

柑桔未成熟幼胚的离体培养

黄志文 何月清

(广东省果树研究所)

提 要

柑桔属的大多数栽培种和品种的种子存在珠心胚的多胚现象,它严重干扰了柑桔的杂交育种工作。本文报道在双目解剖镜下刚能看到幼胚时就进行幼胚的离体培养,可能是避过了多胚的干扰的办法之一。研究的材料是暗柳甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 和椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco)。取暗柳甜橙开花后71天和椪柑开花后90天的直径为0.04—0.10毫米的幼胚于试管中培养。以Marashige和Tucker培养基为基本培养基,附加蜂乳(RJ) 400ppm和赤霉素(GA) 1 ppm。经一个多星期的培养,幼胚已开始长成为较大的子叶胚。以后长成小苗为接种胚数的58.82% (甜橙) 和55.0% (椪柑)。小苗长到2—3厘米高时,转移到含有萘乙酸(NAA) 1 ppm的MT培养基,大部分都能长出根系

试管小苗长至3—4厘米高时,嫁接在盆栽砧木上(红黎檬或其他砧木实生苗),成活率达85.7%。未经诱导生根的小苗同样能嫁接成功。接活后小苗生长快,4个月苗高30厘米,可以移栽于露地。

柑桔属的大多数栽培种和品种的种子存在珠心胚的多胚现象,它严重干扰了柑桔的杂交育种工作。作者于1973年播种以甜橙和温州蜜柑为母本的杂交种子290粒,获得实生苗346株,其中只选得杂种苗21株,杂种苗占(播种量)7.24%,但以椪柑为母本的杂交种子216粒,获得实生苗259株,没有选得一株杂种苗。后经几年重复试验,获得杂种苗的百分率均近似,但以椪柑为母本始终没有获得一株杂种苗。国内外不少柑桔育种工作者为研究克服珠心胚的干扰,做了不少研究工作,甚至应用最先进的科学设备,如用气相色谱仪测定叶片精油^{[6][6]}和用电泳仪测定同功酶^[18]来鉴别杂种苗,但获得的杂种苗仍然不多。1975年王大元等用组织培养方法来培育成熟的杂交种子的小胚,仅获得杂种苗7%^[3]。这是由于大多数成熟的多胚性种子的受精胚已败育^[8],故培养成熟种子幼胚所获得的杂种苗也不多。因此,幼胚培养工作必须提前到受精胚败育之前进行才可能获得较多的杂种苗。

我们从1979年开始研究柑桔未成熟幼胚的早期发育规律和幼胚早期离体培养技术。希望能培养出更多的杂种苗。

材 料 和 方 法

以多胚品种的暗柳甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 和椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 为材料,于开花时(甜橙于3月18—20日,椪柑于3月22日)选择初开的花进行人工授粉,授粉后挂牌,每品种挂牌100朵花。授粉后52天开始取果,在双目解剖镜下观察胚的发育情况(计算幼胚数量和量度幼胚直径),每隔5天观察一次,(幼胚刚出现前后,每隔3天观察一次)直到授粉后165天(甜橙)和179天(椪柑)停止(此时种子已开始成熟)。

在上述观察的基础上,以暗柳甜橙和椪柑为材料,在双目解剖镜下刚看到幼胚出现时(甜橙于授粉后70—73天,椪柑于授粉后88—92天),即取嫩种的幼胚进行离体培养,此时幼胚的直径为0.04—0.08毫米。

培养基以Murashige和Tucker培养基^[1]为基本培养基。培养基的无机盐与Murashige和skoog培养基的相同,其附加有机物为:盐酸硫胺素10mg/l、盐酸吡哆醇10mg/l、抗坏血酸20mg/l、烟酸5mg/l、肌—肌醇100mg/l、甘氨酸2mg/l、水解酪蛋白(CH) 400mg/l、蔗糖5%、琼脂用量为0.7%。

在作者过去研究十余种不同配方的培养基的基础上,进一步研究应用下述有机附加物:蜂乳(RJ),谷氨酰胺(Gn),赤霉素(GA),嫩黄瓜汁(CJ)等配成不同的培养基:

- A. MT + CJ20%
- B. MT + Gn500ppm
- C. MT + RJ400ppm
- D. MT + GA 1 ppm
- E. MT + RJ400ppm + GA 1 ppm

掘内昭作^[4]认为在培养基加入嫩黄瓜汁是最适于培养柑桔离体胚的,故我们以培养基A作为对照。培养基酸度为pH5.8,分装后在1.1—1.2公斤/cm²的热压下灭菌20分钟,其中抗坏血酸赤霉素及蜂乳遇热易分解,不能用热压灭菌,采用6号细菌漏斗(或0.2μm孔径滤片)抽滤后在无菌条件下与经过高压灭菌的培养基混合然后分装。

用2.5×20厘米试管培养。接种前幼果用肥皂水洗擦和水洗清洁,再用酒精及漂白粉液先后浸泡灭菌。于无菌条件下取出种子,在双目解剖镜下计算每粒种子的幼胚总数和量度幼胚的直径,然后把幼胚接种在培养基上,每试管接种一粒种子的全部幼胚,接种后,在25±1℃和1000Lux光照14小时的条件下培养。

幼胚长成小苗后,计算每管长成的小苗数,以及长成小苗的百分率。小苗长至2—3厘米高时,移至含有1ppm萘乙酸(NAA)的MT培养基中。诱发生根。待小苗长至3—6厘米高和具有较好的根系时移出试管。

试管苗移出试管采用下述两种方法：

1. 试管苗移于盛有蛭石的烧杯上，外套尼龙薄膜，一星期后，在薄膜上剪小孔，使逐渐适应外界环境条件。再过 2 — 3 星期除去尼龙薄膜，待小苗生长正常后移于泥土中种植。

2. 试管苗直接嫁接在盆栽砧木苗上，小苗长至 3 — 4 厘米时，取出试管，剪去全部叶片，在生长点下半厘米处开始削去苗茎的一边皮层，一直削至根尖，然后按 T 形芽接方法掀开砧木苗主干的皮层，把削去一边皮的小苗嫁接上，使二者形成层紧贴，用聚氯乙烯薄膜带缚扎，小苗的生长点周围用薄膜块包裹保湿。接活后，解除薄膜并半折倒砧木（即在接口之上半厘米处剪断砧木主干 2/3，折倒砧木上部，但仍有部分相连），让小苗萌发生长。半倒砧的作用是利用砧木的叶片继续制造养分供小苗生长。因此，从嫁接开始要经常把砧木苗本身萌发的新梢摘除，使集中养分供小苗生长，待小苗长出的第一次梢老熟后，齐接口处将砧木苗上部剪去。

结果与分析

（一）幼胚发育规律观察 在双目解剖镜下解剖种子，授粉后 68 天内，不论暗柳甜橙或椪柑均未发现有幼胚。暗柳甜橙在授粉后 70 天才开始在双目解剖镜下看到幼胚，而椪柑一直到授粉后 88 天才开始看到幼胚。此时幼胚的直径在 0.04—0.08 毫米，平均每种子约有幼胚 0.8—4.7 个。以后数天内幼胚迅速增大，由球形胚转变为心形胚，每种子的幼胚数目也迅速增加（如图 1 及图 2）。十天后，平均每种子有幼胚 9.9—18.4 个，而最多 26 个，暗柳甜橙在授粉后 86 天，种子内的幼胚数量达到高峰，平均 22.3 个，最多达到 42 个。以后部分幼胚败育，到授粉后 100 天以后，每种子约存幼胚 15 个左右。

从上述观察的规律可以看出，为减少珠心胚的干扰，离体培养幼胚，最好在幼胚数目最少的时候，也就是在双目解剖镜下刚看到幼胚时立即进行。拖迟几天珠心胚数量便迅速增加，使以后筛选杂种苗增加了困难。

此外，在同一果内不同种子的幼胚数目差异很大，尤其刚看到幼胚的头几天，胚的数目变动在 0 至 16 之间，其变异系数达 73.71—340.79%（如表 1 及表 2）。最初，有的种子大部分只有球形胚，而个别种子却出现心形胚或子叶胚。因此，我们在探索幼胚培养时，必须在双目解剖镜下检查才能确知接种的是球形胚还是心胚或子叶胚。

（二）未成熟幼胚离体培养 1979 年 6 月 16 日我们以暗柳甜橙幼胚为材料，接种于上述 5 种培养基中。培养 40 天后检查，结果如表 3。由于当时市面脱销分析纯（和化学纯）的蔗糖，我们只能用方糖来配制培养基。再加上当时双蒸水的水质不够好。因此每试管培养出的试管苗只有 2—3 株。但从各种培养基来比较，含有蜂乳的培养基 C、含有赤霉酸的培养基 D 和含有“蜂乳+赤霉酸”的培养基 E 明显地比其他培养基效果好，与培养基 A 比较，差异均非常显著，且培养出的小苗生长快而壮健。

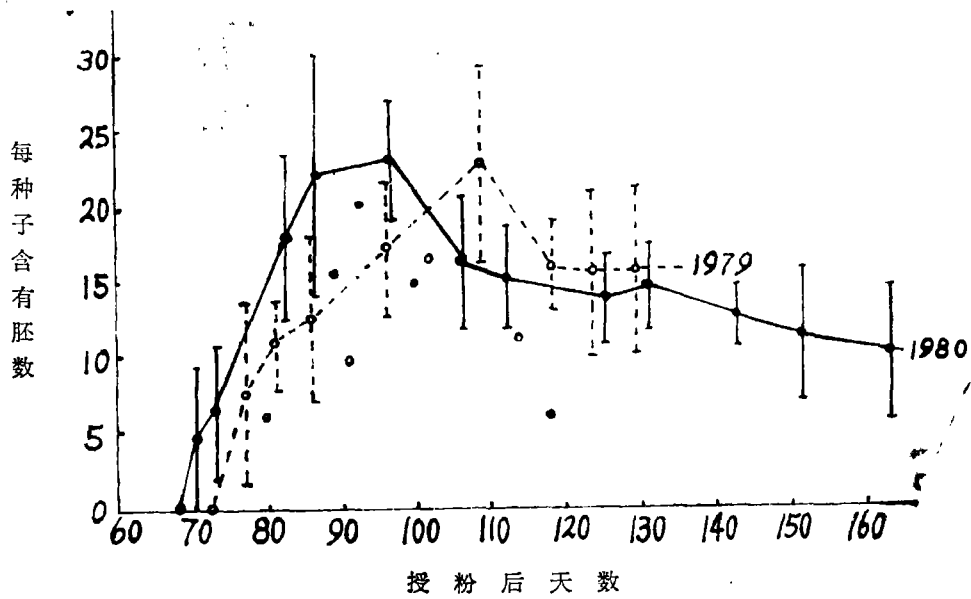


图1.暗柳甜橙不同时期种子中胚数的变化(垂直线为标准差)

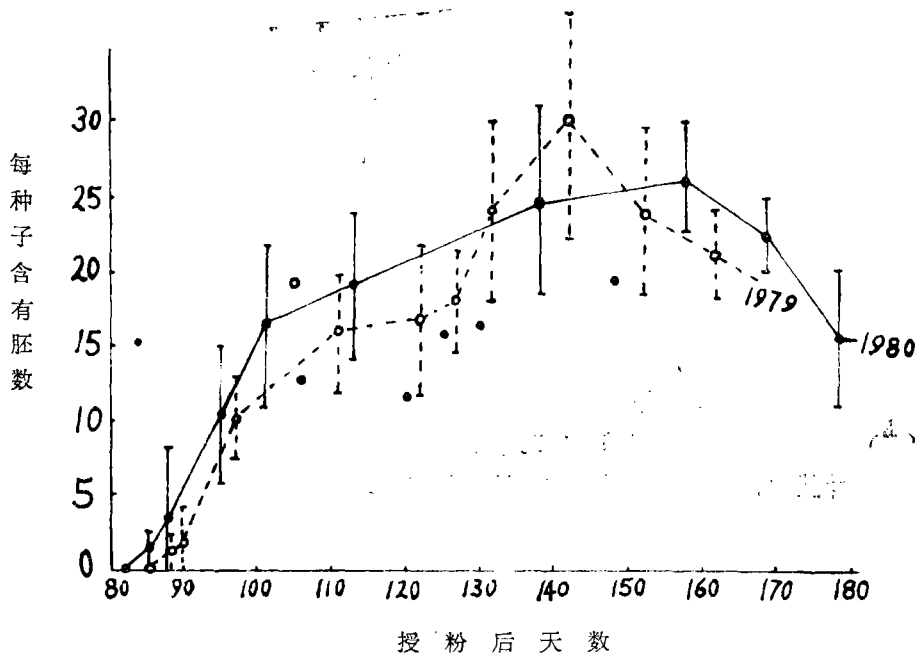


图2.椪柑不同时期种子中胚数的变化(垂直线为标准差)

表 1 暗柳甜橙授粉后 70 天和 72 天幼胚数量及类型

授 粉 后 70 天 (5月28日)					授 粉 后 72 天 (5月30日)				
种 子 号	幼 胚 总 数	其 中 各 类 型 胚 数			种 子 号	幼 胚 总 数	其 中 各 类 型 胚 数		
		球形胚直 径0.1mm 以下	心形胚0.10 —0.20mm	子叶形胚0.2 mm以上			球形胚0.1 mm以下	心形胚0.10 —0.20mm	子叶形胚 0.2mm 以上
1	2	2	0	0	1	1	1	0	0
2	2	2	0	0	2	2	2	0	0
3	2	2	0	0	3	3	3	0	0
4	3	3	0	0	4	3	3	0	0
5	4	4	0	0	5	3	3	0	0
6	4	4	0	0	6	4	3	1	0
7	4	4	0	0	7	5	4	1	0
8	5	5	0	0	8	6	4	2	0
9	5	5	0	0	9	7	4	3	0
10	6	6	0	0	10	10	9	1	0
11	8	8	0	0	11	11	11	0	0
12	11	11	0	0	12	11	7	4	0
13	12	12	0	0	13	12	8	4	0
14	15	4	11	0	14	15	13	2	0
15	16	11	5	0	15	0	0	0	0
16	0	0	0	0	合计	93	75	18	0
17	0	0	0	0	平均	6.2	5.0	1.2	0
18	0	0	0	0	标准差	±4.57	±3.76	±1.47	0
19	0	0	0	0	变异系数	73.71%	75.20%	122.5%	0
20	0	0	0	0					
21	0	0	0	0					
合计	99	83	16	0					
平均	4.70	4.00	0.76	0					
标准差	±4.99	±3.92	±2.59	0					
变异系数	106.17%	98.0%	340.79%	0					

1980年5月29日我们进一步用含有蜂乳及赤霉酸的MT培养基培养暗柳甜橙幼胚。10支试管每管接种一粒种子的全部幼胚、幼胚直径大部分均在0.1毫米以下，结果如表4。有7支试管的幼胚100%长成小苗，有二支试管没有长成小苗，另一支试管只成活25%。幼胚长成小苗的总成活率为58.82%。其中球形胚长成小苗的有53.57%，心形胚长成小苗的有83.33%。

表2 椪柑授粉后88天和91天幼胚数量及类型

授粉后88天(6月20日)					授粉后91天(6月23日)				
种子号	幼胚总数	其中各类型胚数			种子号	幼胚总数	其中各类型胚数		
		球形胚0.1mm以下	心形胚0.1—0.2mm	芽子形胚0.2mm以上			球形胚0.1mm以下	心形胚0.1—0.2mm	子叶形胚0.2mm以上
1	4	4	0	0	1	2	2	0	0
2	10	6	2	2	2	2	2	0	0
3	16	0	14	2	3	2	1	1	0
4	0	0	0	0	4	3	3	0	0
5	0	0	0	0	5	3	2	1	0
6	0	0	0	0	6	4	4	0	0
7	0	0	0	0	7	12	2	10	0
8	0	0	0	0	8	14	5	9	0
9	0	0	0	0	9	0	0	0	0
10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
合计	30	10	16	4	合计	42	21	21	0
平均	3.0	1.0	1.6	0.4	平均	4.2	2.1	2.1	0
标准差	±5.60	±2.16	±4.40	±0.24	标准差	±4.83	±1.60	±3.93	0
变异系数	186.67%	216.0%	750.0%	210.00%	变异系数	115.0%	75.19%	187.14%	0

表3 各种培养基培养效果比较

培养基	接种管数	培养成苗的管数	成活率%	t 值 (与 A 比较)
A	15	2	13.38	
B	12	5	41.66	1.692 (n=25)
C	62	36	58.06	3.284** (n=75)
D	37	20	54.05	2.847** (n=50)
E	39	24	61.54	3.457** (n=52)

同样我们以椪柑为材料,于授粉后90天(6月22),用双目解剖镜观察,刚能见到幼胚时即进行培养。共20支试管,幼胚直径大部分均在0.1毫米以下。结果除一支试管外,19支试管均长成小苗。幼胚长成小苗的总成活率为55.0%。长成的小苗转移到诱导生根的培养基中(MT+NAA1ppm),大部分都能长出新根(照片3)。

(三) 小苗移出试管 小苗长至5—6厘米高移出试管种植于蛭石中成活率较好,移2株,活2株。但3—4厘米高的苗,移植成活率较低,移30株,只成活4株。成活率13.33%(照片4及5)。

小苗移出试管采用嫁接方法的成活率比移栽于土中的好。(如表5)3—4厘米高的小苗嫁接于盆栽钻木上,成活率达85.70%。但2厘米高的小苗嫁接成活率较低。嫁

接于田间大树上的成活率不及嫁接于盆栽砧木的好。其原因是在田间受不良的外界因素影响较大。嫁接成活后，小苗的生长亦以嫁接在盆栽砧木上最好，接后4个月苗高达30厘米（照片7）。没有根的小苗（苗高3—4厘米）同样可以嫁接成活。

表4 暗柳甜橙授粉后71天（5月29日）的幼胚培养成活情况

接 种 日 期	试 管 号	接 种 胚 数	其 中 各 类 型 胚 数			长 成 小 苗 数	长 成 小 苗 %	说 明
			球 形 胚	心 形 胚	子 叶 形 胚			
			0.04—0.10 mm	0.11—0.19 mm	0.2mm 以 上			
五 月 廿 九 日	1	3	2	1	0	3	100	其中一株已长根
	2	12	12	0	0	3	25	另有一个较大的子叶形胚
	3	5	3	2	0	5	100	其中2株已长根
	4	1	1	0	0	1	100	另有一堆子叶形胚
	5	3	3	0	0	5	100	另有2个较大子叶形胚
	6	3	2	1	0	0	0	长成一堆子叶形胚
	7	2	0	2	0	2	100	
	8	2	2	0	0	0	0	
	9	1	1	0	0	1	100	已长出根
	10	2	2	0	0	5	100	另有一个较大的子叶形胚
	合计	34	28	6	0	25	58.82	百分率是按长成20株苗计算，因5号和10号试管多长了几株苗。

注：每试管接种一粒种子的幼胚

表5 试管苗嫁接于盆栽砧木及大树上的成活情况

试管苗的大小	砧 木 的 种 类	嫁 接 苗 数	成 活 苗 数	成 活 %
3—4厘米高	盆栽红黎檬或甜橙	7	6	85.70
2厘米高	“ ”	27	6	22.22
3—4厘米高	田间6年生甜橙树	4	2	50.00
合 计		38	14	36.84

讨 论

柑桔的多胚性对杂交育种的干扰是严重的。过去不少育种工作者为绕过多胚的干扰而不得不采用单胚品种为母本。这固然是一种方法，但这样做并未解决多胚品种间的杂交育种问题。

近十年来，国内外不少育种工作者研究早期合子胚的离体培养。T. S. Rangan (1969) 报导^[9]用经过授粉后100—120天的酸橙 (*Citrus Aurantium* Linn.) 幼胚进行

离体培养获得成功。但据堀内昭作等观察温州蜜柑的种子^[4], 和王大元观察锦橙的种子^[3], 以及我们观察暗柳甜橙和椪柑, 此时每粒种子已有20余个幼胚。珠心胚已充满整个种子。此时进行幼胚离体培养已不能解决多胚的干扰。堀内昭作等(1974)报导^[4], 温州蜜柑授粉后90天的幼胚离体培养获得成功, 但此时平均每种子已有幼胚12个, 王元裕等(1981)^[1]用经过授粉后105天的椪柑和授粉后75天的香水橙的幼胚进行离体培养, 较大的胚(心形胚)获得成功, 但直径0.05—0.08毫米的球状胚没有培养成功。我们培养授粉后71天的暗柳甜橙和授粉后90天的椪柑的球状胚(直径0.04—0.10毫米)均获得成功, 为解决多胚对杂交育种的干扰前进了一步。

在M T培养基中加入蜂乳或赤微酸对柑桔幼胚的培养是很适宜的。直径0.1毫米以下的球状胚接种在培养基上, 一星期后已有部分长成1—2毫米大的子叶胚, 生长快而壮健。有些甜橙和椪柑的幼胚, 培养200天后, 小苗高达4—6厘米。可供移出试管种植或嫁接。

植物组织培养应用含有激素的植物性补品或中药是值得研究的。我们应用蜂乳来培养幼胚不但能成功地培养细小的幼胚, 而且幼胚生长快而壮健。L, H, Hui等用人参粉加入M S培养基中^[12]培养胡椒的 *Peperomia Viridis*和十字花科的芥兰获得成功也是令人感兴趣的。

柑桔试管小苗移出试管种于蛭石和泥土上, 一般成活率较低, 除非小苗高5厘米以上。我们用嫁接方法, 把小苗直接嫁接在盆栽砧木上获得成功, 成活率达85.7%, 这是解决试管苗移出试管的好方法。嫁接成活后小苗生长快, 4个月苗高达30厘米, 比移栽于砧石和泥土上的小苗生长快几倍。采用嫁接方法一个更大的优点是试管苗不用诱导生根即可嫁接, 这样可省去在试管中诱导生根这一步骤, 可提前1—2个月移出试管。

本试验虽然初步解决了幼胚的离体培养, 进一步研究柑桔幼胚离体培养技术和探索获得较高比率的杂种苗是必要的。有人用枳壳为父本与柑桔栽培种杂交来探索获得杂种苗的比率, 但不同父本对获得杂种苗的比率差异是很大的。据Frost与Soost(1968)报导^{[7][8]}粗柠檬用枳壳的花粉来授粉获得实生苗有46%为杂种苗, 而用其他父本的花粉来授粉所获得的实生苗中, 有98%为珠心苗。因此用枳壳为父本来研究获得杂交苗的比率显然是不可靠的。渡边用³H标记的胸腺嘧啶标记园金柑(*Citrus japonica*)的花粉^[14], 然后进行人工授粉, 发现种子有放射性, 这对识别合子胚提供良好的前景。如果幼胚离体培养与这些先进技术相结合(包括同位素标记技术、气相色谱仪测定叶油和电泳仪测定同工酶等), 可能是克服珠心胚对杂交育种的干扰的一个较好的办法。有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王元裕, 1981, 柑桔胚培养技术的研究Ⅱ, 多胚性品种未熟幼胚的早期离体培养, 《园艺学报》, 8(1): 13—18。
- [2] 王元裕等, 1979, 柑桔胚培养技术的研究Ⅰ, 成熟种子的胚分离培养, 《园艺学报》, 6(1): 2—8。
- [3] 王大元等, 1975, 柑桔胚的人工培养, 《植物学报》, 17(2): 149—152。
- [4] 堀内昭作等, 1974, 关于温州蜜柑胚培养的研究, 日本园艺学会, 1974年春季大会研究报告要旨: 28—29。
- [5] 木原武士等, 1974, 早期检定杂种苗的研究(第1报) 柑桔属植物叶片精油成分测定, 日本园艺学会1974年春季大会研究报告要旨: 24—25。
- [6] 池田勇等, 1974, 柑桔育种与测定精油之研究(第二报) 测定叶油成分与识别杂交苗和珠心胚实生苗, 日本园艺学会, 1974年春季大会研究报告要旨: 26—27。
- [7] Soost, R. K. and W. Cameron, 1975: Citrus Chap. in *Advances in Fruit Breeding*.
- [8] 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.*
- [9] 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.*, I: 225—229.
- [10] Button, J. and J. Kochba, 1977: Tissue Culture in the Citrus Industry Chap. 4 in *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 70—92.
- [11] Murashige, Toshio, and David P. H. Tucher, 1969: Growth Factor Requirements of Citrus Tissue Culture. *Proc. Ist. Int. Citrus Sym. III*: 1155—1162.
- [12] Hui, L. H. and S. Y. Zee, 1981: In Vitro propagation of *Peperomia Viridis* Using Medium Supplement with Ginseng Powder, *Hortscience* 16(1): 86—87.
- [13] Soost, Robert K. and Timothy E. Williams, 1980. Identification of Nucellar and Zygotic Seedlings of Citrus with Leaf Isozymes, *Hortscience* 15(6): 728—729.
- [14] 渡边洋、山县弘忠、赤藤克巳, 1970, カンキツ类の多胚现象に関する育种学的研究, Ⅱ, ^3H 标识花粉による受精胚の识别。Japan. J. Breeding. 20(3): 141—145。

THE IN VITRO CULTURE OF EMBRYONIC OVULE OF CITRUS

Huang Zhi-Wen Ho Yue-Ching

(The Fruit Research Institute of Guangdong)

Abstract

Most of the species and cultivars of Citrus are polyembryonic, a phenomenon which interferes seriously into the work of Citrus breeding by hybridization. The method we adopted here by culturing in vitro the barely visible ovules under dissecting microscope may serve as a measure of evading the interference of polyembryony.

The embryonic ovules of "An-Lu-Chen" (*Citrus sinensis* Osbeck), 71 days after pollinating, and of "Ponkan" (*Citrus reticulata* Blanco), 90 days after pollinating were placed on Murashige and Tucker medium supplemented with royal jelly(400 ppm), gibberellic acid(1ppm), and casein hydrolysate(400 ppm). At this stage, most of the embryos were ballshape, and the diameter of the embryos were 0.04-0.10mm.

After one week, cotyledons began to show up from the small ballshape embryos, and then grew into plantlets, leaves and shoots. Altogether 58.82% of An-Lu-Chen's ballshape embryos and 55.0% of Ponkan's ballshape embryos formed plantlets in vitro. When the plantlets were 2-3cm in length, we transplanted them onto MT medium containing NAA (1ppm). In this medium more plantlets formed roots. When the plantlets were 3-4 cm high, we grafted them on *C. limonia* stock or other stocks which were 30-50cm. high potted seedlings. The percentage of success of grafting was 35.7%. Those plantlets which were without roots could be also grafted successfully. The plantlets grew quickly after grafting. Four months after grafting, the plantlets, being 30cm high, could be planted out in the nursery.



图 1 柑桔的胚。右为球形胚（直径0.1mm.）
左为心形胚（直径0.12mm.）



图 2 展开小叶的小苗（在MT+RJ
培养基上）

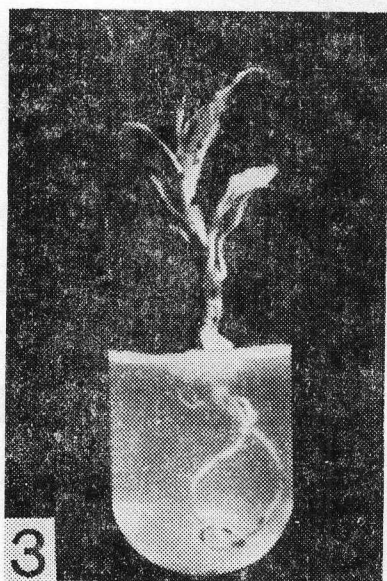


图 3 3.5厘米高的小苗

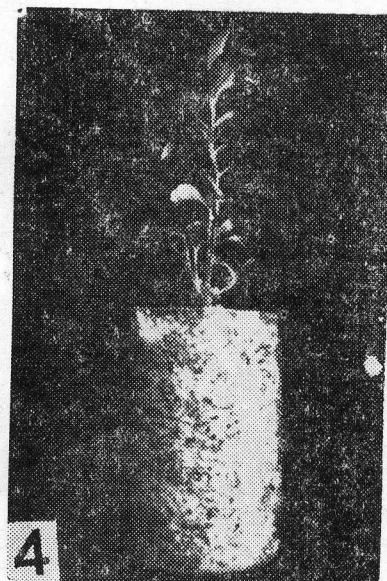


图 4 小苗高 6 厘米移出试管后种于蛭石上

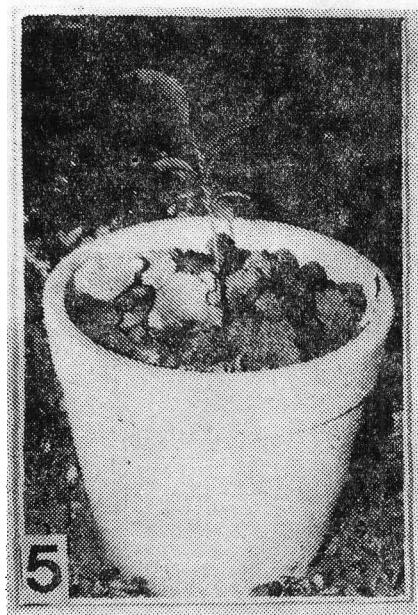


图5 移栽于盆上的小苗



图6 小苗嫁接于盆栽砧木苗上
(砧木主干上的纵线为嫁接口)

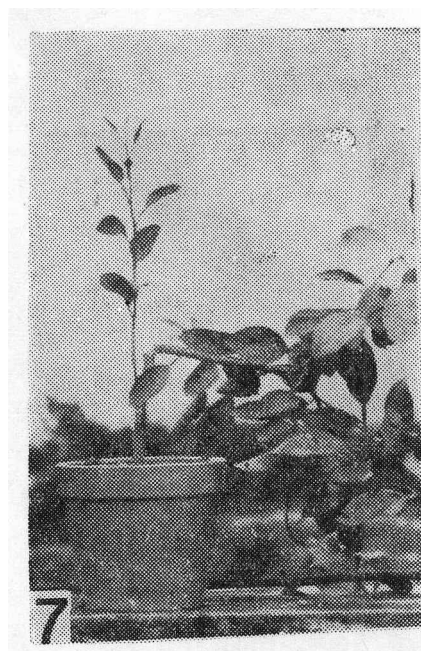


图7 小苗嫁接成活后，将砧木折倒，让小苗长出新梢。



图8 剪去折倒的砧木后小苗长成具有分枝的苗木