

红江橙不同外植体离体培养的研究(简报)

贺红 韩美丽 何亚文 张兰英 李耿光

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

IN VITRO CULTURE OF DIFFERENT EXPLANTS FROM 'HONGJIANG' SWEET ORANGE

He Hong Han Meili He Yawen Zhang Lanying Li Gengguang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

红江橙是华南地区推广的优良柑桔品种,但在品种性状稳定性^[1]及抗病性等方面还有待改良。以往的常规育种由于存在珠心胚干扰及育种周期过长等缺点,育种工作难以进行^[2]。近年来,基因转移改良柑桔农艺性状的技术,为柑桔育种开辟了一条新途径。但要进行遗传转化,首先必须建立高效的植株再生系统。本文以红江橙多种外植体为材料,进行了离体培养的研究,为遗传转化提供良好的组织培养再生体系。

1 材料和方法

植物材料 红江橙(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)种子经表面消毒培养无菌苗,当苗长至一定大小时,取上胚轴、茎段、根尖,切成约1 cm长,下胚轴切成0.5 cm长的小段,子叶和叶片切成约5×5 mm²的小块,每个处理一般接种40块。

离体培养 以MT为基本培养基,根据试验要求附加不同浓度的BA、IBA、IAA、NAA,每天光照16 h,培养温度为26±1℃。

2 结果与分析

2.1 不同外植体成芽能力的差异

红江橙不同外植体:根尖、下胚轴、子叶、上胚轴、茎段及叶片,在附加BA 1 mg L⁻¹的MT培养基上进行培养,结果如表1。

外植体接种一周左右,培养的组织开始膨大,二周后陆续形成芽。芽发生的方式有二种,一是直接从切口处长出1至多个芽,另一种是先在切口处形成淡绿色、瘤状愈伤组织,再从愈伤组织上形成绿色芽眼,而后丛生多个芽。一般外植体的出芽以前一种方式居多,仅下胚轴主要为后

1996-08-19 收稿; 1996-12-10 修回

一种方式。

除叶片外,各种外植体均具有一定分化芽的能力,上胚轴出芽率最高,达 97.8%,茎段次之,为 70.7%,下胚轴和根尖出芽率较低,而子叶仅个别出芽(表 1)。

不同外植体发生芽所需时间也不同,胚轴、茎段一般培养 20 d 左右即能出芽,而根尖、子叶却需要较长的时间,这在一定程度上也反映了分化芽能力的大小。

因此,红江橙在进行无性系快速繁殖、人工诱变及遗传转化时,无菌苗的上胚轴及茎段是较好的材料,不仅出芽率较高,而且出芽快。

2.2 外源激素对出芽的影响

2.2.1 BA 浓度的影响

表 2 可见,BA 为 1 mg L^{-1} 时,上胚轴出芽率高达 95.0%,随着 BA 浓度的升高,出芽率随之下降。而茎段培养中,不加 BA 的 MT 培养基,有较高的出芽率(71.1%),附加 1 mg L^{-1} BA 对出芽没有多大影响,但随着 BA

浓度的升高,出现较强的抑制作用。试验中也观察到,BA 为 2.5 mg L^{-1} 时,部分外植体变黄、死亡,而 BA 升至 5 mg L^{-1} 时,大多数外植体死亡,说明高浓度的 BA 不仅抑制芽的形成,而且对外植体本身也有毒害作用。在未加任何激素的情况下,亦能诱导较高的出芽率,说明红江橙的上胚轴和茎段,含有的内源激素较多,能够形成芽,外加低浓度的 BA 对芽的形成有促进作用。

单个外植体诱导芽的数量与 BA 浓度有关,在不加 BA 时,主要形成单个芽,而附加 BA 能增加单个外植体成芽的数量(表 2)。

表 2 不同 BA 浓度对上胚轴及茎段形成芽的影响

Table 2 effect of BA concentration on shoot formation cultured by epicotyls and stem segments

浓度 Concentration (mg L^{-1})	上胚轴 Epicotyl		茎段 Stem segment		单个外植体诱导芽 的数量(个) Number of shoots from single segment
	外植体数(块) Number of segments	出芽率(%) Frequency	外植体数(块) Number of segments	出芽率(%) Frequency	
0	35	68.6	38	71.1	1-2
1	40	95.0	36	69.4	2-3
2.5	45	55.6	42	11.9	3-5
5	38	13.2	46	0	5个以上

2.2.2 不同生长素对出芽的影响

以茎段和下胚轴为材料,4种激素组合即 BA 1(对照),BA 1+IBA 0.5,BA 1+IAA 0.5

表 1 不同外植体成芽能力比较

Table 1 The ability of shoot formation from different explants cultured

外植体 Explants	外植体数(块) Number of segments	出芽率 % Frequency	出芽所需天数 Days
根尖 Root tip	40	25.0	38
下胚轴 Hypocotyl	42	35.7	34
子叶 Cotyledon	45	13.3	40
上胚轴 Epicotyl	46	97.8	20
茎段 Stem segment	41	70.7	20
叶片 Leaf segment	42	0	-

和BA 1+NAA 0.5(单位均为 mg L⁻¹)的试验结果如下。

茎段及下胚轴在附加有IBA 0.5 mg L⁻¹的培养基中均表现较高的出芽率,分别为81.0%及72.1%,明显高于对照(茎段69.2%,下胚轴37.5%),说明IBA对芽的形成有促进作用。IAA的效果不明显。NAA则抑制茎段出芽,出芽率仅为22.2%,但略能提高下胚轴の出芽率(50.0%)。因此,红江橙茎段及下胚轴在进行离体培养时,BA 1 mg L⁻¹与IBA 0.5 mg L⁻¹配合使用,效果较好。

2.3 实生苗苗龄对出芽的影响

采取不同苗龄实生苗的上胚轴、茎段,培养于附加BA 1 mg L⁻¹的MT培养基上,结果为:上胚轴培养时,实生苗苗龄以20 d为宜,可获最高出芽率(97.8%);而茎段培养时,实生苗苗龄以小于3个月为宜,随着苗龄升高,成芽能力下降,这与高苗龄细胞分化程度较高有关(表3)。因此,外植体进行培养时,选择较适宜的苗龄也较为重要。

2.4 不同取材部位的外植体成芽的能力

用苗龄为20 d的实生苗上胚轴的不同部位,即下端(近子叶端),上端(近叶端),中间作外植体培养,均接种于MT+BA 1 mg L⁻¹培养基上。结果为,从实生苗上胚轴的下部及中部采取的切段,出芽率均为100%,而取自上部的切段出芽率则大为下降,仅65.2%,这在一定程度上反映了不同部位的外植体,其内源激素水平的差异。

2.5 根的诱导

红江橙组织培养诱导形成芽,在原培养基上长出茎叶,一般不能形成根,必须将已形成茎叶的无根苗,切下转入含有生长素的生根培养基,转管后一般一个月左右开始形成根,获得完整植株。试验表明,以MT基本培养基附加0.5-1 mg L⁻¹ NAA效果较好,不仅生根率高,且能保证上部茎叶生长旺盛;在不含有NAA的MT培养基上,亦能诱导生根,但生根率低;而含有较高浓度NAA的培养基,根的生长过于旺盛,产生簇状根,从而抑制上部茎叶的生长。

3 讨论

建立高效稳定的组织培养再生体系是利用遗传转化技术获得转基因植株的重要前提之一。G. A. Moore^[3], Leandro Peña^[4]利用根癌农杆菌感染柑桔实生苗茎段获得转基因植株,这是唯一两例以柑桔外植体为材料,成功进行遗传转化的实例。这也说明柑桔茎段作为遗传转化的起始材料,是较为理想的。本试验用红江橙上胚轴及茎段培养,均获得了较高的不定芽分化频率,同时针对实生苗苗龄、外植体取材部位,也作了适当的选择,较大程度地提高了芽的发生率,为柑桔遗传转化工作的开展及转化效率的提高创造了条件。

表3 实生苗苗龄对形成芽的影响

Table 3 Effect of explants from different seedling ages on shoot formation

外植体 Explants	实生苗 苗龄(d) Age	外植体数(块) Number of segments	出芽率(%) Frequency
上胚轴 Epicotyl	10	42	57.1
	20	46	97.8
	30	40	87.5
茎段 Stem segment	40	38	71.1
	80	41	68.3
	120	40	50.0

本试验未能从叶片培养中获得再生植株,而且子叶出芽率也极低。从现有的报道看^[5-7],前人在柑桔这方面做的工作较少,而在其它的果树^[8]及多种农作物^[9]中,均有较多成功的报道,如何改进叶片、子叶等的培养条件,建立更为广泛的再生体系,还需作进一步的研究。

参考文献

- 1 唐小浪, 易干军等. 红江橙珠心愈伤组织的诱发及其体细胞胚胎发生与植株再生试验. 广东农业科学, 1994, (1):20-22
- 2 [美] W. 鲁瑟, L. D. 巴特勒, H. J. 韦伯主编. 胥洱, 孔焱译. 柑桔生产. 柑桔业(第二卷). 北京: 农业出版社, 1985, 291-299
- 3 Moore G A et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Citrus* segment and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Report*, 1992, 11:238-242
- 4 Leandro Peña et al. Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Report*, 1995, 14:616-619
- 5 张进仁, 高峰. 我国柑桔离体培养研究的进展. 中国柑桔, 1988, 18(3):16-17
- 6 林荣, 王秀琴, 王润珍. 金桔组织培养的初步研究. 广西植物, 1982, 2(1):11-13
- 7 李耿光, 胡兰娟等. 柑桔茎尖培养的初步研究. 植物生理学报, 1978, 4(2):189-196
- 8 Yao Jialong et al. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Rotal Gala. *Plant Cell Report*, 1995, 14:407-412
- 9 程振东, 卫志明, 许智宏. 芸苔属作物的遗传转化. 植物生理学通讯, 1992, 28(3):161-164