

宽皮橘蕉柑的胚性愈伤组织诱导、 悬浮细胞系建立及植株再生

王声斌¹, 黄自然², 余让才², 邹伟权¹, 房师松²

(1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学艺术设计学院, 广东 广州 510642)

摘要:取蕉柑花后 5 周幼果的幼胚接种于含不同浓度 BA、KT 与 IAA 组合的 MT 培养基上, 结果表明, 暗培养条件是蕉柑胚性愈伤组织诱导成功的关键。胚状体在后期发育中畸形胚的比例很高, 经切割后, 在 MT+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.03 kg·L⁻¹培养基上可诱导产生丛芽, 诱导率为 26.7%。幼芽在 1/2MT+NAA 1.0 mg·L⁻¹培养基上生根率达到了 87.0%。蕉柑胚性愈伤组织在 MT 液体培养基中不断地继代培养, 可形成生长稳定的胚性悬浮细胞系, 体胚诱导实验证明悬浮细胞系具有很强的体细胞胚胎发生能力。

关键词: 柑橘; 幼胚; 胚性愈伤组织; 悬浮细胞系; 植株再生

中图分类号: Q831.1

文献标识码: A

柑橘胚性愈伤组织的诱导及其植株再生是开展柑橘生物技术及其相关研究的基础。柑橘胚性愈伤组织的诱导已在普通甜橙、脐橙等^[1~3]柑橘属的部分品种上获得了成功, 但大部分宽皮橘品种的胚性愈伤组织诱导仍然比较困难^[4]。已有资料显示^[5~7], 柑橘胚性愈伤组织经诱导产生的胚状体在后期发育过程中畸形胚的比例很高, 再生植株的频率较低, 如何建立高效的植株再生体系是广大研究者非常关注的问题之一。蕉柑(潮州柑, *Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata)作为宽皮橘的代表性品种之一, 已有百余栽培历史, 近年来由于柑橘黄龙病、溃疡病的危害, 其生产遭受巨大损失, 为此本研究开展蕉柑胚性愈伤组织诱导、悬浮细胞系的建立及植株再生工作, 为外源基因转化、培育抗病品种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

蕉柑(*Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata), 花后 4~8 周幼果, 取自广州市白云区果树良种场。在无菌条件下剥离幼胚获得无菌的胚珠。

1.2 方法

1.2.1 幼胚培养 将剥离的幼胚按 4~6 个/瓶接种到以 MT^[8] 为基本培养基, 添加不同浓度的细胞分裂素 BA(质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)、KT(质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)与生长素 IAA(质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹)培养基上, BA 与 IAA 及 KT 与 IAA 各形成 12 种激素组

合, 观察幼胚的生长变化及胚性愈伤组织的诱导情况。培养条件: 26~30℃, 光照 16 h/d, 光照度 2 400 lx 或暗培养。

1.2.2 胚状体诱导培养 将生长旺盛的胚性愈伤组织继代到以 MT^[8] 为基本培养基, 用不同碳源(甘油、乳糖、半乳糖)替代原培养基中蔗糖的培养基上, 胚性愈伤组织与培养基之间隔有一层滤纸, 30 d 左右, 观察胚性愈伤组织的生长变化及胚状体诱导情况。培养条件: 26~30℃, 光照 16 h/d, 光照度 2 400 lx。

1.2.3 胚状体的芽诱导培养 将畸形发育的胚状体切割成大小约 0.5 cm×0.5 cm 的方块, 继代到以 MT+IAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.03 kg·L⁻¹为基本培养基, 分别附加 BA(质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 mg·L⁻¹)、ZT(2.0 mg·L⁻¹)及 KT(2.0 mg·L⁻¹)的培养基上, 30 d 左右后, 观察芽的诱导情况并统计结果。培养条件同 1.2.2。

1.2.4 生根培养 待诱导出的芽长到长 1 cm 左右, 用解剖刀将芽切下, 接种到 1/2MT+NAA 1.0 mg·L⁻¹培养基上, 60 d 后观察根的生长情况。培养条件同 1.2.2。

1.2.5 蕉柑胚性悬浮细胞系的建立 将生长旺盛的蕉柑胚性愈伤组织按 0.5 g:30 mL 接种量接种到 MT 液体培养基中, 在继代培养过程中, 不断地用网筛除去大的细胞团, 逐渐得到较均一的悬浮细胞系。培养条件: 26~30℃, 光照 16 h/d, 摇瓶转速 110 r/min。

1.2.6 蕉柑胚性悬浮细胞胚状体的诱导培养 以 MT 液体培养基为基础, 用 0.05 kg·L⁻¹乳糖替代原培

培养基中的蔗糖。将 0.1 或 0.2 g 生长旺盛的胚性悬浮细胞继代到 30 mL 上述液体培养基中, 摇瓶培养, 25 d 左右后, 观察胚性细胞的生长变化及胚状体的诱导情况。培养条件同 1.2.5。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对蕉柑幼胚胚性愈伤组织诱导的影响

取花后 5 周的蕉柑幼果的幼胚, 接种到含 24 种不同激素配比(BA、KT、IAA)的 MT 培养基上培养, 6 个月后观察发现在暗培养条件下, 在 MT+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹ 培养基上的部分幼胚形成了白色、疏松、颗粒状明显的愈伤组织(图 1), 这种白色的愈伤组织具有很强的体细胞胚胎发生能力, 诱导率达到了 10.4%。在相同培养基上, 光照培养条件下幼胚的胚性愈伤组织诱导率为 0。

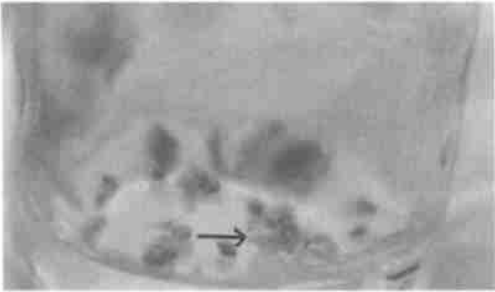


图 1 在 MT+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹ 培养基上形成的胚性愈伤组织
Fig. 1 Callus on MT+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹ medium

幼胚在光照培养条件下, 培养初期就开始发生裂解, 圆球状幼胚的表皮裂开, 露出内部的白色组织, 随着培养时间的延续, 幼胚表面形成大量质地紧密的绿色愈伤组织, 体胚诱导实验表明上述的绿色愈伤组织和白色组织不具备体胚发生能力。光照培养条件下幼胚虽没有形成胚性愈伤组织, 但有胚状体的发生, 24 种培养基相比, MT+KT 1.0 mg·L⁻¹+IAA 0.1 mg·L⁻¹ 及 MT+KT 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.1 mg·L⁻¹ 两种培养基较有利于胚状体的发生, 平均每个幼胚分别产生 1.2 和 1.3 个胚状体。幼胚在暗培养条件下表观上则首先转变成黄褐色, 随着继代培养, 部分黄褐色幼胚形成了少量增殖缓慢的黄褐色愈伤组织, 只有少量黄褐色幼胚产生了白色、疏松、颗粒状明显的愈伤组织, 此愈伤组织在形成初期具有很强的体胚自发发生能力。

2.2 胚状体的诱导

2.2.1 不同碳源对胚状体诱导的影响 生长旺盛、颗粒状明显的胚性愈伤组织在含甘油 0.03 kg·L⁻¹ 或

乳糖 0.05 kg·L⁻¹ 的 MT 培养基上可形成大量的绿色组织(图 2)。这些绿色组织在原培养基上生长极其缓慢。



1. MT+乳糖 0.02 kg/L+蔗糖 0.03 kg/L; 2. MT+半乳糖 0.05 kg/L
3. MT+乳糖 0.05 kg/L; 4. MT+甘油 0.03 kg/L
1. MT+lactose 0.02 kg/L+sucrose 0.03 kg/L; 2. MT+galactose 0.05 kg/L
3. MT+lactose 0.05 kg/L; 4. MT+glycerol 0.03 kg/L

图 2 不同碳源对胚状体的诱导效果

Fig. 2 Effect of carbon sources on somatic embryogenesis

2.2.2 不同培养基对胚状体发育的影响 将上述绿色组织继代到 MT+麦芽提取物(ME)500 mg·L⁻¹+蔗糖 0.05 kg·L⁻¹、MT+ME 1500 mg·L⁻¹+蔗糖 0.05 kg·L⁻¹、MT+ME 500 mg·L⁻¹+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.05 kg·L⁻¹、MT+ME 500 mg·L⁻¹+BA 1.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.05 kg·L⁻¹、MT+ME 500 mg·L⁻¹+BA 0.5 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.05 kg·L⁻¹ 5 种培养基上培养, 1 个月后形成大量直径 1 mm 左右的球形胚(图 3), 几种培养基的效果相似。此后多数球形胚开始畸形发育, 少数球形胚发育到鱼雷胚后停止, 形成大量的畸形胚或畸形叶, 获得再生植株相当困难。

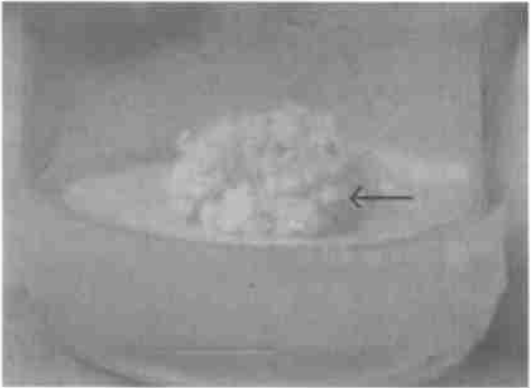


图 3 球形胚

Fig. 3 Globular somatic embryo

2.3 再生植株

2.3.1 不同激素对比对蕉柑胚状体芽的诱导影响 将畸形胚切割成大小约 0.5 cm×0.5 cm 的方块, 实

验比较了不同细胞分裂素(ZT、BA、KT)对诱导畸形胚芽的效果,发现 BA 对芽的诱导效果最好. 为进一步研究 BA 的最佳使用浓度,将切割后的畸形胚继代到以 MT+IAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.03 kg·L⁻¹为基本培养基,附加 BA 浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 mg·L⁻¹的培养基上,25 d 后观察发现,在 BA 浓度 2.0 mg·L⁻¹范围内,芽的诱导率随培养基中 BA 浓度的升高而提高,培养基中过高的 BA 浓度对芽的诱导具有一定的抑制作用. 培养基 MT+BA 2 mg·L⁻¹+IAA0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 0.03 kg·L⁻¹较适合芽的诱导,芽诱导率达到了 26.7%(图 4).



图 4 诱导的丛芽
Fig. 4 Shoots induced

2.3.2 芽的诱导生根 幼芽从畸形胚上切割下来后,在 1/2MT+NAA 1.0 mg·L⁻¹+蔗糖 0.03 kg·L⁻¹培养基上可正常生根,在接种的 46 个芽中有 40 个生根,生根率达到了 87.0%(图 5).



图 5 幼芽生根
Fig. 5 Regenerated plantlets with roots

2.4 蕉柑胚性悬浮细胞系的建立

按 1.2.6 方法经过数次继代培养得到生长稳定、由大小不同细胞团组成的蕉柑悬浮细胞系(图 6).

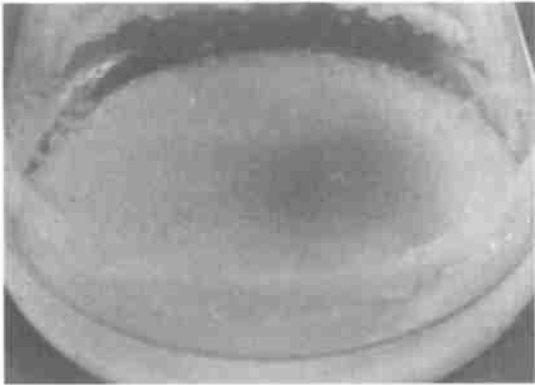


图 6 蕉柑悬浮培养的细胞
Fig. 6 *Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata suspension cell culture

2.5 蕉柑胚性悬浮细胞的胚状体诱导

将生长旺盛的蕉柑胚性悬浮细胞用滤纸过滤收集,继代到 MT+乳糖 0.05 kg·L⁻¹液体培养基中摇瓶培养,接种量为 0.1 g:30 mL 或 0.2 g:30 mL,25 d 后,在培养瓶中可观察到大量绿色细胞团. 此绿色细胞团在原培养基中发育缓慢,转接到 MT+蔗糖 0.05 kg·L⁻¹固体培养基后,发育速度明显加快,形成大量的球形胚. 按蕉柑胚性愈伤组织植株再生途径可获得完整的再生植株.

3 讨论

3.1 蕉柑胚性愈伤组织的诱导

关于光照与黑暗培养条件对柑橘胚性愈伤组织诱导的影响,报道的文献较少. 本实验用相同的培养基比较了光照培养与暗培养条件对蕉柑幼胚培养的影响,结果发现,暗培养条件有利于蕉柑幼胚形成表观疏松、颗粒状明显的胚性愈伤组织. 在光照培养条件下,蕉柑幼胚易发生崩解,形成大量的绿色愈伤组织,在本实验的 20 多种培养基中都没有表观疏松、颗粒状明显的胚性愈伤组织形成.

3.2 蕉柑胚性愈伤组织的体胚诱导及植株再生

邓占鳌等^[5]曾指出甘油、乳糖、半乳糖能明显促进柑橘胚性愈伤组织的胚状体发生,但由此形成的胚状体在原培养基上只能发育到球形胚. 邓秀新^[6]也曾指出,柑橘胚性愈伤组织在 MT+ME 500 mg·L⁻¹+硫酸腺嘌呤(SAD)5 mg·L⁻¹培养基上可形成大量胚状体,但这些胚状体在发育后期多数畸形. 洪勇等^[7]的研究结果也认为,柑橘胚状体在后期发育过程中畸形胚的比例很高. 这些研究结果表明,如何控制胚状体的后期发育,提高植株再生频率还需进一步研究. 本实验在前人研究的基础上建立了一

套植株再生频率较高的蕉柑植株再生体系。研究结果也表明, 甘油、乳糖促进发生的蕉柑胚状体若继续在原培养基上继代培养, 则生长非常缓慢, 且多数畸形发育, 再生频率低, 若将畸形胚切割, 在 MT+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹培养基上不断地继代培养, 可诱导形成形态正常的丛生芽, 芽的诱导率达到了 26.7%。幼芽在 1/2MT+NAA 1.0 mg·L⁻¹生根培养基上培养 1 个多月后生根率高达 87.0%。

参考文献:

[1] 吴金虎, 陈吉笙, 章文才, 等. 柑橘胚珠培养及胚状体发生的研究[J]. 果树科学, 1990, 7(1): 19—24.

[2] 何永睿, 洪 勇, 陈善春, 等. 柑橘组织培养中的次生胚胎发生研究[J]. 热带作物学报, 1999, 20(1): 45—51.

[3] GMITTETR F G, MORE G A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of citrus: Embryo pro-

duction, germination and plant survival[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1986, 6: 139—147.

[4] 霍合强, 郝玉金, 邓秀新, 等. 宽皮柑橘品种的胚性愈伤组织诱导[J]. 实验生物学报, 1999, 32(3): 289—296.

[5] 邓占鳌, 章文才, 万蜀渊. 诱发柑橘‘珠心愈伤组织体细胞胚胎发生的研究[J]. 果树科学, 1991, 8(4): 193—200.

[6] 邓秀新. 柑橘种间体胚融合及培养研究[J]. 遗传学报, 1995, 22(4): 316—321.

[7] 洪 勇, 何永睿, 陈善春, 等. 柑橘体细胞胚胎高频发生及植株再生的研究[J]. 中国南方果树, 1998, 27(4): 9—10.

[8] MURASHIGE T, TUCKER D P H. Growth factor requirement of citrus tissue culture[A]. CHAPMAN H D. Pro 1st Int Citrus Symposium[C]. California: University of California Riverside, 1969. 1 155—1 161.

Studies on the Induction of Embryogenic Callus, Establishment of Cell Suspensions and Plant Regeneration in *Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata

WANG Sheng-bin¹, HUANG Zi-ran², YU Rangcai¹, ZOU Wei-quan¹, FANG Shi-song²
(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 College of Art Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Immature embryos 5 weeks after anthesis were cultured on MT medium supplemented with BA, KT and IAA. The results showed that a dark culture condition was one of key factors affecting the induction of embryogenic callus of *Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata. Glycerol and lactose promoted the somatic embryogenesis in *Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata. Embryoids could develop normally only to globular stage, but most of the embryoids became abnormal later. The frequency of plant regeneration through cotyledon embryos was very low. Numerous shoots could be induced from these abnormal embryos incised in MT+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹+sucrose 0.03 kg·L⁻¹ medium after several subcultures. Most of shoots rooted in the 1/2 MT+NAA 1.0 mg·L⁻¹ medium, the frequency of rooting being 87.0%. Homogeneous embryonic cell suspensions were established after embryogenic callus were subcultured in liquid MT medium several times and cell suspensions passed through a metal screen to remove big cell clusters. Embryogenesis of the cell suspensions could be induced by adding galactose to the liquid medium.

Key words: *Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata; embryo; embryogenic callus; cell suspensions; plant regeneration

【责任编辑 柴 焰】