

从胚乳培养再生三倍体柑桔植株

王大元 张进仁

(中国农业科学院柑桔研究所)

摘 要

为了研究用胚乳培养获得无核水果和通过培养杂种胚乳探索作物育种新领域,我们研究了柑桔胚乳培养的条件。研究结果指出:(1)在 MT 培养基 + 2,4-D (2 ppm) + BA (5 ppm) + CH (1000 ppm) 上,可将发育到细胞时期的幼胚乳诱导成愈伤组织;(2)在 2 MT 培养基 + GA (2—15 ppm) 上,胚乳愈伤组织分化出各种发育阶段的胚状体,这些胚状体并能形成根、茎、叶和完整的小植株;(3)根尖染色体计数初步说明胚乳分化的根是三倍体 ($3n=27$)。

被子植物双受精产物之一的胚乳是由三个单倍体的核融合发育而成的,其功能是作为贮藏组织供给胚发育时所需要的营养。由于胚乳是三倍体组织,由它产生的是三倍体植株,因此胚乳培养有可能成为培育无核果实的一种新技术。我们认为更重要的是由于胚乳也是受精产物,它具有父、母双亲的遗传成份,杂交后所得的是杂种胚乳,由此而分化的植株理应是母本提供两套染色体,父本提供一套染色体的杂种植株。因此培养杂种胚乳,不仅可能有别于目前的常规有性杂交育种和正在探索的体细胞杂交,而形成一个新的杂交育种领域,而且也可能丰富我们对遗传规律的认识。对于柑桔来说,由于珠心多胚的干扰,很难获得杂交苗,因此培养杂种胚乳还有可能成为克服珠心胚对柑桔杂交育种干扰的一个有效手段。

虽然组织培养的各个领域进展很快,但相形之下,胚乳培养的进展却很缓慢。迄今仅有19种植物的胚乳培养成愈伤组织^[1-4],而其中自养植物中只有苹果^[1]、水稻^[5]和 *Putranjiva roxburghii*^[6] 的胚乳被诱导出完整植株,而且尚没有人证明由胚乳分化的器官是三倍体。本文报道柑桔胚乳培养分化为完整植株的初步结果。

一、材料和方法

所用试材为单胚类型的北碚柚 (*Citrus grandis* Osbeck) 和多胚类型的锦橙 (*Citrus sinensis* Osbeck)。由于柑桔的成熟种子中是没有胚乳的,故从花后二个月开始,整体解剖观察,追踪种子的发育过程,现以北碚柚为例予以说明。6月底到7月上旬,胚乳处于游离核时期或部分形成细胞,胚呈心形。7月下旬胚乳已完全形成细胞组织,胚已分化两个子叶(图1),7月底以后,胚乳组织迅速解体,无法取得胚乳。我们主要培养了7月下旬的胚乳。接种时先将幼果表面消毒,然后在无菌条件下取出幼种子,在解剖镜下剥去外珠被、内珠被和珠心组织,仅剩胚和胚乳。然后将其分作两组处理。一组是带胚的胚乳(图2),另一组将胚挑去不要仅剩胚乳(图3),分别接种于培养基上。

本文 1977 年 11 月 19 日收到。

采用的培养基有 MT 和 White 两种,在培养基中单独或综合加入各种浓度的 6-苄胺嘌呤 (BA)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D)、赤霉素 (GA)、吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (IBA)、萘乙酸 (NAA)、酪蛋白水解物 (CH) 和酵母提取液 (YE) 等生理活性物质. GA 用 0.45 微米的微孔滤膜过滤除菌. 蔗糖浓度 5%, 琼脂 0.7%, 消毒前调培养基 pH 为 5.8.

1.1 公斤/厘米² 热压消毒 15 分钟. 愈伤组织的诱导在黑暗中进行. 愈伤组织分化植株则在 2000 Lux 光照条件(荧光灯)下进行,每日照光 14 小时. 培养温度为 28±2℃.

锦橙胚乳的培养条件同北碚柚,但锦橙的胚乳发育到细胞时期较晚 (8 月上旬).

二、实验结果

1. 胚乳愈伤组织的诱导

没有完全形成细胞的胚乳组织,在任何培养基上都没能培养成活. 充分发育并完全形成细胞的胚乳组织在无激素的培养基上,没有任何生长. 在含 IAA 和 BA 的培养基上,胚乳虽略有膨大,但仍无进一步的生长. 在 MT 培养基 + 2,4-D (2ppm) 的培养基上,个别试管的胚乳能产生极少量黄色愈伤组织. 在 MT 培养基 + 2,4-D (2ppm) + BA (5ppm) + CH (1000 ppm) (以下简称为 1 号培养基) 上接种后 20 天,在比较多的试管中产生少量生长缓慢的白色愈伤组织,如果将 CH 换成 YE,则愈伤组织呈黄色 (表 1). 带胚的胚乳与不带胚的胚乳的反应相似,所不同者在无 BA 培养基上,所带之胚迅速萌发成苗,胚乳则被消耗殆尽. 在 White 培养基上培养胚乳,则愈伤组织发生的频率比 MT 上的小. 为了加快上述愈伤组织的生长,将 1 号培养基中的 BA 浓度下降为 0.25 ppm,则愈伤组织迅速生长 (图 4). 在此降低了 BA 浓度的培养基上继代 2 次后,便得到一批胚乳愈伤组织供分化试验用. 用同样的方式,从锦橙中也得到了一些愈伤组织.

表 1 各种生理活性物质对诱导胚乳愈伤组织的影响

MT 培养基中添加物浓度 (ppm)					胚 乳 生 长 情 况
2, 4-D	IAA	BA	CH	YE	
0	0	0	0	0	不生长
0	2	5	0	0	胚乳略有膨大,但不继续增生
2	0	0	0	0	个别试管产生少量黄色愈伤组织
2	0	5	1000	0	较多试管产生白色愈伤组织
2	0	5	0	1000	愈伤组织呈黄色

表 2 基本培养基加赤霉素对胚乳愈伤组织分化的影响

基 本 培 养 基	GA 浓度 (ppm)	分 化 情 况
MT	1	分化成绿色球形胚状体,分化频率低
MT	2	分化成绿色球形胚状体,分化频率低
2 MT*	2—4	分化成心形胚状体,个别形成子叶胚
2 MT*	10	心形胚状体可发育到子叶期胚状体,并产生根
2 MT*	15	子叶期胚状体形成茎、叶和完整植物

* 2MT 系 MT 培养基中无机盐浓度加倍.

2. 胚乳愈伤组织的器官分化和小植株的形成

经过多种处理,发现调节细胞动素(BA)和生长素的浓度以及二者比例,虽然胚乳愈伤组织的生长速度在某些处理中有所区别,但愈伤组织仍然保持白色,没有任何分化的迹象。在含有 1 ppm GA 的 MT 培养基上培养 50 天后,有一管愈伤组织分化出了绿色的球形胚状体。继续培养,此胚状体未能获得进一步发育。在此基础上又设计了各种浓度的基本培养基和 GA 的处理(表 2),发现在将基本培养基无机盐浓度增加一倍、GA 浓度提高到 2—4 ppm 时,愈伤组织上形成了心形胚状体(图 5),个别的进一步形成子叶期胚状体。再将它们转入 2 MT + GA (10 ppm) 的培养基上后,普遍发育成子叶期胚状体(图 6, 7),这些胚状体中少数产生了根(图 8)和叶(图 9)。将 GA 浓度提高到 15 ppm,子叶期胚状体则发育出茎(图 10)和完整植株(图 11)。根尖染色体计数初步表明胚乳分化的根是三倍体 $3n = 27$ (图 12)。

三、讨 论

目前已有三种植物的胚乳分化出完整植株,但它们都是通过茎芽的途径完成分化的。本文则报道了通过胚状体的途径将胚乳分化成完整小植株,并初步证明由胚乳形成的是三倍体器官。

组织培养中的分化大体可以分为两种方式:一种是通过茎芽分化成茎和根,另一种是通过胚状体方式获得完整植株。对前者来说有相当多的植物是遵从 Skoog 的细胞动素/生长素比率控制分化的理论^[7],而胚状体途径目前还没有一个普遍可循的规律。虽然蓖麻^[8]和黑种草^[9]的胚乳已形成胚状体,但 Johri 认为蓖麻形成的只是类似于胚胎发育早期阶段的某些集合体,还没有形成胚状体^[10]。而黑种草胚乳的胚状体并未得到进一步的发育。高浓度赤霉素和高浓度无机盐,是我们成功地将柑桔胚乳诱发胚状体并进而分化植株的主要因素。在组织培养中关于赤霉素对分化影响的研究较少, Halperin^[11] 认为赤霉素完全抑制了胡萝卜体细胞胚状体的分化。而我们在柚子中却证明赤霉素对诱导胚乳愈伤组织胚状体和胚状体的进一步发育都具有促进作用,尤其是我们用高达 15 ppm 的赤霉素来诱导胚状体的发生和发育在组织培养中也是很罕见的。

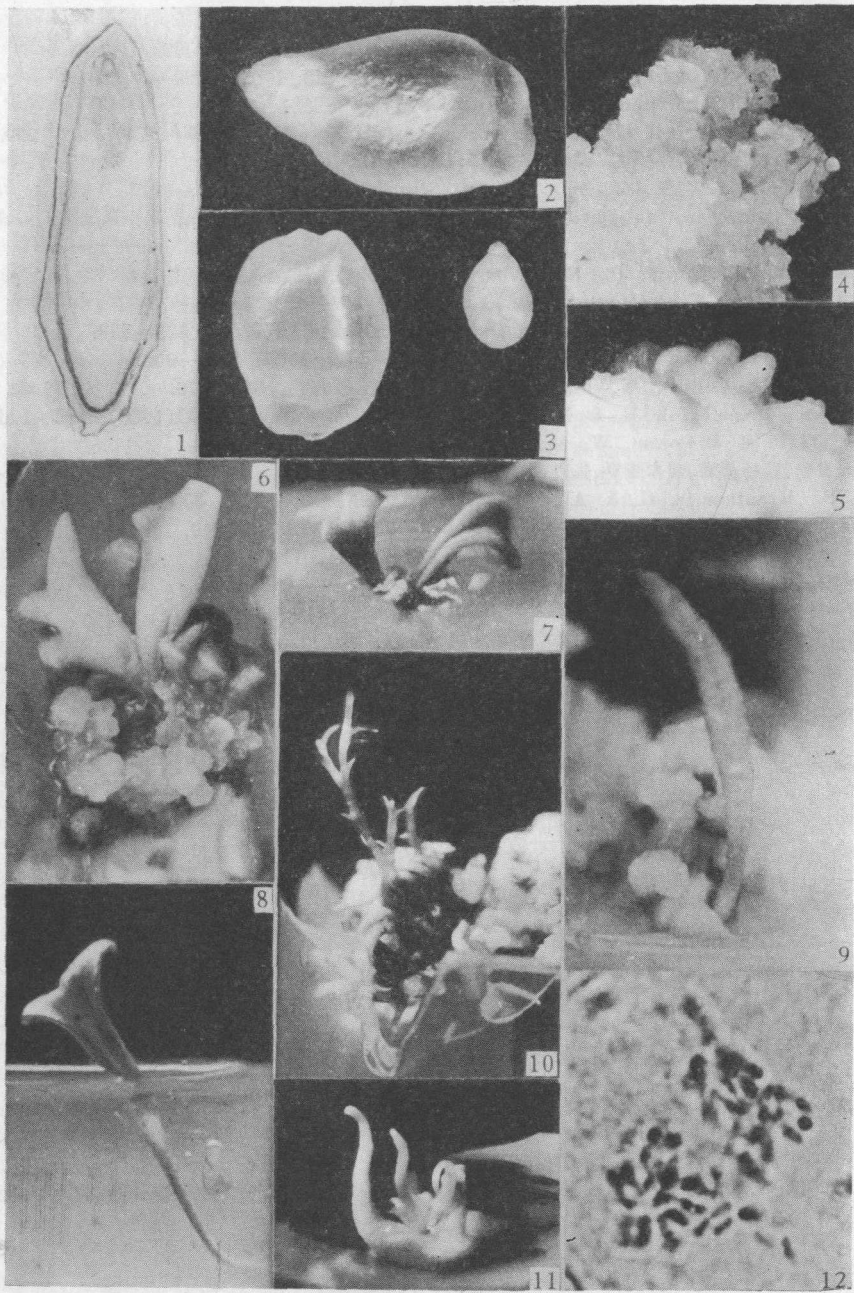
我们在含低浓度 GA (1—4 ppm) 的 MT 培养基上只能得到球形或心形胚状体。Esen 在柑桔中用 $2x \times 4x$ 进行三倍体育种时,所获得三倍体种子都是败育退化的瘪种子,其中的三倍体胚也只能发育到球形或心形阶段^[12]。他们认为胚与胚乳的倍性比为 3:4 时,胚乳首先败育,胚不能正常发育到成熟阶段。我们将培养基的无机盐浓度加倍、赤霉素浓度提高到 10 ppm 以上,就可以使这些三倍体的胚状体进一步发育到子叶期阶段,进而分化成小植株。我们估计 Esen 提出的胚与胚乳的倍性比问题,其实质可能是四倍体胚乳没有足够的营养和赤霉素供给三倍体的胚进一步发育。

关于胚在胚乳培养中的作用,目前有两种结果:一种是 Srivastava^[6,13] 等认为胚乳愈伤组织的诱导和植株的分化必须要有胚参加才能完成,他们将此称之为“胚因子”,并认为赤霉素可以部分取代“胚因子”的作用。另一种结果是毋锡金等认为胚乳愈伤组织的诱导和以后的植株分化无须胚的参加也能完成^[1,2]。我们从带胚的胚乳和不带胚的胚乳都获得愈伤组织,并分化出植株,这个结果与毋锡金等的相同。但我们的分化培养基中,使用了 Srivastava 认为可以部

分取代“胚因子”的赤霉素。因此“胚因子”在胚乳培养中究竟起什么作用是值得深入研究的问题。

参 考 文 献

- [1] 毋锡金等, 植物学报 **19** (1977), 93—94.
- [2] 毋锡金等, 中国科学, **4** (1977), 355—359.
- [3] Johri, B. M. & Bhojwani, S. S., *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1977, 398—411.
- [4] Keller, H., Wanner, H., Baumamm, T. W., *Planta*, **108** (1972), 339—350.
- [5] Nakano, T., Tashiro, T. & Maede, E., *Z. Pflanzenphysiol.*, **76** (1975), 444—449.
- [6] Srivastava, P. S., *Z. Pflanzenphysiol.*, **69** (1973), 270—273.
- [7] Skoog, F. & Miller, C. O., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11** (1957), 118—130.
- [8] Satsangi, A. & Mohan Ram, H. Y., *Phytomorphology*, **15** (1965), 26—30.
- [9] Rangaswamy, N. S., *Current Science*, **45** (1976), 109—111.
- [10] Johri, B. M., *Les cultures de tissus de plantes*, 1971, 269—280.
- [11] Halperin, W., *Control mechanisms in the expression of cellular phenotypes*, 1971, 169—191.
- [12] Esen, A. & Soost, R. K., *Amer. J. Bot.*, **60** (1973), 448—462.
- [13] Johri, B. M. & Srivastava, P. S., *Z. Pflanzenphysiol.*, **70** (1973), 285—304.



1. 接种时发育到细胞时期的胚乳切片 ($\times 12$) 2. 接种时发育到细胞时期的胚乳(带胚) ($\times 20$)
 3. 接种时发育到细胞时期的胚乳(左)及胚(右) ($\times 20$) 4. 胚乳愈伤组织 ($\times 16$) 5. 胚乳愈
 伤组织形成的心形胚状体 ($\times 40$) 6. 胚乳愈伤组织形成的子叶期胚状体 ($\times 7.5$) 7. 胚乳愈
 伤组织形成的子叶期胚状体 ($\times 16$) 8. 胚乳愈伤组织的胚状体形成的根 ($\times 6.4$) 9. 胚乳愈
 伤组织的胚状体形成的叶 ($\times 16$) 10. 胚乳愈伤组织的胚状体形成的茎 ($\times 5$) 11. 胚乳愈伤
 组织的胚状体形成的完整植株 ($\times 5$) 12. 胚乳分化的根的染色体(有丝分裂后期, $3n = 27$)
 ($\times 3000$)