

荔枝胚性愈伤组织诱导和离体保存条件的筛选

王梓清^{1,2}, 刘爱萍³, 胡晓媛⁴, 王家福^{5,①}

- (1. 山东省威海市农业综合开发办公室, 山东 威海 264200; 2. 福建农林大学植物保护学院, 福建 福州 350002;
3. 河南省安阳市文峰区农村工作委员会, 河南 安阳 455000; 4. 山东省嘉祥县林业局, 山东 嘉祥 272400;
5. 福建农林大学亚热带果树研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 对影响荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 胚性愈伤组织诱导的因素 (防褐化剂种类、花期、荔枝品种以及外植体取材部位) 进行了比较研究, 并对其离体保存条件进行了筛选。结果表明, 在愈伤组织诱导培养基 (含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的 MS 培养基, pH 5.8) 中添加防褐化剂水解乳蛋白 ($0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 可使花药胚性愈伤组织的诱导率达到 20.51%; 以茎段、叶柄和幼叶为外植体, 不能诱导出胚性愈伤组织, 而采用花药和幼果培养, 可诱导出胚性愈伤组织, 其中, 第 1 期雄花花药是最适宜的培养材料, 胚性愈伤组织的诱导率可达 20.11%; 荔枝不同品种间幼果的胚性愈伤组织诱导率存在差异, 品种‘及第’的诱导率最低。在 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 将荔枝胚性愈伤组织保存在添加 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的保存培养基 (含 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的 MS 培养基, pH 5.8) 中, 保存效果最佳, 可将继代时间延至 100 d。

关键词: 荔枝; 胚性愈伤组织; 离体保存

中图分类号: S667.1; Q943.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)01-0080-07

Induction and screening of *in vitro* conservation conditions of embryogenic callus of *Litchi chinensis* WANG Zi-qing^{1,2}, LIU Ai-ping³, HU Xiao-yuan⁴, WANG Jia-fu^{5,①} (1. Agricultural Comprehensive Development Office of Weihai City, Shandong Province, Weihai 264200, China; 2. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Country Committee of Wenfeng District of Anyang City, He'nan Province, Anyang 455000, China; 4. Forestry Bureau of Jiexiang County of Shandong Province, Jiexiang 272400, China; 5. Institute of Subtropical Fruits, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(1): 80-86

Abstract: The influence factors in induction of embryogenic callus of *Litchi chinensis* Sonn., including anti-browning agent, flowering stage, cultivar and explant type, were compared and studied, and the *in vitro* conservation conditions of embryogenic callus were screened. The results show that when adding $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ lactoalbumin hydrolysate in the induction medium (MS medium containing $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, pH 5.8), the induction rate of embryogenic callus from anthers can reach 20.51%. The embryogenic callus can be induced from anther and young fruit but not from stem segment, petiole and young leaf. Anther of male flower at first stage is the best explant, and the induction rate reaches 20.11%. The induction rates of embryogenic callus from young fruit of different cultivars of *L. chinensis* are various, and among them, the induction rate of cultivar ‘Jidi’ is the lowest. Conservation effect of embryogenic callus is the best in the conservation medium (MS medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, pH 5.8) added with $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol under $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the subculture time of embryogenic callus can be prolonged to 100 d.

Key words: *Litchi chinensis* Sonn.; embryogenic callus; *in vitro* conservation

收稿日期: 2008-03-05

基金项目: 福建省重大科技专项资助项目(2004NZ2-02)

作者简介: 王梓清(1980—), 女, 山东德州人, 博士研究生, 助理农艺师, 主要从事食用菌生物防治研究。

①通讯作者 E-mail: jiafuwang2003@yahoo.com.cn

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是原产于中国的亚热带常绿果树,为岭南四大佳果之一。荔枝栽培历史悠久,品种繁多,据统计,全国范围内共有荔枝品种约200多个^[1]。保护这些种质资源,是保存荔枝品种遗传多样性的重要保证^[2]。目前国内主要采用种质资源圃的形式对荔枝种质资源进行保存,这种保存方式需要大量的土地和人力资源,成本高,且易遭受各种自然灾害的侵袭,很难控制^[3]。离体保存以其占用空间小、劳力和维持费用低等优点广泛应用于果树种质保存中^[4]。目前,对少数荔枝品种胚性愈伤组织诱导和体胚发生的研究已有报道^[5-11],但有关荔枝胚性愈伤组织继代保存的研究还存在间隔时间较短的缺陷,且研究对象仅限于少数品种。鉴于此,作者以福建省内13个荔枝主栽品种为试材,进行了离体培养体系的建立和胚性愈伤组织继代保存的研究,以期荔枝种质资源的长期离体保存提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的荔枝品种‘兰竹’(‘Lanzhu’)、‘乌叶’(‘Wuye’)、‘竹口乌叶’(‘Zhukouwuye’)和‘下番枝’(‘Xiafanzhi’)采自福建莆田;‘绿纱’(‘Lüsha’)、‘马公壕’(‘Magonghao’)、‘金钟仔’(‘Jinzhongzai’)、‘及第’(‘Jidi’)和‘斗荔枝’(‘Doulizhi’)采自福建漳州;‘早红’(‘Zaohong’)、‘东刘一号’(‘No. 1 of Dongliu’)、‘陈紫’(‘Chenzi’)和‘元红’(‘Yuanhong’)采自福建福州。取上述荔枝品种授粉后30~40 d的幼果以及品种‘元红’的花药和品种‘下番枝’播种后40~50 d的实生苗茎段、叶片和叶柄为外植体。

1.2 方法

1.2.1 胚性愈伤组织的诱导方法 参照文献[12]的方法并略加改进,配制愈伤组织诱导培养基(含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基,pH 5.8)。防褐化剂为水解乳蛋白(lactoalbumin hydrolysate, LH)、活性炭(activated carbon, AC)和 V_c ,其中,LH的浓度分别为 0.2 、 0.4 和 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;AC的浓度分别为 2.0 、 3.0 和 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; V_c 的浓度分别为 0.4 、 0.5 和 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取荔枝品种‘元红’第1期雄花(4

月上旬)的花蕾,用酒精浸泡30 s,分别接种于添加了上述不同种类和浓度防褐化剂的愈伤组织诱导培养基上,以不含防褐化剂的诱导培养基为对照(CK)。每瓶接种10~12枚花药,每处理及对照分别接种20瓶,于25℃条件下暗培养,80 d后统计愈伤组织诱导率,研究防褐化剂对花药愈伤组织诱导的影响。

分别取荔枝品种‘元红’第1期雄花(4月上旬)、雌花(4月中下旬)及第2期雄花(5月上旬)吐白期的花蕾,用酒精浸泡30 s,剥出花药接种到上述愈伤组织诱导培养基上,每处理分别接种20瓶,每瓶接种10~12枚花药,于25℃条件下暗培养,80 d后统计愈伤组织的诱导率,研究不同花期的花药对愈伤组织诱导的影响。

取各品种荔枝幼果,自来水冲洗1 h后,用体积分数75%的酒精浸泡30 s,再用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞消毒7~8 min,无菌水冲洗5次,切开幼果,取出幼胚接种于上述愈伤组织诱导培养基上。每处理分别接种20瓶,每瓶接种5~6个幼胚,于25℃条件下暗培养,40 d后统计愈伤组织的诱导率,比较不同品种荔枝幼胚愈伤组织诱导率的差异。

取品种‘下番枝’实生苗茎段、叶片及叶柄,采用上述消毒方法消毒后分别将茎段和叶柄切成 0.5 cm 小段、叶片切成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 小片后接种到含有 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基(pH 5.8)上。每种外植体分别接种20瓶,每瓶接种3个外植体,于25℃条件下暗培养,40 d后统计愈伤组织的诱导率,比较不同外植体愈伤组织的诱导状况。

1.2.2 胚性愈伤组织保存条件的筛选方法 选择由品种‘陈紫’幼胚诱导出的颗粒状胚性愈伤组织,以含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基(pH 5.8)和含有 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO₃、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基(pH 5.8)为常规保存培养基,将愈伤组织在这2种培养基上交替培养,用于离体保存条件的优化实验。每20天继代1次。培养条件为温度25℃、光照度300 lx、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.2.1 单因素实验 以含 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基(pH 5.8)为常规保存培养基,选择培养基中大量元

素的添加量,蔗糖、琼脂、甘露醇和 PP₃₃₃ 的浓度以及保存温度 6 个因素进行单因素实验。其中,大量元素添加量(A)分别为 1/4MS、1/2MS 和 3/4MS;蔗糖浓度(B)分别为 10、20、40 和 50 g · L⁻¹;琼脂浓度(C)分别为 5、7、8 和 9 g · L⁻¹;PP₃₃₃的浓度(D)分别为 5、10、20 和 40 mg · L⁻¹;甘露醇浓度(E)分别为 10、20、30 和 50 g · L⁻¹;保存温度(F)分别为 0 ℃、10 ℃、15 ℃ 和 20 ℃。每瓶接入愈伤组织 0.5 g,每处理 3 瓶,以常规条件下保存的愈伤组织为对照(CK),于温度 25 ℃、光照度 300 lx、光照时间 12 h · d⁻¹的条件下培养。每隔 5 d 观察 1 次愈伤组织的生长状况,测定愈伤组织的生长量和细胞活力,并据此筛选出各因素的最佳值。

1.2.2.2 综合比较实验 综合单因素实验结果,对常规保存培养基进行更适宜的调整,包括:1) 将大量元素添加量调整为 3/4MS;2) 添加 20 mg · L⁻¹ PP₃₃₃;3) 添加 20 g · L⁻¹甘露醇。每瓶接入愈伤组织 0.5 g,每处理 3 瓶,接种后于 25 ℃ 条件下保存 4 d,再转入 15 ℃ 条件下保存,并以 15 ℃ 条件下接种在常规保存培养基上的胚性愈伤组织为对照(CK)。每隔 10 d 观察 1 次愈伤组织的生长状况,测定愈伤组织的生长量和细胞活力。

1.2.3 保存效果的评价方法 用外观、生长量及细胞活力等指标评价胚性愈伤组织的保存效果。在外观上主要观察愈伤组织的颜色,生活力强的胚性愈伤组织为鲜明的淡黄色,在衰老过程中胚性愈伤组织逐渐变为褐色;生长量的测定采用称重法;细胞活力的测定采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法^[13]。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 软件对实验数据进行统计分析,并进行显著性分析。愈伤组织诱导率的计算公式为:诱导率 = (诱导愈伤组织的外植体数/接种的外植体数) × 100%。生长量的计算公式为:生长量 = 愈伤组织的终质量 - 愈伤组织的接种质量。

2 结果和分析

2.1 荔枝愈伤组织诱导影响因素的比较分析

2.1.1 防褐化剂对花药愈伤组织诱导的影响 不同种类和不同浓度防褐化剂对荔枝品种‘元红’花药愈伤组织诱导率的影响见表 1。在水解乳蛋白(LH)、活性炭(AC)和 V_c 3 种防褐化剂中,AC 的防

褐化效果最好,在接种后 3~5 d,花药没有明显的变褐现象,但其胚性愈伤组织的诱导率却最低,最高也仅为 10.81%,这是由于 AC 在吸附培养基中酚类物质的同时,也吸附了生长调节剂和培养基中的其他成分,从而使愈伤组织诱导率降低。LH 的防褐化效果低于 AC,花药在接种后出现轻微的变褐现象,但添加 LH 可以显著提高愈伤组织的诱导率,以 0.4 g · L⁻¹处理组的诱导率最高,达到 20.51%,说明 LH 不仅在一定程度上具有防褐化的功能,还有利于愈伤组织的形成。V_c 的防褐化效果最差,接种后不仅花药变褐,花药周围的培养基也出现褐色,3 个浓度处理组愈伤组织的诱导率均不高,且差异不显著,表明在进行荔枝花药愈伤组织诱导时 V_c 不宜作为防褐化剂。

表 1 不同防褐化剂对荔枝品种‘元红’花药胚性愈伤组织诱导率的影响¹⁾

Table 1 Effect of different anti-browning agents on induction rate of embryogenic callus induced from anther of cultivar ‘Yuanhong’ of *Litchi chinensis* Sonn.¹⁾

防褐化剂 Anti-browning agent	浓度/g · L ⁻¹ Concentration	N	N _E	I _E /%
LH	0.2	189	14	7.41bc
	0.4	195	40	20.51a
	0.6	197	17	8.63b
AC	2.0	193	11	5.70bc
	3.0	185	20	10.81b
	4.0	186	4	2.15cd
V _c	0.4	179	9	5.03bc
	0.5	181	10	5.52bc
	0.6	186	11	5.91bc
CK		197	2	1.02d

¹⁾ LH: 水解乳蛋白 Lactalbumin hydrolysate; AC: 活性炭 Activated carbon; N: 接种花药数 Number of inoculated anther; N_E: 产生胚性愈伤组织的花药数 Number of anther induced to embryogenic callus; I_E: 胚性愈伤组织诱导率 Induction rate of embryogenic callus. 同列中不同的字母表示差异显著(P < 0.05) The different letters in the same column indicate the significant difference (P < 0.05).

2.1.2 花期对花药愈伤组织诱导的影响 不同花期对荔枝花药胚性愈伤组织诱导的影响效应差异较为显著,详细结果见表 2。第 1 期(4 月上旬)雄花的花药胚性愈伤组织诱导率最高(20.11%),非胚性愈伤组织的诱导率最低,仅为 12.70%。雌花(4 月中下旬)的胚性愈伤组织诱导率最低,仅为 4.98%;非胚性愈伤组织的诱导率最高,达到 20.90%。第 2 期雄花(5 月上旬)的花药胚性愈伤组织和非胚性愈伤

表2 不同花期对荔枝品种‘元红’花药胚性愈伤组织诱导率的影响¹⁾Table 2 Effect of different flowering stages on induction rate of embryogenic callus induced from anther of cultivar ‘Yuanhong’ of *Litchi chinensis* Sonn.¹⁾

花期 Flowering stage	花类型 Type of flower	N	N _N	I _N /%	N _E	I _E /%
4月上旬 The first ten days of April	雄花 Male flower	189	24	12.70b	38	20.11a
4月中下旬 The middle and last ten days of April	雌花 Female flower	201	42	20.90a	10	4.98c
5月上旬 The first ten days of May	雄花 Male flower	197	26	13.20ab	24	12.18b

¹⁾ N: 接种花药数 Number of inoculated anther; N_N: 产生非胚性愈伤组织的花药数 Number of anther induced to non-embryogenic callus; I_N: 非胚性愈伤组织诱导率 Induction rate of non-embryogenic callus; N_E: 产生胚性愈伤组织的花药数 Number of anther induced to embryogenic callus; I_E: 胚性愈伤组织诱导率 Induction rate of embryogenic callus. 同列中不同的字母表示差异显著(P<0.05) The different letters in the same column indicate the significant difference (P<0.05).

组织诱导率均处于中间水平。

2.1.3 品种对幼胚愈伤组织诱导的影响 在同一培养条件下,13个品种的荔枝幼胚经过40 d的暗培养均能够诱导出胚性愈伤组织,但不同品种的诱导率有一定差异,结果见表3。品种‘金钟仔’和‘及第’的胚性愈伤组织诱导率较低,分别仅为19.23%和15.84%,其他品种的诱导率均达到20%~30%。此外,仅品种‘及第’的胚性愈伤组织诱导率与除品种‘金钟仔’外的其他11个品种间差异显著(P<0.05),其余品种间诱导率的差异均不显著。

表3 不同品种荔枝幼胚胚性愈伤组织诱导率的比较¹⁾Table 3 Comparison of induction rate of embryogenic callus induced from young fruit of different cultivars of *Litchi chinensis* Sonn.¹⁾

品种 Cultivar	N	N _E	I _E /%
早红 Zaohong	94	23	24.47a
绿纱 Lüsha	102	26	25.49a
马公壕 Magonghao	105	22	20.95a
兰竹 Lanzhu	97	24	24.74a
乌叶 Wuye	98	27	27.55a
竹口乌叶 Zhukouwuye	96	28	29.17a
下番枝 Xiafanzhi	103	29	28.16a
东刘一号 No.1 of Dongliu	97	26	26.80a
金钟仔 Jinzhongzai	104	20	19.23ab
及第 Jidi	101	16	15.84b
斗荔枝 Doulizhi	96	24	25.00a
陈紫 Chenzi	99	25	25.25a
元红 Yuanhong	102	24	23.53a

¹⁾ N: 接种幼胚数 Number of inoculated immature embryo; N_E: 产生胚性愈伤组织的幼胚数 Number of immature embryo induced to embryogenic callus; I_E: 胚性愈伤组织的诱导率 Induction rate of embryogenic callus. 同列中不同的字母表示差异显著(P<0.05) The different letters in the same column indicate the significant difference (P<0.05).

2.1.4 外植体的取材部位对愈伤组织诱导的影响 在同一条件下培养40~80 d后,以花药和幼胚为外植体,均能够诱导出颗粒状胚性愈伤组织,呈淡黄色,质地软而松散,继代后可大量增殖;而以茎段、叶

柄和幼叶为外植体诱导出的愈伤组织为非胚性愈伤组织,均呈白色块状,质地坚硬,继代后不能增殖或增殖较慢,颜色渐变为褐色并逐渐死亡。与花药和幼胚相比,用茎段、叶柄和幼叶作为外植体,虽然愈伤组织诱导率较高(数据结果略),但得不到胚性愈伤组织,难以进行进一步的增殖培养。

2.2 胚性愈伤组织离体保存条件的筛选和优化

2.2.1 离体保存条件的筛选 选择基本培养基中大量元素的添加量,蔗糖、琼脂、PP₃₃₃和甘露醇浓度以及保存温度等6个因素进行单因子实验,筛选出各因素的最适量,结果见表4。由表4可见,随保存时间的延长,各处理组及对照组均表现出愈伤组织生长量增加、细胞活力下降的趋势,但生长量增加以及细胞活力下降的幅度各异,其中培养基中蔗糖和琼脂浓度的改变对荔枝胚性愈伤组织保存的影响作用不明显。

当保存培养基中大量元素的添加量为1/4MS时,保存20 d后胚性愈伤组织的细胞活力值(3.25 mg·g⁻¹·h⁻¹)低于对照组(4.85 mg·g⁻¹·h⁻¹),不利于愈伤组织的保存;大量元素的添加量为1/2MS和3/4MS,胚性愈伤组织的细胞活力下降缓慢,能够延长愈伤组织的保存期,且以3/4MS添加量效果最好。当其他条件不变时,将培养基中大量元素的添加量调整为3/4MS,保存35 d后,愈伤组织的细胞活力和生长量分别达到3.95 mg·g⁻¹·h⁻¹和2.50 g。

在常规保存培养基中添加不同浓度的生长抑制剂PP₃₃₃,对荔枝胚性愈伤组织的保存作用不同。在培养基中添加20 mg·L⁻¹ PP₃₃₃,保存40 d,愈伤组织生长量为2.20 g,低于对照(3.20 g),但细胞活力保持在2.97 mg·g⁻¹·h⁻¹,明显高于同期对照组的细胞活力(0.52 mg·g⁻¹·h⁻¹)。当PP₃₃₃浓度提高至40 mg·L⁻¹时,仅保存20 d,愈伤组织的细胞活力

表4 在不同保存条件下荔枝胚性愈伤组织生长量和细胞活力的比较

Table 4 Comparison of increment and cell viability of embryogenic callus of *Litchi chinensis* Sonn. under different conservation conditions

处理 ¹⁾ Treatment ¹⁾	不同保存时间愈伤组织的生长量/g Increment of embryogenic callus at different times						不同保存时间愈伤组织的细胞活力/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Cell viability of embryogenic callus at different times					
	20 d	25 d	30 d	35 d	40 d	45 d	20 d	25 d	30 d	35 d	40 d	45 d
1/4MS	1.46	1.70	1.72	1.78	1.80	1.80	3.25	2.22	1.12	1.01	0.31	0.12
1/2MS	1.02	1.75	1.78	2.40	2.51	2.54	4.32	4.25	3.98	2.75	1.54	1.24
3/4MS	1.20	1.35	1.85	2.50	2.65	2.91	4.92	4.75	4.52	3.95	2.52	1.24
10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose	1.50	1.97	2.05	2.46	2.50	2.54	4.00	3.47	3.42	2.57	1.97	1.20
20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose	2.42	2.73	3.00	3.05	3.14	3.21	4.84	4.56	4.31	1.96	1.02	0.37
40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose	1.51	1.98	2.05	2.12	2.54	2.58	4.94	4.76	4.31	3.25	2.03	1.23
50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose	1.42	1.49	1.52	1.57	1.58	1.61	4.05	3.74	3.24	1.52	0.57	0.54
5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar	1.75	1.82	1.84	1.91	1.91	1.85	3.20	2.04	1.54	1.02	0.46	0.21
7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar	1.74	1.85	2.47	2.52	2.74	2.79	4.97	4.92	4.21	2.54	1.75	1.20
8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar	1.24	1.32	1.34	1.37	1.58	1.62	4.53	4.68	4.36	2.30	1.42	0.37
9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar	1.02	1.24	1.30	1.32	1.37	1.37	4.05	3.78	2.57	1.25	0.84	0.51
5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP ₃₃₃	2.11	2.67	2.84	3.02	3.21	3.25	4.80	4.32	4.02	2.04	0.52	0.34
10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP ₃₃₃	1.55	1.72	1.91	2.04	2.25	2.45	4.85	4.46	4.14	3.12	2.72	1.87
20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP ₃₃₃	1.45	1.60	1.85	2.05	2.20	2.42	4.95	4.53	4.25	3.05	2.97	2.04
40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP ₃₃₃	0.89	0.97	1.02	1.24	1.26	1.30	3.97	3.17	3.12	1.16	0.47	0.41
10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol	1.85	2.12	2.70	2.97	3.20	3.25	4.85	4.22	4.02	2.21	1.14	0.97
20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol	1.40	1.55	1.65	1.85	2.05	2.18	4.87	4.27	4.05	3.57	3.05	2.67
30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol	1.44	1.54	1.67	1.87	2.10	2.14	4.84	4.27	4.02	3.60	2.97	2.52
50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol	0.65	0.74	0.81	0.97	1.02	1.07	3.50	3.02	1.53	1.50	0.74	0.57
0 °C	0.11	0.20	0.25	0.25	0.30	0.32	0.27	0.21	0.12	0.07	0.05	0.05
10 °C	0.21	0.24	0.26	0.34	0.35	0.38	1.21	1.17	1.00	0.95	0.94	0.87
15 °C	0.27	0.27	0.34	0.49	0.49	0.50	5.23	5.24	5.20	5.12	5.01	4.87
20 °C	0.31	0.47	0.54	0.74	1.05	1.08	4.84	4.54	4.52	3.03	2.21	2.07
CK	2.10	2.70	3.00	3.05	3.20	3.22	4.85	4.01	3.75	1.90	0.52	0.25

¹⁾基本培养基为含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的 MS 培养基 (pH 5.8) Basic medium is MS medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, pH 5.8.

就下降至 $3.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 明显低于对照 ($4.85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 由于愈伤组织的存活受到抑制, 因此, 添加较高浓度的 PP₃₃₃ 不利于愈伤组织的保存。

在常规保存培养基中添加较低浓度的甘露醇 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 对荔枝愈伤组织的生长量影响不明显, 但对细胞活力的影响较大; 添加 20 和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, 经过 45 d 保存后, 愈伤组织生长量分别达到 2.18 和 2.14 g, 细胞活力分别达到 2.67 和 $2.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 细胞活力明显高于对照; 添加 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, 对愈伤组织的生长及细胞活力有明显影响, 保存 45 d 后, 愈伤组织的生长量和细胞活力分别仅为 1.07 g 和 $0.57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 明显低于对照。因此, 最佳的甘露醇浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在荔枝胚性愈伤组织的保存过程中, 温度具有重要的作用。当温度为 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 保存 20 d 的愈伤组

织的细胞活力仅为 $1.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 生长量仅为 0.21 g, 几乎不增殖, 且转入常温后不能恢复生长, 不利于愈伤组织的保存; 在 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 虽然愈伤组织生长量不大, 但细胞活力较高, 尤其是在 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存 45 d 后, 细胞活力仍达到 $4.87 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 明显高于对照, 说明 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 是较为适宜的保存温度。

根据上述单因素实验结果, 筛选出 4 种较好的保存方法: 减少保存培养基中大量元素的添加量至常规水平的 3/4、添加 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP₃₃₃、添加 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇和 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 可分别将荔枝胚性愈伤组织的保存时间延长至 35、40、40 和 45 d。

2.2.2 最优保存条件的确立 在 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 对由上述实验筛选出的保存培养基 (3/4MS 或添加 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP₃₃₃ 或添加 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇) 进行进一步

优选,经过100 d的离体保存后,观察胚性愈伤组织的生长量和细胞活力的变化,结果见表5和表6。

在15℃条件下保存50 d,3个处理组愈伤组织生长量和细胞活力与对照组差异不明显,说明在50 d内,培养基的改变对荔枝胚性愈伤组织保存无显著影响。在15℃条件下保存50~70 d,3个处理组愈伤组织的细胞活力基本高于对照,说明在这段时间内,这3种培养基能延缓愈伤组织的衰老。保存70 d后,用3/4MS培养基保存的愈伤组织细胞活力降低,基本与对照组持平,说明保存后期培养基中的营养成分不足,对愈伤组织的存活产生了不利影响;而在分别添加20 mg·L⁻¹PP₃₃₃和20 g·L⁻¹甘露醇

的2种保存培养基上,愈伤组织的细胞活力显著高于对照组,且后者更高,保存效果最好。

另外,在3种保存培养基上愈伤组织出现褐变的时间均晚于对照(60 d),其中,3/4MS处理组愈伤组织的褐变时间最早,保存70 d时出现褐变现象;添加20 mg·L⁻¹PP₃₃₃处理组愈伤组织的褐变时间稍晚,为90 d;添加20 g·L⁻¹甘露醇处理组愈伤组织的褐变时间最晚,保存100 d,少数愈伤组织的底部颜色变白、部分边缘出现褐变,大量的愈伤组织仍保持淡黄色的正常状态。结果显示,在15℃条件下,在常规保存培养基中添加20 g·L⁻¹甘露醇可以有效延缓荔枝胚性愈伤组织衰老,延长保存期。

表5 在15℃条件下3种保存培养基对荔枝胚性愈伤组织生长量的影响

Table 5 Effect of three conservation media on increment of embryogenic callus of *Litchi chinensis* Sonn. at 15℃

培养基 ¹⁾ Medium ¹⁾	不同保存时间愈伤组织的生长量/g Increment of embryogenic callus at different times								
	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d	80 d	90 d	100 d
3/4 MS	0.25	0.35	0.45	0.57	0.71	0.97	1.23	1.42	1.64
20 mg·L ⁻¹ PP ₃₃₃	0.30	0.33	0.44	0.54	0.65	0.85	1.03	1.10	1.29
20 g·L ⁻¹ mannitol	0.28	0.32	0.42	0.50	0.63	0.79	0.98	1.13	1.24
CK	0.27	0.34	0.49	0.55	0.68	0.90	1.09	1.30	1.46

¹⁾基本培养基为含有1.0 mg·L⁻¹2,4-D,30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂的MS培养基(pH 5.8) Basic medium is MS medium containing 1.0 mg·L⁻¹2,4-D, 30 g·L⁻¹sucrose and 6 g·L⁻¹agar, pH 5.8.

表6 在15℃条件下3种保存培养基对荔枝胚性愈伤组织细胞活力的影响

Table 6 Effect of three conservation media on cell viability of embryogenic callus of *Litchi chinensis* Sonn. at 15℃

培养基 ¹⁾ Medium ¹⁾	不同保存时间愈伤组织的细胞活力/mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹ Cell viability of embryogenic callus at different times								
	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d	80 d	90 d	100 d
3/4MS	5.20	5.21	5.04	4.82	4.35	3.25	2.42	2.37	1.08
20 mg·L ⁻¹ PP ₃₃₃	5.24	5.24	5.03	4.72	4.31	4.15	3.75	3.21	2.15
20 g·L ⁻¹ mannitol	5.21	5.20	5.09	4.75	4.36	4.13	3.72	3.54	3.35
CK	5.23	5.20	5.01	4.74	3.65	3.27	2.54	2.50	0.57

¹⁾基本培养基为含有1.0 mg·L⁻¹2,4-D,30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂的MS培养基(pH 5.8) Basic medium is MS medium containing 1.0 mg·L⁻¹2,4-D, 30 g·L⁻¹sucrose and 6 g·L⁻¹agar, pH 5.8.

3 讨 论

离体培养是荔枝离体保存的基础,建立无菌系是其中很重要的环节之一。由于荔枝外植体容易褐化,因此能否克服褐化是诱导胚性愈伤组织成功与否的关键之一。在防褐变措施中,常用的方法是加入抗氧化剂及酚类物质吸附剂。由于不同植物种类产生褐化物质的机制不同,因此对不同植物所采用的抗褐化剂也有所不同^[14]。在龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)的组织培养中,用活性炭作为防褐化

剂,防褐化效果优于V_c;在核桃(*Juglans regia* L.)的组织培养中,用硫代硫酸钠或二硫苏糖醇作为防褐化剂,防褐化效果最好,而活性炭和V_c的防褐化效果却很差^[15]。在本研究中,用水解乳蛋白(0.4 g·L⁻¹)作为防褐化剂,对荔枝花药愈伤组织诱导过程中外植体褐化的抑制效果好于活性炭和V_c。

荔枝一般是先开第1期雄花,再开雌花,最后开第2期雄花^[16]。用花药作为外植体,诱导出的胚性愈伤组织主要来源于花粉,而非胚性愈伤组织则是从花丝端部或花药壁诱导而来^[12],因而,花粉活性的高低直接影响到胚性愈伤组织的诱导率。在本研

究中,第1期雄花的花粉活性最高,胚性愈伤组织的诱导率也最高,因而,若以荔枝花药作为外植体,第1期雄花是最适宜的外植体。

在种质资源离体保存过程中,缓慢生长法是通过调节培养温度和改变培养基组分来抑制保存材料的生长和延缓材料的衰老从而延长继代时间的一种保存方法^[17]。在采用这一方法保存植物种质资源的过程中,针对不同的植物种类,可以采用不同的保存条件,但各种保存条件都有各自的优缺点,不能完全互相取代。其中,低温保存对保存大多数果树种质资源最为适用^[18-20];在培养基中添加生长抑制剂虽然可以有效延缓被保存材料的生长,但易使离体保存材料产生某些畸形,对一些植物不适用;在培养基中添加甘露醇等渗透调节剂可以有效地保存离体材料,适用于许多植物。在本研究中,经过单因素筛选和综合比较,优选出在15℃条件下在常规保存培养基(含有 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基,pH 5.8)中添加 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的方法,可将荔枝品种‘陈紫’胚性愈伤组织的继代时间延长至100 d,且继代后的成活率较高。

一般来说,提高蔗糖浓度可增加培养基的渗透压,使愈伤组织对水分和养分的吸收受阻,从而延缓离体保存材料的生长速度,延长继代时间,但在保存后期却能加剧愈伤组织的褐变,并引起再分化产生胚状体,不利于愈伤组织的稳定保存,因此,在荔枝胚性愈伤组织的保存过程中不宜采用增加蔗糖浓度的方法。琼脂浓度的高低对愈伤组织的增殖和保存期长短都有一定的影响,但琼脂浓度的改变对保存期的延长效果并不显著,所以,在荔枝胚性愈伤组织的保存过程中不必采用改变琼脂浓度的方法。

参考文献:

- [1] 徐迟默. 世界荔枝品种[J]. 世界热带农业信息, 2007(5): 20-23.
- [2] FAO. Report on the State of the Worlds Plants Genetic Resources [C] // International Technical Conference on Plant Genetic Resources. Leipzig: FAO, 1996: 20-34.
- [3] 杨青. 果树种质离体保存[J]. 福建果树, 2005(4): 26-29.
- [4] 梁忠锋, 李茂富, 李绍鹏. 果树种质资源离体保存研究进展[J]. 广西农业科学, 2007, 38(4): 375-378.
- [5] 俞长河, 陈振光. 幼胚和花药培养诱导荔枝胚性愈伤组织[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(2): 168-172.
- [6] 刘华清, 陈容茂. 荔枝胚性愈伤组织的诱导和保持[J]. 福建果树, 1997(4): 1-3.
- [7] 郑启发, 胡桂兵. 正交试验法在龙眼和荔枝组织培养中的应用[J]. 果树科学, 2000, 17(4): 269-272.
- [8] 周丽依, 邝哲师. 荔枝幼胚培养及体细胞胚胎发生研究初报[J]. 广东农业科学, 1993(5): 14-15.
- [9] 赖钟雄, 桑庆亮. 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]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(2): 131-136.
- [10] 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[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 161-165.
- [11] 肖华山, 黄代青, 吕柳新. 荔枝生物技术研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2001, 30(2): 63-65.
- [12] 傅莲芳, 唐道一. 荔枝花粉植株诱导的研究[J]. 遗传学报, 1983, 10(5): 369-374.
- [13] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [14] 黄浩, 鲁明波, 梅兴国. 红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J]. 华中理工大学学报, 1999, 27(4): 107-109.
- [15] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 396-407.
- [16] 李建国, 王泽槐. 荔枝第二期雄花对花期落果的影响及其对策研究[J]. 中国南方果树, 1999, 28(3): 27-28.
- [17] Negash A, Krens F, Schaart J, et al. *In vitro* conservation of onset under slow-growth conditions[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 66(2): 107-111.
- [18] Bessembinder J J E, Staritsky G, Zandvoort E A. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 33(2): 121-127.
- [19] 王家福, 刘月学, 宋刚, 等. 枇杷胚性愈伤组织的诱导和保存[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(3): 305-310.
- [20] 刘月学, 刘小军, 王家福, 等. 低温等因素对枇杷种质离体保存的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 28-31.