植物学通报 2004, **21** (2): 189~194
Chinese Bulletin of Botany

咖啡多胚现象与多胚苗形态发育的研究

莫 饶 郑成木① 朱 稳 韩平原

（华南热带农业大学农学院 儋州 571737）

摘要 通过目测筛选出咖啡多胚豆(种子)，对其进行离体胚培养获得幼小植株，观察分析了多胚及其幼苗的形态发育特征。结果表明，不同倍性咖啡种质均存在多胚现象，不同材料的双胚率不同(变幅在1.06‰ ~ 4.46‰)，其中四倍体材料普遍比二倍体的高。多胚豆中胚的形态和着生位置各异。多胚再生植株生长发育特点各不相同，一般大胚再生植株生长发育正常；小胚植株长势弱，出现畸形植株及生长过程中夭亡等现象。同一咖啡豆中远离正常胚位的额外胚可能是由胚囊外的体细胞发育而形成的不定胚。

关键词 咖啡，多胚，多胚苗，无融合生殖

The Polyembryony and Morphogenesis of Multi-seedlings in Coffee

MO Rao ZHENG Cheng-Mu① ZHU Wen HAN Ping-Yuan

(*South China University of Tropical Agriculture*, Danzhou 571737)

Abstract The polyembryonic materials of coffee were selected by eye survey and *in vitro* cultured in this study. Observation of morphological characters was performed on polyembryonies and generated seedlings. The results showed that polyembryony existed in different multiploid coffee materials, the twin embryos rate varied in different materials from 1.06‰ to 4.46‰ among them, the twin embryos rate in 4X materials was higher than that in 2X materials. The shape and position of the embryos in seeds and growth characters of the seedlings with polyembryony in all the materials tested were very different. In general, the generated seedlings from big embryo grew normally and those from small embryo were weak, abnomrmal or died during growth.

Key words Coffee, Polyembryony, Multi-Seedling, Apomixis

无融合生殖(Apomixis)是一种发生于性器官中不经过精卵融合而形成胚，以种子进行繁殖的特殊生殖方式。它是与有性生殖、无性生殖并存的自然界三大生殖系统之一（孙敬三，1996)。自 1841 年 Smith 首先在麻杆属发现无融合生殖以来，已在被子植物 29 目 35 科 434 个种中发现了无融合生殖（黄群策，1999）。通过无融合生殖可获得不分离的杂种后代，是

①通讯作者。Author for correspondence. E-mail: zecemu@163.net
作者简介：莫饶,男,副教授,1963年生,从事热带植物遗传育种方面的研究；郑成木,男,教授,博士生导师,从事植物遗传育种的科研与教学工作。
收稿日期：2003-03-12 接受日期：2003-10-27 责任编辑：崔郁英

固定杂种优势的理想途径。因此，引起了许多科学工作者的关注。袁隆平（1987）首先提出利用无融合生殖固定水稻杂种优势，变“三系”为“一系”的战略设想。黄群策（1999）提出在多倍体水平寻找和创造无融合生殖种质的基本策略。无融合生殖具有双胚珠、双胚囊、双胚、双苗或多苗等特点(Hanna,1973；Tang,1980)，虽然有些双苗或多苗也不一定都是无融合生殖(Powell,1968；Rao,1986)，但由于这种现象与无融合生殖密切相关，且易鉴别，故可作为线索，以便从大量栽培品种中筛选无融合生殖的突变体(黎垣庆和袁隆平, 1990；高建伟等，2000)。如水稻的 PY1PJ5（刘向东，1990）、SB-1（刘永胜，1994）、C1001（谭薇等，1994），都是由此途径选出的无融合生殖种质。不定胚已在被子植物 16 个科,172 个种中发现（母锡金等，2001）。咖啡属(*Coffea*)植物有 60~70 个种，又存在不同倍性水平的种质，如 2X(中粒种、大粒种)、3X（远缘杂交后代）、4X（小粒种、远缘杂交后代等）及 6X（诱导染色体数加倍）。但迄今尚未见有关咖啡多胚及其产生机制的研究报道。本文首次报道咖啡多胚现象及其多胚苗形态发育的研究结果，旨在为研究咖啡无融合生殖提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

咖啡供试材料包括：查里种（*Coffea excelsa*）,大粒种（*Coffea liberica*）,中粒种（*Coffea robusta*）7 个品种（包括兴 24-11、兴 24-10、兴 24、兴 26、兴 6、兴 24-1、兴 24-2），小粒种(*Coffea arbica* L.)2 个品种（包括墨西哥-2、巴西），中小粒种间杂种材料 1 份（杂种 4X），共 12 份材料，均种植在本校农学院的咖啡种质圃中。

1.2 方法

将成熟的咖啡果剥除果皮、果浆、种壳和种皮，筛选出多胚豆（种子）。观察多胚豆中胚的形态及着生位置，统计多胚率。多胚豆经表面消毒后切取种胚，接种于培养基(MS+KT 0.01 mg/L+3% 蔗糖 +0.6% 琼脂)上，置于恒温培养室培养。种胚培养成植株后，观察记录多胚苗生长状况及形态特征。培养室条件为: 28 ℃，光照强度 2000 Lx，光照 10~12 h/d。

2 结果与分析

2.1 多胚现象观察结果

所观察的 12 份咖啡材料均存在多胚现象，多胚率在 1.06‰～4.46‰之间（表 1）。其中，四倍体的双胚率(3.06‰～3.47‰)和多胚率(3.36‰～3.67‰)一般比二倍体高，但二倍体查理种例外，其多胚率高达 4.46‰；兴 24-11（2X）也较高，达 3.52‰。部分材料（如查理种、兴 24-11、兴 24-10、兴-24、兴-6、杂种 4X）具有三胚现象，但频率较低，在 0.15‰－0.61‰之间；而中粒种也较高（3.52‰）。另外，杂种 3X 材料因其结实率极低，只采收到几十粒果实，多数不饱满，大部分没有胚，29 粒有胚的咖啡豆中发现双胚豆 4 粒，双胚率高达 137.9‰（未统计在表 1），是一个更为特殊的材料。

2.2 多胚豆中胚的形态与着生位置

咖啡单胚豆的胚着生在种子的底部，子叶朝向种子顶部，胚具有发育完整的子叶和胚轴（图 1-A）。本研究发现咖啡豆多胚的形态及其着生部位存在多样性，如图 1 所示。从多胚豆中切取胚进行胚形态的观察，发现胚有大胚和小胚之分，大胚的形态大小和生长发育状况

表 1 供试咖啡材料多胚率统计

Table 1 Multi-embryony rate in coffee materials tested

材料 Materials	倍性 No.of genomes	总粒数 Total seeds	双胚豆数 No.of twin embryos	双胚率 Rate[1] (‰)	三胚豆数 No.of triplet embryos	三胚率 Rate[2] (‰)	四胚豆数 No.of tetrad embryos	四胚率 Rate[3] (‰)	合计 Total multiem-byros	多胚率 Rate[4] (‰)
C. excelsa	2X	6281	27	4.3	1	0.16	-	-	28	4.46
C. liberica	2X	9408	10	1.06	-	-	-	-	10	1.06
Xing24-11	2X	9380	28	2.99	4	0.43	1	0.11	33	3.52
Xing 24-10	2X	6380	14	2.19	1	0.16	-	-	15	2.35
Xing 26	2X	6810	20	2.94	-	-	-	-	20	2.94
Xing 24	2X	7830	18	2.3	3	0.38	-	-	21	2.68
Xing 6	2X	6520	10	1.53	1	0.15	-	-	11	1.69
Xing 24-1	2X	8990	22	2.45	-	-	-	-	22	2.45
Xing 24-2	2X	2610	6	2.3	-	-	-	-	6	2.30
Hybrid 4X	4X	1635	5	3.06	1	0.61	-	-	6	3.67
Mexico 2	4X	3870	13	3.36	-	-	-	-	13	3.36
Brazil	4X	4906	17	3.47	-	-	-	-	17	3.47
Total		74649	194	2.55						

Note: 1) twin embryos rate; 2) triplet embryos rate; 3) tetrad embryos rate; 4) Multi-embryos rate.

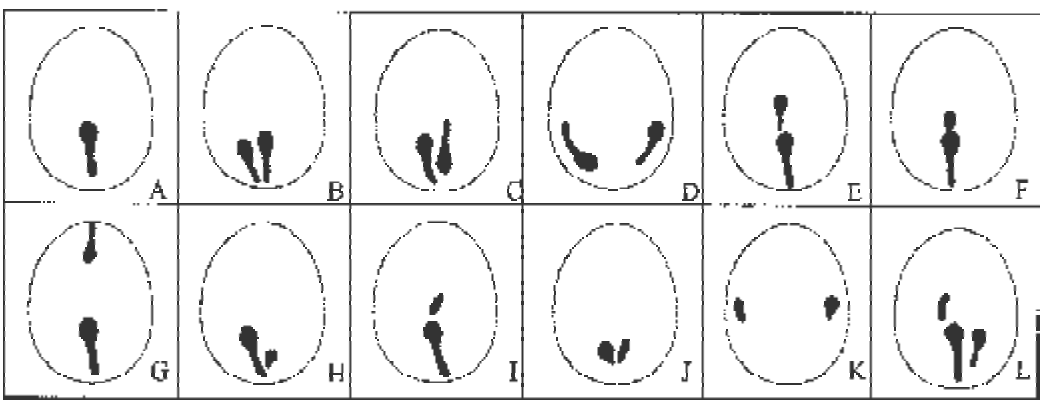

图 1 咖啡豆多胚形态和位置示意图

A.单胚豆正常胚位；B.双胚均在正常胚位，两胚紧靠着；C.双胚均在正常胚位紧靠着，极性相反；D.双胚均在正常胚位，极性相反，两胚分离；E.大胚在正常胚位，小胚位于种子中部；F.大胚在正常胚位，大小胚瓦叠着；G.大胚在正常胚位，小胚在顶部；H.大小胚在正常胚位紧靠着，小胚畸形；I.大胚在正常胚位，畸形小胚位于中部；J.双胚畸形，在正常胚位紧靠着；K.双胚畸形，两胚分离在中部两侧；L.三胚豆，一个大胚，二个小胚。

Fig. 1 The shape and position of polyembryony in coffee seeds

A. Normal shape and position of single embryo in seed; B. Position of twin embryos are normal, a embryo abuts on the other; C. Position of twin embryos are normal and polarity is reverse; D. Position of twin embryos are normal, polarity reverse, embryos separative; E. Position of big embryo is normal and the small one is located in the middle of seed; F. Position of big embryo is normal and lapped by the small; G. Position of big embryo is normal and the small one is located in the top of seed; H. Position of twin embryos are normal, but the small one is abnormal and abuts on the big; I. Big embryo is normal, small embryo is abnormal and located in the middle of seed; J. Both embryos are abnormal and abut on each other in the bottom of seed; K. Position of both embryos are abnormal and are separated in the middle of seed; L. Triplet embryos seed, a big embryo and two small embryos exist in seed.

与单胚豆的胚一致，胚发育正常（有胚轴和子叶）；小胚个体小，有些发育完整，有胚轴和子叶，一些发育不完整成畸形（或无子叶或无胚轴或胚轴极短等）。依胚大小和发育的完整性可将双胚豆初步划分为 4 种类型：(1)双胚正常，即双胚大小相同，胚发育完整(图 1-B, C, D); (2)双胚发育完整，但一个胚大，一个胚小(图 1-E,F,G); (3)大胚正常，小胚发育畸形(图 1-H, I); (4)双胚发育畸形 (图 1-J,K)。这 4 种类型各占的比率分别约为 5%、10%、45%、40%。对胚的着生位置观察后发现，单胚豆的胚一般着生在种子的底部，而多胚豆的胚可出现在种子的底部、顶部、中部和中部的两侧；双胚有紧靠着的，有分开的。依多胚在种子内的着生位置可将双胚豆初步划分为 2 种类型: (1)双胚紧靠着生在种子底部(图 1-B,C,H,J); (2)双胚分离着生。双胚分离着生类型又可分为 4 种情况：(1）着生在种子中部两侧(图 1-K); （2）着生在种子底部两侧（图 1-D)；(3）一胚在底部，另一胚在中部(图 1-E,F,I); （4）一胚在底部，另一胚在顶部（图 1-G)。另外，三胚豆一般有一个大胚在正常胚位，另二个或是小胚或是畸形 (图 1-L)。

2.3 多胚植株发育状况

离体多胚在试管里培养 60 d 后，发现多胚苗在长势，个体大小，根、茎、叶器官发育等性状上各异；一般大胚生长发育成大植株，小胚生长发育成小植株或畸形植株；出现双胚苗连体、小胚苗或无子叶、或无胚轴、或胚轴极短、或无根及夭亡等现象。双胚植株的形态可归纳为 5 种类型：(1) 双同株，即两植株大小、长势相同、生长发育正常（图 2-A)；(2)大小株，即两植株生长发育正常、但一株长势正常另一株长势稍弱（图 2-B)；(3)大残株，即大植株长势和生长发育正常，但小植株生长发育不正常，或无根、或无胚轴、或胚轴极短、或无子叶以上部分、或子叶以上部分极弱小、或夭亡（图 2-C)；(4)双残株，即两植株生长发育均不正常（图 2-D)；(5) 连体株，即两植株胚轴部分连体生长，或胚轴基部连

表 2 双胚植株生长情况观察

Table 2 The observation of twin-embryonic seedlings development

材料 Materials	接种瓶数[1] No.of vaccinated bottles[1]	类型 Type of twin seedlings										
		双同株 Big-big		大小株 Big-small		大残株 Big-abnorma		双残株 Abnormal-abnormal		连体株 Siamese-twins		合计[2] Total[3]
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
C. excelsa	22	2	11.76	3	17.65	5	29.41	7	41.18	-	-	17
C. liberica	10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10.00	1
Xing 24-11	28	2	11.76	3	17.65	6	35.29	5	29.41	1	5.88	17
Xing 24-10	14	-	-	-	-	7	23.64	3	27.27	1	9.09	11
Xing 26	20	2	10.53	3	15.79	10	52.63	4	21.05	-	-	19
Xing 6	10	0	0	1	10.00	4	40.00	5	50.00	0	0	10
Xing 24-1	23	1	6.67	1	6.67	6	40.00	6	40.00	1	6.67	15
Xing 24-2	11	1	9.09	1	9.09	4	36.36	3	27.27	2	18.18	11
Hybrid 4X	4	0	0	1	25.00	1	25.00	2	50.00	0	0	4
Brazil	17	-	-	1	25.00	-	-	3	75.00	-	-	4
Total	159	8	7.34	14	12.84	43	39.45	38	34.86	6	5.50	109

注：1)表中瓶数即双胚豆数（同一种子的双胚接种在同一瓶子内); 2)在观察前已污染的未计入表内。

Note: 1) The No. of bottles is the No. of twin embryos(twin embryos is vaccinated in one bottle); 2) The contaminative materials have not been counted.

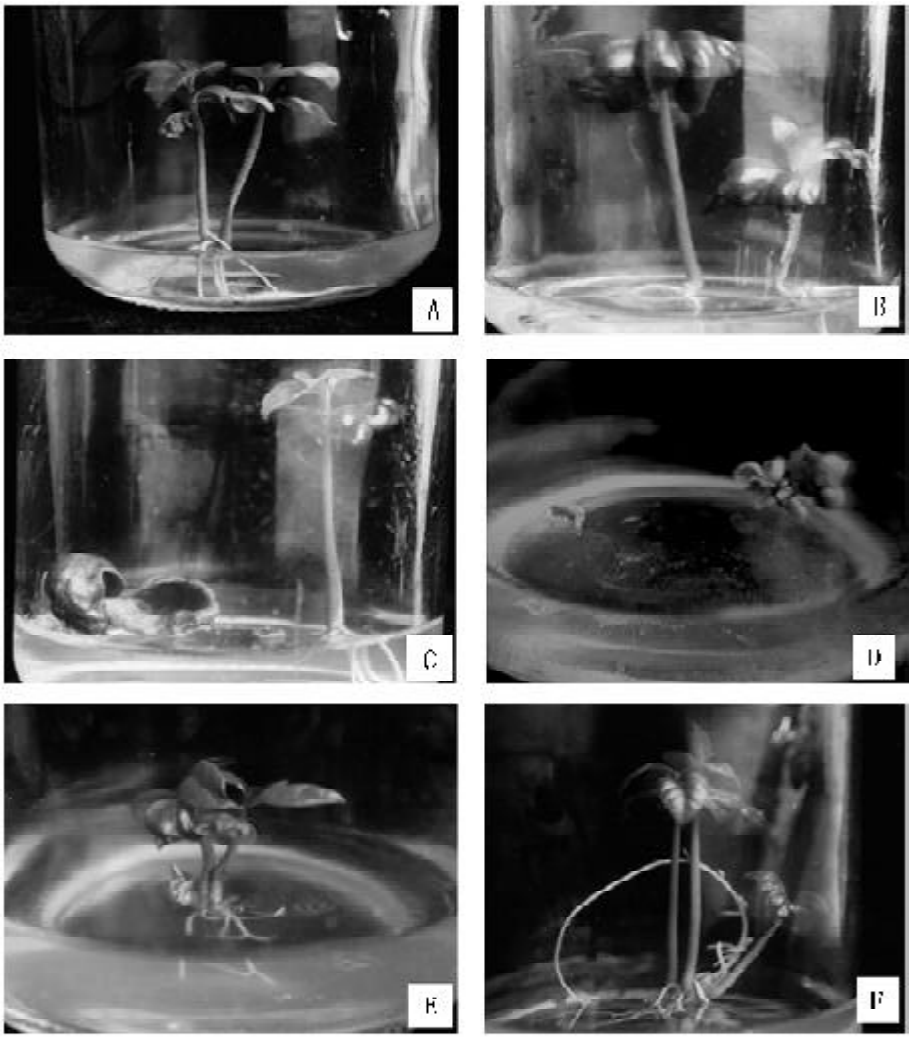

图 2 多胚植株发育状况

A. **双同株**; B. **大小株**; C. **大残株**; D. **双残株**; E. **连体株**; F. **三胚苗**

Fig.2 Developing status of multi-seedlings

A. Big-big type: both seedlings are big; B. Big-small type: one is big, the other is small; C. Big-abnormal type: one is big, the other is abnormal; D. Abnormal-abnormal type: both seedlings are abnormal; E. Siamese twins type; F. Triplet seedlings.

体、或胚轴中部连体、或胚轴中部以下部分连体、或整个胚轴连体（图 2-E**）。另外，在三胚再生植株中，可见** 1~2 **个植株生长正常，其余的长势较弱或发育不完整（图** 2-F**）；四胚豆只有一粒，见到再生植株** 3 **株发育完整，** 1 **株发育不完全，且有两株胚轴基部连体。各供试材料双胚再生植株生长情况观察统计列于表** 2**。**

从表 2 **可以看出，** 5 **种材料（如查理种、兴** 24-11**、兴** -26**、兴** 24-1**、兴** 24-2**）具有双同株类型（**6.67%～11.76%**）；** 8 **种材料（如查理种、兴** 24-11**、兴** -26**、兴** -6**、兴** 24-

1、兴 24-2、杂种 4X、巴西种）具有大小株类型（6.67%～25.00%）；几乎所有的材料均出现大残株、双残株这 2 种类型且比率较高（在 70% 以上）。就育种材料而言，双同株、大小株这 2 种类型更值得关注。已移栽的生长发育正常的再生苗（包括双同株、大小株 2 种类型）46 株，目前均生长良好。

3 讨论

对于种子中多胚的来源，一般认为除了由精细胞和卵细胞通过受精作用所产生的合子胚（或有性胚）之外，在其多胚中额外胚可以由合子或原胚或胚柄通过裂生方式产生，或者由助细胞产生，也有可能由胚囊内的反足细胞形成胚，除此之外，还可能由胚囊外体细胞形成胚。本试验观察到，咖啡的各个材料多胚率在 1.06‰～4.46‰，多胚在种子内的位置也各不一样。其中，在正常位且发育正常的胚，可能来源于受精作用而产生的合子胚。多胚中的额外胚（尤其是那些远离正常胚位的）是否是由胚囊外体细胞发育（即无融合生殖）所形成的不定胚，还有待进一步研究，因为这可能成为研究咖啡无融合生殖的重要依据。

参 考 文 献

高建伟,李忠德,孙其信,刘建山, 2000.植物融合生殖研究进展.生物工程进展,**20**(5):43~47

黄群策, 1999. 禾本科植物无融合生殖的研究进展.武汉植物学研究, **17**（增刊）：39~44

刘向东, 1990.水稻多胚苗的初步研究,I.胚胎学观察.福建农学院学报, **9**: 131~137

刘永胜, 1994.多胚水稻品系 SB-1 的细胞学研究: 助细胞无融合生殖.植物学报, **36**：828~832

黎垣庆,袁隆平, 1990.水稻（*Oryza sativa* L.）双胚苗遗传学的研究.作物学报, **16**: 176~181

母锡金,蔡雪,孙德兰,时光春等, 2001.被子植物的无融合生殖和它的应用前景.作物学报, **27**: 590~599

孙敬三,刘永胜,辛化伟,1996.被子植物的无融合生殖. 植物学通报, **13**(1): 1~8

谭薇，郭学兴，孔繁伦, 1994.遗传背景对水稻无融合生殖材料 C1001 双胚苗频率影响的研究.西南农业大学学报, **16**：369~372

袁隆平, 1987.杂交水稻育种战略设想.杂交水稻, (6): 1~4

Hanna W W, Powell J B, 1973. Stubby head , an induced facultative apomict in pearl millet. *Crop Sci* ,**13**:726~728

Powell J B, Burton G W, 1968. Polyembryony in pearl millet, *pennisetum typhoides. Crop Sci*, **8**:771~773

Rao P N, Ranganadam P, Nirmala A,1986. Twins and triplets in pearl millet: their cytology and origin. *Ann Bot*, **58**: 627~630

Tang C Y, Schertz K F, Bashaw E C, 1980. Apomixis in sorghum lines and their F_1 progenies. *Bot Gaz*, **141**: 294~299