

影响四季桔器官发生的因素

贺红 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

何亚文, 张兰英 李耿光

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

S666.901

A 摘要 对四季桔胚轴直接出芽、愈伤组织诱导及植株再生能力的研究表明: 上、下胚轴在含有 BA 的 MT 培养基上, 均能直接出芽, 但上胚轴出芽能力明显高于下胚轴, 最高出芽率为 96.9%。外植体在培养基上的接种方式, 对出芽也有一定影响, 上胚轴切段以形态学下端垂直插入, 出芽率高, 且在培养前期表现尤为突出。胚轴愈伤诱导的适宜培养基为 MT+IBA 0.5 mg L⁻¹+BA 1 mg L⁻¹, 愈伤组织分化时, 上、下胚轴愈伤组织所要求的 BA 浓度分别为 4 mg L⁻¹ 及 2 mg L⁻¹, 在根的诱导中, 附加的生长素种类, 不仅影响生根率的高低, 而且影响上部茎叶的生长, 其中以加入 1 mg L⁻¹ IBA 的效果最好, 生根率达 84.4%。

关键词 四季桔; 离体培养; 器官发生

FACTORS AFFECTING ORGANOGENESIS OF
CITRUS MICROCARPA BUNGE

He Hong Pan Ruichi

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

He Yawen Zhang Lanying Li Gengguang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Hypocotyls and epicotyls from sterile seedling of *Citrus microcarpa* Bunge were examined for direct shoot formation, callus induction and plant regeneration. The ability of shoot induction from epicotyl was much higher than that from hypocotyl, with the highest shoot production frequency of 96.9%. Epicotyl segments oriented with their apical ends protruding from the medium (↑) produced more shoots than that when they were placed with their basal end upwards (↓) or placed horizontally (-). Optimal callus induction medium was MT+IBA 0.5 mg L⁻¹+BA 1 mg L⁻¹. MT media with BA 4 mg L⁻¹ for epicotyl callus, and BA 2 mg L⁻¹ for hypocotyl callus, gave higher plant regeneration frequencies. When individual shoot was rooted on a rooting medium supplemented with IBA 1 mg L⁻¹, a root induction rate of 84.4% was observed.

Key words *Citrus microcarpa* Bunge; *In vitro* culture; Organogenesis

利用组织培养技术进行柑桔快速繁殖,可概括为外植体直接出芽、愈伤组织和胚状体三种途径^[1]。体细胞胚状体的诱导在柑桔中已获得成功^[2,3],但主要局限于胚性材料。外植体直接出芽,通过产生不定芽,再生根成完整植株,已从酸橙、甜橙、枳橙、金柑、柠檬等获得了再生体系^[4-7],而四季桔还未见报道。愈伤组织途径,即经愈伤组织阶段、再经器官发生再生植株,这方面的研究很少。柑桔愈伤组织的诱导不受基因型和外植体类型的限制,研究其器官发生与植株再生具有更广泛的意义。由胚性材料到利用营养器官为材料,无疑更前进了一步,因而能更快、更好地运用到育种实践中去。本文以四季桔胚轴为材料,研究胚轴直接出芽及经愈伤组织再分化芽两种再生途径,为快速繁殖、诱变育种及遗传转化,提供参考。

1 材料与方 法

植物材料 四季桔(*Citrus microcarpa* Bunge)种子经表面消毒培养无菌苗,当苗长至 20 d 左右,取上、下胚轴为试验材料。以下每个处理一般接种 40 块。

直接出芽试验 将无菌苗上胚轴切成约 1 cm 长,下胚轴约 0.5 cm 长,接种于附加一定浓度 BA 的 MT 培养基中。

愈伤组织诱导 切取上、下胚轴约 0.5 cm 长的小段,接种于愈伤组织诱导培养基。

愈伤组织分化 当愈伤组织生长一个月左右,从外植体上切下,转至分化培养基。

培养条件 培养温度为 26 ± 1 °C,每天光照 16 h。

2 结果与分析

2.1 胚轴培养诱导直接出芽

不同 BA 浓度的影响 BA 对四季桔胚轴出芽效果较好。以 MT 为基本培养基加入不同浓度的 BA,试验结果可见(表 1),上胚轴出芽率普遍高于下胚轴,培养 50 d 时,上胚轴最高出芽率可达 96.9%,下胚轴仅为 32.3%。上胚轴培养中,培养至 30 d 时,BA 对芽的发生有一定的延缓作用。以不加 BA 的 MT 培养基

表 1 不同 BA 浓度对出芽率的影响
Table 1 Effect of BA concentration on frequency of shoot formation at 30 and 50 days after inoculation

BA (mg L ⁻¹)	上胚轴 From epicotyls (%)		下胚轴 From hypocotyls (%)	
	接种后 30 d	接种后 50 d	接种后 30 d	接种后 50 d
0	65.3	70	26.7	30.0
1	61.3	73.3	23.5	32.3
2	50.9	90.2	16.7	22.1
3	40.5	96.9	15.3	17.8
4	16.7	93.3	0	0

的出芽率最高(65.3%),加入 BA 出芽率反而降低,而且这种下降趋势随 BA 浓度的升高而越明显。但培养至 50 d 时,MT 培养基出芽率变化不大,而加入 BA 后,出芽数大增,尤以 2-4 mg L⁻¹ BA 突出。下胚轴培养中,30 d 和 50 d 出芽率无明显变化,培养基以不加 BA 或 1 mg L⁻¹ BA 为好,随着 BA 浓度升高,出芽率下降。

外植体在培养基中放置方式的影响 用上胚轴以 3 种接种方式,即形态学下端垂直插入(↑),形态学上端朝下垂直插入(↓)和外植体水平放置(-)于培养基 MT+BA 2 mg L⁻¹(图版 I: 1, 2)。结果表明(表 2),“↑”放置的上胚轴切段出芽率最高,“↓”放置,培养 30 d 时,出芽水平极低,仅为 12.1%,但随着培养时间的延长,出芽率则大大提高,与“-”放置的外植体达到接近的

水平(60%以上)。这说明"↓"放置的外植体,在培养时,体内激素有一个再分配的过程,表现前期出芽速度慢。

2.2 胚轴愈伤组织的诱导及分化

愈伤组织的诱导 基本培养基附加 1 mg L^{-1} 的 BA, 并分别配合不同生长素类: 2,4-D、IAA、NAA 和 IBA, 浓度均为 0.5 mg L^{-1} , 试验结果显示: 四种培养基均能成功诱导胚轴愈伤组织发生(图版 I: 3),

但从后期分化试验中观察到, 在诱导愈伤组织的培养基中, 附加的生长素种类可直接影响分化能力, 例如在附加 2,4-D 培养基上生长的愈伤组织难以分化; 而 IBA 处理中获得的愈伤组织却能得到较多分化芽; IAA、NAA 处理次之。

不同 BA 浓度对分化的影响 几种激素组合的比较试验表明, BA 与 IBA 结合, 有利于四季桔愈伤组织的分化(表 3)。

愈伤组织转至分化培养基经一段时间后, 愈伤组织开始变绿, 表面变粗糙, 长出许多小突起, 进而长成小芽点, 再生长成茎芽, 有单生, 也有丛生, 有的芽多达 10 个以上(图版 I: 4,5)。上胚轴愈伤组织分化率普遍高于下胚轴, BA 浓度 $3-5 \text{ mg L}^{-1}$ 时, 上胚轴愈伤组织均有较高的分化率, 其中以 BA 4 mg L^{-1} 的分化率最高(74.7%)。下胚轴适宜的 BA 浓度为 2 mg L^{-1} , 分化率为 54.6%。试验中还观察到, BA 为 $4-5 \text{ mg L}^{-1}$ 时, 下胚轴愈伤组织均有部分变黄、死亡, 说明该浓度对愈伤组织本身造成了毒害, 而在上胚轴愈伤组织培养中, 未发现此现象。由此说明, 来源于不同外植体的愈伤组织, 在分化时, 所要求的 BA 浓度是不同的。

2.3 根的诱导

胚轴培养直接出芽及胚轴愈伤组织分化得到的芽, 长出茎叶后, 在原培养基上一般不能形成根, 或仅形成少量根, 必须将已形成茎叶的无根苗, 切下转入生根培养基, 才能成功诱导生根(图版 I: 6)。

不同生长素类化合物对生根的效果不同。将具有数片真叶的无根苗, 转至附加 1 mg L^{-1} 不同生长素类的 MT 培养基中, 一般转管后 20 d 左右即开始生根, 一个月可达到较高的生根率。结果表明, 四季桔无根苗的生根以 IBA 效果最好, 生根率达 84.4%; IAA 次之(75.9%); 不加任何生长素的 MT 培养基, 也有较高的生根率(57.4%); NAA 效果最差, 仅为 40.6%。试验中还观察到, 在附加 IAA、IBA 及无激素的 MT 培养基上生长的根, 形态相似: 较稀疏、细长, 苗的生长也都较好, 茎叶生长旺盛, 叶片颜色深绿。NAA 处理中, 根的生长更为旺盛, 一般成簇状, 且在根部形成少量愈伤组织, 这在一定程度上抑制上部茎叶的生长, 表现为植株长势不良, 茎秆纤细, 叶片小而色淡。

表 2 外植体在培养基中放置方式对出芽的影响
Table 2 Effect of explant posture orientation in medium on shoot formation frequency

放置方式 Posture orientation of explants	30 d 出芽率 At 30 d (%)	50 d 出芽率 At 50 d (%)
↑	52.0	89.3
↓	12.1	66.0
-	29.2	64.2

表 3 BA 浓度对愈伤组织分化率(%)的影响
Table 3 Effect of BA concentration on the differentiation rate (%) of callus

培养基 Media (mg L^{-1})	下胚轴 (%) From hypocotyls	上胚轴 (%) From epicotyls
MT+IBA 0.5+BA 1	14.3	21.4
MT+IBA 0.5+BA 2	54.6	50.3
MT+IBA 0.5+BA 3	48.2	70.3
MT+IBA 0.5+BA 4	40.0	74.7
MT+IBA 0.5+BA 5	22.5	64.5

3 讨论

四季桔胚轴培养诱导直接出芽,在MT基本培养基上,不加任何激素,也有较高的出芽率;无根苗在MT培养基上也能部分生根,这说明外植体及其再生芽,含有较多内源激素,本身具有较强的再生能力,这对于四季桔组织培养是一个有利条件。

在四季桔愈伤组织的器官发生再生植株过程中,植物激素起着重要作用。一定的外源激素水平,可能调节内源激素配比,从而有利于愈伤组织的诱导与分化。植物激素的作用在于引起细胞发育途径的改变,使得离体组织的细胞经历一个脱离原状态而进入到分生状态的过程,以恢复分裂增生的能力,在新的培养条件下,开始新的分化发育过程,最终形成新的组织、器官,再发育成完整植株。从脱分化到再分化,在植株个体发育过程中出现的顺序前进以此完成生活周期,这种离体培养较之于活体提供了一个更为一致和可控的系统,这对于遗传学的研究、培育新品种及获得新种质,具有重要意义。

从柑桔离体培养现有的文献看到,诱导不定芽生根的生长素,一般是选择NAA^[8,9],而本试验中,NAA对于四季桔生根并不理想,生根率低,且上部茎叶生长不良,但IBA却表现出明显优势。IBA不仅能成功诱导生根,而且有利于愈伤组织诱导及分化,对于四季桔外植体器官发生具有良好的效果。

参考文献

- 1 张进仁,高峰.我国柑桔离体培养研究的进展.中国柑桔,1989,18(3):15-17
- 2 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,第六集,北京:科学出版社,1990,75-79
- 3 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
- 4 杨乃博.柑桔与金桔的器官发生研究.植物生理学通讯,1983,(6):33-37
- 5 唐小浪.柑桔不定芽的诱导和再分化植株的培养.中国柑桔,1989,18(3):18-19
- 6 Edriss M H, Burger D W. *In vitro* propagation of Troyer citrange from epicotyl segment. Sci Hort, 1984, 23: 159-162
- 7 Sauto A et al. Plant regeneration from *Citrus* roots meristem. J Hort Sci, 1983, 57:227-231
- 8 林荣,王秀琴,王润珍.金桔组织培养的初步研究.广西植物,1982,2(1):11-13
- 9 Gill M I S et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explant of 'kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* Lour. × *Citrus deliciosa* Tenora). J Hort Sci, 1994, 69(2):231-236

图版说明

1. 上胚轴垂直放置出芽; 2. 上胚轴水平放置出芽; 3. 上胚轴培养诱导的愈伤组织; 4. 愈伤组织开始分化; 5. 愈伤组织分化出多个芽; 6. 无根苗诱导出根

Explanation of plate

1. Shoots from epicotyl vertically put into the medium; 2. Shoots from epicotyl horizotally laid on the medium; 3. Callus from epicotyl; 4. Initial differentiation from callus; 5. Shoots differentiated from callus; 6. Root induced from shoot.