

# 荔枝生物技术研究进展

王家保\*, 贾彩红, 徐碧玉, 金志强, 李美英

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

**摘要:** 综述了离体培养、有利基因的克隆及遗传转化等生物技术的三个方面在荔枝研究中的应用进展。已有研究者分别建立了花粉培养、叶片培养、幼胚培养等获得植株的再生体系, 克隆了部分荔枝基因, 建立了基因枪与根瘤农杆菌转化体系。这些研究为荔枝生物技术育种提供了基础。

**关键词:** 荔枝; 生物技术; 离体培养; 基因克隆; 遗传转化

**中图分类号:** Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)06-0832-05

## Advances in biotechnological research on Litchi (*Litchi chinensis*)

WANG Jia-Bao\*, JIA Cai-Hong, XU Bi-Yu,  
JIN Zhi-Qiang, LI Mei-Ying

(Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract:** The advances in research on *in vitro* culture, gene cloning and genetic transformation of litchi were reviewed in this paper. Plant regeneration from pollen, leaves and young embryo had already been succeeded. Some useful genes had been cloned and the genetic transformation mediated by particle bombardment and *Agrobacterium tumefaciens* infection had been constructed. The problems and prospects of litchi biotechnology were also discussed.

**Key words:** litchi; biotechnology; *in vitro* culture; gene cloning; genetic transformation

荔枝是华南重要的果树之一, 在农业经济中占有重要地位。但栽培荔枝仅有 1 个种, 遗传基础比较单一, 且花小、坐果率低, 加上实生苗的童期较长, 杂交育种较为困难, 使得许多优良种质不能在荔枝育种中快速应用。克隆有利基因, 通过生物工程技术如原生质体融合、转基因技术等培育具有特殊性状的荔枝新种质将会极大加快荔枝育种进程。本文仅对荔枝生物技术研究进展做一综述。

### 1 离体培养的研究进展

#### 1.1 花药培养再生

傅连芳等(1983)将岵山醮核与莆田陈紫的荔枝

单核靠边期花药接种在 MS+KT2.0 mg/L+2,4-D2.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L 的培养基上培养, 3 周后即出现体细胞愈伤组织, 2 个月后又出现颗粒状愈伤组织。将两种愈伤组织转入 MS 和改良 B5 附加 KT0.5 mg/L+NAA0.1 mg/L+蜂皇浆 400 mg/L+水解酪蛋白(LH)500 mg/L 的分化培养基上进行培养, 体细胞愈伤组织不能进行器官分化, 而颗粒状愈伤组织经 30 d 左右分化出胚状体。胚状体转入 MS 和改良 B5 培养基附加蜂皇浆 400 mg/L+谷氨酰胺 500 mg/L+LH500 mg/L 的生长培养基进一步培养出芽; 最后用 1/2 改良 B5 或 2.5 倍 White 大量元素附加 KT0.1 mg/L+IAA0.01 mg/L+LH500 mg/L+谷氨酰胺 1 600

收稿日期: 2007-09-07 修回日期: 2008-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(30460085); 海南省教育基金(Hj200534); 中央级公益性科研院所基本业务费专项(ITBBZD2007-3-1)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30460085); Foundation for Education of Hainan Province(Hj200534); Special Fund for the Basic Scientific Research of National Non-profit Institutes from Chinese Government]

作者简介: 王家保(1974-), 男, 山东鄄城人, 博士, 助理研究员, 从事果树生物技术研究工作。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: jbwang2@163.com)

mg/L 进一步分化成具根、茎、叶器官的完整植株,共获得 24 株,大部分是单倍体植株。多次继代的愈伤组织细胞中二倍体较少。

谢玉明等(2006)利用单核期的妃子笑花粉诱导出了胚性愈伤组织、胚状体及完整植株。同时发现活性碳及谷氨酰胺促进体胚形成,但水解乳蛋白、蜂皇浆及水解酪蛋白不利于体细胞胚形成与生长。获得的胚性愈伤组织中单倍体、二倍体及三倍体细胞均有。俞长河等(1997)也用荔枝的花药诱导出愈伤组织,并发现幼龄树的花粉更易诱导胚性愈伤组织,在培养基中添加一定的硫代硫酸银可提高胚性愈伤组织的诱导率,这种作用可能与硫代硫酸银抑制乙烯生成有关。

## 1.2 叶片培养再生

Puchooa(2004)以无菌播种生长的大造幼苗幼叶为外植体,详细研究各种因素对叶片再生的影响,最终获得了再生植株。先用含 Tween20 的 1.5% 次氯酸钠浸泡 15 min 消毒,然后在无菌水中冲洗 3 次除菌,再置入 MS+维生素 C+柠檬酸 225 mg/L 培养 1~2 h+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 2.5 g/L,或在固体培养基上培养几个小时后,当外植体分泌大量酚类物质时取出,于维生素 C 225 mg/L+柠檬酸 225 mg/L 中冲洗后再次接种,可有效防止褐变。诱导培养基的最佳配方为 MS+2,4-D 1.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 2.5 g/L,20~25 d 68% 外植体大量产生愈伤组织,其中多为胚性愈伤组织及体细胞胚,特征是细胞壁厚、无淀粉粒、具大液泡。分化培养基的最佳配方是 MS+6-BA 2.0 mg/L+3.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂糖 2.5 g/L,接种 30 d 后 80% 愈伤组织再生出芽,2 周后长出嫩茎。生根培养基最佳配方是 MS+6-BA 2.0 mg/L,3 周内生根率达 76%。生根的幼苗在等量混合的泥碳、地衣、蛭石介质中炼苗时成活率达 40%。1.0~3.0 mg/L 的 NAA 也可大量诱导生根,但根较纤细,炼苗时不能成活。

苏明申等(2005)研究指出,成年元红荔枝幼叶的中段及靠近叶柄的后段可诱导产生愈伤组织,而实生苗刚转绿幼叶的各部分、未转绿幼叶中段、幼茎均可诱导产生愈伤组织,以刚转绿幼叶中段为外植体且叶背朝向接种诱导效果最好。但产生的愈伤组织较差,未能进一步分化出胚状体。

## 1.3 幼胚培养再生

1.3.1 外植体的选择 幼胚培养比其它组织更易诱

导胚性愈伤组织,获得体细胞胚(俞长河等,1997;邝师哲等,1997)。诱导的效率与胚的发育时间有关,糯米糍荔枝在 30 d 左右最佳(周俪依等,1996)。不同品种的幼胚诱导率也不同,下番枝最高,乌叶最低(俞长河等,1997)。

1.3.2 胚性愈伤组织诱导与保存 幼胚培养一般以 MS 为基本培养基,50 g/L 蔗糖为最佳用量,过高过低都不利于愈伤组织的诱导。常用 2,4-D 为诱导生长调节剂,最佳用量在 2~8 mg/L 的范围内(邝师哲等,1997;俞长河等,1997;周俪依等,1996;刘华清等,1997),因品种而异。低浓度的生长素类对胚性愈伤的诱导起促进作用(邝师哲等,1997;俞长河等,1997)。液体震荡培养有利于胚性愈伤组织产生(周俪依等,1996)。诱导的胚性愈伤组织淡黄色小颗粒状,较为松散(俞长河等,1997;刘华清等,1997)。在附加生长调节剂的固体培养基上长期继代,或液体震荡培养长期继代,胚性愈伤组织生长逐渐减慢,逐渐丧失形态发生能力(黄素华等,2003;刘华清等,1997)。交替培养可维持愈伤组织的生长势与胚性,即:在无生长调节剂的培养基上继代 3~4 次,然后转入含 2 mg/L 的 2,4-D 和 29.4  $\mu$ mol/L 的硫代硫酸银或 1 mg/L 的 BA 的培养基上培养 1~2 代;或液体震荡培养 5~6 代后再固体培养基培养 1 代(刘华清等,1997;俞长河等,1998;Yu 等,2000)。在继代培养基中降低 2,4-D 的浓度也可保持愈伤组织的生长势(周俪依等,1996)。荔枝胚性愈伤组织中具有旺盛分裂能力的胚性细胞位于外缘(曾黎辉等,2002;邓朝军等,2006),有利于根瘤农杆菌的侵染转化。

胚性愈伤组织中存在较高的染色体数目变异。单、二、三、四倍体及非整倍体细胞均有。染色体变异在非胚性愈伤组织中高,继代次数增加、较高浓度的 2,4-D、2,4-D 与 NAA 混合使用都可提高变异率。外植体类型与品种来源影响染色体变异率,花药培养的愈伤组织高于幼胚培养获得的愈伤组织,而元红低于下番枝(黄素华等,2003)。

1.3.3 体细胞胚的诱导、成熟及成苗 从胚性愈伤组织生成体细胞胚大致需经 2 个阶段。第一阶段是胚性细胞团的诱导阶段。在 2,4-D 的存在下,淡黄色或黄色、疏松的胚性愈伤组织经过暗或光培养一段时间,可形成许多颗粒状的胚性细胞团,与周围细胞有明显的界限。这些胚性细胞团进一步分化,形成许多球形胚和梨形胚聚集在一起。第二阶段是胚状体的发育成熟;将第一阶段培养获得的胚性细胞

团继代于只附加 NAA 和 IBA 的培养基上,胚状体一步发育形成表面光滑的各个时期的胚状体(邝哲师等,1996;邓朝军等,2006)。由于分化不同步,球形胚、梨形胚、心形胚、鱼雷形胚及子叶期胚状体等各种类型会同时出现。

2,4-D 抑制体细胞胚的进一步发育,使其仅滞留在球形胚或梨形胚阶段(邝哲师等,1997;周俪依等,1996;赖钟雄等,2003)。而低浓度的 NAA、IBA 及 ZR 可促进体胚的发生(周俪依等,1996;赖钟雄等,2003)。培养基中蔗糖浓度过低会使胚状体玻璃化,而琼脂浓度过高,则降低体细胞胚的生成量(赖钟雄等,2003)。震荡培养有利于体细胞胚的发生(周俪依等,1996)。车建美等(2005)研究了体细胞胚发生过程中的几种内源激素含量的变化,发现 IAA、ABA、玉米素(ZT)、二氢玉米素(DHZT)的含量变化分别在 40.1~694.0、14.6~452.9、20.7~262.1、11.5~118.8 ng/gFW 之间,不同的内源激素含量变化规律有差异,但总体上,体细胞胚发生过程中 ABA/IAA 和 ABA/CTK 的值较高有利于球形胚的发生。

荔枝异常体细胞胚的比例较高(赖钟雄等,2003),同一发育阶段的不同体细胞胚 POD 与 EST 同工酶谱变化较大(黄素华等,2002),可能由胚性愈伤组织中存在较大的染色体变异引起(黄素华等,2003)。但二倍体细胞在培养过程中似乎具有选择优势,随培养时间的延长,二倍体细胞逐渐增多(黄素华等,2003)。

体细胞胚的成熟在无生长调节剂的 MS 培养基上即可进行,但效果较差。MS 基本培养基 + 100 mL/L 椰子汁成熟效果好,在成苗培养基上萌发率达 5%(赖钟雄等,2003)。生根培养常用半量 MS 培养基与低浓度生长素类生长调节剂相结合(邝哲师等,1997)或直接用无生长调节剂的 MS 培养基(赖钟雄等,2003),可萌发成为具有根、茎、叶的完整小植株。

#### 1.4 原生质体培养

俞长河等(1996)首次报道了荔枝原生质体再生植株获得成功。研究者利用下番枝幼胚诱导继代的胚性愈伤组织建立了胚性悬浮细胞系,以继代 3~4 d 的胚性悬浮细胞为分离原生质体的起始材料,以 CPW 盐 + 甘露醇 11% + 纤维素酶 0.8% + 离析酶 0.4% 为酶液组合解离,经离心法收集原生质体。原生质体得率为  $10 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ ,成活率为 92%~

97%。采用 1.8% 的褐藻酸钙包埋和饲养细胞共培养的方法有效地促进了原生质体持续分裂,并形成小愈伤组织。少数原生质体可直接发生体胚。小愈伤组织释放后转移至固体培养基,继代增殖后,在分化培养基上体胚分化率为 100%。少数体胚在诱导培养基、成熟培养基和萌发培养基上培养 2~5 个月,先出根后抽茎展叶,最终再生出完整植株。后来,作者又对研究体系进行了优化,获得了更好的结果(俞长河等,1998;Yu 等,2000)。通过电融合技术,赖钟雄等(2001)获得了龙眼和荔枝原生体融合杂种细胞的细胞团。

#### 1.5 其它离体培养

余亚白(1991)研究了茎段培养的效果。外植体以新抽生嫩叶的刚转绿新梢顶端 2cm 左右茎段最佳,接种于 MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L 培养基上,茎段萌芽率 90% 以上,37% 的芽能长成 2 cm 以上,带 2~3 片叶的幼茎。0.6 mg/L 的  $GA_3$  对萌芽有促进作用。幼茎接种于生根培养基 MS + IBA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L 上,1~2 个月后即可生根。

## 2 荔枝重要功能基因的克隆与表达分析

有关于荔枝基因克隆与表达分析的研究较少,多集中在通过基因保守序列设计简并引物,结合 RACE 技术进行基因同源克隆上。Ding 等(2001)用同源克隆和 RACE 技术克隆到了荔枝果实的 ACC 氧化酶(ACO)基因全长,并在大肠杆菌中进行表达,获得了 60KD 的融合蛋白。禚维言等(2005a;2006)也克隆了荔枝 MADS-box 基因全长,发现其在雄花及雌花中特异表达,但转基因拟南芥 T1 代植株中未发现该基因与花发育相关。此外,已先后用同源克隆技术克隆到的荔枝基因片段或全长还有乙烯受体基因全长(朝继成等,2003)、2 个膨大素基因(Expansin)片段(陆旺金等,2003)、5 个 NBS-LRR 类抗病基因同源序列片段(黄代青等,2002)、SOD 基因片段(邓九生等,2000)、2 个 HMG 基因片段(夏瑞等,2006)、Profilin 基因全长(张红云等,2006)等。这些研究均只对基因序列作了简单的生物信息学分析,未做进一步研究。

荔枝无核或焦核是一个重要的经济性状,已有研究者初步进行了胚败育导致焦/无核的分子机制

研究。张以顺等(2004b)用抑制差减杂交技术,以桂味正常发育胚为驱动子(driver),败育胚为检测子(tester),建立了代表桂味败育胚特异表达的 cDNA 文库,经 Virtual Northern 检测,获得 3 个阳性克隆。其中一个为泛素结合酶基因,另 2 个是 S-腺苷蛋氨酸合成酶(SAM)基因。通过 RACE 技术获得了 SAM 基因的 cDNA 全长并对其作了序列分析(张以顺等,2004a)。禡维言等(2005b)也用 SSH 技术构建了富集无核荔枝败育果基因的 cDNA 文库,通过反向 Northern 杂交得到了 61 个阳性克隆,测序了其中 10 个,多数是在荔枝中首次报道的功能未知基因。但以上研究尚未得出有关荔枝胚败育机制的明确结论。

### 3 荔枝遗传转化研究进展

#### 3.1 根癌农杆菌侵染转化

根癌农杆菌侵染转化是双子叶植物成功的转基因方法。欧阳曙等(1985)曾用注射器将根癌农杆菌的 4 个菌系注入乌叶荔枝三年生实生苗与八年生结果树枝条上,待致瘤后,将结瘤组织置于 MS 培养基上培养,获得了愈伤组织,经检测,T-DNA 整合到了荔枝的瘤组织中。说明 T-DNA 可以作为荔枝基因工程的良好载体,而荔枝也是 T-DNA 的良好受体。

曾黎辉等(2003)以元红荔枝胚性愈伤组织为试材,研究了共培养时间、菌株类类型、继代培养时间、菌液浓度等对根癌农杆菌转化效果的影响,结果表明:继代 15 d 的胚性愈伤组织处于旺盛分裂期,是转化的合适受体。EHA105 株系的侵染力最强,共培养 2 d 是最适合的时间,菌液浓度以  $0.5 \times 10^8$  为佳,而转化前将胚性愈伤组织进行 1 h 风干预处理有利于提高转化率。作者用优化的侵染条件获得了稳定表达 uidA 基因的荔枝抗性愈伤组织;并利用中间表达载体 pBI 121 构建了 LEAFY 基因带有植物组成型启动子 CaMV 35S 的植物表达载体并导入菌株农杆菌 EHA105,以继代培养 15 d 的元红胚性愈伤组织为转化受体,G418 作为转化细胞的选择剂,将 LEAFY 基因导入“元红”并获得了 3 株转基因植株。Puchooa(2004)通过农杆菌侵染法,将绿色荧光蛋白基因导入了“Tai So”荔枝胚性愈伤组织,但未获得转基因植株。

#### 3.2 基因枪转化

桑庆亮等(2001)曾用基因枪转化法将 *Gus* 基

因转入了荔枝元红及下番枝荔枝愈伤组织中,发现轰击后 24 h 为检测 GUS 瞬时表达的最佳时间。赖钟雄等(2002,2003)以荔枝“下番枝”胚性愈伤组织为材料,建立了荔枝高效遗传转化系统:继代培养 5~10 d 的胚性愈伤组织是最适的转化受体。荔枝胚性愈伤组织对卡那霉素不敏感,但潮霉素对荔枝胚性愈伤组织有致死效应,50 mg/L 是合适的筛选浓度。以含选择标记基因 *hpt* 和报告基因 *gus* 的质粒 pGAMBIA 1301 作为供体质粒 DNA,采用基因枪轰击法转化荔枝胚性愈伤组织,在附加 50 mg/L 潮霉素的筛选培养基上对轰击后的荔枝胚性愈伤组织进行筛选,获得多个稳定表达 GUS 的抗性细胞系。PCR 检测表明,*hpt* 和 *gus* 基因已整合进荔枝基因组。抗性细胞系保持了强烈的胚胎发生能力,形成了大量的胚状体,获得了一批完整植株,其中 18 株来自稳定表达 GUS 的抗性细胞系的再生植株,经 GUS 组织化学检测为转基因植株。转外源 *hpt* 与 *gus* 基因的下番枝转基因抗性胚性愈伤组织细胞系与对照相比 EST 同工酶谱未发生变化(赖呈纯等,2005)。

### 4 研究展望

以上研究为荔枝新种质的培育提供了必要的技术基础,将成为荔枝常规育种的有益补充。但由于褐变及内生菌严重,荔枝再生体系的建立一直较为困难,现有的报道仅集中在下番枝、元红、“Tai Sao”等几个品种中,获得再生植株的也仅见下番枝与“Tai Sao”两个。尚需进一步研究影响荔枝外植体再生的因素,扩大供试的品种范围,建立妃子笑、淮枝、黑叶、桂味等主要品种的高频再生体系。

果实发育及采后衰老由基因表达控制,如荔枝的焦核/无核、采后果皮褐变等。关于荔枝发育的分子生物学研究尚处于探索阶段,鲜见有关荔枝采后分子生物学的研究报道。应加强荔枝果实发育及采后分子生物学的研究,克隆控制荔枝特殊性状发育及采后果皮衰老的关键基因,这将有助于从根本上理解果实发育与衰老的分子机理,从而为应用生物技术培育具特异性状和耐贮荔枝种质或品种提供基础。

荔枝转基因研究正处于起步阶段,能够获得转基因幼苗的报道极少,并且没有后续的研究报道。因此,仍需加强荔枝转基因技术体系的系统研究,如

探讨农杆菌转化时品种、菌株、载体、培养条件等对转化效率的影响,以获得高效转化效率的技术体系,为遗传转化提供技术基础。

### 参考文献:

- Che JM(车建美), Lai ZX(赖钟雄), Lai CC(赖呈纯), et al. 2005. Changes of endogenous phytohormones during the early somatic embryogenesis in litchi (*Litchi chinensis*) (荔枝体细胞胚胎发生早期的3种内源激素含量变化)[J]. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 26(2): 55-61
- Deng JS(邓九生), Zhang DP(张大鹏), Chen DM(陈大明). 2000. Cloning and sequencing of Cu/Zn superoxide dismutase gene of litchi(荔枝铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与序列分析)[J]. *J Guangxi Agric Biotech* (广西农业生物科学), 19(2): 73-76
- Ding XD, Lu LX, Xue YB, et al. 2001. Cloning of ACC oxidase gene in fruit of *Litchi chinensis* and its expression in *E. coli*[J]. *Acta Hort*, 58: 161-165
- Fu LF(傅连芳), Tang DY(唐道一). 1983. Induction pollen plants of litchi tree (*Litchi chinensis*) (荔枝花粉植株诱导的研究)[J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 10(5): 369-374
- Han JC(韩继成), Fang XJ(方宜钧). 2003. Cloning and analyzing of a cDNA for ethylene receptor, LcERS1, of lychee (*Litchi chinensis*) (编码荔枝乙烯受体(LcERS1)的cDNA基因的克隆与分析)[J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 1(3): 351-35
- Huang DQ(黄代青), Lü LX(吕柳新), Wang P(王平). 2002. Cloning and analysis of resistance gene analogs in litchi(荔枝R基因同源序列的克隆与分析)[J]. *J Fujian Normal Univ* (福建师范大学学报), 18(4): 86-90
- Huang ZZ(黄祖珍), You KZ(游哲哲). 1990. Primary study on propagation of litchi stem *in vitro* (荔枝茎段离体培养初探)[J]. *J Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), (3): 27-29
- Huang SH(黄素华), Lai ZX(赖钟雄). 2002. Analysis of isoenzymatic patterns of POD and EST of somatic embryos in litchi(荔枝胚状体POD与EST同工酶谱分析)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ* (Nat Sci) (福建农林大学学报·自然科学版), 31(4): 467-469
- Huang SH(黄素华), Lai ZX(赖钟雄). 2003. The change of the chromosome number in the embryogenic calli and in the process of the somatic embryogenesis in litchi(荔枝胚性愈伤组织及其体胚发生过程中染色体数目的变化)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ* (Nat Sci) (福建农林大学学报·自然科学版), 32(4): 458-463
- Kuang ZS(邝哲师), Zhou LN(周丽依), Ma XJ(马雪筠), et al. 1996. Study on the types of embryonic in tissue culture on *Litchi chinensis* (荔枝组织培养中胚状体产生的类型及分析)[J]. *J Fruit Sci* (果树科学), 13(增刊): 25-28
- Kuang ZS(邝哲师), Zhou LN(周丽依), Ma XJ(马雪筠), et al. 1997. Somatic embryogenesis and seedling generation of litchi (荔枝体胚发生及成苗研究)[J]. *J Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), (1): 15-17
- Lai CC(赖呈纯), Lai ZX(赖钟雄), Che JM(车建美), et al. 2005. Analysis of EST isozymes in transgenic resistant embryogenic calli in litchi (*Litchi chinensis*) (荔枝转基因抗性胚性愈伤组织的酯酶同工酶分析)[J]. *Subtrop Agric Res* (亚热带农业研究), 1(2): 21-23
- Lai ZX(赖钟雄), Chen ZG(陈振光). 2001. Electrofusion of protoplasts between longan and litchi(龙眼荔枝属间原生质体电融合)[J]. *J Fujian Agric Univ* (福建农业大学学报), 30(3): 347-352
- Lai ZX(赖钟雄), Sang QL(桑庆亮), Pan DM(潘东明). 2002. Establishment of transgenic system of embryogenic callus via particle bombardment in litchi(荔枝胚性愈伤组织基因枪转化系统的建立)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ* (Nat Sci) (福建农林大学学报·自然科学), 31(3): 484
- Lai ZX(赖钟雄), Sang QL(桑庆亮). 2003. Optimization of somatic embryogenesis system from embryogenic callus and plant regeneration from transformed hpt-resistant calli of litchi (*Litchi chinensis*) (荔枝胚性愈伤组织体胚发生系统的优化及转化抗性愈伤组织培养再生植株)[J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 9(2): 131-136
- Liu HQ(刘华清), Chen RM(陈容茂). 1997. Induction and preservation of litchi embryonic callus(荔枝胚性愈伤组织的诱导与保持)[J]. *Fujian Fruits* (福建果树), (4): 1-3
- Lu WJ(陆旺金), Jiang YM(蒋跃明). 2003. Cloning and sequence analysis of expansin genes in *Litchi chinensis* fruits(荔枝果实两个膨大素基因的克隆与序列分析)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 36(12): 1525-1529
- Ou YS(欧阳曙), Zheng XY(郑晓英), Wang RZ(王瑞珍), et al. 1985. T-DNA Transfer and tumor formation induced by *Agrobacterium tumefaciens* on *Litchi chinensis* (致瘤农杆菌对荔枝的致瘤及T-DNA转移)[J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 12(1): 42-45
- Puchooa D. 2004. Expression of green fluorescent protein gene in litchi (*Litchi chinensis*) tissues [J]. *J Appl Hort*, 6(1): 11-15
- Puchooa D. 2004. *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis*) [J]. *African J Biotech*, 3(11): 576-584
- Sang QL(桑庆亮), Lai ZX(赖钟雄), Pan DM(潘东明). 2001. A preliminary study on the genetic transformation via particle bombardment in litchi(荔枝基因枪转化研究初报)[J]. *J Fujian Agric Univ* (福建农业大学学报), 30(2): 266-267
- Su MS(苏明申), Lin SQ(林顺权), Chen ZG(陈振光), et al. 2005. Induction of callus form litchi leaves(荔枝叶片愈伤组织的诱导)[J]. *South Chin Fruits* (中国南方果树), 34(1): 25-26
- Xia R(夏瑞), Lu WJ(陆旺金), Li JG(李建国), et al. 2006. Programming design of degenerate primers and the cloning of litchi HMGR gene fragments(简并引物的程序化设计与荔枝HMGR基因片段的克隆)[J]. *J Fruit Sci* (果树学报), 23(6): 903-906
- Xie YM(谢玉明), Yi QJ(易千军), Zhang QM(张秋明), et al. 2006. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from anther of Feizixiao litchi(荔枝“妃子笑”品种花药培养及其体胚发生)[J]. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 27(1): 68-72
- Xuan WY(榭维言), Li MF(李明芳), Zheng XQ(郑学勤). 2005a. Cloning and structural analysis of flower development associated MADS-box gene fragment in seedless litchi(无核荔枝花发育相关MADS-box基因的克隆及结构分析)[J]. *Biotechnology* (生物技术), 15(3): 6-9

(下转第734页 Continue on page 734)

Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey Hsu YC, Hang CC, Ren XW. 1985. Fagaceae[M]//Cheng WJ (ed). *Sylva Sinica*. Beijing: China Forestry Press, 2: 2 311—2 313

Huang CC, Chang YT, Bartholomew B. 1999. Fagaceae[M]//Wu CY, Raven PH (eds). *Flora of China*. Beijing and St. Louis: Science Press and Missouri Botanical Garden Press, 4: 380—400

Liao JC. 1996. Fagaceae[M]//Committee F. o. T. e. (ed). *Flora of Taiwan*. Taipei: Department of Botany, National Taiwan University, 2: 51—123

Menitsky LL. 1984. *Oaks of Asia*[M]. St. Petersburg: Leningrad

Sciences; 1—119

Ohashi H, Ohashi K, Takahashi H. 2006a. Identity of *Quercus acuta* (Fagaceae) recorded from Taiwan and China[J]. *J Japanese Bot*, 81(5): 268—74

Ohashi H, Sasaki Y, Ohashi K. 2006b. The northernmost limit of distribution of *Quercus acuta* (Fagaceae)[J]. *J Japanese Bot*, 81(3): 173—87

Ohba H. 2006. Fagaceae[M]//Iwatsuki K, Boufford DE, Ohba H (eds). *Flora of Japan*. Tokyo: Kodansha Ltd, 2: 42—60

# 尖叶青冈在中国香港及广东的新分布记录

邓 敏<sup>1</sup>, 曹利民<sup>2</sup>, 曹 明<sup>3\*</sup>

(1. 中国科学院 昆明植物研究所 生物多样性生物地理重点实验室, 昆明 650204; 2. 江西赣南师范学院 化学与生命科学学院, 江西 赣州 341000; 3. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006 中国科学院)

摘要: 基于对中国主要标本馆的青冈亚属标本的全面整理, 该研究证实尖叶青冈(*Quercus acuta* Thunberg)在中国香港及广东省有分布, 并且本文对尖叶青冈及其近缘种鉴别特征进行了讨论和界定。

关键词: 尖叶青冈; 新分布; 分类

\*\*\*\*\*

(上接第 836 页 Continue from page 836)

Xuan WY(禰维言). 2005b. Cloning and function analysis of genes associated with development of flower and fruit of seedless litchi(无核荔枝花与果实发育相关基因的克隆和功能分析)[D]. Ph. D. dissertation of South China University of Tropical Agriculture(华南热带农业大学博士学位论文)

Yu CH(俞长河), Chen ZG(陈振光). 1997. Induction of litchi embryogenic calli by immature embryos and anthers culture *in vitro*(幼胚和花药培养诱导荔枝胚性愈伤组织)[J]. *J Fujian Agric Univ*(福建农业大学学报), 26(2): 168—172

Yu CH(俞长河), Chen ZG(陈振光). 1998. Embryogenic suspension culture and protoplast isolation in litchi(荔枝胚性悬浮培养物的建立、保持和优化原生质体分离的研究)[J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 19(3): 16—20

Yu CH, Chen ZG, Lu LX, et al. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplasts isolated from embryogenic suspensions[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 61: 51—58

Yu YB(余亚白). 1991. Some studies on litchi tissue culture (荔枝组织培养的若干研究)[J]. *Sci Tech Fujian Agric*(福建农业科技), (1): 15—16

Zeng LH(曾黎辉), Lü LX(吕柳新), Wang P(王平), et al. 2002. Cytohistological observation of embryogenic callus of litchi and longan(荔枝、龙眼胚性愈伤组织的细胞组织学观察)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ(Nat Sci)*(福建农林大学学报·自然科学), 31(3): 331—333

Zeng LH(曾黎辉), Lü LX(吕柳新). 2003. A preliminary report on *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of litchi(根癌农杆菌介导荔枝遗传转化研究)

[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 20(4): 287—290

Zeng LH(曾黎辉), Lü LX(吕柳新). 2001. Transformation and transgenic plantlets regeneration of litchi(*Litchi chinensis*) with *LEAFY* gene(*LEAFY* 基因转化荔枝获得再生植株)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ(Nat Sci)*(福建农林大学学报·自然科学), 30(4): 563—564

Zhang YS(张以顺), Xiang X(向旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004a. Full-length amplifying and sequencing of S-adenosyl-methionine synthetase gene in litchi aborted-embryo of ‘Guiwei’(荔枝败育胚 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的全长扩增和序列分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 31(2): 160—164

Zhang YS(张以顺), Xiang X(向旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004a. Cloning and sequencing of cDNA fragments differentially expressed between aborted and normal development embryo in litchi(荔枝胚败育差异表达基因 cDNA 片段的克隆及序列分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 31(1): 25—28

Zhang HY(张红云), Song JJ(宋娟娟), Liu ZG(刘志刚), et al. 2006. Cloning and sequence analysis of panallergen profilin genes in *Litchi chinensis* Sonn(荔枝果实中泛变应原 profilin 基因的克隆及序列分析)[J]. *J Trop Med*(热带医学杂志), 6(6): 620—623

Zhou LN(周丽依), Kuang ZS(邝哲师), Ma XJ(马雪筠), et al. 1996. The study of factors affecting somatic embryogenesis in young embryo culture of *Litchi chinensis*(影响荔枝幼胚体细胞胚胎发生因素的研究)[J]. *J Agric Biotech*(农业生物技术学报), 4(2): 161—165