

不同培养条件对柑桔胚性愈伤组织离体诱导的影响

罗君琴, 徐建国, 王 平

(浙江省柑桔研究所, 浙江 黄岩 318020)

摘 要:以 5 个不同品种柑桔为试材, 研究比较了不同培养基激素浓度、接种外植体类型及不同品种实生试管苗下胚轴对柑桔离体培养外植体愈伤及胚性愈伤诱导分化的影响。结果表明: 下胚轴外植体胚性愈伤诱导效果以 BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 为好, 而子叶外植体则以 BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 或更高激素浓度条件为宜; 外植体胚性愈伤诱导能力以下胚轴最强, 子叶与幼根外植体次之, 上胚轴最弱。5 个供试柑桔品种下胚轴胚性愈伤诱导能力“本地早蜜桔”最强, 其次是“四季桔”、“南丰蜜桔”, 再次为“刘本橙”, “罗浮金弹”最弱。

关键词:柑桔; 愈伤组织; 诱导分化; 影响因子

中图分类号:S 666.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0125-03

近年来随着生物技术的迅猛发展, 胚性愈伤组织作为理化诱变、原生质体融合、转基因等生物育种手段的理想起始材料^[1-2], 在作物物质资源遗传创新及离体保存中的基础研究地位日益显现^[3,7]。柑桔胚性愈伤组织目前主要通过败育的成熟胚珠、未成熟胚珠、实生幼苗胚轴茎段、子叶以及花药培养等途径来诱导获得^[3,5-6,9-10]。该研究以“本地早蜜桔”、“四季桔”、“罗浮金弹”、“南丰蜜桔”、“刘本橙”5 个柑桔品种为试材, 以其各自试管播种的实生幼苗上胚轴近顶端、子叶、含子叶节间的下胚轴及幼根为外植体进行胚性愈伤组织诱导试验, 探究不同接种外植体、培养激素浓度及品种遗传物质基础对柑桔体细胞胚诱导的影响, 以期对柑桔胚性愈伤组织的更好诱导及其在遗传转化中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“本地早蜜桔”、“四季桔”、“罗浮金弹”、“南丰蜜桔”、“刘本橙”5 个柑桔品种均采自浙江省柑桔研究所山地试验站。

1.2 试验方法

在无菌条件下, 取各柑桔品种鲜果种子, 消毒灭菌后, 剥除内外种皮, 接种 MT 基本培养基, (25±1)℃暗培养 2 周, 备用。试验时于超净工作台上切取各柑桔品种各类型外植体, 分别接种于愈伤诱导试验培养基。各试验处理外植体接种后, 均在(25±1)℃条件下暗培养。

1.2.1 培养基激素浓度对柑桔外植体胚性愈伤诱导的影响 以 MT 为基本培养基, 同苗龄“本地早蜜桔”、“四季桔”2 周实生幼苗子叶、含子叶节间下胚轴为接种外植体, 分别接种于 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L、6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L、6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 愈伤诱导培养基^[2-6,8-12]中。每处理 25~35 个接种外植体, 重复 3 次。接种 45 d 后, 观察记录各处理外植体愈伤诱导和胚性愈伤诱导比例情况。

1.2.2 不同接种外植体类型对柑桔胚性愈伤组织诱导的影响 分别以“本地早蜜桔”、“刘本橙”2 周实生幼苗近顶端上胚轴、子叶、含子叶节间的下胚轴、幼根为外植体, 接种于 MT+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 进行愈伤组织诱导比较试验。每处理接种 20~40 个外植体, 重复 3 次。接种 45 d 后, 观察分析各处理外植体愈伤诱导和胚性愈伤诱导发生情况。

1.2.3 5 个柑桔品种实生幼苗下胚轴愈伤诱导比较 5 个柑桔品种相同苗龄实生幼苗含子叶节间下胚轴为外植体, 接种于 MT+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 愈伤诱导培养基。每处理接种 35~45 个外植体, 重复 3 次。45 d 后观察分析各处理接种外植体愈伤及胚性愈伤诱导情况。75 d 后观察记录已诱导产生愈伤外植体的褐化情况, 愈伤外植体褐化比例=褐化的有愈伤外植体/产生愈伤的外植体总数。

2 结果与分析

2.1 培养基激素浓度对柑桔外植体胚性愈伤诱导的影响

外植体接种 45 d 后, 观察统计供试柑桔子叶及下胚轴外植体在 3 种不同激素浓度水平下愈伤诱导和胚性愈伤诱导比例。由图 1 可以看出, 无论是“本地早蜜桔”还是“四季桔”子叶外植体, 其诱导产生胚性愈伤组织的比率在

第一作者简介:罗君琴(1972-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事园艺植物组织培养等研究工作。E-mail:english0576@163.com.

基金项目:国家现代农业(柑桔)产业技术体系岗位科学家资助项目(MATS-NYCYTX-07);台州市科技资助项目(091KY02-23-27)。

收稿日期:2013-03-04

6-BA/NAA 比值保持 2 不变时,6-BA 在 0.5~2.0 mg/L 浓度范围内,随着 6-BA、NAA 激素绝对量的提高而明显增加。一定程度上反映出柑桔子叶胚性愈伤诱导时所需外源激素绝对浓度较高,在 6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 添加浓度的基础上还有进一步提高的潜在空间。

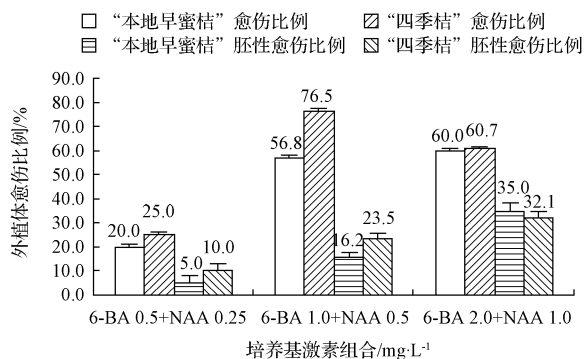


图 1 培养基激素浓度对子叶愈伤诱导的影响

Fig. 1 The influence of different hormone concentration on callus induction from cotyledons

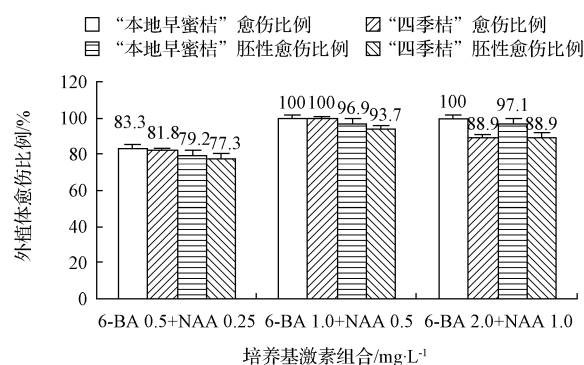


图 2 培养基激素浓度对下胚轴愈伤诱导的影响

Fig. 2 The influence of different hormone concentration on callus induction from hypocotyls

结合图 1、2 不难看出,下胚轴对激素浓度的反应与子叶不尽相同,相同柑桔品种、相同培养基激素浓度条件下,下胚轴外植体更易诱导产生愈伤及胚性愈伤。2 个柑桔品种下胚轴在 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L 浓度条件下胚性愈伤诱导率就可达到 75%以上,高出子叶外植体 50 个百分点左右。“本地早蜜桔”在 BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 与 BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基中下胚轴愈伤形成比例均为 100%,达到最高水平。而“四季桔”下胚轴愈伤及胚性愈伤诱导比例在 BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 时分别为 100%和 93.7%,在 BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 条件下反而有所下降。3 个水平激素浓度水平条件下,柑桔下胚轴愈伤诱导选用 BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 为宜。

2.2 不同接种外植体类型对柑桔胚性愈伤组织诱导的影响

以“本地早蜜桔”、“刘本橙”2 个供试品种上胚轴、子

叶、下胚轴及幼根为外植体,接种于愈伤诱导培养基 45 d 后,愈伤及胚性愈伤诱导结果见表 1。无论是“本地早蜜桔”还是“刘本橙”,4 种不同类型外植体在相同诱导培养基中脱分化形成愈伤及胚性愈伤的能力不同,且都达到极显著差异水平;2 个供试品种均以下胚轴胚性愈伤诱导效果最好,以上胚轴胚性愈伤诱导效果最差。子叶与幼根外植体在不同柑桔品种中胚性愈伤诱导表现并不一致,但均极显著优于上胚轴接种外植体。

表 1 “本地早蜜桔”和“刘本橙”不同接种外植体类型愈伤诱导产生情况

Table 1 The callus induction results from different explants in 'Bendizao' and 'Luiben' mandarin

柑桔品种	外植体种类	接种数	愈伤外植体比例/%	胚性愈伤外植体比例/%
“本地早蜜桔”	上胚轴	22	27.3±0.6D	9.1±0.1D
	子叶	37	54.1±0.7B	18.9±1.3C
	下胚轴	37	100.0±0.1A	97.3±0.7A
	幼根	30	36.7±0.3C	26.7±1.2B
“刘本橙”	上胚轴	32	43.8±0.9C	15.6±0.3D
	子叶	24	83.3±1.0B	41.7±1.0B
	下胚轴	35	91.4±0.3A	88.6±1.2A
	幼根	26	30.8±0.5D	23.1±0.7C

注:数据分析采用 LSD 多重比较法。下同。

2.3 5 个柑桔品种实生幼苗下胚轴愈伤诱导比较

由表 2 可知,在相同愈伤诱导培养基、相同类型接种外植体条件下,5 个品种在下胚轴愈伤诱导分化的中前期,“本地早蜜桔”胚性愈伤诱导最好,显著优于“四季桔”、“南丰蜜桔”,再次为“刘本橙”,“罗浮金弹”胚性愈伤诱导比例最低;5 个供试品种胚性愈伤诱导能力与愈伤诱导能力存在一定的正相关性,易产生愈伤的品种,其胚性愈伤也较容易形成。

表 2 5 个供试柑桔品种实生幼苗下胚轴愈伤诱导及后续培养中愈伤外植体褐化情况

Table 2 The callus induction and browning results of five different citrus varieties

柑桔品种	接种数	45 d 后愈伤外植体比例/%	45 d 后胚性愈伤外植体比例/%	75 d 后愈伤外植体褐化比例/%
“本地早蜜桔”	45	100±0.0a	95.6±2.2a	28.9±1.3b
“四季桔”	40	100±0.0a	92.5±2.0b	12.5±1.3c
“南丰蜜桔”	35	100±0.0a	91.4±1.4b	77.1±2.0a
“刘本橙”	43	90.7±2.6b	88.4±2.0c	28.2±1.0b
“罗浮金弹”	40	87.5±1.0c	70.0±1.9d	5.7±0.2d

在愈伤诱导培养后期,外植体愈伤褐化程度并未表现出与愈伤诱导能力的线性相关。“南丰蜜桔”的愈伤外植体褐化比例显著高于其它 4 个品种,达 77.1%,脱分化诱导的胚性愈伤组织细胞衰老比较快,在继代培养过程中宜缩短换瓶周期或适当降低培养温度,延缓愈伤衰老;“罗浮金弹”虽然胚性愈伤诱导能力在 5 个品种中最低,其愈伤外植体在接种后 75 d 时褐化比例也最低,产生的胚性愈伤最不易褐化衰老。

3 结论与讨论

诱导培养基中添加激素种类及浓度是影响柑桔接

种外植体胚性愈伤分化形成的关键因子之一,试验筛选合适的培养基激素使用浓度是外植体愈伤诱导成败的重要影响因子。试验中“本地早蜜桔”、“四季桔”柑桔品种下胚轴、子叶外植体在不同培养基激素浓度水平下愈伤及胚性愈伤诱导效果不尽相同。接种下胚轴愈伤及胚性愈伤诱导效果以 BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 激素浓度水平为好,而子叶外植体则以 BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 激素浓度条件愈伤诱导效果好,且培养基使用激素浓度还有进一步提高的潜在空间。

相同柑桔品种、相同苗龄实生母本来源、相同培养基激素浓度条件下,不同接种外植体类型对外源添加激素浓度的反应不同。试验中“本地早蜜桔”、“刘本橙”2个供试柑桔品种上胚轴、子叶、下胚轴及幼根外植体在相同诱导培养基中均可脱分化形成一定比例的胚性愈伤,但4种外植体类型之间愈伤诱导能力均存在极显著差异,其胚性愈伤诱导能力以下胚轴最强,子叶与幼根外植体次之,上胚轴最弱,一个新柑桔品种的胚性愈伤诱导试验宜以下胚轴为首选接种外植体。

柑桔实生幼苗下胚轴愈伤诱导能力受不同品种遗传基因的影响。相同愈伤诱导培养基相同类型接种外植体条件下,5个供试柑桔品种间愈伤诱导能力不同,这与萧浪涛等^[8]试验结果相一致。试验中下胚轴胚性愈伤诱导能力“本地早蜜桔”最强,其次是“四季桔”、“南丰蜜桔”,再次为“刘本橙”,“罗浮金弹”最弱。该试验5个供试柑桔品种中“南丰蜜桔”种胚为单多胚混合胚,胚性愈伤形成能力居中;其它4个品种均为多胚品种,胚性愈伤诱导有强有弱,并未表现出多胚品种比单胚品种更易诱导产生胚性愈伤,这与霍合强等^[3]的研究结论并不一致,有待进一步试验探讨。

该试验探究了柑桔试管实生幼苗组织器官离体愈

伤及胚性愈伤诱导关键影响因子技术相关性,初步明确了不同培养基激素浓度水平、接种外植体类型及品种遗传物质基础对柑桔离体愈伤及胚性愈伤诱导分化影响技术参数范围,为今后能够更好地开展柑桔胚性愈伤诱导及其在柑桔种质资源保存、基因改良生物工程中转化应用等方面工作奠定了一定的技术试验基础。

参考文献

- [1] 张俊娥,郭文武,邓秀新. 柑橘愈伤组织倍性变化及其与体细胞胚胎发生能力的关系[J]. 遗传学报(英文版),2006,33(7):647-654.
- [2] 张存智. 枣胚愈伤组织诱导和胚状体发生[J]. 北方园艺,2011(13):125-127.
- [3] 霍合强,邓秀新. 柑桔胚性愈伤组织的诱导、保存和利用[J]. 植物生理通讯,2000,36(2):181-187.
- [4] 曲芬霞. 桂东大山楂愈伤组织诱导初探[J]. 中国南方果树,2011,40(4):89-90.
- [5] Li J Q, Wang Y Q, Lin L H, et al. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 115: 329-336.
- [6] Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T. Plantlet formation by anther culture of *Citrus aurantium* L. [J]. Japanese Society of Breeding, 1982, 32(3): 247-252.
- [7] 陈勇,陈娴婷,王军晖. 瓯柑愈伤组织玻璃化法超低温保存研究[J]. 浙江大学学报,2004,31(2):197-201.
- [8] 萧浪涛,胡家金,邓秀新. 柑橘愈伤组织内源激素代谢与体细胞胚胎发生能力关系的研究[J]. 湖南农业大学学报,2001,27(3):197-199.
- [9] 王声斌,黄自然,余让才,等. 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[J]. 华南农业大学学报(自然科学版),2002,23(3):52-55.
- [10] 张秀枝. 红江橙与柠檬愈伤组织诱导的研究[J]. 广西农业科学,2008,39(1):6-11.
- [11] 孔维萍. 利用正交试验筛选玉米成熟胚愈伤组织诱导培养基[J]. 农业科技通讯,2010(1):62-63.
- [12] 田晓艳,刘延吉,丛楠楠. 南果梨不同外植体诱导黄色愈伤组织的影响因素[J]. 北方园艺,2008(1):19-21.

Effect of Different Culture Condition on Embryogenic Callus *in Vitro* of Citrus

LUO Jun-qin, XU Jian-guo, WANG Ping
(Zhejiang Citrus Research Institute, Huangyan, Zhejiang 318020)

Abstract: Taking 5 different varieties of citrus as materials, the effect of different hormone concentrations, explants and varieties on embryogenic callus induction of citrus *in vitro* were studied. The results showed that the optimal hormone concentration media for inducing embryogenic callus from hypocotyls was MT+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, while that for cotyledons was MT+BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L or much higher; the ability of forming embryogenic callus from explants were hypocotyls>cotyledons, rootlets>epicotyls; and the ability of induced embryogenic callus from hypocotyls for citrus varieties were ‘Bendizao mandarin’>‘Calamondin’, ‘Nanfeng mandarin’>‘Luiben orange’>‘Oval kumquat’.

Key words: citrus; callus; induction; influence factors