

影响椪柑上胚轴再生不定芽的几个生理因素

黄家权 邬志荣 孙中海*

华中农业大学柑橘研究所, 武汉 430070

提要 探讨几种因素对椪柑实生苗上胚轴再生不定芽影响的结果表明, 在6-BA $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 椪柑上胚轴切段的出芽率达到61.1%, 每个上胚轴上的不定芽数也同时达到最大(7.10个); 黑暗处理20 d后转入光照条件下培养可提高椪柑上胚轴切段不定芽的再生率; 上胚轴水平放置于培养基中有利于不定芽的再生, 形态学下端插入培养基有利于不定芽的生长。再生的不定芽在附加NAA $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的1/2MT培养基中生根并再生椪柑植株。

关键词 椪柑; 不定芽; 上胚轴; 再生

Several Physiological Factors Influencing Adventitious Bud Regeneration from the Epicotyls of Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco)

HUANG Jia-Quan, WU Zhi-Rong, SUN Zhong-Hai*

Citrus Research Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

Abstract Several physiological factors influencing the bud regeneration from the epicotyls of Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) were studied. The results showed that epicotyl segments horizontally placed in the medium and 20-d dark incubation followed by the continuous light condition enhanced the bud regeneration from the Ponkan epicotyl segments. However, the best growth quality of the adventitious buds was obtained when epicotyl segments inserted in the medium with the morphological lower end. The highest rate of adventitious bud regeneration was reached when the MT medium supplied with 6-BA $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The plantlet formed when the buds were subcultured in 1/2MT with $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA.

Key words *Citrus reticulata* Blanco; adventitious bud; epicotyls; regeneration

柑橘杂交育种进展缓慢的主要原因是多胚性、童期长和遗传上的高度杂合。传统育种方法难以适应生产的需要。体细胞原生质体融合的研究, 虽然实现了柑橘基因组的转移, 得到了一大批种间及属间体细胞的杂种^[1], 但由于一些不良性状的连锁, 无法实现某个或某些基因的定向转移。随着遗传转化技术的发展, 虽然已实现了在基因水平上定向地通过基因转移来改良柑橘的农艺性状, 但仍然没有建立一个高效的植株再生体系。在现有柑橘遗传转化的报道中, 植株再生体系主要采用原生质体再生^[2,3]、体细胞胚发生^[4,5]和实生苗茎段的器官发生^[6,7] 3种途径。采用原生质体作遗传转化受体, 可以避免转化嵌合体的出现, 但其转化频率低, 有时难以获得转基因植株; 体细胞胚再生途径, 再生频率较高, 但经过分化和脱分化后变异频率较高。而通过实生苗茎段器官发生, 较前两种途径具有操作简单, 培养物变异小等优势。

柑橘类实生苗的上下胚轴^[6~9]、茎段^[10]、叶片^[11]等离体培养再生植株的研究已有许多报道。但用器官发生途径再生植株时, 基因型对其影响很大。Bordon等^[9]比较光照、激素和外植体接种方式对4个柑橘品种上胚轴切段离体再生的影响时, 发现不同品种的器官再生情况有质和量上的差别。这一结果进一步说明, 一个高效的植株再生体系工作应针对不同柑橘品种进行优化。

椪柑具有生长快、成形迅速、结果早的生物学特性, 是优质高产的柑橘良种, 在南方各省已普遍推广。但是, 椪柑还具有种子多、不抗寒等不良特性。如何在不改变其现有优良品质的条件下定向改造椪柑品种, 是当前亟待解决的问题。

收稿 2004-05-11 修定 2004-11-01

资助 农业部“948”柑桔项目(992019)。

* 通讯作者(E-mail: sunzhonghai@mail.hzau.edu.cn, Tel: 027-87281587)。

题。椪柑种子萌发成的植株绝大多数都从珠心胚发育而来, 因此具有和母本相同的遗传特性。现有的椪柑遗传转化离体再生体系的研究只有珠心组织的报道。采用上胚轴作为外植体通过器官直接发生途径再生不定芽, 能够继续保持其优良特性, 并能利用转基因定向改造椪柑。本文在前人工作的基础上, 对影响椪柑上胚轴离体再生植株的几个生理因子作了研究, 得到一个较为适宜的椪柑上胚轴再生体系, 现报道如下。

材料与方 法

椪柑(*Citrus reticulata* Blanco)种子在超净工作台上用75%的酒精处理30 s, 0.1%升汞溶液(加2滴吐温-20)中浸泡10 min后用无菌水清洗3~4次, 剥去种皮, 播种在培养基: MT^[12]+40 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂(pH 5.8~6.0)中, 光照条件下(16/8 h, 光/暗周期)培养1个月, 光照度约为75 μmol·m⁻²·s⁻¹, 培养温度为(25±2)℃。

不定芽(梢)诱导培养基以MT为基本培养基, 附加各种生长调节剂(在高压灭菌前加入)和蔗糖, 用7 g·L⁻¹琼脂使培养基固体化, 培养基pH用0.1 mol·L⁻¹的NaOH调至5.8~6.0, 高压灭菌条件为121℃下保持20 min。

诱导不定芽(梢)中的生长调节剂选用6-BA和NAA, 6-BA分0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹ 4个水平; NAA分0.01、0.05、0.1、0.5 mg·L⁻¹ 4个水平。6-BA和NAA共16个组合, 每个处理至少用20个外植体。

取实生苗上胚轴, 横切成1.0 cm左右的切段, 按上胚轴上部、上胚轴下部、上胚轴中部3个种类平放于不定芽(梢)诱导培养基上, 分别置于光培养和连续暗培养20 d再转入光下。50 d后观察记录上胚轴不定芽(梢)的发生情况。从实验中选择最佳植物生长调节剂的组合, 然后进行上胚轴放置方式和光照条件比较实验。

取最佳生长调节剂组合的培养基, 以椪柑上胚轴为外植体, 采用3种接种方式: (1)上胚轴水平放置, (2)形态学下端垂直插入, (3)形态学上端朝下垂直插入, 再置于不同的光照处理条件下培养。

再生梢生根时, 切下大于8 mm的不定梢转

移到生根培养基中。生根培养基为: 1/2MT基本培养基附加25 g·L⁻¹蔗糖、7 g·L⁻¹琼脂以及不同浓度水平的NAA(0.1、0.5、1.0、4.0 mg·L⁻¹), 光照条件下培养。

数据分析采用变量分析法。出现明显差异时, 则采用邓肯氏(Duncan)新复极差测验进行多重比较, 检测以5%的水平为差异显著。

结果与讨论

1 不同部位上胚轴不定芽(梢)发生能力比较

近叶端的上胚轴(上部)出芽率高, 但不定芽数低; 而近子叶端(下部)的出芽率低, 但不定芽数较高(表1)。这与贺红等^[13]研究红江橙的结果不同。我们认为, 可能是本文采用的植物生长调节剂是6-BA和NAA组合, 而贺红等的实验中只附加了6-BA, 因而影响了不同部位上胚轴的出芽率。这同时也说明, 在不同部位上胚轴的内源激素分布是有差异的。

表1 不同部位上胚轴成芽能力的比较

Table 1 Comparison of adventitious bud regeneration from different parts of Ponkan epicotyls

上胚轴切段部位	出芽率/%	每个上胚轴的不定芽数/个
上部	45.83	2.55
下部	26.04	3.64
中间	28.13	2.04

2 NAA和6-BA的不同组合对上胚轴不定芽(梢)发生的影响

在MT基本培养基中, 椪柑上胚轴以形态学下端插入培养基时能再生不定芽, 但再生频率低; 水平放置于培养基中的上胚轴无不定芽的生成。MT基本培养基附加一定浓度的6-BA有利于不定芽(梢)的发生。上胚轴接种后1周左右, 两端开始膨胀, 有的形成愈伤组织, 以暗培养条件下的较多, 颜色偏白色; 接种后第3周开始形成芽。6-BA为1.0 mg·L⁻¹时, 出芽率达到61.11%, 此时不定芽数也达到最大5.14个。随着6-BA浓度的降低或升高, 出芽率及不定芽数都随之下降。6-BA为2.0 mg·L⁻¹时, 只有极少数上胚轴产生不定芽(表2), 多数膨胀或黄化, 愈伤极少; 不定

表2 6-BA 和 NAA 不同浓度组合对椪柑
上胚轴不定芽发生的影响

Table 2 Effects of combinations of various concentrations of
6-BA and NAA on adventitious buds proliferation
in epicotyls pieces of Ponkan

植物生长调节物质的浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		上胚轴平均 不定芽数/个 ¹⁾	不定芽发 生率/%
6-BA	NAA		
0.1	0	1.63 ^{cd}	52.8
0.1	0.01	1.42 ^{cd}	55.6
0.1	0.05	1.66 ^{cd}	44.4
0.1	0.10	2.00 ^{bcd}	33.3
0.1	0.50	2.25 ^{cd}	22.2
0.5	0	2.19 ^{cd}	44.4
0.5	0.01	4.00 ^{bcd}	33.3
0.5	0.05	2.60 ^{bcd}	27.8
0.5	0.10	1.70 ^{cd}	61.1
0.5	0.50	1.63 ^{cd}	38.9
1.0	0	5.14 ^{bc}	61.1
1.0	0.01	5.64 ^{ab}	55.6
1.0	0.05	4.71 ^{bc}	44.4
1.0	0.10	7.40 ^a	61.1
1.0	0.50	2.29 ^{bcd}	11.1
2.0	0	4.20 ^{bcd}	13.9
2.0	0.01	1.19 ^{cd}	16.7
2.0	0.05	0.14 ^{df}	5.6
2.0	0.10	0.14 ^{df}	5.6
2.0	0.50	0.64 ^{cd}	16.7

1) 邓肯的新复极差法的多重比较, 相同字母表示差异不显著。

芽较短或较弱小, 黄化死亡的比率增加。说明高浓度 6-BA 不仅抑制芽的形成, 而且对上胚轴有毒害作用。

NAA 加入到含 6-BA 的培养基中后, 可提高不定芽(梢)数量, 但是效果不十分明显(表2)。仅当 6-BA 为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 附加不同浓度的 NAA 的不定芽数才有显著性差异; 而在其他浓度 6-BA 中, 在 $0\sim 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 范围内, 各处理之间的不定芽数无显著差异。高浓度 NAA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 下, 不定芽发生率降低; 而低浓度下的不定芽发生率主要由 6-BA 浓度决定, 如 6-BA 浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA 浓度小于 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不定芽的发生率均超过 50%, 而当 6-BA 浓度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不定芽发生率均小于 20%。所有组合中, 以 6-BA 为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 NAA 为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的发芽率

和上胚轴上的不定芽数为最高, 是 16 个组合中的最佳组合。在这种条件下, 椪柑上胚轴产生 7.4 个生长良好的不定芽(梢), 不定芽发生率也达到 61.1%, 与前人的结果^[14]相似。

3 培养基中上胚轴放置方式对不定芽(梢)发生的影响

以 3 种方式将上胚轴切段放置于加有最佳生长调节剂的 MT 培养基中的结果显示, 水平放置的上胚轴两端都发生膨大, 形成不定芽; 形态学下端插入培养基的上胚轴基部膨大, 形成愈伤组织, 端部无明显膨大, 形成不定芽; 在光照培养条件下, 形态学上端插入的上胚轴基部发生的愈伤组织少, 少数端部膨大, 没有愈伤组织和不定芽形成。在黑暗中培养 20 d 后转入光时, 上胚轴基部膨大形成白色愈伤组织, 端部裂开, 有的形成少量愈伤组织, 有少数发生不定芽。在连续光照或黑暗 20 d 后转入光照培养的条件下, 水平放置时再生的不定芽数高于其他两种放置方式。但形态学下端插入的上胚轴出芽很快, 1 周左右就明显有不定芽的形成; 而水平放置的 2 周后才有不定芽形成。形态学下端插入的上胚轴形成的不定芽质量高, 不定梢生长快。形态学上端插入培养基的上胚轴无论是出芽的速度还是出芽率都明显低于其他两种放置方式(图1)。这可能与生长素的极性运输有关。芽的生长质量与上胚轴质量也有一定的关系, 生长好的上胚轴发生的不定芽质量也好, 这可能与生长好的上胚轴自身对培养基营养的利用能力较强有关。根据前人一般上胚轴出芽率最高, 茎段次之, 子叶和叶片较低^[15]的实

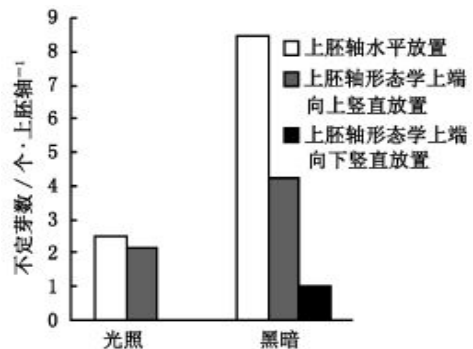


图1 上胚轴切段在培养基中放置方式以及光照对芽形成的影响

Fig. 1 Effects of epicotyl segment orientation and light condition on adventitious buds formation

验结果, 我们只选取上胚轴为外植体。

4 光照条件对上胚轴不定芽(梢)发生的影响

由图1可以看到, 各种放置方式的上胚轴在黑暗下培养20 d后的不定芽个数远远高于光照的。这说明适当的暗中培养可增加上胚轴的脱分化和再分化能力, 提高上胚轴再生不定芽的水平。已有报道认为, 弱光有利于愈伤组织的发生^[16], 梨和苹果的实验结果也表明适当的暗培养有利于不定芽发生^[17]。徐凌飞等^[18]则认为梨叶片离体暗培养20 d后, 再生频率最高。

一般来说, 通过器官发生途径再生不定芽时的出芽方式有两种: 一是直接从切口处长出芽, 即不经过愈伤组织诱导阶段, 而是直接再生出不定芽。本文观察到的是连续光下培养的上胚轴多数用此再生方式。另一是先在切口处形成愈伤组织, 再从愈伤组织上形成绿色芽眼, 而后丛生出多个芽。暗培养后转入光下的上胚轴中有一部分采用此种再生方式, 这和Moreira-Dias等^[19]用Troyer 枳橙上胚轴为外植体的结果一致。

另外, 我们还观察到, 不定梢在附加NAA ($0.1 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的生根培养基中, 3 d后即分化, 约20 d后可见到不定根的形成。

参考文献

- 1 邓秀新, 章文才. 柑橘原生质体培养与融合研究. 自然科学进展——国家重点实验通讯, 1995, 5(1): 35~41
- 2 邓秀新, 章文才. 柑橘原生质体分离及再生植株的研究. 园艺学报, 1988, 15(2): 99~102
- 3 Vardi A, Bleichman S, Aviv D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant Sci, 1990, 69: 199~206
- 4 邓占鳌, 章文才, 万蜀渊等. 诱发柑橘“适应型”珠心愈伤组织体细胞胚胎发生的研究. 果树科学, 1991, 8(4): 193~200
- 5 张进仁, 陈善春, 高峰等. 柑橘细胞悬浮培养及再生植株的研究. 热带作物学报, 1993, 14(2): 67~70
- 6 陈大明, 徐昌杰, 张上隆. 柑橘高效离体再生系统研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(5): 493~499
- 7 贺忠群, 段新玲, 张卫芳. 金橘上胚轴组织培养及植株再生. 塔里木农垦大学学报, 2001, 13(2): 23~24
- 8 贺红, 潘瑞焱, 韩美丽. 枳壳外植体再生及农杆菌介导的遗传转化. 云南植物研究, 1998, 20(4): 459~463
- 9 Bordon Y, García-Luis A, Guardiola JL. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of citrus rootstocks. Ann Bot, 2000, 86(1): 159~166
- 10 Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep, 1992, 11: 238~242
- 11 胡继金, 孔振光. 甜橙完整叶片培养芽直接发生与解剖观察. 果树科学, 1990, 7(2): 81~84
- 12 Murashige T, Tucker DPH. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc First Int Citrus Symp, 1969 (3): 1155~1161
- 13 贺红, 韩美丽, 何亚文等. 红江橙不同外植体离体培养的研究. 热带亚热带植物学报, 1997, 5(2): 85~88
- 14 Pérez-Molphe-Balch E, Ochoa-Alejo N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. Hortic Sci, 1997, 32(5): 931~934
- 15 王秀琴, 王润珍, 林荣. 金柑组织培养研究. 中国柑橘, 1985, (1): 19~21
- 16 陈振光. 园艺植物离体培养学. 北京: 中国农业出版社, 1995. 28
- 17 Leblay C, Chevreau E, Raboin LM. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 25: 99~105
- 18 徐凌飞, 马锋旺, 王吉之. 梨叶片离体培养和植株再生. 园艺学报, 2002, 29(4): 367~368
- 19 Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordón Y et al. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer Citrange differ in hormone requirements and in their response to light. Ann Bot, 2000, 85: 103~110