

甘薯体细胞胚发生和人工种子的制作

张宝红 丰 嵘

(中国农业科学院棉花研究所,河南安阳·455112)

摘 要 对甘薯组织培养体细胞胚发生、成熟及萌发,体细胞胚发生的细胞组织学,胚的同步化和单胚化,人工种子制作等方面的研究现状进行了综述,并指出了这一生物技术目前存在的主要问题,展望了该技术将来的发展方向。

关键词 甘薯,胚胎发生,植株再生,人工种子

中图分类号 S531.035.3, S531.032

自1960年 Nielsen 首次报道用甘薯茎尖分生组织培养成无病毒植株以来,甘薯组织培养发展十分迅速^[1],在许多方面均获得了一定的结果,并在逐步走向应用。其中甘薯体细胞胚发生和人工种子的制作,不仅解决了甘薯贮藏、运输和栽培中的困难,实现省力、低成本及无菌化栽培;而且还可以有目的地向人工胚乳中加入杀虫剂、杀菌剂和除草剂,以减少病虫害的危害;同时还可以利用体细胞胚发生的途径,有目的地进行基因转育以改育薯种。

人工种子的制作可分为两大步骤:一是体细胞胚的诱导与形成;二是人工种皮的制作与装配。现仅就甘薯上这两方面的研究进展加以综述。

1 甘薯体细胞胚发生

甘薯组织培养虽早在60年代初就已开始,但其胚状体的诱导直到70年代末才有报道^[2]。1979年蔡新声^[3]由花药愈伤组织诱导出胚状体,并发育成植株。1980年 Hwang 利用块根培养也获得了胚状体。在以后几年中,几乎没有见到这方面的报道。直到1984年, Liu 等采用叶片、茎尖、茎段和块根等多种外植体培养,均获得了大量的体细胞胚,并再生出植株^[3,4]。此后人们对甘薯组织培养体细胞胚发生进行了广泛的研究。

1.1 影响体细胞胚发生和植株再生的因素

基因型 甘薯体细胞胚的发生能力在品种间有很大差异。蔡新声等^[3,4]培养6个品种的花药,仅有3个品种获得了体细胞胚,且不同品种对同一培养基的反应也不相同;辛淑英等以10个品种为试材,其中仅8个品种获得了体细胞胚,且产生体细胞胚的途径和方式也不尽相同^[5]。甘薯品种资源丰富,但能诱导产生体细胞胚的基因型却很少,目前仅从白星、PI8491、GaTG3和台农新31号等少数基因型获得体细胞胚并再生出植株,其中以白星最易诱导,且用之已建立起甘薯体细胞发生和植株再生体系^[6]。

外植体 甘薯胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚的形成,目前可用块根、茎段、叶柄、叶

片、花药、茎尖(3~5 mm)及生长点(0.5~1.0 mm)、原生质体等进行^[1],但外植体的不同来源对体细胞胚的发生有很大的影响。Cantliffe^[9]和 Jarret^[3]等指出,甘薯体细胞胚发生和植株再生的最佳组织为生长点,且随着生长点上叶原基数的增加,其诱导形成体细胞胚的频率也急剧下降。这说明进行细胞分裂活跃的部位,在适宜的条件下更容易发生不均等分裂,并最终进行体细胞胚发生^[10]。

激素 甘薯胚愈伤组织诱导、胚状体分化及植株再生过程中,激素起着重要作用。其中2,4-D的影响尤为突出。2,4-D在体细胞胚的诱导阶段有重要作用,但在胚状体的发育阶段却要降低或完全去掉,以利于体细胞胚的发育。这是因为在含2,4-D的培养基上甘薯体细胞胚仅能发育到球形期或心形期^[4,11],而只有转移到不含2,4-D的培养基上才能继续发育到鱼雷期和子叶期^[11]。显然,去除2,4-D有利于胚的成熟。在生长素类物质中IAA对体细胞胚的分化也具有促进作用。

细胞分裂素与生长素的配合使用往往有利于体细胞胚的诱导。为了选择并增殖甘薯胚性愈伤组织,Chée等^[11]研究了BA和2,4-D的浓度组合对两类愈伤组织生长量的影响,找出了胚性愈伤组织的最佳固体和液体增殖培养基,在这些培养基中胚性愈伤组织的增殖均大于非胚性愈伤组织。BA单独使用,低浓度时促进胚性愈伤组织产生和增殖,高浓度时抑制胚性愈伤组织的产生和增殖^[3]。NAA的添加既能促进芽的形成又能促进根的萌发,能有效地促进胚向植株的转化^[12]。

其他激素及有机物在体细胞胚的诱导和发育中也起着重要作用。ABA能有效地促进体细胞胚的发生^[9]及向心形胚、鱼雷胚和子叶胚的转化^[13];TIBA的添加促进胚性愈伤组织的生长和体细胞胚的形成^[14];IAA促进体细胞胚的分化^[5];椰子汁的添加对体细胞胚的诱导也产生明显效果^[11,15]。

培养方式 固体培养和液体培养均能用于胚性愈伤组织的增殖和体细胞胚的形成,但由于外界环境的差异造成了培养物对激素和激素配比的不同要求。Chée等^[13]研究认为胚性愈伤组织在附加有10 μmol/L 2,4-D和1 μmol/L BA的固体培养基上与在附加5 μmol/L 2,4-D的液体培养基中具有相同的增殖特性。在胚的发育方面,固体培养远优于液体培养,这是因为发育到球形期以后的胚均与其结构极性相一致,而琼脂固化的培养基正好为胚的发育提供了骨架,从而促进了球形胚、向心形胚、鱼雷胚和子叶胚的转化;而液体培养则不具备这一特性,故悬浮培养产生的胚大多停滞在球形期^[9]。因而在液体培养形成球形胚后,应及时转入固体培养基上,以促使其向成熟胚方向发育,从而为人工种子的制作和植株再生奠定了基础。

其他 在继代培养中添加一定浓度的KCl有助于胚性愈伤组织增殖;在体细胞胚培养过程中适当降低氨态氮浓度,增加硝态氮浓度,有利于胚的成熟^[16]。

一般来说,初诱导的或短期培养的愈伤组织较易诱导产生体细胞胚,随着培养时间的延长和继代次数的增加,胚发生能力会逐渐下降以至消失,但若能在诱导培养基上不断进行更新培养往往能恢复胚发生能力。目前甘薯已有在固体培养基上维持34个月(8周继代1次)仍保持胚发生能力的报道^[11],这种继代培养基的成分与诱导培养基非常接近。

1.2 体细胞胚发生和植株再生的培养程序

甘薯体细胞胚发生和植株再生的培养过程可分为四步:即胚性愈伤组织的诱导、胚性

愈伤组织的增殖、体细胞胚发生和植株再生。表1表示了以甘薯茎尖分生组织为外植体完成体细胞胚发生和植株再生的具体步骤。

表1 甘薯体细胞发生和植株再生

培养项目	第一步		第二步		第三步		第四步
	胚性愈伤组织诱导		胚性愈伤组织增殖		体细胞胚形成		植株再生
培养材料	含有1~2片叶原基的生长点		第1,2步的愈伤组织		第2步的愈伤组织		第3步的胚状体
培养方式	固体		固体	液体	固体	液体	固体
培养基	MS*		MS*	MS*	MS*	MS*	MS*
接种量	0.2~1.0mm		1mg/cm ²	26mg/mL	1mg/cm ²	26mg/mL	1mg/cm ²
植物激素	22,4-D	10	10	5	0	0	0
	NAA	0	0	0	0	0	0.1
	BA	0	1	0	0	0	0
	蔗糖(%)	3	3	3	3	3	1.6
	琼脂(%)	0.6	0.6	0	0.8	0	0.8
培养条件	光照	黑暗	黑暗	黑暗	最初7d黑暗以后10h光照		10h光照
	温度(℃)	27	27	27	明期27,暗期25		明期27,暗期25
继代培养周期			8周	2周			
培养过程	4周内产生非胚性愈伤组织 8周内产生胚性愈伤组织				8d内形成球形胚, 12d内形成鱼雷胚, 21d形成成熟胚		8~14d发根 14~21d发芽

注: * MS无机盐,另加肌醇500μmol/L,烟酸10μmol/L,盐酸硫氨酸5μmol/L,盐酸吡哆醇5μmol/L。

甘薯体细胞胚发生的两种情况,一种是从外植体上直接诱导出体细胞胚;一种是先诱导产生愈伤组织,再从愈伤组织上分化出体细胞胚^[7]。

甘薯体细胞胚的发育与合子胚相似,均经过原胚期、球形期、心形期、鱼雷期和子叶期5个不同阶段^[8]。但并不是所有阶段的胚均能发育成植株。Chée 和 Cantliffe 研究表明仅鱼雷后期和子叶期的胚才能发育成植株;其他阶段的胚或仅形成根,或仅形成芽,均不能发育成完整的植株。若想发育成植株,就必须转化为成熟胚,即鱼雷后期以后的胚^[8]。

1.3 体细胞胚发生的细胞学与组织学研究

甘薯外植体诱导产生愈伤组织可分为两类:一类是胚性愈伤组织,一类是非胚性愈伤组织。二者在来源、形态等方面都存在着异同(表2),前者将来能形成体细胞胚,而后者则不能分化形成体细胞胚^[4,8]。

表2 甘薯胚性和非胚性愈伤组织的比较

愈伤组织	产生时间 (周)	愈伤组织形态					细胞形态			
		形状	生长速度	质地	颜色	比重 (g/cm ³)	直径 (μm)	形状	活性	细胞质
胚性	4	小瘤状	慢	致密	黄色不透明	1.15~1.19	25~50	球形	高	丰富
非胚性	8	匀质	快	疏松	白色半透明	1.03~1.11	75~200	长椭圆形	低	贫乏

利用液体培养基培养胚性愈伤组织,会得到各种大小不同的由胚性和非胚愈伤组织构成的细胞团。该细胞团的大小与胚的发生能力有很大关系。其中98%的胚性愈伤组织直径在55~100 μm 之间,且胚性愈伤组织越大越易进一步发育成体细胞胚,越小越易增殖,因而可通过分筛的方法将直径在355~710 μm 的部分用于胚性愈伤组织增殖,710 μm 以上的部分用于体细胞胚的形成,355 μm 以下的部分弃去^[15]。

1.4 甘薯体细胞胚的同步化和单胚化

人工种子的包埋、机械播种、萌发等都需要胚的同步化和单胚化。然而在培养时,体细胞胚的发生常表现为非同步性和胚的集合性,这就需要控制体细胞胚的同步化发育和个体胚的产生。

通过胚性愈伤组织过筛可获得不同组织单位的细胞团,其中基础胚单位为180~350 μm 、胞质化的小细胞集合体可以产生个体胚^[15]。但在液体培养中往往停滞在球形胚阶段^[9,15]。此时若将该种胚转入固化培养基上,通过调节2,4-D浓度和培养条件就有可能得到同步化的个体胚。

1.5 体细胞胚的成熟与萌发

在体细胞胚的发育中,往往停滞在不同的发育阶段,而只有3个发育时期的胚可发育成植株,即鱼雷后期胚、子叶胚和胚轴伸展的鱼雷胚^[9],这些胚通称成熟胚。因而在获得体细胞胚后,必须及时地创造条件促进胚进一步发育,使其转变为成熟胚,发育成植株。

在体细胞胚的成熟过程中,激素起着关键性作用。在培养基中加入0.1 $\mu\text{mol/L}$ NAA,胚的发芽率由17%提高到41%,植株再生率由3%提高到38%^[12]。去除2,4-D,增加硝态氮与氨态氮的比值可促进胚发育成熟^[5]。此外,BA、蔗糖等的应用均影响胚的成熟^[12]。

当胚状体发育成熟后,在合适条件下即可萌发成苗。体细胞胚的萌发有的先生根,有的先出芽,有的根芽平衡生长。一般将成熟胚转入成苗培养基上,8~14d即可发根,14~21d即可发芽,不久就长成根、茎、叶发育平衡的小植株^[12]。当再生植株长到约50cm高时,将其移入无菌的混合土中(细砂:土=1:1),在室内驯化7d,再移入温室或花盆,成苗率可达95%以上。

2 甘薯人工种子的制作

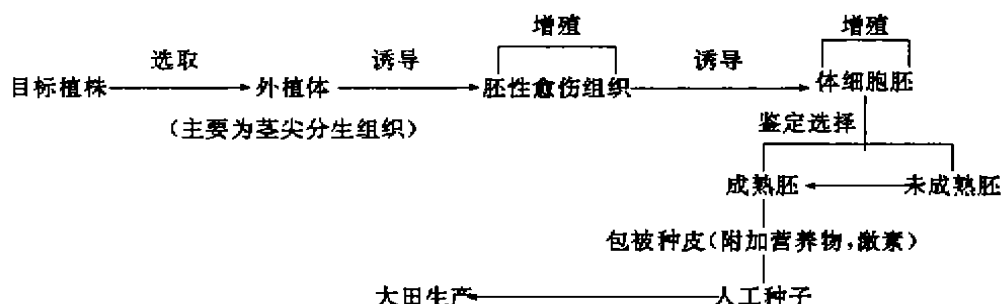
人工种子对人工种皮的基本要求包括^[10]:对体细胞胚无损害,能保护内部的体细胞胚免受冲击,具有一定的硬度,能保持胚生存所必需的水分,体细胞胚萌动后不影响胚突破种皮和胚的生长。美国佛罗里达大学的Schultheis小组测试了一些凝胶对甘薯体细胞胚的影响,在聚丙烯盐或美洲胶体中,6d内80%的胚死亡,然而体细胞胚可在纤维素羧乙基醚凝胶中成活^[13]。日本的Teijin申报了甘薯人工种子制作专利,所用的保护膜从聚乙烯脂、羧甲基纤维素、甲基纤维素、明胶和金属藻酸盐中选出。

此外,美国佛罗里达大学还开发了甘薯人工种子的流体播种法(将人工种子混合于农用凝胶中播种的方法)。他们调查了农用凝胶对体细胞胚的影响,并对几种商用胶作了比较。结果表明纤维素羧乙基醚能促进胚的正常发芽生长,在流体播种法中使用这种凝胶效果最佳。并且他们还计划向其基质中添加杀菌剂及抗生物物质,从而使其制成的人工种子具有抑制杂菌增殖和促进体胚发芽、生长的作用;为了减少氮素肥料的施用量,美国还正计

划将根瘤菌添加到甘薯人工种皮中去。

近来,我国西南师范大学和中科院植物所合作,分析了甘薯天然种子种皮的化学组成,合成了一种新的甘薯人工种皮,并成功地制作出甘薯人工种子,但未见详细报道。

概括起来,甘薯人工种子的制作和应用可采用下面的一般流程(附图)。



附图 甘薯人工种子的制作^[10]

3 结束语

由于甘薯体细胞胚的诱导和人工种子的研制起步较晚,目前虽取得不少进展,但仍存在着许多有待进一步解决的问题,要使人工种子实用化,还需要多年的努力。

1)应建立适用于所有基因型的高频体细胞胚发生和植株再生体系。至今,虽有白星、PI 8491和GaTG3等少数品种获得了体细胞胚并再生出植株,但这些品种大多生产性状不理想,这就限制了甘薯人工种子的制作和应用。所以应在白星等模式品种的基础上广泛开展目前生产上大面积推广的优良品种如徐薯18、南薯88等体细胞胚发生和植株再生的研究,并逐步探讨筛选适宜的培养条件和培养环境,以提高体细胞胚的发生频率。

2)胚的同步化和单胚化仍是急待解决的问题。目前这方面的报道,仅停留在分筛方法上,且最终效果也不理想。因而需要探讨不同的方法,如生理法、机械法等,在甘薯胚发生同步化和单胚化上的应用,以寻找出一种适用于甘薯同步胚和个体胚生产的方法。

3)甘薯人工种子制作的成败取决于胚转化率的高低。在目前的研究中,大多数体细胞胚均能发根,而芽则较难形成,因而进一步提高体细胞胚芽分化频率是保证人工种子有较高出苗率的基础。

4)人工种皮和人工胚乳的研制还需要不断探索,以适应于人工种子的贮藏、运输、加工及机械化播种的需要。

此外,甘薯是一种蔓生极易生根的营养体繁殖作物,用很小的茎尖就能在有光或无光下繁殖成苗。因而可把茎尖作为体细胞胚的类似物,外面包埋上人工胚乳和人工种皮以制作成人工种子。这样制作的人工种子,不仅避免了基因型限制,而且还大大降低了生产成本和技术要求。

参 考 文 献

- 1 张宝红,丰 峰. 甘薯组织培养名录. 植物生理学通讯, 1991; 27(3): 237~240
- 2 Tsay H S, Tseng M T. Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot Bull

- Academia Sinica*, 1979;20:117~122
- 3 Jarret R L, Salazar S, Fernandez Z R. Somatic embryogenesis in sweet potato. *Hort Science*, 1984; 19:397~398
 - 4 Liu J R, Cantliffe D J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of sweet potato. *Plant Cell Reports*, 1984; 3:112~115
 - 5 蔡新声, 赖本智, 陈良乐. 甘薯花药、茎段及块根愈伤组织之器官形成. *中华农业研究*, 1982; 31(3):191~198
 - 6 Tsay H S, Lai P C, Chen L J. Organ regeneration from anther callus of sweet potato. *J Agric Res China*, 1982; 31(2):122~126
 - 7 Xin S Y. Somatic embryogenesis from the explant of sweet potato. In: You C B, Chen Z L. *Agricultural Biotechnology*. Beijing: China Science and Technology Press, 1992; 650~652
 - 8 Chée R P, Cantliffe D J. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1988; 24(9):955~958
 - 9 Chée R P, Cantliffe D J. Embryo development from discrete cell aggregates in *Ipomoea batatas* Lam. in response to structural polarity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1989; 25(8):757~760
 - 10 谈峰, 李坤培. 甘薯体细胞胚的发生和植株再生. *植物生理学通讯*, 1992; 28(1):67~71
 - 11 Chée R P, Cantliffe D J. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1988; 15:149~159
 - 12 Chée R P, Cantliffe D J. Plant recovery from sweet potato somatic embryos. *Hort Science*, 1990; 25(7):795~797
 - 13 Cantliffe D J. Development of sweet artificial seeds of Sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. in: Smith W H, Frank J R. *Methane from biomass: A systems approach*, Elsevier, New York, 1988; 183~195
 - 14 Chée R P, Cantliffe D J. Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,3,5-trilodobenzoic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cultured in vitro. *J Plant Physiol*, 1989; 135:398~403
 - 15 Chée R P, Cantliffe D J. Composition of embryogenic liquid cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized from cell aggregate suspensions. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1989; 17:25~28
 - 16 张宝红, 谈峰. 人工种子研究现状. *中国农学通报*, 1991; 7(3):25~28
 - 17 Liu J R, Cantliffe D J, Simonds S C *et al.* High frequency somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem domes of sweet potato. *SABRAO Journal*, 1989; 21(2):93~101
 - 18 张宝红. 植物组织培养在甘薯上的应用现状. *中国甘薯*, 1990; 4:8~13

Somatic Embryogenesis of Sweet Potato and Production of Artificial Seeds

Zhang Baohong Feng Rong

(Institute of Cotton, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan, China, 455112)

Abstract The paper reviews the sweet potato somatic embryogenesis, somatic embryos maturation, germination and plant regeneration; cytological observation and the production of sweet potato artificial seeds, and also, the paper points out the present existing problems in biotechniques and presents a look ahead of the future developing direction.

Key words sweet potato, embryogenesis, plant regeneration, artificial seeds