

芫荽人工种子制作的研究

陈柔如 张江涛 李宝平 郭双生 郝建平 周小梅

(山西大学生物系, 太原)

本文进行了芫荽愈伤组织、胚状体诱导条件的研究和体细胞胚的包埋、萌发以及幼苗移栽等过程的初步试验。在无菌条件下, 人工种子的成苗率达82%, 移栽到土壤中的成活率达83%以上。

关键词 芫荽; 人工种子

人工种子是一项新兴的生物工程技术, 是当前体细胞胚胎学、遗传学以及植物生理学领域中的一项重要研究课题。它是通过在植物离体培养中产生的成熟胚状体包在有机化合物作为提供营养和保护作用的“种皮”内, 使之成为相似于天然种子的一种结构。

人工种子的提出最早始于70年代^[1,2]。1984年, Kitto首次制作出了胡萝卜的人工种子, 但存活率很低^[3]。之后, Redenbaugh等通过用藻酸盐包裹体细胞胚, 才成功地制出了芹菜和苜蓿的人工种子, 并使成苗率大为提高^[4-6]。在国内, 金冀毅等进行了芹菜人工种子的研究^[7], 李修庆^[8]建立了胡萝卜人工种子的基本制作流程, 桂耀林^[15]等研究了黄连体细胞的胚胎发生并制出了人工种子。

我们以芫荽 (*Coriandrum sativum* L.) 为材料, 进行了人工种子制作的研究。

材料与方 法

(一) 供试材料

取生长在温室中的芫荽幼苗的茎作为供试材料。将材料用自来水冲洗几遍, 放入75%酒精中浸泡30s, 再用10%次氯酸

钠消毒15min, 最后用无菌水冲洗3次。

(二) 诱导培养基

诱导愈伤组织的基本培养基为MS^[14], 附加激素分别为: 1. 2,4-D 1.0mg/L; 2. NAA 1.0mg/L; 3. 2,4-D 1.0mg/L + KT 0.5mg/L; 4. NAA 2.0mg/L + KT 0.5mg/L。

(三) 分化培养基和分化条件

愈伤组织在诱导培养基上继代2—3次后, 转至分化培养基上诱导胚状体。分化培养基为MS+NAA 1.0mg/L+3%蔗糖+酪朊水解物(CH)2000mg/L, 分固体和液体两种。液体培养在摇床(70r/min)上进行; 固体培养, 光照2000lx, 每日光照12h, 温度25±2℃。

(四) 包埋剂

人工种子的包埋剂为3%海藻酸钠, 用2%CaCl₂·2H₂O固化, 二者均用1/2MS溶液配制。先将成熟的胚状体与包埋剂相混合, 然后用吸管吸取胚状体并逐一滴入固化液中, 待固化成形后用无菌水冲洗2次, 即得到人工种子。

(五) 萌发基质

人工种子的萌发基质分别为1/2MS

本文于1990年3月20日收到。

(含 3% 蔗糖)固体培养基、湿润滤纸和蛭石,待萌发长出的幼苗达 5cm 高时移栽至带土的花盆中。

本试验所有培养基、包埋剂、固化液及无菌蒸馏水均用高压消毒锅灭菌(121℃, 20min),操作过程均在无菌状态下进行。

试 验 结 果

(一) 愈伤组织的诱导及体细胞胚的产生

本试验设计的 4 种诱导培养基均能诱导出芫荽的愈伤组织(表 1),但诱导率及愈伤组织的质地结构则因诱导培养基中激素成分的不同而有所差异。由结果可见,2,4-D 的诱导效果不及 NAA,生长素类与细胞分裂素类配合使用比单独施加生长素类的诱导效果要好。从愈伤组织的质地状态来看,在仅含 2,4-D 的培养基上,其愈伤组织呈紧密的白色颗粒状结构,经 2—3 次继代培养便发育成为颗粒状的胚性愈伤

表 1 激素对芫荽愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effect of phytohormone on callus induction of coriander calli

激素成分 Hormone composition (mg/L)	外植体数 Nos. of explants	愈伤组织数 Nos. of callus	诱导率 Induction rate(%)
2,4-D 1.0	47	18	38.3
NAA 1.0	45	20	44.4
2,4-D 1.0 + KT 0.5	48	23	47.9
NAA 2.0 + KT 0.5	45	24	53.3

表中数字为 3 次重复的平均数

Numbers in the table are the average value of three replicates

组织,将其转移到分化培养基或不含 2,4-D 的 MS 固体培养基上,便依次发育成球形胚(图版 I-1)、心形胚(图版 I-2)、鱼雷形胚(图版 I-3)在大约 20 天左右就形成了大量的成熟胚状体(图版 I-4,5)。

在仅含有 NAA 的培养基上诱导出的愈伤组织为淡黄色较为松散的颗粒状结构,转至分化培养基上,则可通过胚状体途径直接分化出苗。而在含有较高浓度 NAA 与 KT 的培养基上,形成浅绿色松散结构的愈伤组织,不能分化形成胚状体。在含 2,4-D 与 KT 的培养基上,愈伤组织呈坚硬的块状,在分化培养基上虽能形成胚状体,但数量很少。

在芫荽体细胞胚胎发育过程中,去掉 2,4-D 是完全必要的。当 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 时,则完全抑制了成熟体细胞胚的形成(表 2)。

有机添加物对芫荽体细胞胚的发育也有显著的影响。添加一定量的酪朊水解物对体细胞胚的发育有极为明显的促进作用,其中以每升培养基加入 1500—2000mg 的效果最好,过多反而使体细胞胚的数量呈下降趋势(表 3)。

表 2 2,4-D 对芫荽成熟体细胞胚形成的影响
Table 2 Effect of 2,4-D on the formation of mature somatic embryos

2,4-D 浓度 2,4-D concentration(mg/L)	成熟体细胞胚的数目 Nos. of mature somatic embryos	相对百分比 Relative percentage (%)
0	280	100.0
0.1	160	57.1
0.5	40	14.3
1.0	0	0

基本培养基为 MS, 附加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂

The basic medium is MS + 3% sucrose + 0.8% agar
表 2、3、4 中的数字为每克愈伤组织中成熟胚状体 3 次重复的平均数

The number of mature somatic embryos in callus per grame is an average of three replicates in Table 2, 3 and 4.

碳水化合物对芫荽体细胞胚的形成和发育也有一定的影响(表 4)。3% 蔗糖含量最适于芫荽成熟体细胞胚的形成,过高或过低都有一定的抑制作用,其中浓度过高的抑制效应尤为明显。

表 3 酪蛋白水解物对芜菁体细胞胚发育的影响
Table 3 Effect of casein hydrolysate on the developmet of mature somatic embryos

酪蛋白水解物含量 Casein hydroly- sate concentra- tion (mg/L)	成熟体细胞胚的数目 Nos. of mature somatic embryos	相对百分比 Relative value (%)
0	80	100.0
500	181	225.0
1000	262	327.5
1500		482.5
2000	32	540.0
3000	240	300.0
5000	156	195.0

基本培养基为MS，附加3%蔗糖，NAA1.0mg/L和0.8%琼脂

The basic medium is MS+3% sucrose+NAA 1.0mg/l+0.8% agar

表 4 蔗糖对芜菁成熟体细胞胚形成的影响
Table 4 Effect of sucrose on the formation of mature somatic embryos

蔗糖含量 Sucrose con- centration (%)	成熟体细胞胚数目 Nos. of mature somatic embryos	相对百分比 Relative value (%)
1.0	280	100.0
3.0	320	177.8
5.0	126	45.0
7.0	36	12.9
9.0	26	9.3
10.0	20	7.1

基本培养基为MS，附加NAA1.0mg/L、琼脂0.8%

The basic medium is MS+NAA1.0mg/l+0.8% agar

(二) 胚状体的包埋

在固体分化培养基上产生的正常成熟胚状体，可挑出直接进行人工种子的制作；而在悬浮培养中形成的成熟胚状体，则先用18目的不锈钢丝网过滤，除去大的愈伤组织块，用长度约2mm的成熟胚状体进行包埋。包埋球在固化液(2%CaCl₂·2H₂O)中停留约20—30min。

在固体培养基上，每克愈伤组织可形成400—500个成熟胚状体，其中绝大多数发育正常，可供包埋用。用液体悬浮的方法，每瓶(50ml悬浮液)能产生1500左右的成熟体细胞胚，但许多胚状体呈玻璃化状态，包埋后不能正常萌发成苗。

(三) 人工种子的播种、萌发及幼苗的移栽

在三种基质中，播种在1/2MS固体培养基上的人工种子萌发情况最好，达86%以上(图版I-7,8)；在湿润滤纸上的萌发率为62%，而播种在湿润蛭石中的人工种子萌发情况最差，只有2%。这一方面是由于许多人工种子被污染丧失萌发能力，另一方面可能是通气不良使呼吸作用被抑制所致。此外，种子存放的时间对萌发率也有影响，在4℃冰箱中存放一段时间后，许多人工种子内的胚变褐丧失萌发能力，这可能也是由于“种皮”透气性不好，导致长时间无氧呼吸的结果。表5列出了萌发率与人工种子存放时间的关系。

表 5 人工种子存放(4℃下)时间对萌发的影响
Table 5 Effect of storage time (4℃) on germination of artificial seeds

存放天数 Days	播 种 数 Nos. of sowing		萌 发 数 Nos. of germination		萌 发 率 Germination rate(%)	
	1/2MS培养基 On 1/2MS medium	滤 纸 On filter paper	1/2MS培养基 On 1/2MS medium	滤 纸 On filter paper	1/2MS培养基 On 1/2MS medium	滤 纸 On filter paper
1	200	69	164	41	80.2	59.4
10	220	83	156	38	70.9	45.8
20	60	57	39	23	65.0	40.4

鉴于人工种子的“种皮”有天然种子胚乳的作用,我们尝试了在包埋剂中加入一定量的糖来作为胚的营养。结果表明,加入糖不能提高胚的生活力,相反,它对人工种子的萌发还稍有抑制作用(表6)。人工种子萌发后,基本上都能形成正常的幼苗。

表 6 在包埋剂中加入糖对芫荽人工种子萌发的影响

Table 6 Effect of sugar in encapsulating agents on germination of artificial seeds of coriander

蔗糖 Sucrose 浓度Conc. (%)	葡萄糖 Glucose	播种数 Nos. of sowing	萌发数 Nos. of germination	萌发率 Germination rate (%)
0		74	64	86.5
3		94	64	68.1
	3	73	39	53.4
3	3	74	41	55.4
3	6	74	51	68.9

表中数字为3次重复的平均数

Numbers in the table are the average value of three replicates

当幼苗长到约5cm高时,移栽到温室里带土的花盆中,刚移栽的苗必须保持足够的湿度。本试验中,幼苗移栽后的成活率为83%(图版I-9)

讨 论

芫荽愈伤组织发生胚性细胞必须要有生长素物质的存在,但高浓度的2,4-D又会阻碍球形胚以后各阶段的发育。因此,只有降低2,4-D浓度或完全去掉,才能使得胚状体正常发育。这一点与大多数植物相同,如胡萝卜^[9]、甘蔗^[10]、芹菜^[7]等。芫荽在只含有NAA的培养基中,愈伤组织也可以依次经过球形胚、心形胚、鱼雷形胚,最后发育为成熟的胚状体,这一点又与甘蔗等植物不同^[10-12]。激动素对芫荽体细胞胚的形成似乎是多余的,

在含有KT培养基上产生的成熟胚状体数远不如不含KT培养基上的多,这与大多数植物的情况相反。激素对植物体细胞胚胎发生的影响是一个十分重要而又复杂的问题,不同植物对激素的反应是不尽相同的,这方面的问题仍需进一步的研究探讨。

对于获得正常的成熟胚状体,固体培养和悬浮培养各有利弊。液体悬浮培养的的优点是一次可得到大量的胚状体,但是许多胚状体呈现玻璃化状态,同时容易增大体细胞无性系变异,形成不正常胚^[8]。Gray^[13]和金冀毅等^[7]用干燥体细胞胚的方法,部分地提高了体细胞胚长成植株的能力,同时大幅度地提高了胚在贮存时的生活力。固体培养基上产生的多为健壮正常的胚状体,Redenbaugh等^[6]曾直接用手工从琼脂培养基上挑选成熟健壮的胚来制种。但用此方法得到的胚状体数量少,不利于大量人工种子的制作。我们认为,人工种子的研究目的是为了得到大量正常的植株,因此培养大量正常健壮的胚状体是人工种子制作的前提,这是今后一个值得认真研究探讨的问题。

用海藻酸钠作为胚的包埋剂是由Redenbaugh等首创的。用这种包埋剂制出的人工种子,只能在无菌条件下很好地萌发,并且极易失水而干枯死亡,只有在琼脂培养基上,人工种子才能很好地萌发成苗。同时,由于海藻酸钙的通气性差,抑制了胚的呼吸,不利于长时间的保存。我们曾尝试了其他几种物质(如琼脂糖、Gel-rite、氨基甲酸乙酯等)作为包埋剂,但在操作和结果上均不理想。此外,包埋剂中其他物质的加入也是很必要的,金冀毅等^[7]认为,碳源对于包埋后胚的萌发是必需的。而在我们的工作中,包埋剂中加入糖后对芫荽胚的萌发不仅没有促进作用,而且不同程度地抑制了胚的萌发,这

可能是播种基质(1/2MS + 3% 蔗糖)中的糖与包埋剂中的糖造成过高渗透压使得胚吸水困难的缘故。总之, 对于包埋剂的种

类和包埋剂中必要营养成分的研究还需不断地深入, 以期使人工种子尽快用于生产。

参 考 文 献

- [1] Murashige, T., *Acta. Hort. Sci.*, 78:17—30, 1977.
- [2] Kitto, S. and Janick, S., *Hort. Sci.*, 17:448, (Abst), 1981.
- [3] Kitto, S., Ph. D. Thesis, Purdue University, West Lafayette, Ind., 1984.
- [4] Redenbaugh, K. et al., *In Vitro*, 20:256—257, (Abst)1984.
- [5] Redenbaugh, K. et al., *Biotech.*, 4:797—801, 1986.
- [6] Redenbaugh, K. et al., Scale-up: Artificial Seeds, In *Plant Tissue and Cell Culture* (C.E. Green et al. eds), Liss, New York, pp. 473—493, 1987.
- [7] 金冀毅, 郭仲琛: 植物细胞工程应用基础研究新进展(中国科学院植物研究所, 兰州大学生物系主编), pp. 84—89, 1988.
- [8] 李修庆: 植物学报, 31(9):873—877, 1989.
- [9] Halperin, W., In Padykula(ed) *Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes*, Symp. Intl. Soc. Cell Biol., 3:189—191, 1970.
- [10] Ahloowalia, B. S. and Maretzki, A., *Plant Cell Reports*, 2:21—25, 1983.
- [11] 周俊彦: 植物生理学报, 7:388—391, 1981.
- [12] 桂耀林等: 植物学报, 24(3):218—221, 1982.
- [13] Gray, D. J., *Hort Science*, 25(5):810—814, 1987.
- [14] Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant*, 15:473—497, 1962.
- [15] 桂耀林等: 植物学报, 31(12):923—927, 1989.

A Study on the Production of Artificial Seeds of Coriander

Chen Rouru Zhang Jiangtao Li Baoping

Guo Shuangsheng Hao Jianping Zhou Xiaomei

(Department of Biology, Shanxi University, Taiyuan)

Artificial seeds of coriander were produced by the procedure including callus and somatic embryo formation, and embryo encapsulation. The germination capacity of the artificial seeds under sterile conditions reached 82%, and the survival rate of the seedlings reached 83% after they were transplanted into soil.

Key words

Coriander; artificial seeds

图 版 说 明

Explanation of Plate I

1. 球形胚Globular embryoid; 2. 心形胚Heart-shapet embryoid; 3. 鱼雷形胚Torpedo-shaped embryoid; 4、5. 用于制作人工种子的发育正常的子叶期胚Normal embryoid with cotyledon used for artificial seeds; 6. 芫荽的人工种子 Artificial seeds of coriander; 7、8. 人工种子在无菌条件下萌长成小植株Plantlet emerged from artificial seeds of coriander; 9. 移栽到温室花盆中的芫荽人工种子植株 Plant grown up from artificial seeds of coriander after transplanted into the flower pot in the greenhouse

