

# 两种凝固剂对冰糖橙愈伤组织增殖及植株再生的影响

李松丽, 黄欢欢, 蔡小东

(长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

**摘 要:**以冰糖橙胚性愈伤组织为试材,研究了琼脂及 Gelrite 2 种凝固剂对愈伤组织增殖、胚状体诱导、芽诱导及生根的影响。结果表明:以琼脂为凝固剂的培养基有利于提高胚性愈伤组织的增殖率,以 Gelrite 为凝固剂的培养基有利于胚状体诱导、芽诱导和生根。因此,在愈伤组织增殖过程中可使用琼脂,在体细胞胚状体诱导、芽诱导和生根阶段可使用 Gelrite。

**关键词:**柑橘;凝固剂;愈伤组织;植株再生;Gelrite

**中图分类号:**S 666.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0108-03

在植物的离体培养中,除外植体基因型、外植体来源、生长调节物质及光照条件等因素互作影响外植体的分化或脱分化外,凝固剂的种类和添加量也是影响外植体生长发育的重要因素之一。凝固剂的选择和用量直接关系到培养基的 pH 值大小以及培养基的硬度<sup>[1]</sup>。长期以来,琼脂因良好的凝固性且能吸附某些有害代谢物质等优点在植物组织培养中被广泛使用,但琼脂本身含有许多不可避免的杂质,有时对培养物会产生不利影响<sup>[2]</sup>。Gelrite 作为凝固剂,具有透明度高、杂质含量少、通气性好、凝固温度低等优点,因此,通常能促进芽和根的生长,增强根系活体,也能促进愈伤组织发育<sup>[3]</sup>。有关冰糖橙胚性愈伤组织的诱导及再生已有报道<sup>[4-5]</sup>,而研究凝固剂种类对柑橘胚性愈伤组织再生的影响较少。该研究以冰糖橙胚性愈伤组织为试材,研究了琼脂及 Gelrite 对胚性愈伤组织增殖、胚状体发生及植株再生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试冰糖橙(*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Bingtang)胚性愈伤组织从成熟果实未发育胚珠诱导,现保存于长江大学园艺园林学院园艺植物逆境生理实验室光照培养室中。试验前先进行液体悬浮培养 12 d,以保证材料

的一致。

### 1.2 试验方法

以 MT 为基本培养基,凝固剂分别为琼脂和 Gelrite (Sigma)。试验共计 8 种培养基用于胚性愈伤组织的分化培养,所有培养基的 pH 值均为 5.8。增殖采用暗培养,其余均在光照周期 14 h/10 h,光照强度 2 000 lx 左右下培养,温度均为 25℃左右。

**1.2.1 冰糖橙胚性愈伤组织的增殖** 取约 0.5 g 胚性愈伤组织分别接种于培养基 A(MT+30 g/L 蔗糖+7.2 g/L 琼脂)、B(MT+30 g/L 蔗糖+2.4 g/L Gelrite)上,每种培养基接种 6 瓶。30 d 后统计愈伤组织增殖率。愈伤组织增殖率(%)=(增殖后质量-增殖前质量)/增殖前质量×100。

**1.2.2 胚状体及芽的诱导** 胚状体的诱导:将约 0.5 g 胚性愈伤组织置于 C(MT+50 g/L 蔗糖+500 mg/L ME(麦芽提取物)+7.2 g/L 琼脂)、D(MT+50 g/L 蔗糖+500 mg/L ME+2.4 g/L Gelrite)培养基上。每种培养基接种 6 瓶,记录胚状体最早出现的时间,统计胚状体的数量。芽的诱导:挑取上述胚状体接种到 E(MT+30 g/L 蔗糖+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+7.2 g/L 琼脂)、F(MT+30 g/L 蔗糖+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+2.4 g/L Gelrite)培养基上,每种培养基接种 6 瓶,每瓶接种 5 个胚状体。统计胚状体出芽的快慢和质量,30 d 后统计再生芽的胚状体数量。胚状体出芽率(%)=(再生芽的胚状体数/接种胚状体数)×100。

**1.2.3 芽诱导生根** 将通过胚状体诱导出的芽切下,置于 G(1/2MT+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L IBA+0.5 g/L 活性炭+20 g/L 蔗糖+7.2 g/L 琼脂)、H(1/2MT+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L IBA+0.5 g/L 活性炭+20 g/L 蔗糖+2.4 g/L Gelrite)培养基上诱导生根。每

**第一作者简介:**李松丽(1979-),女,河南南阳人,硕士,实验师,现主要从事园艺植物逆境生理研究工作。

**责任作者:**蔡小东(1978-),男,湖北浠水人,博士,副教授,现主要从事园艺植物生物技术育种研究工作。E-mail:caixiao.dong@163.com.

**基金项目:**经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室开放课题资助项目(20011BLKF239)。

**收稿日期:**2013-06-19

种处理接种 5 瓶,每瓶放 5 个芽,记录再生根最早出现时间及培养 30 d 后产生再生根的芽的数量。

1.3 数据分析

接种或继代 30 d 后统计愈伤组织增殖率、胚状体诱导与再生、生芽和生根等数据。所得数据用 SPSS 16.0 数据处理系统进行单因素方差分析和显著性检验 ( $P<0.05$ )。

2 结果与分析

2.1 不同凝固剂对冰糖橙胚性愈伤组织增殖的影响

由表 1 可知,培养 30 d 后,在培养基 A 中再生了大量质地较硬、颗粒小、乳白色的愈伤组织(图 1A);在培养基 B 中,再生出大量生长量适中,质地疏松湿润、颗粒大、浅黄色的胚性愈伤组织(图 1B);但有少数培养在 B 培养基上的愈伤组织呈水渍状;2 种培养基上愈伤组织均增殖较快,增殖率差异不显著。但以琼脂为凝固剂更有利于提高胚性愈伤组织的增殖率。

表 1 2 种凝固剂对愈伤组织增殖的影响

Table 1 Effects of two types of gelling agents on the proliferation of callus

培养基	增殖前平均 质量/g	增殖后平均 质量/g	增殖率 /%	胚性愈伤组织的状态
A	0.503	0.933	85.5±0.05a	质地较硬、颗粒小、乳白色
B	0.510	0.870	70.4±0.06a	质地疏松湿润、颗粒大、浅黄色

2.2 不同凝固剂对胚状体诱导的影响

为获得胚状体,该试验分别挑取上述状态一致的胚性愈伤组织,转移至 C、D 培养基上。由表 2 可知,光照

培养 15 d 后可看到 D 培养基中有胚状体再生,在 C 培养基中培养 20 d 后才看到开始出现胚状体,其中 C 培养基中有 2 瓶因褐化未诱导出胚状体。从图 1C 和图 1D 可以看出,2 种培养基诱导出的胚状体在形态上有较大差异,且培养基 D 上诱导再生胚状体的平均数显著多于 C 培养基上。由此可以看出,在供试的 2 种培养基中,再生胚状体在以 Gelrite 为凝固剂的培养基中发生时间较琼脂中早,且发生数量更多。可见,Gelrite 作凝固剂更有利于胚状体的诱导。

表 2 2 种凝固剂对胚状体诱导的影响

Table 2 Effects of two types of gelling agents on the induction of somatic embryoid

培养基	胚状体开始发生时间/d	每瓶再生胚状体平均数/个
C	20	7.17±2.56 a
D	15	12.00±3.00 b

2.3 不同凝固剂的培养基对由胚状体诱导生芽的影响

将胚状体转移到培养基 E、F 中诱导生芽。由表 3 可以看出,培养第 8 天,培养基 F 中的胚状体开始萌芽,而在培养基 E 中第 12 天才开始生芽。培养 20 d 后,发现培养基 E 中有少数球形的畸形胚状体褐化,而培养基 F 中也有一些玻璃化的畸形胚状体(图 1E),且有玻璃化现象。光照培养 30 d 后 2 种培养基中的胚状体几乎都诱导出芽。方差分析表明,2 种培养基上芽诱导率差异不显著,但芽在培养基 F 上最早发生时间早且生长整齐,状态更好。故以 Gelrite 为凝固剂的培养基更有利于从胚状体诱导生芽。

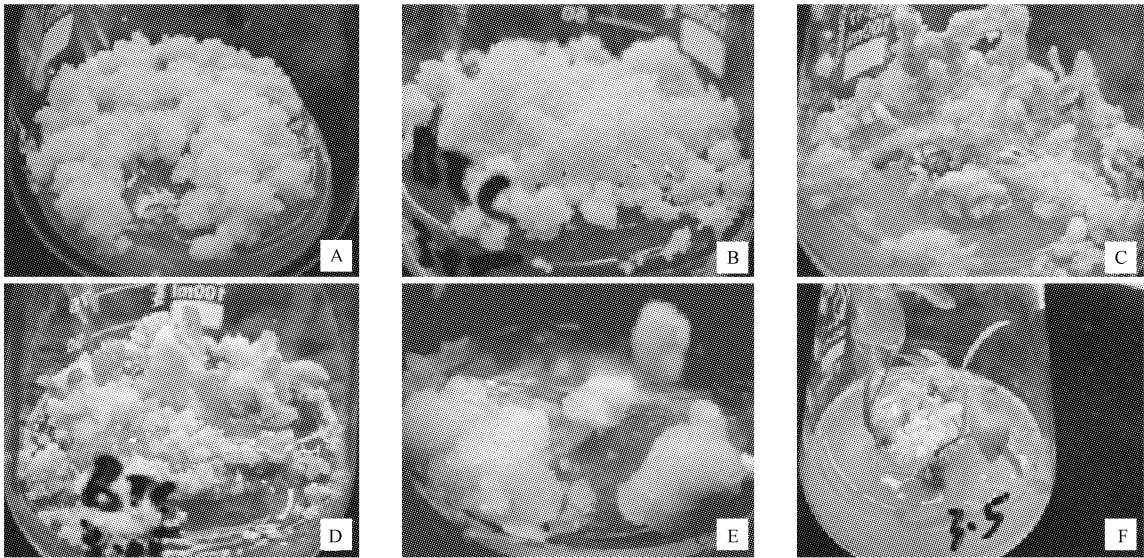


图 1 2 种凝固剂对冰糖橙胚性愈伤组织增殖及植株再生的影响

注:A. 琼脂培养基中增殖 30 d 后的胚性愈伤组织;B. Gelrite 培养基中增殖 30 d 后的胚性愈伤组织;C. 琼脂培养基中诱导培养 30 d 后的胚状体;D. Gelrite 培养基中诱导培养 30 d 后的胚状体;E. 琼脂培养基中再生芽诱导 30 d 后生根;F. Gelrite 培养基中玻璃化胚状体。

Fig. 1 Effect of two types of gelling agents on the callus proliferation and plant regeneration of *C. sinensis* L. Osbeck cv. Bingtang

Note: A. Embryogenic callus on agar medium after 30 days; B. Embryogenic callus on gelrite medium after 30 days; C. Embryoid on agar medium after 30 days; D. Embryoid on gelrite medium after 30 days; E. Regenerated bud could form root on agar medium after 30 days; F. Vitriification embryoid on gelrite medium.



表 3 2 种凝固剂对芽诱导的影响

Table 3 Effects of two types of gelling agents on the induction of shoot

培养基	接种状态数/个	芽最早发生时间/d	每瓶再生芽胚数/个	芽诱导率/%	芽的状态
E	24	12	3.5	70.00±4.47a	淡绿色、芽较长,少数芽浓绿肥厚,基部较肥短,呈白色
F	24	8	3.8	76.67±3.33a	翠绿色,基部短,芽肥厚呈丛状

## 2.4 不同凝固剂的培养基对再生芽诱导生根的影响

挑选部分健壮的芽诱导生根,以获得冰糖橙的完整再生植株。将这些由胚状体诱导出的芽分别接种到 G、H 生根培养基上。由表 4 可知,光照培养 7 d 后发现培养基 H 中有 1 瓶出现 2 条细小的白色的根,10 d 后培养基 G 中有 2 瓶也开始生出 2 条细小的根。培养 1 个月后发现,G、H 培养基中的各重复均诱导出白色至浅黄色的根,根多数细长,少部分粗短,胚性愈伤组织通过体胚发生途径形成完整植株(图 1F)。方差分析表明,2 种培养基中生根率则十分接近,二者差异不显著,表明凝固剂对生根率的影响很小。

表 4 2 种凝固剂对诱导生根的影响

Table 4 Effects of two types of gelling agents on the induction of root

培养基	接种芽数/个	开始生根天数/d	生根率/%
G	25	10	84.0±7.48 a
H	25	7	88.0±4.90 a

## 3 讨论

成分、纯度和物理性能是衡量凝固剂质量高低的标准,不同种类凝固剂及其浓度对培养基的物理结构与培养物对营养成分的吸收利用影响很大,从而影响外植体的生长发育。张巧等<sup>[6]</sup>研究发现,Gelrite 对陆地棉胚性愈伤组织增殖的效果优于琼脂。王贺飞等<sup>[7]</sup>在草坪草愈伤组织研究中发现,Gelrite 固化培养基上愈伤组织的再生率比琼脂上高 2~2.5 倍。在木本植物核桃中,

Cornu 等<sup>[8]</sup>认为,Gelrite 促进了愈伤组织的形成。该研究中,Gelrite 固化的培养基更有利于诱导胚状体,不仅发生时间更早、数量多,且显著降低了冰糖橙胚性愈伤组织的褐化现象;由胚状体诱导生芽时发现,以 Gelrite 为凝固剂的培养基上出芽速度快、数量多、生长整齐。但在愈伤组织增殖阶段,该研究发现,使用琼脂作为凝固剂的愈伤组织增殖率略高于 Gelrite,可能与 Gelrite 培养基中部分愈伤组织呈超度含水态有关。该研究中还发现出现了玻璃化现象,可能与所用 Gelrite 浓度有关。通过增加 Gelrite 浓度,能够减少玻璃化和超度含水态现象的发生<sup>[3]</sup>。总之,Gelrite 对冰糖橙愈伤组织植株再生有一定的促进作用,在愈伤组织诱导过程中可使用琼脂,在体细胞胚状体诱导、植株再生阶段可使用 Gelrite。该研究为进一步研究凝固剂对植物愈伤组织再生的影响提供了一定的参考和依据。

## 参考文献

- [1] Smith R H. Plant tissue culture: techniques and experiments [M]. Pittsburgh Academic Press, 2012: 37.
- [2] 曹夜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1999:15-16.
- [3] Huang L C, Kohashi C, Vangundy R, et al. Effects of common components on hardness of culture media prepared with Gelrite<sup>TM</sup>[J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1995, 31(2): 84-89.
- [4] 范永梅,甘霖,邓秀新. 冰糖橙胚性愈伤组织的诱导及无碎叶病毒植株再生[D]. 长沙:湖南农业大学,2003.
- [5] 蔡小东,张金晶,林丽君. ‘冰糖橙’畸形胚状体的生理生化特性研究[J]. 中国农学通报,2010, 26(20): 259-262.
- [6] 张巧,汪静儿,林君,等. 不同凝固剂对陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生的影响[J]. 棉花学报,2010, 22(1): 3-9.
- [7] 王贺飞,柴明良. 4 种固化剂对若干草坪草愈伤组织诱导的影响[J]. 园艺学报,2006, 33(2): 437-440.
- [8] Cornu D, Jay-Allemand C. Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) through culture and multiplication of embryos[J]. Ann Sci For, 1989, 46: 113-135.

## Effects of Two Types of Gelling Agents on the Callus Proliferation and Plant Regeneration of *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Bingtang

LI Song-li, HUANG Huan-huan, CAI Xiao-dong

(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

**Abstract:** Taking embryogenic callus of *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Bingtang as initial explants, the effects of two types of gelling agents, agar and gelrite on the callus proliferation, somatic embryoid induction, bud induction and rooting *in vitro* was studied. The results showed that the culture medium prepared with agar was helpful for improving the proliferation rate of the embryogenic callus, and the culture medium prepared with gelrite facilitated somatic embryoid induction, bud induction and rooting of the embryogenic callus. Therefore, agar may be used during the process of callus culture, and it may be more reasonable of using gelrite as a gelling agent at the stages of somatic embryogenesis, bud induction and rooting.

**Key words:** *Citrus*; gelling agent; callus; plant regeneration; Gelrite