

荔枝幼叶愈伤组织诱导的研究

范翠娜 刘国杰

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属植物。荔枝组织培养比较困难。荔枝内源酚类物质含量较高, 外植体在培养期间易发生褐变, 导致培养失败。目前, 荔枝组织培养多选用胚性器官和组织作为外植体, 如花药、幼胚等, 用嫩叶作为外植体进行植株再生的极少。D. Puchooa^[1]以荔枝组培苗嫩叶为外植体, 通过器官发生途径实现了植株再生; 同时通过体胚发生途径诱导出了体胚, 但体胚没有发芽。苏明申^[2]用荔枝嫩叶为外植体进行了愈伤组织诱导尝试, 结果有少量愈伤组织发生。另外, Richard E Litz^[3]、赖钟雄^[4]用荔枝近缘植物龙眼的嫩叶为外植体, 实现了植株再生。本试验的目的是明确影响荔枝幼叶愈伤组织发生的因素, 以进一步开展荔枝再生体系的建立和转基因研究工作。

1 材料与方 法

1.1 材 料

外植体为温室中栽培的3年生‘妃子笑’荔枝树嫩叶, 叶片展开10天左右, 已基本退红。

1.2 方 法

1.2.1 基本培养基种类、生长调节剂配比以及抗褐化剂种类对愈伤组织诱导的影响试验

培养基试验采用正交设计 $L_9 (3^4)$ 表, 即基本培养基种类、2,4-D 浓度、6-BA 浓度、抗褐化剂种类4个因素, 每因素设3个水平, 共9个处理(见表1)。培养基蔗糖浓度50 g/L, 有机添加物为谷氨酸0.4 g/L+水解酪蛋白0.2 g/L, 琼脂7 g/L。抗褐化剂为维生素

C (Vc) 0.1 g/L 和柠檬酸 (CA) 0.1 g/L。所有试验培养基均是分装好再进行高压灭菌, 灭菌温度121 ℃, 灭菌时间15分钟。

将从温室取回的荔枝嫩叶首先在自来水下冲洗1.5小时, 之后再换用0.1%升汞消毒15分钟, 用无菌水冲洗3次, 之后再用75%酒精消毒30秒, 用无菌水冲洗3次。在超净工作台上将消毒的外植体嫩叶切去周缘和叶脉以及消毒破损部位, 切成1 cm见方小块, 接入分别装有9种供试培养基的100 mL三角瓶中, 每瓶接种4块, 为1次重复, 每处理8次重复。接种完毕即将其放置到 (25 ± 2) ℃ 的培养室培养, 遮光培养4周后, 观察并记录愈伤组织发生情况。

1.2.2 不同生长调节剂配比对愈伤组织诱导的影响试验

培养基中生长调节剂配比试验设2个因素, 每因素设3个水平, 即2,4-D 浓度0.5、1.0、2.0 mg/L 和 NAA 浓度0.2、0.5、1.0 mg/L, 采用完全排列试验设计, 试验共9个处理(见表2)。基本培养基和其它添加物为: MS基本培养基+维生素C 0.1 g/L+柠檬酸0.1 g/L+谷氨酸0.4 g/L+水解酪蛋白0.2 g/L+蔗糖50 g/L+琼脂7 g/L。所有试验培养基均是分装好再进行高压灭菌, 灭菌温度121 ℃, 灭菌时间15分钟。

试材前处理及其他培养条件同1.2.1。每瓶接种4块, 为1次重复, 每处理8次重复。遮

本文于2006-01-19收到。

刘国杰为通讯作者, 电话: (010) 62794837

光培养4周后观察并记录愈伤组织发生情况。

2 结果与分析

2.1 基本培养基种类、生长调节剂配比以及抗褐化剂种类对愈伤组织诱导的影响

不同培养基配方对荔枝嫩叶愈伤组织的诱导率影响很大。从极差可以看出,影响荔枝嫩

叶愈伤组织诱导率的因子由大到小依次是抗褐化剂、2,4-D、基本培养基、6-BA。由极差可以推出,最佳培养基组合为:MS+B5+维生素C 0.1 g/L+柠檬酸 0.1 g/L+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L,即试验中的处理8,荔枝嫩叶愈伤组织的诱导率为95.45%,显著高于其它处理组合。

表1 不同培养基配方对荔枝嫩叶愈伤组织的诱导结果

处理组合	基本培养基	2,4-D浓度(mg/L)	6-BA浓度(mg/L)	抗褐化剂	诱导率(%)
1	B5	0.5	0.2	Vc	46.67 d
2	B5	1.0	0.5	CA	4.55 a
3	B5	2.0	1.0	Vc+CA	10.00 ab
4	MS	0.5	0.5	Vc+CA	62.50 d
5	MS	1.0	1.0	Vc	45.83 cd
6	MS	2.0	0.2	CA	6.25 ab
7	MS+B5	0.5	1.0	CA	22.22 ab
8	MS+B5	1.0	0.2	Vc+CA	95.45 e
9	MS+B5	2.0	0.5	Vc	26.92 bc
y ₁	20.41 a	43.80 b	49.46 b	39.81 b	
y ₂	36.11 b	48.61 b	31.32 a	11.01 a	
y ₃	48.20 b	14.39 a	26.02 a	55.98 c	
R	27.79	34.22	23.44	44.97	

注:抗褐化剂Vc是维生素C 0.1 g/L,CA为柠檬酸 0.1 g/L。小写英文字母表示在0.05水平上的差异显著性,字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著。

2.2 生长调节剂比对愈伤组织诱导的影响

在基本培养基和其它添加物一致的条件下,添加2,4-D和NAA的浓度不同,荔枝嫩叶愈伤组织的诱导率各不相同,添加2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L的组合愈伤组织诱导率最高,为90.00%,添加2,4-D 2.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L的组合愈伤组织诱导率最低,为50.00%,但各处理间愈伤组织诱导率的差异显著性各不相同。总的看来,2,4-D浓度为0.5~1.0 mg/L时,NAA浓度在0.2~1.0 mg/L范围内,愈伤组织诱导率均较高;2,4-D浓度为2.0 mg/L时,愈伤组织诱导率呈下降趋势,但没发现NAA浓度与愈伤组织诱导率之间存在明显的规律(表2)。

所有外植体在接种1周时外围开始卷曲,并出现褶皱状,2周开始有白色愈伤组织出现,最初出现在周缘伤口处,随后在中部没有

切割伤口的地方也出现愈伤组织。刚出现的愈伤组织呈疏松状,分生能力强,4周以后愈伤组织开始呈现衰败趋势。

表2 培养基中不同生长调节剂比对荔枝嫩叶愈伤组织的诱导结果

2,4-D浓度(mg/L)	NAA浓度(mg/L)	诱导率(%)
0.5	0.2	90.00 a
0.5	0.5	87.50 a
0.5	1.0	70.83 bc
1.0	0.2	80.00 ab
1.0	0.5	82.14 ab
1.0	1.0	85.71 a
2.0	0.2	60.71 bc
2.0	0.5	81.25 ab
2.0	1.0	50.00 c

注:基本培养基和其它添加物为:MS基本培养基+维生素C 0.1 g/L+柠檬酸 0.1 g/L+谷氨酸 0.4 g/L+水解酪蛋白 0.2 g/L+蔗糖 50 g/L+琼脂 7 g/L。小写英文字母表示在0.05水平上的差异显著性,字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著。

3 讨论

(1) 以往荔枝组织培养方面的研究主要集中在用胚性器官和组织作为外植体进行植株再生, 用荔枝嫩叶作为外植体进行植株再生的报道并不多, 且结论一般是诱导率低, 其原因是荔枝嫩叶愈伤组织容易褐化死亡。本试验研究表明在培养基中有抗褐化剂、谷氨酸、水解酪蛋白等添加物的条件下, 以荔枝嫩叶作为外植体来进行培养, 其愈伤组织有较高的诱导率, 并不比用自身胚性器官如幼胚^[5]、花药^[6]等作外植体的再生能力差, 且荔枝嫩叶诱导的愈伤组织质量较好, 有很强的分生能力。

(2) 本试验表明, 抗褐化剂的种类是影响荔枝嫩叶愈伤组织发生的重要因素之一。这可能因为荔枝自身多酚氧化物含量较高, 以其嫩叶作为外植体容易褐化死亡而失去再生能力, 另外, 也有可能是多酚氧化物与培养基里面的激素反应, 影响这些激素的浓度和活性。黄诚梅等^[7]用0.02%活性炭或0.02%PVP来减轻甘蔗组培中的褐化问题, 活性炭在吸附褐化物质同时也吸附培养基中的植物生长素类物质, 另外谷氨酰胺和硝酸银^[8]也被用来抑制褐化。本试验在培养基中添加维生素C 0.1 mg/L + 柠檬酸 0.1 mg/L 作为抗褐化剂效果较为理想。

(3) 比较2个荔枝嫩叶愈伤组织发生试验, 可以看出, 在培养基中不管是单独使用植物生长素类物质(2, 4-D + NAA), 还是在含有生长素类物质的基础上再添加低浓度细胞分裂素类物质(2, 4-D + 6-BA), 都可以有较高频率的愈伤组织诱导率, 但是添加少量细胞分裂素(6-BA), 荔枝嫩叶愈伤组织最高诱导率比添加植物生长素(2, 4-D + NAA)类物质的最高诱导率要高, 说明植物生长素类物质(2, 4-D + NAA)是诱导荔枝嫩叶愈伤

组织所必需的, 但添加少量细胞分裂素效果更好。另外, 植物生长素类物质(2, 4-D + NAA)自身的绝对浓度和相对浓度也对荔枝嫩叶愈伤组织诱导率有较大的影响。

(4) 荔枝组织培养的基本培养基多数为MS培养基, 只有少数用到1/2MS^[9]和B5^[10]培养基。本试验结果表明, 荔枝嫩叶培养用“MS + B5”培养基诱导效果最好, 原因可能是荔枝嫩叶愈伤组织诱导需要高盐(MS)和高有机物(B5)的培养基, 或者荔枝嫩叶自身的特殊性要求还原型氮和氧化型氮的比例比较严格。

参考文献

- 1 Puchooa D. *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). African Journal of Biotechnology, 2004, 3 (11): 576 - 584
- 2 苏明申, 林顺权, 陈振光, 等. 荔枝叶片愈伤组织的诱导. 中国南方果树, 2005, 34 (1): 25 - 26
- 3 Richard E Litz. Somatic embryogenesis from cultured leaf explants of the tropical tree euphorbia longan stand. Plant Physiol, 1998, 132: 190 - 193
- 4 赖钟雄, 潘良镇, 陈振光, 等. 龙眼体细胞胚胎的高频率萌发与植株再生. 福建农业大学学报, 1998, 27 (1): 31 - 36
- 5 周丽依, 邝哲师, 马雪筠, 等. 影响荔枝幼胚体细胞胚胎发生因素的研究. 农业生物技术学报, 1996, 4 (2): 161 - 165
- 6 傅莲芳, 唐道. 荔枝花粉植株诱导的研究. 遗传学报, 1983, 10 (5): 369 - 374
- 7 黄诚梅, 李杨瑞, 叶燕萍. 甘蔗茎尖培养中减轻酚害. 植物生理学通讯, 2004, 40 (1): 39 - 41
- 8 周敏, 庄东红. 谷氨酰胺和硝酸银对花生幼叶芽再生的促进作用. 植物生理学通讯, 2002, 38 (3): 240 - 241
- 9 吕柳新, 余小玲. 荔枝幼胚的离体培养. 福建农学院学报, 1993, 22 (4): 410 - 413
- 10 Yu Changhe, Chen Zhengguang. Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplasts isolated from embryogenic. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 61: 51 - 58