

影响沙田柚叶片离体培养的因素研究

黄 涛, 董高峰, 张兰英, 李耿光

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘 要: 研究了离体培养条件下影响沙田柚叶片愈伤组织诱导和分化的一些因素。结果表明, 2,4-D 可以诱导愈伤组织的形成, 高浓度的蔗糖(6%)显著提高叶片愈伤诱导率与愈伤组织重量, 且在 2,4-D 和蔗糖之间存在着相互作用。外源 GA3 处理抑制愈伤组织的诱导和生长, 而 CCC 与 ABA 处理显著提高叶片的愈伤诱导率和愈伤组织生长量。愈伤组织转移到附加 3.0 mg/L BA 的 MS 分化培养基上可以分化出芽, 0.25 mg/L GA3 的加入可以进一步提高愈伤组织的分化率和每块愈伤组织的再生芽数。

关键词: 沙田柚; 愈伤组织诱导; 分化

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)06-0561-04

Factors affecting *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Citrus grandis* (L.) Osbeck cv. Shatian-Yu

HUANG Tao, DONG Gao-feng, ZHANG Lan-ying, LI Geng-guang

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Some factors were investigated in the shoot regeneration from the leaf explants of *Citrus grandis* (L.) Osbeck cv. Shatian-Yu. The results showed that 2,4-D could induce the callus formation from leaf explants. The addition of the sucrose at 6% significantly increase the callusing frequency and the callus growth. The interaction existed between 2,4-D and the sucrose. Exogenous GA3 inhibited the callus formation and their growth. Chlorocholine chloride (CCC) and abscisic acid (ABA) treatments, however, significantly increased callusing frequency and the callus growth. Adventitious shoots were differentiated when calli were transferred to MS medium supplemented with 3.0mg/L BA. The addition of GA3 at 0.25 mg. L⁻¹ greatly increased regeneration frequency and the regenerated shoots number per callus.

Key words: *C. grandis*; callus induction; differentiation

沙田柚是我国南方重要的经济果树。由于沙田柚是多年生木本果树, 传统的育种手段在改良沙田柚品质、培育新种质上显得效率低且不易操作。生物技术的应用为快速改良沙田柚提供了一个新的手段。一个高效离体再生体系的建立对于沙田柚的遗传转化非常重要。由柑桔叶片再生完整植株比较困

难(Yelenosky, 1987), 迄今为止, 有关柚类叶片诱导的愈伤组织再生植株仅有少数的报道(Chaturvedi 和 Mitra, 1974; Goh 等, 1995), 且再生频率较低。本文通过研究一些影响沙田柚叶片再生的因素而建立一个高效的培养体系, 为进一步的遗传转化奠定良好的基础。

收稿日期: 2002-03-08 修订日期: 2002-07-22

基金项目: 国家自然科学基金(39870539); 广东省自然科学基金(980178); 广东省百项创新工程(99B05902X)资助。

作者简介: 黄 涛(1972-), 男, 河南正阳县人, 博士, 从事细胞工程研究。

1 材料与方法

1.1 材料培养

沙田柚种子去皮后在 75% 乙醇中浸 30 s, 然后用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min, 在无菌工作台上剥去内种皮, 播种于内含 20 mL 1/2MS 培养基的大试管中。在 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照条件下培养, 每天光照 16 h, 温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。培养 30 d 后取叶片用于愈伤组织诱导。

1.2 愈伤组织诱导

以无糖 MS 为基本培养基, 分别附加不同浓度蔗糖(0%、3%、6%、9%)与不同浓度 2,4-D 的组合处理(表 1), 以研究 2,4-D 与蔗糖对叶片愈伤组织诱导的影响。为研究 GA₃、ABA 与 CCC 对叶片愈伤组织诱导的影响, 在附加 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 与 6% 蔗糖的 MS 培养基上, 分别加入不同浓度的 GA₃、ABA 和 CCC(表 2)。GA₃ 在培养基灭菌后过滤加入。培养的光照条件同上。

1.3 愈伤组织分化

以 3.0 mg·L⁻¹ BA 的 MS 为分化培养基, 由不同条件下诱导的愈伤组织转移到分化培养基上, 培养条件同上, 培养 40 d 后统计分化率和单位外植体再生芽数。为了研究 GA₃ 处理对愈伤组织分化的影响, 在分化培养基上另外再加入不同浓度的 GA₃(表 3), 所用的愈伤组织是在附加 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 与 6% 蔗糖的 MS 培养基上诱导的愈伤组织。

2 结 果

2.1 2,4-D 与蔗糖配合处理对叶片愈伤组织诱导的影响

从表 1 可知, 在最初培养的 14 d 内, 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 与 6% 蔗糖处理的叶片愈伤组织诱导率最高, 而当 2,4-D 浓度为 3.0 mg·L⁻¹ 时, 6% 的蔗糖完全抑制愈伤组织的发生。在培养的第 40 d 时, 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 与 6% 蔗糖处理的叶片愈伤组织生长量最大, 而对于 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 来说, 3% 的蔗糖可以产生最大的愈伤诱导率和愈伤组织生长量。因此, 2,4-D 与蔗糖在诱导叶片愈伤组织上具有浓度效应, 同时二者间存在一定的相互作用。1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 诱导淡绿色致密的愈伤组织, 这种愈伤组织可以在附加 BA 的 MS 培养基上分化, 但 3.0

mg·L⁻¹ 2,4-D 诱导黄褐色疏松的愈伤组织, 这种愈伤组织在附加 BA 的 MS 培养基上不能分化不定芽。

表 1 蔗糖浓度对 2,4-D 诱导沙田柚叶片愈伤组织的影响

Table 1 Influence of sucrose concentration on callus formation induced by 2,4-D from leaf explants of *C. grandis* (L.) Osbeck cv. Shatian-Yu

2,4-D (mg·L ⁻¹)	蔗糖 Sucrose (%)	愈伤组织诱导率 Callusing frequency (%)		伤组织重量 Callus fresh weight(mg)
		14 d	40 d	
1.0	0	4.6±1.4a	55.5±6.3b	145.4±12.5a
1.0	3	14.3±3.8b	61.9±5.1b	260.3±23.3b
1.0	6	60.9±9.4d	91.7±10.2c	308.7±32.1c
1.0	9	17.4±4.2b	39.1±4.4a	210.3±19.8b
3.0	0	15.0±3.5b	38.1±3.6a	105.2±10.4a
3.0	3	30.4±7.2c	80.9±7.7c	296.2±25.8bc
3.0	6	0.0 a	38.1±5.1a	172.1± 24.3a
3.0	9	0.0 a	30.0± 6.7a	161.2± 16.9a

每处理的外植体数量为 45, 重复 3 次。通过 LSD(0.05) 分析, 同一栏中字母相同的表示无显著性差异。

Values are means of three replications with each treatment using 45 explants. The same letter in the column denotes no significant difference by LSD test at 0.05 significant level.

2.2 GA₃、ABA 与 CCC 对叶片愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知, GA₃ 处理显著降低叶片愈伤诱导率与愈伤组织的生长量, 随着 GA₃ 浓度的增加, 抑制作用增强。GA₃ 诱导的愈伤组织在外观上呈黄褐色, 当转移到附加 3.0 mg/L BA 的 MS 培养基后, 这种愈伤组织不能分化。而 ABA 与 CCC 处理可以显著提高愈伤组织诱导率和愈伤组织生长量。ABA 与 CCC 的作用具有浓度效应, 其中 0.1 mg·L⁻¹ ABA 与 1.0 mg·L⁻¹ CCC 诱导愈伤组织的作用最强。ABA 与 CCC 均诱导淡绿色的愈伤组织, 这种愈伤组织在附加 3.0 mg·L⁻¹ BA 的 MS 分化培养基上可以分化不定芽。

2.3 GA₃ 对愈伤组织分化的影响

由叶片诱导的淡绿色愈伤组织可以在附加 3.0 mg·L⁻¹ BA 的 MS 培养基上分化。分化培养基中加入 GA₃ 可以进一步提高愈伤组织分化率和每块愈伤组织的再生芽数, 培养 6 周后的统计结果表明 0.25 mg·L⁻¹ GA₃ 诱导的愈伤组织分化频率最高(表 3)。GA₃ 诱导愈伤组织分化的芽在形态上变得细长, 叶片变得狭窄(图 1)。这种不定芽转移到附加 0.2 mg·L⁻¹ BA 的 MS 培养基上增殖培养时, 可平均增殖 4~6 个芽(图 2)。不定芽转移到附加 1.0 mg·L⁻¹ IBA 的 1/2MS 生根培养基上培养 20 d 后可以再

生 1~2 条根(图 3)。生根苗在室内锻炼 2 周后移栽到大田,成活率达 89%左右。



图 1 愈伤组织在附加 GA3 的培养基上分化不定芽
Fig. 1 Adventitious shoots regeneration from callus cultured on MS medium supplemented with GA3



图 2 再生芽在附加 0.2 mg. L⁻¹BA 的 MS 培养基上增殖培养
Fig. 2 Multiplication of adventitious shoots cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg. L⁻¹BA



图 3 再生芽在附加 1.0 mg. L⁻¹IBA 的 MS 培养基上诱导生根
Fig. 3 Rooting of regenerated shoots on MS medium supplemented with 1.0 mg. L⁻¹IBA

表 2 GA3,BA 与 CCC 对沙田柚叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of GA3,ABA and CCC on the callus induction from leaf explant of *C. grandis* Osbeck cv. Shatian-Yu

处理 Treatments	浓度 Concentra- tion(mg. L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Callusing frequency(%)	愈伤组织重量 Callus weight (mg)
CK	—	56.7±6.6c	105.2±12.3b
GA3	0.1	28.6±3.5b	92.5±9.8b
	0.2	8.7±2.1a	84.6±10.4b
	0.5	5.0±1.5a	37.3±6.5a
	1.0	3.6±1.3a	29.1±3.4a
ABA	0.05	75.2±7.2d	205.8±18.5c
	0.1	80.8±8.3d	337.3±23.6d
	0.2	80.9±6.4d	214.7±15.1c
	0.5	73.9±11.2d	178.9±16.2c
CCC	0.1	80.0±8.6d	189.2±14.2c
	0.5	76.2±6.7d	229.4±17.6c
	1.0	95.8±9.3e	291.3±21.4d
	5.0	88.0±7.8de	247.9±23.5c

表 3 GA3 处理对沙田柚叶片诱导的愈伤组织分化不定芽的影响

Table 3 Effects of GA3 at different concentrations on adventitious shoot regeneration from leaf-derived callus of *C. grandis*(L.)Osbeck cv. Shatian-Yu

GA3 (mg. L ⁻¹)	分化率(%) Callus with shoots	不定芽/每块愈伤组织 Shoots number per callus
0.0	19.2±2.8a	3.9±1.1a
0.05	18.8±3.6a	3.5±1.3a
0.1	28.9±4.4b	5.7±1.8b
0.25	62.4±7.5c	9.2±2.3c
0.5	38.3±4.6b	6.3±2.2b
1.0	20.5±4.2a	5.1±1.7ab

3 讨 论

在植物组织培养中,蔗糖不仅为培养物提供能量,而且是培养物渗透环境的主要调节者。培养基中糖的种类和浓度不仅影响培养物生长速度和生长量,而且影响其代谢水平及细胞的形态和发生。吕芝香等(1981)研究了不同碳源对甘薯块根愈伤组织诱导和生长的影响,结果发现 2%蔗糖最有利于愈伤组织的生长,高浓度蔗糖(8%)完全抑制愈伤组织生长。本文的研究表明 6%的蔗糖较适合叶片愈伤组织的诱导和生长,高浓度蔗糖(9%)同样抑制愈伤组织的生长。这种对蔗糖需求的差异也许与植物种类及外植体的差异有关。蔗糖浓度过高抑制愈伤组

织生长可能与渗透压增高,从而影响水分的吸收有关(吕香芝等,1981)。Giladi 等(1977)报道甜橙的芽在无糖的培养基上能产生最多的愈伤组织,高浓度的糖抑制愈伤组织发生,但高浓度蔗糖抑制愈伤组织发生同渗透压无关,因为高浓度甘露醇并不抑制愈伤组织的发生。本文的结果表明,在蔗糖和 2,4-D 浓度间存在着一定的相互作用,对于 1.0 mg. L⁻¹ 2,4-D 而言,6%的蔗糖最适合愈伤组织诱导,而当 2,4-D 浓度为 3.0 mg. L⁻¹ 时,3%的蔗糖最适合愈伤组织诱导(表 1),这说明蔗糖是直接影响愈伤组织的诱导和生长。

在植物组织培养中,通常使用生长素类物质诱导愈伤组织,除此之外,其它生长调节物质也显著影响愈伤组织的诱导和生长。本文的结果表明,GA₃ 处理抑制愈伤组织的诱导和生长,而如果用 ABA 处理则显著促进愈伤组织的生长(表 2)。Altman 与 Goren(1971,1974)报道 ABA 可促进甜橙嫩芽诱导的愈伤组织,并进一步证明 ABA 诱导愈伤组织包括 2 个阶段,即先由 ABA 诱导特定的细胞活化,随后愈伤组织的增殖可由 GA 促进,因此甜橙愈伤组织的诱导取决于外植体中 ABA 与 GA 的平衡。Goren 等(1979)进一步报道了 ABA 对甜橙愈伤组织诱导的促进作用与 ETH 有关。本文的结果证实 GA₃ 抑制愈伤组织的诱导和增殖,这一点可由 GA 合成抑制剂 CCC 处理能显著提高愈伤组织诱导率和愈伤组织生长而得到进一步证实(表 2)。但 GA₃ 却有利于愈伤组织在分化培养基上分化不定芽(表 3),因此,GA₃ 在愈伤组织诱导和愈伤组织分化阶段具有相反的作用。在不同的培养阶段可以通过在

培养基中加入 GA₃ 或其拮抗剂 ABA、合成抑制剂 CCC 而调节外植体的分化,从而建立一个高效的离体培养体系。

参考文献:

- 吕香芝,王曼丝,董建国. 1981. 不同碳源对甘薯(*Ipomoea batatas* L. Lam)块根愈伤组织的形成和生长的影响[J]. 植物生理学报, 7(2): 105—110.
- Altman AR, Goren R. 1971. Promotion of callus formation by abscisic acid in citrus bud cultures[J]. *Plant Physiol.* 47: 844—846.
- Altman AR, Goren R. 1974. Interrelationship of abscisic acid and gibberellic acid on the promotion of callus formation in the abscission zone of citrus bud cultures[J]. *Physiol Plant*, 32: 55—61.
- Chaturvedi HC, Mitra GC. 1974. Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures[J]. *Hortsci.* 9: 118—120.
- Giladi I, Altman A, Goren R. 1977. Different effects of sucrose, abscisic acid and benzyladenine on shoot growth and callus formation in the abscission zone of excised citrus buds[J]. *Plant Physiol.* 59: 1 161—1 164.
- Goh CJ, Sim GE, Morales CL, et al. 1995. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pomello tissue culture[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 43: 301—303.
- Gore R, Altman A, Giladi I. 1979. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures [J]. *Plant Physiol.* 63: 280—282.
- Yelenosky G. 1987. Shoot organogenesis from rooted citrus leaves[J]. *Hortscience*, 22: 312