

# 红江橙体胚发生及影响因素的研究

贺 红 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

韩美丽 李耿光

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘 要** 红江橙花后 4 周的幼果, 直径约 1 cm 左右, 这时期的胚珠最适于胚性愈伤组织的诱导。以 MT 为基本培养基, 加上适当浓度的 IAA、BA 和 ME 可显著提高胚性愈伤组织诱导率。体胚发生, 以 MT + IAA  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  + BA (ZT)  $1 \text{ mg l}^{-1}$  培养基较好, 能诱导产生正常体胚, 且频率较高。胚性愈伤组织继代次数对体胚发生也有一定的影响, 继代 6 次以内, 胚性愈伤组织具有旺盛产生体胚能力; 继代至第 9 次时, 产生体胚的能力明显下降; 至第 12 代时, 不能产生胚状体。成熟胚转换成小植株, 以 MT + GA  $2 \text{ mg l}^{-1}$  + NAA  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  培养基成苗率最高。

**关键词** 红江橙; 胚性愈伤组织; 体胚发生

## The study on the factors affecting embryogenesis of *Citrus sinensis* Osbeck cv. Hongjiang

He Hong Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Han Meili Li Gengguang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510631)

**Abstract** Ovules excised from the 4-week-old fruit of Hongjiang sweet orange after anthesis were suitable for embryogenic callus induction. MT basal media containing IAA, BA and ME were effective to induce embryogenic callus with the induction frequency of 25.5%. An optimal medium for somatic embryogenesis was MT + IAA  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  + BA (ZT)  $1 \text{ mg l}^{-1}$ , inducing normal embryoids. Embryogenic callus was subcultured at intervals 30 days. Embryogenesis frequency was high before the 6th subculture with 10 ~ 19 embryoid/piece callus. Embryoid numbers remarkably decreased after the 9th subculture. Continued subculturing at 12th did not induce any embryoids. A mature embryoid could develop into a whole plant in the MT basal medium with GA<sub>3</sub>  $2 \text{ mg l}^{-1}$  and NAA  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ .

**Key words** *Citrus sinensis* Osbeck cv. Hongjiang; embryogenic callus; embryogenesis

红江橙是华南地区推广的优良柑桔品种,其果实外型美观、肉红汁多,风味独特,是目前我国重要的出口创汇果品,深受国内外消费者欢迎,但在品种稳定性与抗病性两方面仍有待改良。本文以红江橙幼果胚珠为材料,对体胚发生及其影响因素作了系统的研究,从而建立高效的体胚再生系统,为应用生物技术改良红江橙打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 胚性愈伤组织的诱导及继代培养

用红江橙开花后 30~70 d 的幼果为材料,经 75%酒精擦洗表面,再用 0.1% $\text{HgCl}_2$  溶液浸泡 10 min 后,在无菌条件下取出种子,剥取胚珠接种于愈伤组织诱导培养基上。诱导愈伤组织培养基为 MT,附加不同的植物激素及有机附加物。形成的胚性愈伤组织在一定大小时,可继代于无激素的 MT 培养基上,每隔 30 d 继代一次。

### 1.2 体胚诱导及植株再生

胚性愈伤组织接种于附加不同种类激素的 MT 培养基上,进行固体培养,以诱导体胚发生,胚状体转绿后接种于附加有  $\text{GA}_3$  与 NAA 的植株再生培养基上,可发育成完整植株。

所有培养基 pH 为 5.8,使固化琼脂为 0.65%,培养温度  $26 \pm 1$  °C,每天光照 16 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚性愈伤组织的诱导及继代培养

红江橙幼果胚珠培养,产生两类愈伤组织,一类结构致密、淡黄色;另一类为白色疏松状(图版 I: 1, 2),分化试验表明前一类不能产生胚状体,后一类能诱导体胚发生,为胚性愈伤组织。试验还观察到,大多数胚珠培养后,只形成前一类愈伤组织,只少量胚珠形成后一类愈伤组织,而且一般在接种 2 个月才开始形成。影响胚性愈伤组织诱导的因素很多,本试验研究了幼果发育时期及激素和有机附加物对诱导率的影响。

#### 2.1.1 幼果发育时期对胚性愈伤组织诱导的影响

红江橙幼果在不同时期采收,4月初至4月中旬,果实直径 1 cm 左右;4月中旬至5月中旬,果实直径 1.5~2 cm;5月中旬至5月底,果实直径则达 2~2.5 cm。将不同直径幼果分成 3 组,分别取其胚珠诱导胚性愈伤组织,结果列于表 1。果径 1 cm 左右,胚性愈伤组织诱导率为 20.0%;果径为 1.5~2 cm 和 2~2.5

表 1 幼果发育时期对胚性愈伤组织诱导的影响  
Table 1 Effect of the stage of fruit development on embryogenic callus induction

幼果直径(cm) Diameter of fruits (cm)	胚珠数 No. of ovules	发生胚性愈伤组织数 No. of ovules forming embryogenic callus	诱导率(%) Frequency of induction (%)
1 cm 左右	215	43	20.0
1.5~2 cm	196	24	12.2
2~2.5 cm	204	4	2.0

cm,诱导率分别为 12.2%和 2.0%,表明胚珠越小,其产生胚性愈伤组织的可能性越大。

#### 2.1.2 植物激素及附加物对胚性愈伤组织诱导的影响

通过大量实验,找到了适当的诱导培养基。从表 2 可见,10 号培养基胚性愈伤组织诱导率较高(25.5%),其次为 8 号和 9 号,诱导率分别为 20.8%和 16.0%,说明 IAA 与 BA 或 ZT 结合,能促进胚性愈伤组织的发生,BA 比 ZT 更加明显。2,4-D 的作用效果不大,附加 2,4-D 的培养基,仅 6 号具有一定的诱导率,为 5.2%,其余均不能诱导成功。表 2 结果还表明,ME 对胚性愈伤组织的形成有良好的效果,在不加激素的情况下,诱导率就达 14.6%,根据以上结果得出:IAA、BA 与 ME

配合对胚性愈伤组织的形成有良好的作用。

待胚珠产生的白色、疏松胚性愈伤组织长到一定大小时,可以进行继代培养,每隔 30 d 左右继代一次。继代培养基,以不加激素的 MT 培养基较好,既有一定的增殖速度,又不易形成胚状体;而继代于附加激素或 ME 的培养基上,对细胞的增殖有一定促进作用,但可能形成胚状体,因此,胚性细胞的增殖,可以不需在 MT 培养基上加任何外源激素。

## 2.2 体胚诱导及植株再生

### 胚性愈伤组织的分化分两种

情况:一是由胚珠上长出的白色、疏松的愈伤组织形成胚状体(图版 I: 3),胚状体转绿开始发育(图版 I: 4)并形成正常植株(图版 I: 6);二是已经分化的胚状体由于培养基等条件不适宜,胚状体畸形,不能正常发育(图版 I: 5)。

### 2.2.1 植物激素对体胚发生的影响

植物激素直接影响体胚发生能力。从表 3 可见,2 号和 3 号培养基诱导产生正常体胚,胚发生频率和同步化程度较高。BA、IAA

及 ZT 单独使用时,体胚发生能力低,仅形成少量胚状体或畸形胚,甚至没有胚状体发生,BA 与 ZT 结合使用,细胞增殖多,但也无体胚发生,说明当 IAA 分别与 BA、ZT 配合使用时,能促进体胚发生。

### 2.2.2 胚性愈伤组织继代次数对体胚发生的影响

Kochba 等<sup>[1]</sup>(1977)报道,每隔 4~5 周继代一次的甜橙愈伤组织,随继代次数的增加,胚状体发生能力减弱。我们的实验结果表明,继代 6 次以内,胚性愈伤组织具有旺盛的分化能力,每块(约黄豆大)愈伤组织平均分化出 10~19 个胚状体;当继代到第 9 次时,愈伤组织形成胚状体数量明显减少,平均在 5 个以下;到第 12 代时,虽然愈伤组织仍有一定增殖速度,但未见胚状体出现。

将正常的子叶胚转移到再生培养基上,能长成完整植株,培养基以 MT + GA<sub>3</sub> 2 mg l<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup> 为宜,胚状体成苗率可达

70.2%,GA<sub>3</sub> 浓度升高,能提高成苗率,但植株发育不正常,上胚轴特别长,叶变小;NAA 浓度提高,能诱导生根,但抑制长苗,并诱导出愈伤组织。一般随着培养时间的延长,生根与出苗将会进一步提高。

表 2 植物激素及附加物对胚性愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of plant hormones and additional substances in the medium on the embryogenic callus induction

编号 No.	培养基 Media (mg l <sup>-1</sup> )	胚珠数 No. of ovules	发生胚性愈伤组织数 No. of ovules forming embryogenic callus	诱导率(%) Frequency of induction (%)
1	MT	56	0	0
2	MT + ME 500	48	7	14.6
3	MT + CH 500	50	0	0
4	MT + 2,4-D 0.2	52	0	0
5	MT + IAA 0.2	47	0	0
6	MT + 2,4-D 0.2 + IAA 0.2	58	3	5.2
7	MT + 2,4-D 0.2 + ZT 0.5	38	0	0
8	MT + IAA 0.2 + BA 0.5	53	11	20.8
9	MT + IAA 0.2 + ZT 0.5	50	8	16.0
10	MT + IAA 0.2 + BA 0.5 + ME 50	51	13	25.5

表 3 植物激素对体胚发生的作用

Table 3 The influence of plant hormones on somatic embryogenesis

编号 No.	培养基 Media (mg l <sup>-1</sup> )	细胞增殖 Cell proliferation	体胚发育情况 Development of somatic embryoid
1	MT	++	无胚形成
2	MT + IAA 0.1 + BA 1	++	胚发育正常、频率高
3	MT + IAA 0.1 + ZT 1	++	胚发育正常、频率高
4	MT + IAA 0.1	+	形成少量畸形胚
5	MT + BA 1	++	胚发育正常、但频率低
6	MT + ZT 1	++	无胚形成
7	MT + BA 1 + ZT 1	+++	无胚形成

注:+++ 愈伤组织细胞增殖很多,++ 愈伤组织细胞增殖较多, + 愈伤组织细胞少量增殖。

### 3 讨论

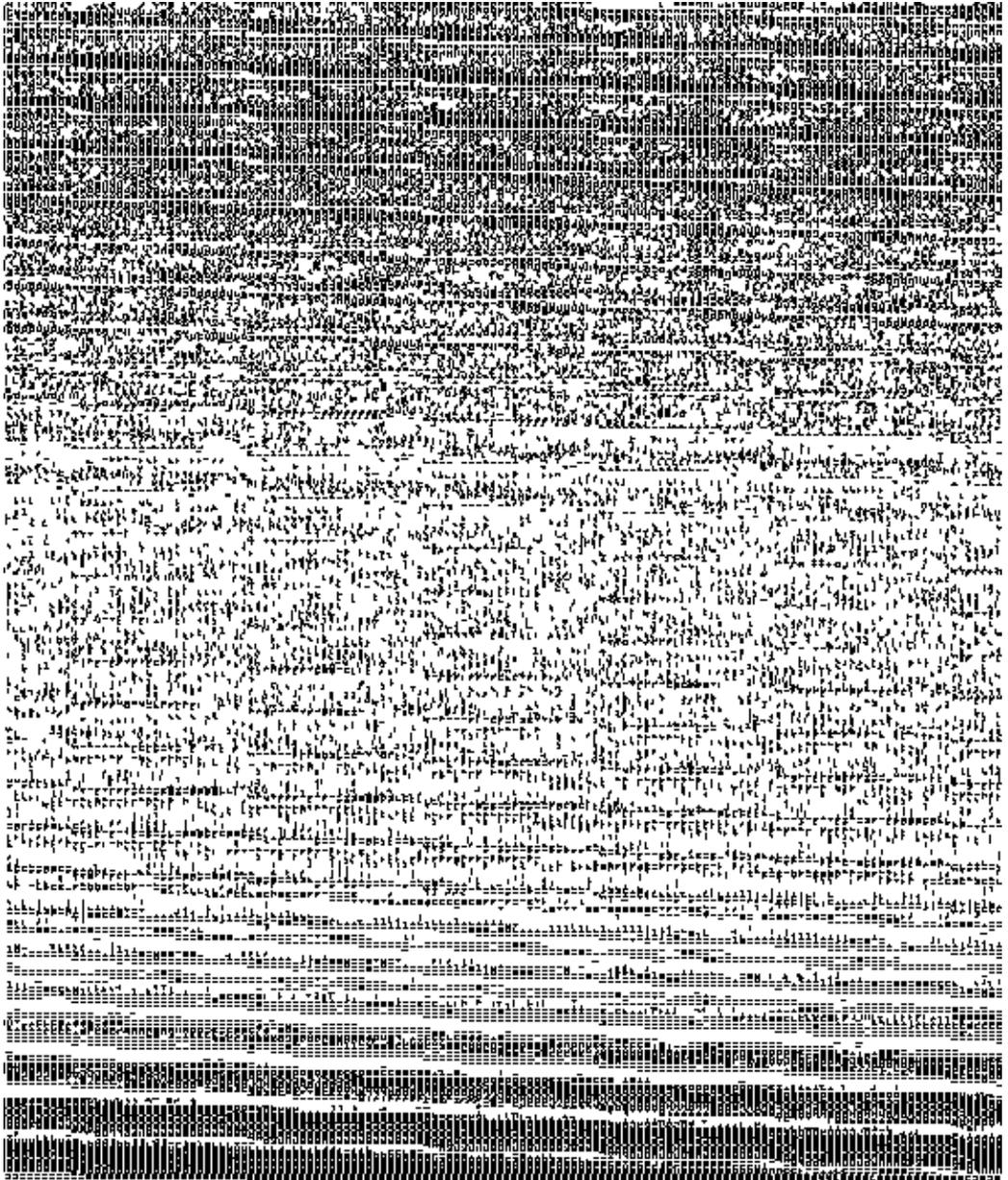
红江橙幼果胚珠胚性愈伤组织的繁殖,不需任何激素,只在 MT 培养基中附加一定量的蔗糖,就可以达到继代增殖的目的。这与文献中报导的其它柑桔类的结果相似(J. Kochba 等<sup>[1]</sup>, 1977; 邹韵霞等<sup>[2]</sup>, 1989; 陈如珠等<sup>[3]</sup>, 1990)。通过诱导柑桔胚性愈伤组织,并定期地继代培养,进而形成数量多和结构完整的胚状体,这样的离体繁殖方式比之通过茎芽完成分化的途径是更有效的。

张进仁等<sup>[4]</sup>(1987)将 1976 年柳橙胚培养诱导的胚性愈伤组织,继代于 MT + IBA 0.5 mg l<sup>-1</sup>或 MT + GA<sub>3</sub> 1 mg l<sup>-1</sup>培养基上,每隔 10~12 周交替继代培养,已达 8 年半,共 38 代,仍保持愈伤组织的增殖和再分化植株的能力。长期继代培养的愈伤组织,不仅是建立细胞无性繁殖系和作为种质资源保存的一种材料,也是突变育种、遗传转化的理想试材。这主要有材料一致、容易处理,不受季节和植物发育阶段的限制等优点。本试验得到红江橙胚性愈伤组织继代至 12 代以上时,仍具有较高的增殖速度,但不能诱导体胚发生,这可能与品种差异性有关,能否改善培养条件,再次“激活”其再分化能力,尚待研究。

Kochba<sup>[5]</sup>(1978)首次报道赤霉素具有促进胚状体后期发育作用。王大元等<sup>[6]</sup>(1978)报道 GA<sub>3</sub> 和高浓度无机盐使胚状体发育成完整植株。随后 Gmitter 等<sup>[7]</sup>(1986),陈如珠等<sup>[3]</sup>(1990)的研究结果也充分肯定了无机盐和 GA<sub>3</sub> 对胚状体再生植株的作用。本试验进一步证实了前人的结果并发现适当浓度的 GA<sub>3</sub> 与 NAA 结合,对胚状体芽端发育及生根都有良好效果。

### 参考文献

- 1 Kochba J, Spiegel-Roy P. The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryo genesis in habituated ovular callus of the 'shamouti' orange. *Z. Pflanzphysiol.* 1977, **81**: 283~288
- 2 邹韵霞,许丽萍,李宝健. 贡柑体胚发生和成苗的研究. 中山大学学报(自然科学论丛[18]), 1989, **8**(4): 110~117
- 3 陈如珠,李耿光,张兰英等. 柑桔珠心培养胚状体发生及植株再生的影响因素探讨. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1990, **6**: 75~79
- 4 张进仁,吴安仁,高峰. 长期继代培养的柳橙胚愈伤组织再分化能力和遗传性研究. 园艺学报, 1987, **14**(3): 213~216
- 5 Kochba J, Spiegel-Roy P, Neumann H *et al.* Stimulation of embryogenesis in Citrus ovular callus by ABA, ethephen, CCC and Akar and its suppression by GA<sub>3</sub>. *Z. Pflanzenphysiol.* 1978, **89**: 427~432
- 6 王大元. 用组织培养法繁殖柑桔. 遗传学报, 1978, **5**(2): 133~137
- 7 Gmitter F G, Moore G A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of Citrus: embryo production, germination and plant survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1986, **6**: 139~147



1. 红江橙胚珠培养形成的愈伤组织, 此类愈伤组织不能产生胚状体; 2. 红江橙胚珠培养形成的胚性愈伤组织, 能诱导体胚发生; 3. 胚性愈伤组织形成胚状体; 4. 胚状体开始发育; 5. 胚状体形成的畸形苗; 6. 胚状体发育成正常植株。
1. Callus from ovules— derived of Hongjiang sweet orange could not induce embryoids; 2. Embryogenic callus from ovules— derived of Hongjiang sweet orange could induce normal embryoids; 3. Embryoids from the embryogenic callus 4. Embryoids initial differentiate; 5. Anomalous plantlets from the embryoids; 6. Normal plantlets from the embryoids.