

柑橘愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生的关系

张俊娥

(江西师范大学 生命科学学院, 南昌 330022)

摘要: 为了探讨柑橘愈伤组织不能再生的原因, 试图寻找柑橘愈伤组织生长速度与其体细胞胚胎发生之间的关系, 对7种柑橘类型的29种基因型的愈伤组织的生长速度进行了测定, 并对愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生之间的相关性进行了统计分析。结果表明, 柑橘愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生之间的相关系数为 $r = -0.3683$ 。由此推断在这两者之间还存在其它影响因素。

关键词: 柑橘; 愈伤组织; 生长速度; 体细胞胚胎发生

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)05-0682-04

Relation between callus growth speed and somatic embryogenesis of citrus

ZHANG Jun-E

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: In order to discuss the cause of loss of regeneration capability of citrus callus, and to look for the relation between callus growth speed and somatic embryogenesis, in this study, calli growth speed of twenty-nine genes from seven citrus types were detected, and the correlation between callus growth speed and somatic embryogenesis was statistically analyzed. The results showed that correlation coefficient of the growth speed and somatic embryogenesis was -0.3683 . It was thus deduced that other influence factors still occurred between them.

Key words: citrus; callus; growth speed; somatic embryogenesis

植物组织培养中, 愈伤组织经长期继代后分化能力的保持问题, 一直是细胞工程研究中的重要课题(谷明光等, 1982; Hao & Deng, 2002)。已有不少报道指出, 愈伤组织长期继代后, 分化能力降低是较为普遍的现象, 如胡萝卜、烟草和水稻, 在继代多次后, 愈伤组织分化植株的能力就会完全消失(Murashige & Tucker, 1969; 余建明等, 1984)。但也有—些植物的愈伤组织在继代中, 它们分化能力是可以很好保持的。如玉米, 花粉愈伤组织继代两年后仍有很强的植株再生能力(余建明等, 1984)。而不同基因型的柑橘愈伤组织经长期继代后分化能力却有所不同, 一些柑橘愈伤组织继代多年后仍有再生

能力, 但有些愈伤组织在继代不长时间就丧失了再生能力(张俊娥等, 2006)。这些丧失了再生能力的柑橘愈伤组织是非常重要的遗传育种材料, 它们在柑橘遗传转化、离体诱变、离体筛选突变体、快速繁殖中发挥重要的作用。我们面临的问题是, 如何才能让这些丧失了再生能力的柑橘愈伤组织恢复再生能力? 柑橘愈伤组织的再生能力又跟哪些因素有关呢? 张俊娥等(2006)对影响柑橘体细胞胚胎发生能力的可能影响因素进行了分析, 结果表明, 柑橘体细胞胚胎发生能力与愈伤组织的倍性变化无关, 也与愈伤组织继代时间无关。就在寻找影响柑橘体细胞胚胎发生能力的可能影响因素之时, 作者在对柑橘

收稿日期: 2009-03-29 修回日期: 2009-12-16

基金项目: 国家自然科学基金(30370743); 江西师范大学博士启动资金(2441)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370743); Doctoral Start-up Foundation of Jiangxi Normal University(2441)]

作者简介: 张俊娥(1972-), 女, 山西榆社人, 博士, 副教授, 研究方向为植物生物技术与遗传育种, (E-mail) zhangjune2001@yahoo.com.cn.

愈伤组织的继代过程中发现,具有再生能力的柑橘愈伤组织生长速度比较慢,如暗柳橙,伏令夏橙等,而失去再生能力的愈伤组织生长速度却较快,如国庆1号,意大利血橙等。那么,柑橘愈伤组织的生长速度与体细胞胚胎发生是否是负相关的关系呢?如果是,我们就可以通过调节愈伤组织的生长速度来调节体细胞胚胎发生。为此,本试验对7种柑橘类型的29种基因型的愈伤组织的生长速度进行了测定,对愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生之间的相关性进行统计分析,为进一步研究柑橘体细胞胚胎发生提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试愈伤组织取自华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室(供试材料的外植体主要来源于柑橘幼嫩胚珠和未受精败育胚珠)。供试材料继代培养基为改良的MT+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂,不加任何激素。用于体细胞胚胎发生研究的材料分别属于7种柑橘类型有29种基因型。供试材料的基因型和继代培养时间见表1。

表1 供试的29种不同基因型的柑橘愈伤组织
Table 1 Twenty-nine citrus embryogenic calli of different genotypes

柑橘类型 Types of Citrus	基因型 Genotypes	学名 Latin name	培养时间(年) Subculture time
甜橙(12种)	伏令夏橙(Valencia)	<i>Citrus sinensis</i>	17
	卡特夏橙(Carter)	<i>C. sinensis</i>	8
	奥林达夏橙(Olinda)	<i>C. sinensis</i>	8
	里奇凤梨甜橙(Ridge Pineapple)	<i>C. sinensis</i>	13
	沙漠蒂甜橙(Shamouti sweet orange)	<i>C. sinensis</i>	7
	暗柳橙(Anliucheng)	<i>C. sinensis</i>	8
	无酸甜橙(Succari)	<i>C. sinensis</i>	10
	纽荷尔脐橙(Newhall)	<i>C. sinensis</i>	13
	佛罗斯特脐橙(Frost)	<i>C. sinensis</i>	8
	红肉脐橙(Cara Cara)	<i>C. sinensis</i>	12
	鲁斯脐橙(Russ navel)	<i>C. sinensis</i>	11
	意大利血橙(Tarroco)	<i>C. sinensis</i>	15
	宽皮柑橘(10种)	尾张(Owari)	<i>C. sinensis</i>
国庆1号(Guoqing No. 1)		<i>C. sinensis</i>	8
国庆5号(Guoqing No. 5)		<i>C. sinensis</i>	8
建柑(Jiangan)		<i>C. sinensis</i>	8
四季橘(Calamondin)		<i>C. sinensis</i>	11
华农本地早(Bendizao)		<i>C. sinensis</i>	8
丹西红橘(Dancy)		<i>C. sinensis</i>	10
印度酸橘(Cleopatra)		<i>C. sinensis</i>	11
夏甜橙(Natsudaikai)		<i>C. sinensis</i>	11
茶香柑(Chaxianggan)		<i>C. sinensis</i>	8
葡萄柚(2种)	红马叙葡萄柚(Red Marsh)	<i>C. sinensis</i>	11
	路比葡萄柚(Ruby)	<i>C. sinensis</i>	10
酸橙(2种)	意大利酸橙(Italy sour orange)	<i>C. sinensis</i>	15
	美国酸橙(Sour orange)	<i>C. sinensis</i>	9
桔柚(3种)	佩奇桔柚(Page tangelo)	<i>C. sinensis</i> × <i>C. sinensis</i>	15
	明尼奥拉桔柚(Mineneola tangelo)	<i>C. sinensis</i> × <i>C. sinensis</i>	9
	桑帕丝特桔柚(Sunburst)	<i>C. sinensis</i> × <i>C. sinensis</i>	11
桔橙(1种)	默科特桔橙(Murcott)	<i>C. sinensis</i> × <i>C. sinensis</i>	17
其它(1种)	澳洲指橘(Microcitrus)	<i>Microcitrus papauwana</i>	10

1.2 试验方法

1.2.1 测定柑橘愈伤组织的生长速度 将柑橘愈伤组织用滤纸吸干后称取0.5 g接种到MT固体培养基上,在光照培养室培养30 d,然后将增殖的愈伤组

织用滤纸吸干后称重,并根据公式计算生长速度,生长速度=(增殖后重量-增殖前重量)/增殖前重量。每个基因型设3次重复。

1.2.2 诱导体细胞胚胎发生及统计其个数 诱导体

细胞胚的培养基为改良的 MT+20 ml/L 甘油+7 g/L 琼脂。愈伤组织在诱导培养基上生长 1 月后, 每种材料随机取 3 瓶, 在每瓶中随机称取 0.3 g 放在小培养皿中, 加少量水使其散开, 在体视显微镜下统计体细胞胚个数, 用计数器计数。每瓶重复 3 次。

1.2.3 分析方法 愈伤组织的生长量之间和胚状体个数之间的差异显著性分析采用 SPSS10.0 分析软件。

表 2 柑橘愈伤组织体细胞胚胎发生能力的比较
Table 2 Comparison of competence for somatic embryogenesis in citrus calli

柑橘类型 Types	基因型 Genotypes	体细胞胚胎发 生能力(个/g) Competence for somatic embryogenesis
甜橙(5种)	无酸甜橙(Succari)	2260.4±24.6 A
	佛罗斯特脐橙(Frost)	2070.0±30.5 B
	伏令夏橙(Valencia)	2024.2±8.7 B
	暗柳橙(Anliucheng)	1635.0±17.8 C
	红肉脐橙(Cara Cara)	853.4±11.5 D
宽皮柑橘(2种)	茶香柑(Chaxianggan)	607.3±15.9 E
	酸橙(1种)	1608.6±22.9 C
其它(1种)	澳洲指橘(Microcitrus)	349.3±12.5 F

注: 差异显著性采用邓肯氏新复极差分析($P < 0.01$), 同一列中相同字母表示差异不显著。

Note: Significant difference was analysed via Duncan Analyse ($P < 0.01$), same capital letter in the column means insignificant.

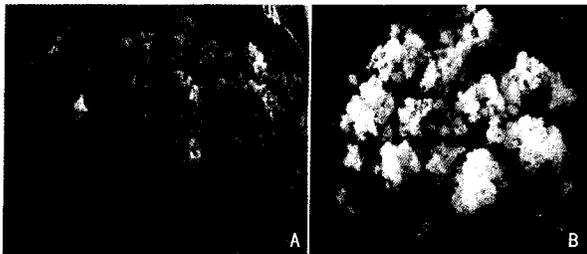


图 1 佛罗斯特脐橙(A)和澳洲指橘(B)愈伤组织在甘油培养基(20 ml/L)上再生胚状体
Fig. 1 Somatic embryogenesis of Frost and Microcitrus on glycerol medium

2 结果与分析

2.1 柑橘愈伤组织再生胚状体能力大小比较

本试验对 29 种不同基因型的柑橘愈伤组织进行体细胞胚诱导并统计其个数。结果表明, 它们再生胚状体的能力大小不同(表 2)。无酸甜橙、佛罗斯特脐橙、伏令夏橙、暗柳橙、美国酸橙有极强的再生能力, 每克再生群体中胚状体数超过 1 600 个(图

1); 红肉脐橙属于易再生的品种, 每克再生群体中胚状体数分别为 890 个和 853 个; 茶香柑、澳洲指橘具有再生能力, 每克再生群体中胚状体数分别为 607 个和 349 个(图 1)。具有再生能力的 8 种愈伤组织中, 不同基因型愈伤组织的体细胞胚胎发生能力之间存在显著性差异。其它 21 种愈伤组织在甘油培养基上长不出胚状体。分析表 2 可见, 12 种甜橙愈伤组织中, 有 5 种愈伤组织在甘油培养基上能长出胚状体, 且胚胎发生能力均较强; 而 10 种宽皮柑橘愈伤组织中, 只有 1 种具有再生能力, 且胚胎发生能力次于甜橙类愈伤组织。柑橘愈伤组织再生胚状体如图 1 所示。

2.2 柑橘愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生能力之间的关系

试验中发现, 暗柳橙、伏令夏橙和佛罗斯特脐橙等愈伤组织在 MT 培养基上生长比较缓慢, 当转入甘油培养基时, 它们能够再生胚状体; 而国庆 1 号、意大利血橙和默科特桔橙等愈伤组织在 MT 培养基上增殖很快, 但是当转入甘油培养基上时, 它们不能再生胚状体。于是, 对 29 种基因型的愈伤组织的生长速度进行测定, 试图发现柑橘愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生能力之间的定量关系。结果如表 3 所示。不同基因型愈伤组织的生长速度之间存在显著性差异。分析柑橘愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生能力之间的相关性发现, 两者的相关系数是 $r = -0.3683$ ($P < 0.01$), 说明柑橘愈伤组织与体细胞胚胎发生能力之间有一定的相关性, 但未达到显著水平, 可能在两者之间还有其它影响因素起作用。

3 讨论

在植物繁殖和遗传操作中, 研究离体再生体系所面临的主要问题之一是胚胎发生能力和器官发生能力的丧失。Torrey(1967)和 Murashige(1969)等认为, 随着时间的推移, 多倍化和非整倍化提高, 胚胎发生能力逐渐丧失。这些变化是遗传因素或生理因素引起的。D, Amato(1985)却认为, 离体培养条件下, 再生能力的决定因素不一定总是遗传因素引起的。高频率的体细胞胚胎发生对于植物细胞的遗传转化、离体诱变、离体筛选突变体、快速繁殖等工作具有特别重要的意义。但柑橘愈伤组织具有普遍不能再生胚状体现象。为探询柑橘愈伤组织不能再

生胚状体的原因,作者做了诸多探索。张俊娥等(2006)分析了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,结果表明,柑橘愈伤组织倍性

变化与体细胞胚胎发生能力之间的相关性较小。另外,柑橘胚性愈伤组织继代时间与体细胞胚胎发生能力之间的相关性也不显著。本文对 29 种柑橘愈

表 3 29 种不同基因型的愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生能力的比较

Table 3 Comparisons between the growth speed and competence for somatic embryogenesis of twenty-nine citrus calli

基因型 Genotypes	生长速度 Growth speed	体细胞胚胎发生能力(个/g) Competence for somatic embryogenesis	相关性分析 Correlation analyse ($P < 0.01$)
国庆 1 号(Guoqing No. 1)	8.33±0.22 A	0	R=-0.3683
意大利血橙(Tarroco)	8.24±1.00 A	0	
里奇凤梨甜橙(Ridge Pineapple)	6.69±0.80 B	0	
尾张(Owari)	6.21±0.26 BC	0	
澳洲指橘(Microcitrus)	6.01±0.31BCD	349.3±12.5 F	
默科特桔橙(Murcott)	5.85±0.28 BCD	0	
建柑(Jiangan)	5.72±0.87 BCDE	0	
印度酸橘(Cleopatra)	5.57±2.01 BCDE	0	
沙漠蒂甜橙(Shamouti sweet orange)	5.17±0.17 CDEF	0	
茶香柑(Chaxianggan)	4.99±0.31 CDEFG	607.3±15.9 E	
四季橘(Calamondin)	4.81±0.33 CDEFG	0	
鲁斯脐橙(Russ navel)	4.75±0.39 DEFGH	0	
丹西红橘(Dancy)	4.73±0.31 DEFGH	0	
华农本地早(Bendizao)	4.57±0.73 DEFGHI	0	
明尼奥拉桔柚(Mineneola tangelo)	4.35±0.20 EFGHI	0	
美国酸橙(Sour orange)	4.27±0.29 FGHIJ	1608.6±22.9 C	
奥林达夏橙(Olinda)	4.18±0.29 FGHIJ	0	
纽荷尔脐橙(Newhall)	4.09±0.28 FGHIJ	0	
意大利酸橙(Italy sour orange)	4.07±0.26 FGHIJ	0	
卡特夏橙(Carter)	4.01±0.48 FGHIJ	0	
无酸甜橙(Succari)	3.99±0.12 FGHIJ	2260.4±24.6 A	
路比葡萄柚(Ruby)	3.61±0.39 GHIJK	0	
国庆 5 号(Guoqing No. 5)	3.57±0.84 GHIJK	0	
红肉脐橙(Cara Cara)	3.57±0.59 GHIJK	853.4±11.5 D	
伏令夏橙(Valencia)	3.29±0.16 HIJK	2024.2±8.7 B	
佛罗斯特脐橙(Frost)	3.16±0.18 IJK	2027.0±30.5 B	
夏甜橙(Natsudaikai)	2.85±0.30 JK	0	
暗柳橙(Anliucheng)	2.23±0.33 K	1635.0±17.8 C	
红马叙葡萄柚(Red Marsh)	0.19±0.77 L	0	

伤组织生长速度进行了定量测定,对愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生的关系进行了研究,分析了 29 种愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生能力之间的相关关系。结果发现,具有再生能力的柑橘愈伤组织生长速度确实比较慢,如暗柳橙的生长速度只有 2.23 ± 0.33 ,伏令夏橙的生长速度只有 3.29 ± 0.16 ,对于失去再生能力的愈伤组织生长速度也确实较快,如国庆 1 号的生长速度达到 8.33 ± 0.22 ,意大利血橙的生长速度达到 8.24 ± 1.00 。然而,在统计分析柑橘愈伤组织的生长速度与体细胞胚胎发生能力之间的相关关系时却发现,它们的相关系数仅为 $r = -0.3683$ 。由此推断,在这两者之间还有其它影响因素的存在。另外,作者也对其它可能影响

柑橘愈伤组织再生能力的影响因素(碳源、高温和低温等)作了探索,结果发现,不同碳源对具有体细胞胚胎发生能力的柑橘愈伤组织的影响各异,但对于失去再生能力的愈伤组织而言,不同碳源似乎对其体细胞发生不起作用。高温与低温处理的愈伤组织体细胞胚胎发生能力的影响也不是很明显。有望为研究柑橘愈伤组织体细胞胚胎发生提供依据。

参考文献:

- 谷明光,张雪琴,曹孜义. 1982. 在继代培养中玉米花粉愈伤组织的分化能力及其染色体稳定性[J]. 植物学报,24:319-325
 余建明,孙立华,黄明. 1984. 水稻花粉愈伤组织在继代培养中的分化能力及其染色体变异[J]. 遗传,6:17-19
 (下转第 600 页 Continue on page 600)

谱数据库能够灵敏、可靠、稳定地反映甘蔗种质资源的遗传特性。本研究中 21 对核心引物由 Pan (2006,2007) 从 221 对 SSR 引物中筛选而来, 利用 SSR 荧光标记结合 DNAMAN 软件、NTSYS 软件, 满足了构建甘蔗种质资源指纹图谱数据库和遗传分析的要求。在以后的研究中, 随着甘蔗材料数量增加, 可筛选增加 SSR 引物, 使指纹图谱数据库满足鉴定甘蔗品种与甘蔗育种的要求。

参考文献:

- 邓重熹. 1990. 中国甘蔗品种志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1-7
- Aitken KS, Jackson PA, McIntyre. 2005. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar [J]. *Theor Appl Genet*, **110**:789-801
- Chandra Punit, Singh RK, Singh IS, et al. 2001. Possibility of identification and characterization of sugarcane cultivars on the basis of protein profiles[J]. *Sugar Tech*, **3**(1):59-62
- Clark JM. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases[J]. *Nucleic Acids Res*, **16**:9 677-9 686
- Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ. 2000. Characterization of microsatellite markers from sugarcane(*Saccharum* spp.), a highly polyploid species[J]. *Plant Sci*, **155**:161-168
- Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm [J]. *Plant Sci*, **165**:181-189
- Glaszmann JC, Fautret A, Niyer JL, et al. 1992. Utility of isozymes in sugarcane breeding[J]. *Sugarcane*, **3**:14-21
- Hemaprabha G, Govindaraj P, Balasundaram N, et al. 2005. Genetic diversity analysis of indian sugarcane breeding pool based on sugarcane specific STMS markers [J]. *Sugar Tech*, **7**(2):9-14
- Hoarau JY, Offmann B, DHont A, et al. 2001. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar(*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, **103**(1):84-97
- Levinson G, Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution [J]. *Mol Biol Evol*, **4**(3):203-221.
- Nair NV, Selvi A, Sreenivasan TV, et al. 2002. Molecular diversity in Indian sugarcane cultivars as reveal by randomly amplified DNA polymorphisms[J]. *Euphytica*, **127**:219-225
- Pan YB. 2006. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing [J]. *Sugar Tech*, **8**(4):246-256
- Pan YB, Scheffler BS, Richard EP. 2007. High-throughput genotyping of commercial sugarcane clones with microsatellite(SSR) DNA markers [J]. *Sugar Tech*, **9**(4):176-181
- Slotterer C, Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. *Nuc Acids Res*, **20**:211-215
- Srivastava S, Gupta PS. 2002. SDS and native PAGE protein profile for identification and characterization of elite sugarcane genotypes[J]. *Sugar Tech*, **4**(4):143-147
- Stevenson GC. 1965. Genetics and Breeding of Sugar Cane[M]. London: Longmans Green and Co, LTD:39-71
- Weber JL May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction [J]. *Am J Hum Genet*, **44**:388-396
- You JH(游建华), Wu KC(吴凯朝), Liang J(梁俊). 2008. Assessment the genetic diversity among sugarcane cultivars by using SSR marker(利用 SSR 标记评价甘蔗品种遗传多样性)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), **36**(10):3 990-3 992, 3 998
- 张俊娥, 郭文武, 邓秀新. 2006. 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*, **33**(7):647-654
- D, Amato P. 1985. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants [J]. *Criti Rev Plant Sci*, **3**:73-112
- Etienne H, Bertrand B. 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: Effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants [J]. *Tree Physiol*, **23**(6):419-426
- Hao YJ, Deng XX. 2002. Stress treatments and DNA methylation affect somatic embryogenesis from citrus callus [J]. *Acta Bot Sin*, **44**(6):673-677
- Murashige T, Tucker DPH. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture [C]. In: Proc First Int Citrus Symp Univ California, Riverside, **3**:1 155-1 161
- Torry JG. 1967. Morphogenesis in relation to chromosome constitution in long-term plant tissue cultures [J]. *Plant Physio*, **20**:265

(上接第 685 页 Continue from page 685)