

柑桔胚的人工培养

王大元 张进仁

(中国农业科学院柑桔研究所)

摘 要

为了提高柑桔杂交育种效率和探讨胚培养在柑桔生产上应用的可能性,我们研究了锦橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) × 枳 (*Poncirus trifoliata* Raf.) 的杂交种子胚培养技术。证明:怀特 (White) 培养基+IAA (1ppm)+CH (600ppm) 和 MT 培养基 +GA (1ppm) 能使第五个小胚 (E 胚) 萌发成苗;在 MT 培养基+2,4-D (0.7ppm)+BA (0.23ppm) 上,有些胚先形成愈伤组织,然后从原有的胚中生根出苗。将此愈伤组织切下,移入含 BA (5ppm) 和 IAA (1ppm) 的 MT 培养基中,则能出芽成茎,但不能形成根。再移入只含 NAA (1ppm) 的 MT 培养基中,则能分化出根,形成完整的小植株。为研究合子胚分布和克服珠心胚干扰杂交育种工作提供了合适的技术。

一、为什么搞柑桔胚的人工培养

柑桔是我国南方地区盛产的名贵水果之一。随着国内广大劳动人民的生活和对外贸易的需要,对柑桔的需求量也在不断增加。生产上迫切需要培育出早熟、高产、优质的柑桔新品种,可是,柑桔属广泛存在珠心多胚现象,严重干扰了杂交育种工作。那么如何才能克服珠心胚的干扰而快速培育柑桔新品种呢?毛主席教导我们:“**你要有知识,你就得参加变革现实的实践。你要知道梨子的滋味,你就得变革梨子,亲口吃一吃。……你要知道革命的理论和方法,你就得参加革命。一切真知都是从直接经验发源的。**”毛主席的指示给我们指明了前进的方向。我们为了提高柑桔杂交育种的效率和探讨胚培养在柑桔生产上应用的可能性,于1973年开始进行了这方面的研究工作。

二、我们是如何进行柑桔胚人工培养工作的

根据前人的工作来看,杂种胚比珠心胚生长分化能力弱,不易成苗。因此我们采用柑桔胚人工培养法来解决未分化或发育不良的小胚发育成幼苗的问题。柑桔小胚发育也有它的规律,只有掌握了它生长、发育的规律,并给予一定的条件,才能促使小胚逐渐发育成苗。列宁教导我们说:“**要真正地认识对象,就必须把握和研究它的一切方面、一切联系和‘媒介’。**”我们研究了可能影响柑桔小胚发育的几种条件。例如:培养基、光照、温度以及培养基的pH等。

我们使用的基本培养基有两种:(1)改良的怀特(White)培养基的无机盐、维生素;(2)MT培养基的无机盐、维生素。但怀特培养基中的铁盐改为 EDTA-Fe。在这两种基本培养基中根据试验设计,分别以单独或混合加入 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素(GA)(于基本培养基高压消毒后加入)、*N*⁶-苄基腺嘌呤(BA)和酪蛋白水解物(CH)

等生理活性物质。蔗糖浓度 5%，琼脂 1%，15 磅/吋² 消毒 15 分钟，消毒前 pH 调至 5.8。培养时温度控制在 26—30℃，光照强度为 2000 勒克司(萤光灯)，每日照光 16 小时。

实验采用多胚的锦橙为母本，枳为父本，按常规程序进行人工杂交。杂交种子的胚最多是 10 个，最少是 1 个，平均胚数 5.1。枳的三叶对锦橙的单叶是显性，因此用以指示后代是否为合子胚的苗。果实成熟后，在无菌条件下取出种子，用 0.1% 的升汞水浸泡 3 分钟，然后用无菌水洗两次，剥开种皮，分胚(带子叶)接种于培养基中(太小的胚在解剖镜下挑出)，并依胚的大小依次将其编号为 A、B、C、D……。各级胚的大小范围和特征见表 1。其中 C 以下的小胚大多子叶小而薄，呈淡绿色，个别小胚子叶还未分化，呈心形幼胚，因此这些小胚实际上是发育不良、没有成熟的幼胚。

实验结果，发现两种基本培养基上除 A 和 B 两个大胚能生根成苗外，C 以下的小胚基本上不能萌发成苗。但下列三种培养基对小胚的萌发或生长成苗都有显著的促进作用。

(1) 怀特基本培养基 + IAA(1 ppm) + CH(600 ppm);

(2) MT 基本培养基 + GA(1 ppm);

(3) MT 基本培养基 + 2,4-D(0.7 ppm) + BA(0.23 ppm)。

在培养基 (1) 上，C—E 的小胚大多都能发育为比较粗壮的根和苗，移入土中后大多都能成活，大胚(A 和 B 胚)的侧根也发生得比较多(表 1; 图版 I, 图 1)。在培养基(2)上，F 胚也能得到一定程度的萌发，并且生根成苗，但小植株比较细弱纤长。在这种培养基上大胚也有侧根发生(图版 I, 图 2)。

表 1 怀特培养基+IAA+CH 和 MT 培养基 +GA 对胚萌发的影响

培 养 基 记 载 项 目		胚的编号							
		A	B	C	D	E	F	G	H
		胚的大小 (毫米)							
		7—10	4.5—8	3—6.2	2—4.2	1.2—3	0.8—2.1	1 以下	1 以下
		子叶颜色		浅 绿			浅黄绿	浅 黄	
White+IAA+CH	胚的数目	20	19	19	16	13	8	2	1
	成苗数	20	19	17	10	6	2	1	0
	杂交苗	1	1	4	0	0	0	0	0
MT+GA	胚的数目	10	10	10	10	8	5	2	1
	成苗数	10	9	10	6	6	2	0	0
	杂交苗	1	1	0	0	0	0	0	0
总 计	胚的数目	30	29	29	26	21	13	4	2
	成苗数	30	28	27	16	12	4	1	0
	杂交苗	2	2	4	0	0	0	0	0
	杂交苗 %	6.6	7.1	15	—	—	—	—	—

在培养基(1)和培养基(2)上培养的 30 个种子共有 154 个胚，其中有 118 个胚萌发成苗。这 118 个胚中有 8 个是合子胚，它们都萌发为具有父本三叶特征的合子胚的苗(图版 I, 图 7)，也就是说合子胚约占总胚数的 7% 左右，珠心胚约占 93%。在此 30 个种子中有 5 个种子胚的数目较少，我们将这 5 个种子的所有胚都诱导成苗，未发现合子胚苗，因此可以看出至少有些锦橙 × 枳的杂交种子是不含合子胚的。

在培养(3)上, 胚的发育则以完全不同的方式进行。培养 30 天后, 从 A—F 各胚, 陆续产生大量淡黄色, 质地疏松的愈伤组织(子叶上没有发生愈伤组织)。有些胚在产生了愈伤组织后即停止发育, 有些胚虽然产生了愈伤组织, 仍能正常分化, 生长成苗(图版 I, 图 3)。但培养基中再加入 1 ppm 的 GA 以后, 首先是子叶迅速膨大, 然后再从胚发生愈伤组织。此种愈伤组织培养 60 余天后, 虽然可从原有的胚上生根 10 余条, 但不能成苗(图版 I, 图 4)。将上述愈伤组织切下(不带原来的胚), 转入 MT+BA (2—5ppm)+IAA (0.5—1 ppm) 的培养基中培养 50—60 天后, 愈伤组织转绿, 每块愈伤组织上出现一些绿色的“胚状体”。这些“胚状体”进而出芽, 生长出 2 个以上的嫩茎。继续培养并不能分化出根(图版 I, 图 5)。但再转入 MT+NAA (1ppm) 的培养基中培养 20—30 天后, 即可分化出根, 形成完整的小植株(图版 I, 图 6), 由于此组处理在转移过程中大多污染, 虽然观察到 E 胚有三叶苗, 也未统计到表 1 之中。

三、我们的看法

目前关于克服珠心胚干扰杂交育种的研究工作大体上有如下几个方面: (1) 在珠心胚发生之前, 早期培养幼合子胚, Rangan^[8] 报道说, 已在酸橙(*Citrus aurantium* L.) 中获得成功。但据我们对锦橙 × 枳胚珠的观察, 授粉后 70—80 天, 在 100 倍解剖镜下能观察到幼胚时, 胚囊内已有 20 余个球形原胚, 并无 Rangan 所指出的合子胚在胚囊内单独存在的阶段。Kochba^[5] 亦报道, 在 Shamouti 甜橙中, 珠心胚比合子胚先发育。因此 Rangan 的方法似无普遍意义。(2) 利用气相色谱和红外光谱分析叶油^[4]、皮油^[9], 从而区分鉴别杂交苗。此项研究尚处于探索阶段。(3) 将一些无害的显性特征(如刺的有无) 作为父本进行杂交^[10]。(4) 柑桔品种间的多胚性有很大差异, 因此可以用单胚品种作母本, 绕过珠心胚的干扰。但这样做并未看正解决多胚品种间的杂交育种问题^[3]。(5) 渡边^[1]用 H³ 标记的胸腺嘧啶标记金柑 (*Citrus japonica*) 的花粉, 然后进行人工自花授粉, 发现 40% 的种子有放射性, 而这些放射性大多位于 C 胚和 D 胚。渡边的同位素标记工作对识别合子胚可能提供了有效的手段。进一步要解决的问题是把被同位素标记了的小胚培育成苗。我们认为将他们的同位素标记技术和我们培养小胚的技术结合起来, 有可能成为克服珠心胚对杂交育种的干扰, 提高杂交育种效率的手段之一。

另外, 从柑桔受精后的珠心组织^[7,8]和未受精的胚珠^[2,5]直接诱导植株进行无性繁殖已有报道。用芽或种子作为辐射育种的材料常常产生在生产上是不利的嵌合体, 为了避免嵌合体的产生, 也有人利用柑桔胚珠产生的愈伤组织进行辐射处理, 进而将此愈伤组织诱导成苗^[6,11]。我们在培养基(3)上诱导的愈伤组织能够进而分化成完整的植株。这将作为我们应用于柑桔无性繁殖和突变育种深入研究的试验材料。我们相信经过广大群众和科研人员的深入实验和研究, 一定能够克服珠心胚对杂交育种的干扰, 从而提高杂交育种效率, 并且逐步创造出新品种而应用于生产。

参 考 文 献

- [1] 渡边 洋、山县弘忠、赤藤克己, 1970, カンキツ类の多胚現象に関する育種学的研究, II. ³H 标识花粉による受精胚の识别。 *Japan. J. Breeding*, 20 (3): 141—145。
- [2] Button, J. and C. H. Borman, 1971: Development of nucellar plants from unfertilized ovules

- of Washington navel orange through tissue culture. *Citrus Grower and Sub-tropical Fruit Journal*, 1971 (453): 11—14.
- [3] Frost, H. B. and R. K. Soost, 1968: Seed reproduction: development of gametes and embryos. Chap. 4, in *The Citrus Industry* rev. ed. Vol. II. Univ. of California, Division of Agric. Sciences.
- [4] Kesterson, Jw., A. P. Pieringer, G. F. Edwards and R. Hendrickson, 1964: Application of gas-liquid chromatograph to the Citrus leaf oils for the identification of kinds of citrus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 84:199—203.
- [5] Kochba, J., P. Spiegel-Roy and Hannah Safrah, 1972: Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. *Planta*, 106:237—245.
- [6] Kochba, J. and P. Spiegel-Roy, 1973: Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenzüchtg*, 69:156—162.
- [7] Ranga Swamy, N. S., 1961: Experimental studies on female reproductive structure of Citrus microcarpa. Bunge. *Phytomorphology*. 11:109—127.
- [8] Rangan, T. S., T. Murashige and W. P. Bitters, 1969: In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in Citrus. *Proc. Ist. Int. Citrus. sym.*, 1:225—229.
- [9] Scora, R. W., J. W. Cameron and A. B. England, 1968: Rind oil Components of intergeneric *Citrus-Poncirus* hybrids and their parents. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 92:221—226.
- [10] Spiegel-Roy, P. and A. H. Teich, 1972: Thern as a possible genetic marker to distinguish zygotic from nucellar seedlings in citrus. *Euphytica*, 21:534—537.
- [11] Spiegel-Roy, P. and J. Kochba, 1973: Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. *Radiation Botany*, 13(2):97—103.

ARTIFICIAL CULTURE OF EMBRYO IN CITRUS

WANG TA-YUNG AND CHANG CHIN-JEN

(*Institute of Citrus, Academy of Agricultural Sciences*)

ABSTRACT

In an attempt to promote the efficiency in citrus breeding and estimate the possibility of embryo culture applied to citrus production, we carried out the culture technique in the hybrid embryos (*Citrus sinensis* Osbeek × *Poncirus trifoliata* Raf.). The results are summarized as follows:

The fifth small embryos of the hybrid developed into seedlings on White's medium containing IAA (1 ppm) and CH (600 ppm) and on the MT medium containing GA (1 ppm), but some of these embryos cultured on the MT medium containing 2,4-D (0.7 ppm) and BA (0.23 ppm) produced callus at first, and formed roots and plantlets from the original embryos later on. When the callus tissues excised from the embryos were transferred into the MT medium supplemented with BA (5 ppm) and IAA (1 ppm), they produced buds and developed into shoots, but no root was formed. When they were again transferred into a medium containing NAA (1 ppm) only, they could form roots and they developed into perfect plantlets as well.

According to these studies it seems practical that the embryo culture technique could be used to study the distribution of zygote embryos and to overcome the interference of nucellus embryos in citrus breeding.

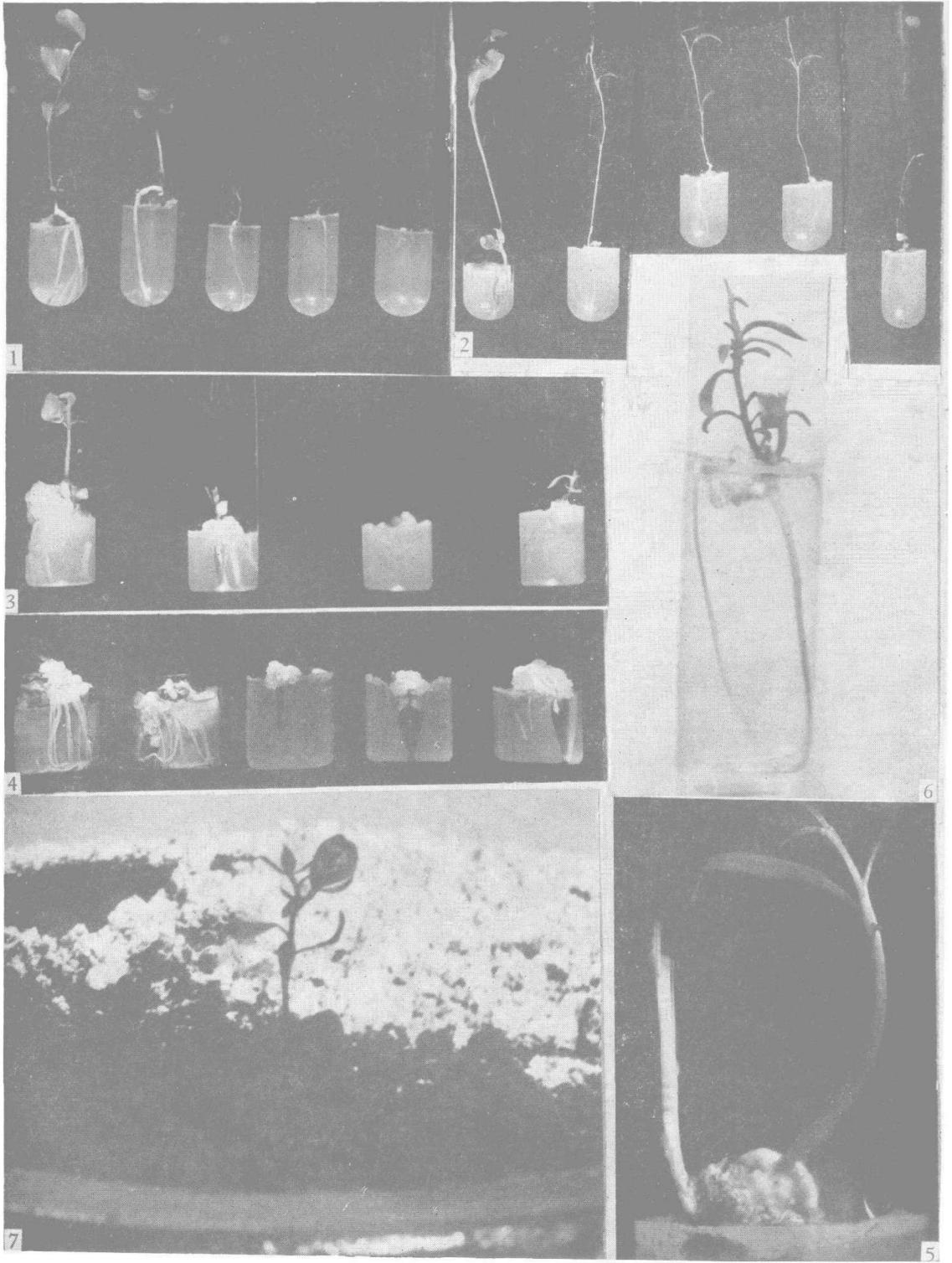


图1. 在 White+IAA(1ppm)+CH(600ppm) 培养基上培养 40 天后,自左至右依次为 A、B、C、D、E 各胚 ($\times 0.4$); 图2. 在 MT+GA(1ppm)的培养基上培养 40 天后,自左至右为 A、B、C、D、E 各胚 ($\times 1/3$); 图3. 在 MT+2,4-D(0.7ppm)+BA(0.23ppm)培养基上培养 60 天,自左至右为 C、D、E、F 各胚 ($\times 0.5$); 图4. 在 MT+2,4-D(0.7ppm)+BA(0.23ppm)+GA(1ppm)培养基上培养 60 天,自左至右为 A、B、C、D、E、F 各胚 ($\times 0.6$); 图5. 将愈伤组织转移到含 BA 和 IAA 的 MT 培养基上 70 天,长苗不发根 ($\times 2.2$); 图6. 将无根的幼苗转入只含 NAA(1ppm)的 MT 培养基上 30 天后分化出根(原大); 图7. 转入土中,具有父本三叶特点的合子胚苗(原大)。