养基上的萌发率

Tab.1 Effects of moisture content on somatic embryo germination

体细胞胚含水量 (%)	发芽时间 (天)	萌发率 (%)	成苗率* (%)
>90	10	63.3	61.7
	20	95.0	
70~80	10	87.2	74.0
	20	92.1	
50~70	10	90.7	82.1
	20	95.8	
40~50	10	41.4	40.3
	20	47.3	
20~30	10	4.0	5.0
	20	6.0	

* 发芽50天后统计

的耐脱水能力不强, 含水量小于 30% 的体细胞胚存活率低。Mckersie 等报道⁽⁸⁾, 苜蓿的干燥体细胞胚脱水至含水量 10~15% 仍能存活。Gray 等⁽⁴⁾也曾报道 Orchardgrass 的体细胞胚脱水至含水量 13% 时仍有 12% 的体细胞胚可以萌发。这种不同植物间对脱水忍耐程度的差异在正常种子中也是存在的。很多热带作物(例如可可、橡胶等)的种子对脱水十分敏感, 因而被称为顽拗性种子。

不同含水量的体细胞胚在室温(25℃)下进行贮藏时的萌发情况列入表2。未经脱水的体细胞胚贮藏10天后即有部分开始萌动,根根伸长。20天时已有23%的体细胞胚萌发,到80天时更高达34.5%。低温(4℃)条件下其萌发率稍低,贮藏80天后的萌发率为18.1%。而含水量50%~70%的干燥体细胞胚在室温下贮藏期间完全处于静止状态,无一萌发。干燥体细胞胚贮藏后的萌发情况见表3。由表3可知,贮藏60天后的干燥体细胞胚在MSO培养基上的萌发率仍达83%,这说明贮藏是成功的。Ammirato^[3]曾认为植物体细胞胚发育成小苗的过程是不能间断的。McKersie等^[7]报道,含水量10%的干燥苜蓿体细胞胚可保存8个月时间。我们的结果也证明,经适当干燥的植物体细胞胚是可以贮藏的。此外,从表3也可以看出,番木瓜干燥体细胞胚经贮藏80天后,其萌发率显著下降,仅为11.4%。我们已知,正常种子贮藏时,含水量是影响种子活力保持时间长短的重要因素,即含水量越低,种子活力保持时间越长。我们所获得的番木瓜体细胞胚耐脱水能力不强,也许是其贮藏时间相对较短的重要原因。

表2 体细胞胚在室温(25℃)下贮藏期间的萌发率

Tab.2 Germination rate of somatic embryo during storage period in 25℃

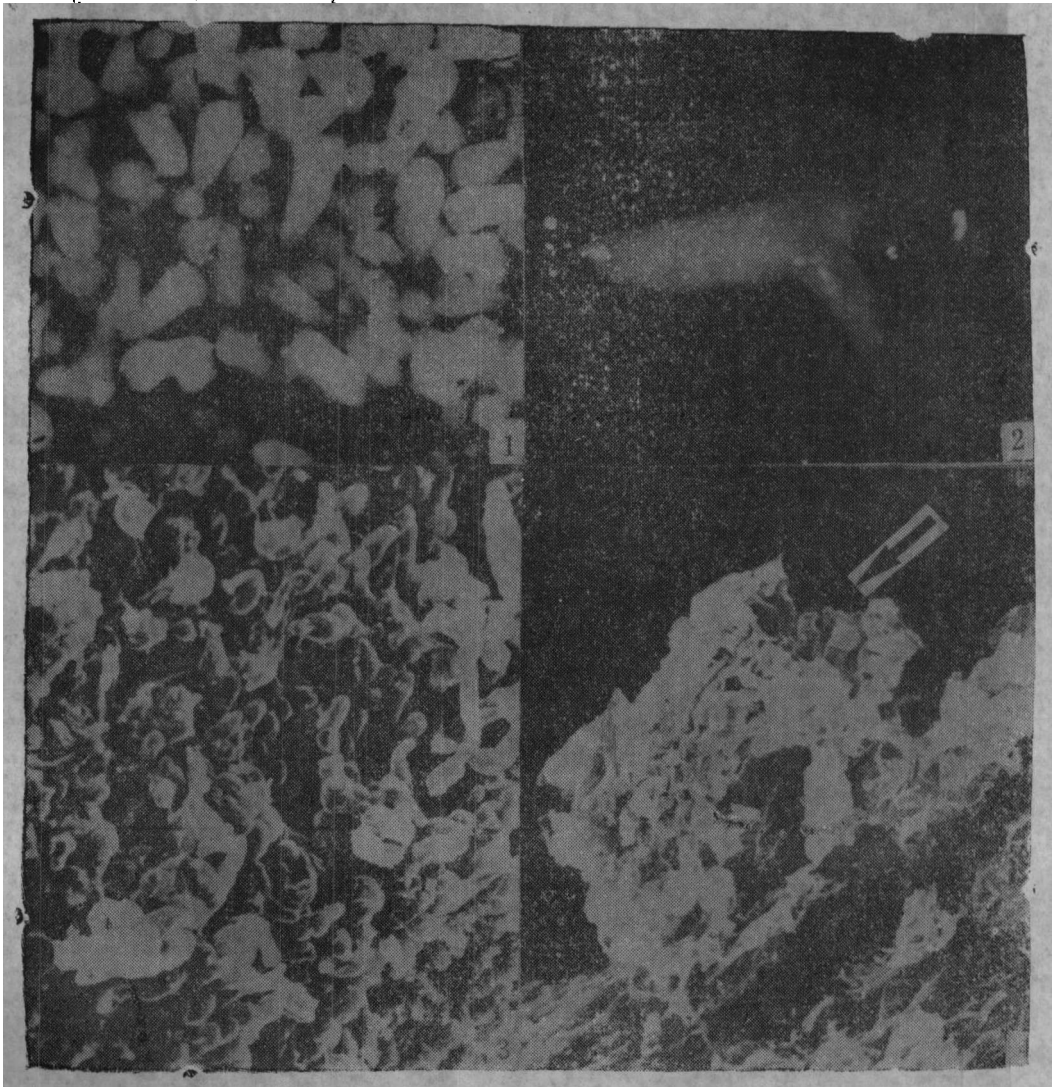
体细胞胚含水量 (%)	贮藏时间 (天)	萌发率 (%)
>90	20	23.3
	40	30.7
	60	32.1
	80	34.5
50~70	20	0
	40	0
	60	0
	80	0

表3 贮藏后的干燥体细胞胚在MSO培养基上的萌发率

Tab.3 Germination rate of dry somatic embryos on MSO medium after storage

贮藏时间(天)	发芽时间(天)和发芽率(%)		
	10天	20天	30天
0	92.4	95.6	96.0
20	90.1	93.2	93.8
40	81.2	89.3	90.7
60	61.7	74.7	83.1
80	7.0	10.2	11.3

我们在实验中还发现,在悬浮培养过程中产生的一些肥大体细胞胚在萌发时几乎全部愈伤化或次级体细胞胚化,很难成苗,它们通常被看作“畸形”胚。但经过适当干燥后,这些体细胞胚却能够正常萌发并长成健康植株。此外,这些肥大体细胞胚的耐脱水能力比一般体细胞胚更强一些。Gray等^[9]认为植物体细胞胚的耐脱水能力与其贮藏物质,尤其是淀粉含量的多少有关。我们对肥大体细胞胚的测定表明,其蛋白质和淀粉含量均高于形态正常的体细胞胚(待发表资料)。因此,除形态观察外,贮藏物质的含量可能应成为判断体细胞胚成熟和健康的一种生化标志。



图版 I

- 图1 由番木瓜愈伤组织悬浮培养获得的大量体细胞胚。×10
 图2 具子叶的成熟体细胞胚。×25
 图3 新鲜体细胞胚表面的扫描电镜图象。×220
 图4 新鲜体细胞胚萌发时其表面形成的愈伤组织，箭头所示。×100

Plate I

- Fig.1 A lot of somatic embryos of papaya were obtained from callus suspension cultures. ×10
 Fig.2 Mature somatic embryos with fully formed cotyledones. ×25
 Fig.3 Scanning electron micrograph of the surface of fresh somatic embryo. ×220
 Fig.4 Callus formation was induced on the surface of germinating fresh somatic embryo. ×100



图版 I

图5 新鲜体细胞胚萌发时其表面形成的次级体细胞胚,箭头所示。 $\times 100$; 图6 含水量50%~70%的干燥体细胞胚表面的扫描电镜图象。 $\times 350$; 图7 含水量50%~70%的干燥体细胞胚生长点的扫描电镜图象。 $\times 400$; 图8 干燥体细胞胚在MSO培养基上再生为小植株; 图9 植株转入盆栽

Plate I

Fig. 5 Secondary embryogenesis was induced on the surface of geminating fresh somatic embryo. $\times 100$; Fig. 6 Scanning electron micrograph of the surface of desiccated somatic embryo. $\times 350$; Fig. 7 Scanning Electron micrograph of desiccated somatic embryo growing point. $\times 400$; Fig. 8 Plantlets regenerated from desiccated somatic embryos on MSO medium, Fig. 9 Plants grown in soil

参 考 文 献

- 1 程井辰. 天仙子花粉愈伤组织胚胎发生中的RNA合成. 实验生物学报, 1990, 23: 145~153
- 2 Terzi M, Pitto L, Sung Z R. Somatic embryogenesis. Incremento Produttività Agricole, Roma, 1985
- 3 Ammirato P V. Organizational events during somatic embryogenesis In "Plant Tissue and Cell Culture". New York: Alan R Liss, Inc, 1987, 57~82
- 4 Gray D J, Conger B V, Songstad D D. In Vitro Cell Dev Biol, 1987. 23: 29~33
- 5 Senaratna T, Mckersie B D, Bowley S R. In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26, 85~90
- 6 叶克难、马蕾、李宝健. 番木瓜悬浮培养的体胚发生与植株再生. 植物学报, 1991, 33, 565~568
- 7 Kim Y H, Janick J. Hortscience, 1989, 24: 674~676
- 8 Mckersie B D, Senaratna T, Bowley S R et al. In Vitro Cell Dev Biol, 1989, 1183~1188
- 9 Gray D J, Conger B V. Somatic embryo ontogeny in orchardgrass. In "Tissue Culture in Forestry and Agriculture". New York: Plenum Press, 1985. 49~57

Effect of Desiccation on Papaya Somatic Embryo Storage and Regeneration

Ye Kenan Yu Diqui Huang Jiunchao Li Baojian

Abstract Fresh somatic embryo obtained from suspension culture had more than 90% water content. They had poor conversion frequency and could not be stored. After desiccated to 50-70% water, 82% dry somatic embryos converted to seedlings on MSO medium. Besides, dry somatic embryos did not germinate during storage at room temperature (25℃) and 83% survived after storage for 60 days. However, survival of dry somatic embryos was decreased when desiccated below 30% water. Scanning electron micrograph showed that there were many projecting cells on the surface of fresh somatic embryo. These cells divided and formed calli or secondary embryos during somatic embryo germination. The surface cells on dry somatic embryo died, but the growing point of embryo was intact.

Keywords Papaya (*Carica papaya L.*), embryogenesis, desiccation, somatic embryo, storage, regeneration

• Biotechnology Research Center, Zhongshan University