

用组织培养法繁殖柑桔¹⁾

王大元 张进仁

(中国农业科学院柑桔研究所)

继代培养了两年半的锦橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) × 枳 (*Poncirus trifoliata* Raf.) 无性胚的愈伤组织通过下列三个阶段恢复了分化植株的能力: (1)在 N₆ 培养基 + BA(0.25ppm) + NAA(0.1 ppm) + ME(1,000 ppm) 上形成芽原基; (2)在 1/2 MT 培养基 + BA(5 ppm) + IAA(0.5ppm) + CH(500ppm) 上芽原基分化为茎芽,进而形成茎; (3)将带叶的小茎扦插于 MT 培养基 + NAA(1ppm) 上,诱导生根,形成完整的小植株。根尖染色体检查,初步证明这些小植株是 $2n = 18$ 的二倍体。

良种的快速繁殖是植物育种工作中的一个重要环节。柑桔类果树由于童期(juvenile)长、珠心胚的干扰等原因,给柑桔育种工作带来很大困难,选育出一个优良的柑桔品种殊非易事。选育出的优良品种往往只有一个单株或单枝,而生产上需要的却是千百万株良种苗木,这是常规的繁殖方法在短期内无法满足的。因此,如何将新选育出的优良柑桔品种快速推广到生产中去则成为柑桔育种工作中的一个重要问题。

利用组织培养法作为作物良种快速繁殖的方法 Murashige 已有评述^[16]。这方面的工作归纳起来有两种方式:一种是通过茎尖培养,使茎原基不断增加,加大繁殖系数,如兰花^[17]、菊花^[6]、花椰菜^[6]、石刁柏^[15]、菠萝^[13]及苹果^[10];另一种是诱导植物的某一器官或组织产生愈伤组织,然后将愈伤组织定期分割,继代培养,使愈伤组织的数量以几何级数的方式增加,最后再将其分化为植株,如风信子^[9]。但如用通过愈伤组织的增殖再诱导分化为植株的方式作为良种快速繁殖的手段,我们认为,技术上至少要解决以下四个问题: (1)愈伤组织形成后能继代培养而不退化; (2)继代培养的愈伤组织仍能保持较高的植株分化率; (3)这样分化出来的小植株其染色体的倍数性及其它性状没有发生变化; (4)移到土中的成活率较高。本文主要报道我们用柑桔为试材对前面三个问题的研究结果。

材料和方法

用我们已报道过的锦橙 × 枳无性胚愈伤组织作为起始培养物^[1],此愈伤组织已继代培养了两年半。另外又用继代培养了一年半的柳橙(*C. sinensis* Osbeck)胚的愈伤组织作补充试验。经过初步试验,确定了愈伤组织继代培养的适宜条件是在 MT 培养基 + 2,4-D(1ppm) + BA(0.25ppm) 上暗培养。每隔 4—12 周继代一次,每次切割成 8—12 小块。

愈伤组织的分化 所用的基本培养基有 MT、White 和 N₆^[12] 三种。在基本培养基中单独或综合加入的生理活性物质有各种浓度的 N⁶-苄胺嘌呤(BA)、赤霉素(GA)、 α -萘乙

本文于 1977 年 10 月 12 日收到。

1) 本文承北京大学生物系朱激同志提出宝贵意见,特此致谢。

酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、酪蛋白水解物(CH)、麦芽提取物(ME)等。ME按啤酒厂的方法自制,GA和ME均用 0.45μ 的微孔滤膜过滤除菌。

除本文中已指出外,所有培养基的蔗糖浓度均为5%,琼脂0.7%,15磅/时²热压消毒15分钟。消毒前调整pH为5.8。培养室温度为 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。每日光照14小时,光强2,000 lux(荧光灯)。

根尖染色体计数 取试管中小植株的根尖,用对二氯苯前处理,1:3的醋酸/乙醇固定。在 60°C 下用1N HCl水解后用席夫试剂染色,统计10个样品的染色体数目。

试 验 结 果

愈伤组织继代培养3次后,在原来的分化培养基上^[1],愈伤组织不再分化。为了恢复此愈伤组织的分化能力,又作了深入研究。研究表明,继代多次的柑桔愈伤组织的分化要经过以下三个阶段:

(一) 芽原基的发生和增殖 将培养了8周的继代愈伤组织转入 N_6 培养基 + BA(0.25 ppm) + NAA(0.1 ppm) + ME(1,000 ppm)上(以下简称I号培养基),培养40天后,在原来淡黄色的愈伤组织表面上形成一些绿色的球形芽原基(图版I, 1),这些芽原基的表面粗糙不平,有许多短毛。随培养时间的延长,芽原基越来越多,密集相连,成为一片绿色的表面。继续培养并不能分化成苗。如果将基本培养基改用MT或White配方,则发生的芽原基数量较少,生长也很缓慢。如果将BA的浓度提高到5ppm,愈伤组织虽有一定程度转绿,但从未看到发生芽原基。改变蔗糖浓度,调节渗透压,也仍以5%的蔗糖浓度诱导芽原基的效果最好(表1)。

表1 激素、蔗糖浓度和基本培养基成份对继代二年半的锦橙×枳的胚愈伤组织产生芽原基的影响

		基本培养基为 MT, 改变激素种类和浓度						
处 理		1	2	3	4	5	6	7
实验 I	BA	10	5	1		0.5	0.25	
	IAA	0.5	0.5					
	GA			1	1			
	NAA					0.1	0.1	
	ME					1,000	1,000	
	CH	500	500					
芽原基%(以试管计)		0	愈伤组织 转绿不分 化芽原基	0	0	2/27	6/11	0
在实验 I 的第 6 处理基础上改变蔗糖浓度								
实验 II	蔗糖浓度	10%		5%		2%		0
	芽原基%(以试管计)	芽原基分化不良		12/21		2/23		0
在实验 I 的第 6 处理基础上改变基本培养基								
实验 III	基本培养基	2MT	MT	$\frac{1}{2}$ MT	$\frac{1}{3}$ MT	N_6		
	芽原基%(以试管计)	0	12/21	11/15	3/20	14/17		

(二) 茎叶的分化 将在 I 号培养基上培养了 60 天以上, 并产生大量绿色芽原基的愈伤组织转入 $1/2$ MT 培养基 + BA(5ppm) + IAA(0.5ppm) + CH(500ppm) 上(以下简称 II 号培养基), 40 天后绿色的芽原基发育为茎芽(图版 I, 2), 在这些茎芽表面可以清楚地看到外包的鳞片。1 个愈伤组织上可以形成几十个茎芽。60 天后这些茎芽即可发育成 1 厘米左右的幼茎(图版 I, 3)。以后幼茎不断伸长, 叶片逐步展开(图版 I, 4), 1 个愈伤组织可形成多达 10 株以上的小茎, 但长到 2 厘米以上的小茎却只有 1—3 个。由愈伤组织分化为小茎的比率约为 75% (表 2)。在 II 号培养基上继续培养并不能分化出根。

表 2 基本培养基和激素对形成了芽原基的愈伤组织分化成茎叶的影响

基本培养基	激素种类和浓度(ppm)						茎叶分化率(%) (以试管计)
	BA	IAA	NAA	GA	CH	ME	
N_6	0.25		0.1			1000	0
N_6	5	0.5			500		2/20
$\frac{1}{2}$ MT	0.25		0.1			1000	0
MT	5	0.5			500		1/19
$\frac{1}{2}$ MT	5	0.5			500		27/36
$\frac{1}{2}$ MT	10	0.5					9/13
$\frac{1}{2}$ MT				1			0

(三) 根的分化 将上述形成了茎叶的愈伤组织整个地移入加 NAA(1ppm) 的 MT 培养基上, 未能诱导生根。但将小茎切下, 使其不带愈伤组织, 扦插于此培养基上, 10 天后切口处即发生少量愈伤组织。20 天后由此新生的愈伤组织中产生了根(图版 I, 5), 30 天时根可长达 4 厘米左右(图版 I, 6)。在此培养基上根的分化率可达 90% 以上。

胚状体的发生和培养: 用柳橙胚的愈伤组织作了与上相同的试验, 结果相似。但在将带小茎的愈伤组织移入 MT 培养基 + IBA(0.5 ppm) 上作诱导根的试验时, 少数培养物从老的愈伤组织的表面上产生了胚状体(图版 I, 7), 它与正常胚胎发育过程时产生的胚相同, 外表光滑嫩绿色, 在增殖过程中出现了球形期、心形期和子叶期各种发育阶段的胚状体(图版 I, 8)。与此同时, 在一些胚状体上又发生一些白色的愈伤组织, 这些愈伤组织再继续代入同样的培养基中, 仍然保持其胚性特点。将心形胚及子叶胚移入加 GA(1ppm) 的培养基中, 先发生根, 然后分化出茎叶(图版 I, 9)与种子的正常萌发过程相同。

染色体计数结果: 根据 10 个根尖细胞的染色体计数, $2n = 18$ (图版 I, 10), 都是二倍体, 表明没有发生染色体倍数性的变化。

讨 论

关于长期继代培养的愈伤组织仍然保持分化植株能力的报道不多,烟草^[1]、胡萝卜^[20]是这些例子中有代表性者。近年来,柑桔上也获得二例成功,一是 Kochba^[4, 11]从长期继代培养的“Shamonti”甜橙的胚珠愈伤组织中选择到“驯化”的株系,此株系无需外加激素就可通过胚状体的方式增生和分化,但它们不能将非胚性的愈伤组织诱导分化^[12]。另一个是 Chaturvedi 等^[3]用玉米素代替 BA,从而使长期培养的柚的茎愈伤组织所产生的一种不分化的 B 型愈伤组织重新分化出胚状体。在我们实验系统中,长期继代培养的胚愈伤组织的分化是通过顺序改变培养基成份,调节激素种类和浓度,将愈伤组织的分化过程分解为 3 个形态发生阶段而逐步完成的。通过这样的步骤,小植株的分化率是相当高的(约 65% 左右)。最近 Söndahl 等^[19]在咖啡上也通过顺序改变培养基的成份将愈伤组织诱导出胚状体。可能顺序改变培养基的成份对木本植物愈伤组织的分化有重要作用。

值得注意的是我们在柳橙胚的愈伤组织中,一方面可以通过茎芽的方式完成分化,另一方面又出现了由胚状体直接分化植株的途径。深入研究这两种不同的形态发育过程,不仅将加深我们对发育控制的认识,而且与诱导茎芽的方式相比较,胚状体具有数量多、速度快和结构完整 3 个优点,因而有可能成为一个更有效的无性繁殖方式。例如,Steward 等^[18]曾报道胡萝卜的 1 个合子胚的培养可以在 1 个培养瓶中产生 10 万个胚状体。

继代培养的愈伤组织常常产生各种倍性的细胞,在许多情况下并产生多倍体植株^[7]。这种遗传上的不稳定性动摇了无性繁殖的基础——保持原有品种的遗传特性。我们对小植株所作的初步检查没有发现多倍体植株。诚然,今后尚需作更多的染色体观察和长期的形态观察才能对此问题作出确切的回答。但这里可以指出一点,即愈伤组织中的多倍体细胞的分化条件未必与二倍体细胞的相同。例如用本文介绍的方法我们未能从柑桔的花药和胚乳的愈伤组织中分化出小植株,相反,我们用另一完全不同的方法却从柑桔的胚乳愈伤组织中诱导出胚状体。Mchra 等在扁桃^[14]、Yamane 在荞麦^[21]上均从继代培养的愈伤组织中只分化出二倍体植株,与我们的结果相一致。

根据本实验可粗略估计,如果 1 个胚的愈伤组织每 8 周继代 1 代,每次分割成 10 小块,经过 6 次继代(约一年)便可产生 10^6 块愈伤组织,然后再经过 5 个月左右的分化时间,便可得到 10^6 以上的小植株,这就有可能在短期内为生产提供大量的良种苗木。须指出的是,我们的愈伤组织来源于胚,它没有渡过童期,因而只能作为良种砧木快速繁殖进一步研究的试材。

参 考 文 献

- [1] 王大元、张进仁: 1975. 柑桔胚的人工培养. 植物学报, 17(2): 149—152.
- [2] 朱至清、王敬驹、孙敬三、徐振、朱之根、尹光初、毕风云: 1975. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学, (5): 484—490.
- [3] Asuwa, N., 1972. Progressive change in organforming capacity of tobacco callus during single subculture period. *Japan. J. Gen.*, 47(1): 53—60.
- [4] Button, J., J. Kochba, and C. H. Bornman, 1974. Fine structure and embryoid development from embryogenic ovular callus of “Shamonti” orange (*Citrus Sineusis* Osbeck). *Jour. Exp. Bot.*, 25(85): 446—457.

- [5] Chaturvedi, H. C. and G. C. Mitra, 1975. A shift in morphogenetic pattern in citrus callus tissue during prolonged culture. *Ann. Bot.*, 39(162):683—687.
- [6] Crisp, P. and D. G. A. Walkey, 1974. The use aseptic meristem culture in cauliflower breeding. *Euphytica*, 23(2):305—313.
- [7] D'Amato, 1975. The problem of genetic stability in plant tissue and cell culture. In *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*, pp. 333—348.
- [8] Earle, E. D. and R. W. Langhans, 1974. Propagation of chrysanthemum *in vitro*. I. multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue culture. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 99(2):128—131.
- [9] Hussey, G., 1975. Propagation of hyacinths by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 3(1):21—28.
- [10] Jones, O. P., M. E. Hoppood, and D. O'Farrell, 1977. Propagation *in vitro* of M 26 apple rootstock. *Jour. Hort. Sci.*, 52(2):235—238.
- [11] Kochba, J. and J. Button, 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange as effected by tissue age and sucrose concentration. *Z. Pflanzenphysiol.*, 73(5):415—421.
- [12] Kochba, J. and Spiegel-Roy, 1977. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.*, 81(4):283—288.
- [13] Mathews, V. H., T. S. Rangan, and S. Narayanaswamy, 1976. Micro-propagation of *Ananas sativas in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 79(5):450—454.
- [14] Mehra, A. and P. N. Mehra, 1974. Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in almond. *Bot. Gaz.*, 135(1):61—73.
- [15] Murashige, T., M. N. Shabda, P. M. Hasegawa, F. H. Takatori, and J. B. Jones, 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlet. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97(2):158—161.
- [16] Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:135—166.
- [17] Rao, A. N., 1977. Tissue culture in the orchid industry. pp. 44—69. In *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Orgtn Culture*.
- [18] Steward, F. C., M. O. Mapes, and P. V. Ammirato, 1969. Growth and morphogenesis in tissue and cell cultures. Chap. 8, In *Plant Physiology*. Vol. VB, *Academic Press Inc., New York*.
- [19] Söndahl, M. R. and W. R. Sharp, 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81(5):395—408.
- [20] Sussex, L. M. and K. A. Frei, 1968. Embryoid development in long term tissue culture of carrot. *Phytomorphology*, 18(3):339—349.
- [21] Yoshifumi Yamane, 1974. Induced differentiation of buckwheat plants from subcultured callus *in vitro*. *Japan. Jour. Gen.*, 49(3):139—146.

PROPAGATION IN VITRO IN CITRUS

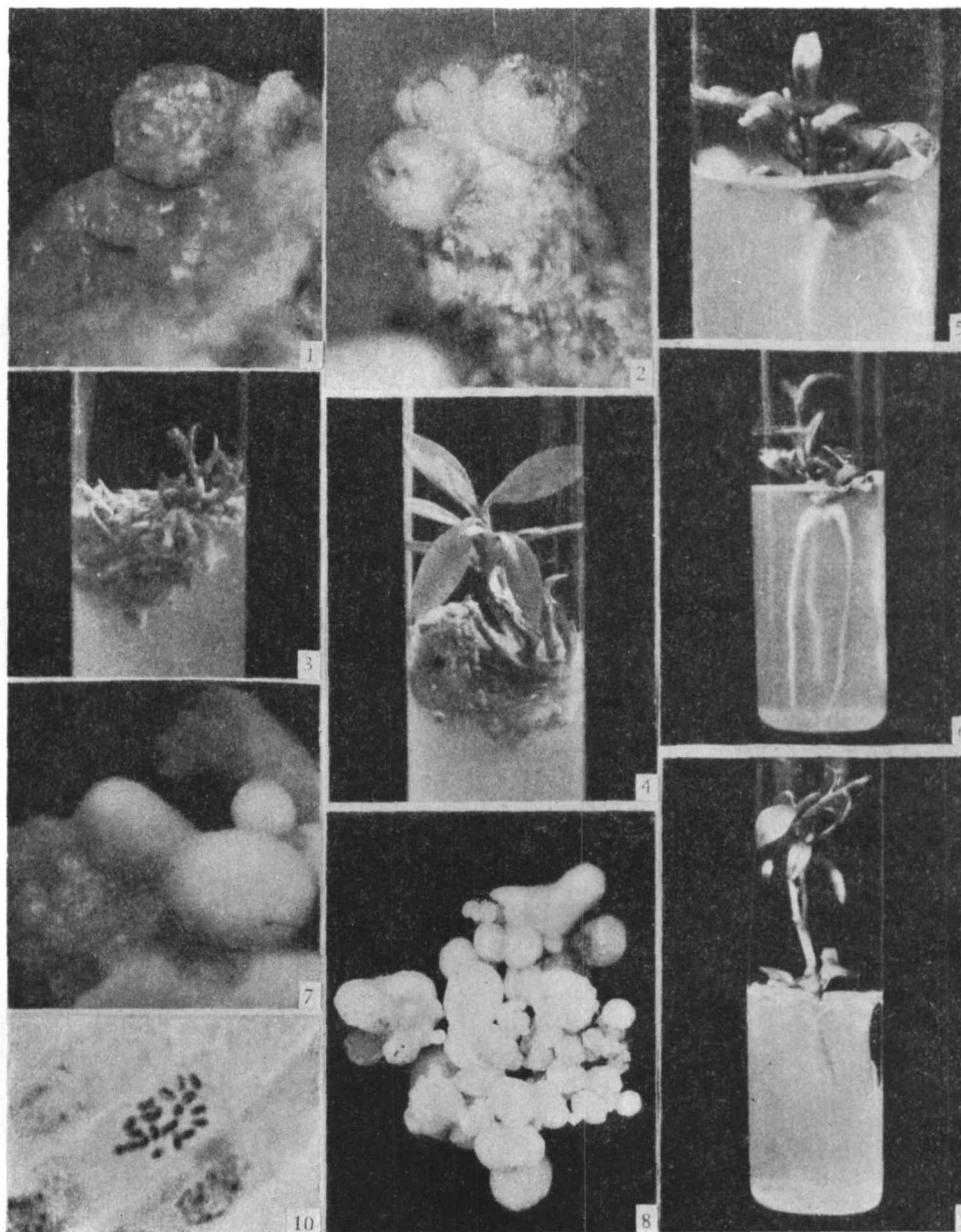
Wang Ta-yuan Chang Chin-jen

(Institute of Citrus, Academy of Agricultural Science of China)

ABSTRACT

After two and half years of subculture, the callus tissue of embryo of *Citrus sinensis* Osbeck × *Poncirus trifoliata* Raf. recovers its ability to differentiate plantlets through the following three phases: (1) Bud primordium grows on N₀ medium + BA (0.25 ppm) + NAA(0.1 ppm) + ME(1,000 ppm); (2) The bud primordium differentiates into shoot buds and the latter grow into shootlet on ½MT medium + BA(5 ppm) + IAA(0.5 ppm) + CH(500 ppm); (3), Put the cuttings of leafy shootlet into MT medium containing NAA (1 ppm) to induce them to strike root and grow into plantlets.

Cytological examination proves these plantlets to be diploid of $2n = 18$.



1. 继代培养二年半的锦橙×枳胚的愈伤组织移入 N₀ 培养基 + BA(0.25 ppm) + NAA(0.1 ppm) + ME(1,000 ppm) 上培养40天后出现的芽原基(36×)。
2. 带芽原基的愈伤组织移入 1/2MT 培养基 + BA(5 ppm) + NAA(0.5 ppm) + CH(500 ppm) 上, 50天出现的茎芽(16×)。
- 3—4. 分别为培养65天和80天后的带叶小茎(原大)。
5. 将小茎扦插于 MT 培养基 + NAA(1 ppm) 上, 20天的生根情况(2×)。
6. 将小茎扦插于 MT 培养基 + NAA(1 ppm) 上, 30天的生根情况(0.64×)。
7. 继代培养了一年半的柳橙胚的愈伤组织在 MT 培养基 + IBA(0.5 ppm) 上发生的胚状体(60×)。
8. 柳橙愈伤组织产生的各种发育阶段的胚状体(24×)。
9. 将子叶胚移入 MT 培养基 + GA(1 ppm) 上, 30天后分化出完整的小植株(0.64×)。
10. 锦橙×枳胚的愈伤组织分化的小植株的根尖染色体 $2n = 18(2,000\times)$ 。