



龙眼

生物技术研究

■ 赖钟雄 著

■ 福建科学技术出版社



S667.2
7



龙眼

生物技术研究

■ 赖钟雄 著

■ 福建科学技术出版社

GD 009/4598

图书在版编目 (CIP) 数据

龙眼生物技术研究/赖钟雄著. —福州: 福建科学技术出版社, 2003.12

ISBN 7-5335-2147-1

I. 龙... II. 赖... III. 龙眼—生物技术—研究
IV. S667.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 030773 号

书 名	龙眼生物技术研究
编 著	赖钟雄
出版发行	福建科学技术出版社 (福州市东水路 76 号, 邮编 350001)
经 销	各地新华书店
排 版	福大校办工厂产品经营部
印 刷	福州晋安文化印刷厂
开 本	787 毫米×1092 毫米 1/16
印 张	10
字 数	256 千字
版 次	2003 年 12 月第 1 版
印 次	2003 年 12 月第 1 次印刷
印 数	1—1300
书 号	ISBN 7-5335-2147-1/S · 280
定 价	17.20 元

书中如有印装质量问题, 可直接向本社调换

内 容 简 介

本书为作者近 10 年来对我国南方热带亚热带特产果树——龙眼的生物技术研究的工作总结。全书的主要内容包括：龙眼细胞工程（胚性愈伤组织诱导与保持、体胚发生、胚性悬浮细胞培养、单细胞克隆、原生质体培养等）、基因工程（基因克隆与遗传转化）、细胞与分子生物学（体胚发生的细胞与分子生物学）、龙眼与荔枝之间的基因组转移，以及龙眼生物技术研究的应用价值等。全书的核心内容是目前木本植物最为优良的龙眼体胚发生模式系统。

本书可供高等院校相关专业师生以及果树科研人员参考。

前 言

龙眼是我国南方重要的热带亚热带木本特产果树，福建是世界上最主要的龙眼产区之一。生物技术在龙眼遗传改良、人工种子制作、胚胎发育调控等方面有重大应用价值，受到有关机构和果树工作者的重视。近年来，作者主持了7项有关龙眼生物技术的国家和省级科研课题，包括国家自然科学基金(No.39870544)、霍英东教育基金会高校青年教师基金(No.71026)、教育部首批高校骨干教师资助计划(No.2000-65)、国家“948”计划(No.991029)和福建省自然科学基金(No.C97030、No.B0010014、No.F99003)等项目，现已完成大部分工作。本书主要内容即是上述科研项目研究结果的总结。我们在有关龙眼生物技术研究的过程中，觉得最有意义的是建立了高频率的龙眼体胚发生系统。这是目前木本植物最优良的体胚发生模式系统，对于研究植物细胞全能性、胚胎发育与调控、人工种子制作和转基因具有较大的意义。本书的出版旨在抛砖引玉，加强与同行交流，共同促进龙眼生物技术的发展。

本书是在导师陈振光教授的悉心指导下完成的。福建省园艺学会理事长、原福建农业大学校长吕柳新教授长期关心本书的进展。福建农林大学亚热带果树研究所(园艺植物生物工程研究所)的陈春玲硕士、桑庆亮硕士、黄素华硕士，博士生王凤华，硕士生车建美、李冬梅、赖呈纯、张妙霞等同志协助完成了许多工作；硕士生郭文义、沈庆斌、陈义挺、蔡英卿、李惠华、林莉，实验师吴金寿，以及园艺学院的郭志雄博士、郭玉琼硕士等老师提供了实际帮助。在此，一并致谢。

由于作者学识水平及工作能力有限，在龙眼生物技术研究方面工作不够深入和全面，加上编写时间仓促，书中肯定还存在不少错漏。不足之处恳请读者和同行不吝指教。

赖钟雄

2003年2月于福建农林大学

目 录

第一章 龙眼生物技术研究概况	(1)
第一节 龙眼细胞工程	(1)
第二节 龙眼基因工程	(2)
第三节 龙眼细胞与分子生物学	(3)
第二章 龙眼松散型胚性愈伤组织系的建立与保持	(5)
第一节 龙眼松散型胚性愈伤组织系的建立	(5)
第二节 龙眼松散型胚性愈伤组织系的保持	(14)
第三节 龙眼松散型胚性愈伤组织长期保持及其染色体数目变异	(15)
第三章 龙眼胚性愈伤组织的体胚发生	(18)
第一节 胚性愈伤组织的体胚诱导	(18)
第二节 体细胞胚胎的成熟	(22)
第三节 体细胞胚胎萌发再生植株与移栽	(23)
第四章 龙眼胚性悬浮细胞培养	(27)
第一节 龙眼胚性悬浮细胞系的建立	(27)
第二节 龙眼胚性悬浮细胞系的生长曲线	(29)
第三节 龙眼胚性悬浮细胞系的保持	(30)
第四节 影响龙眼胚性悬浮细胞系生长的因素	(31)
第五节 龙眼胚性悬浮细胞系的体胚发生与植株再生	(32)
第六节 龙眼胚性悬浮细胞系建立和保持的技术关键	(33)
第五章 龙眼单细胞克隆的建立	(34)
第一节 龙眼单细胞悬浮细胞系的建立	(34)
第二节 龙眼单细胞的体胚发生	(35)
第六章 龙眼原生质体培养	(37)
第一节 龙眼胚性培养细胞原生质体分离与纯化	(37)
第二节 龙眼胚性悬浮细胞原生质体培养	(42)
第七章 龙眼基因克隆与遗传转化	(51)
第一节 DNA 与 RNA 提取	(51)
第二节 基因克隆	(52)
第三节 遗传转化	(53)
第八章 龙眼体细胞胚胎发生的细胞与分子生物学	(55)
第一节 龙眼体细胞胚胎发生过程中的细胞组织形态观察	(55)
第二节 龙眼体细胞胚胎发生过程中的超微结构变化	(58)
第三节 龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源激素变化	(62)

第四节	龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源多胺变化	(67)
第五节	龙眼体细胞胚胎发生过程中的同工酶变化	(70)
第六节	龙眼胚性培养物的 DNA 和 RNA 提取方法	(74)
第七节	龙眼胚性培养物的蛋白质提取及电泳方法	(77)
第八节	龙眼体细胞胚胎发生过程中的特异基因表达	(81)
第九章	龙眼与荔枝属间基因组转移研究	(84)
第一节	荔枝松散型胚性愈伤组织的筛选与保持	(84)
第二节	荔枝胚性悬浮细胞与原生质体培养	(97)
第三节	荔枝转基因系统的建立与抗性标记原生质体的获得	(100)
第四节	龙眼与荔枝属间原生质体融合	(114)
第五节	微核技术与龙眼、荔枝微细胞杂交	(117)
第十章	龙眼生物技术研究的应用价值	(121)
第一节	在生物学基础研究上的应用	(121)
第二节	在农业上的应用	(124)
第三节	在工业上的应用	(126)
缩略语表		(127)
参考文献		(129)

第一章 龙眼生物技术研究概况

第一节 龙眼细胞工程

龙眼的细胞工程研究,始于20世纪80年代初。1981年,魏文雄等首先报道,由东壁和红核子两个品种的幼胚子叶培养形成愈伤组织,并通过体细胞胚胎发生的方式获得了再生植株。1984~1987年杨永青等报道,进行花药培养,通过体胚发生方式获得单倍体花粉植株,并进行焦核胚胎挽救。1988年美国Florida大学的Litz 进行龙眼成年树叶片培养,通过体胚发生获得再生植株。同时,陈菁瑛等报道了龙眼茎尖、茎段培养通过器官发生方式再生植株及脱毒的初步研究结果。这些研究为龙眼细胞工程研究奠定了重要基础,也引起有关科学工作者对龙眼生物技术的兴趣。但是,不管是通过体胚发生方式还是器官发生方式,龙眼离体培养研究都存在着难以克服的障碍,使龙眼细胞工程研究无法进一步深入与应用。到了20世纪90年代中期,我们通过建立可长期继代培养、具有强烈体胚发生能力与植株再生能力的松散型龙眼胚性细胞系,推动了龙眼细胞工程深入到细胞水平及分子生物学领域,取得了突破性的进展,相继建立了高频率体胚发生模式系统、胚性细胞悬浮培养系统、单细胞克隆技术、原生质体再生系统,并在体胚发生的细胞与分子生物学研究、细胞杂交与微细胞杂交方面取得一定进展。不过,在龙眼器官发生方面,由于木本植物通常具有的众所周知的特性,成年树外植体的培养技术仍很不完善。

一、器官发生

目前龙眼离体培养再生植株的报道中,器官发生的再生途径仅见于以茎段、茎尖、侧芽以及转化毛状根为外植体的培养。由于龙眼营养组织酚类物质含量高,外植体易褐变致死;同时,成年材料诱导出的芽苗生根困难(赖钟雄等 1997)。周丽依等(1986)、陈菁瑛等(1991)用实生苗和成年树的茎尖(茎段)为外植体进行培养,获得了少量试管苗,但成活率、增殖率和生根率低;后来,陈菁瑛等(1996)改变了取材和消毒方法后,成活率和增殖率有所提高,并且结合热处理方法获得了去除龙眼鬼帚病的脱毒试管苗,但尚未能应用于生产。福建农林大学亚热带果树研究所生物技术实验室的王家福等(2000)也进行了类似的研究。总的说来,龙眼茎尖(段)、侧芽培养通过器官发生再生芽苗的途径,在技术上还不很成熟,有待于进一步探索。此外,福建农林大学亚热带果树研究所生物技术实验室的曾黎辉(1998)发现,在高浓度BA作用下,龙眼Ri质粒转化毛状根也能萌发不定芽。

二、体细胞胚胎发生

龙眼离体培养中，绝大部分是通过体细胞胚胎发生方式再生植株的。

1. 龙眼胚性细胞系的建立、长期保持与应用

胚性细胞系的建立与长期保持是龙眼生物技术研究的重要基础工作。长期以来，龙眼胚性愈伤组织的诱导与稳定保持一直是龙眼生物技术研究“瓶颈”。20世纪90年代中期，赖钟雄等（1997，1995）以龙眼未成熟胚胎作为起始材料，在高浓度2,4-D的条件下诱导出胚性很强的松散型胚性愈伤组织，采用含高浓度2,4-D与含AgNO₃的培养基交替培养的方法使胚性愈伤组织长期稳定保持。经5a的继代保持，至今仍保持旺盛的增殖能力和强烈的体细胞胚胎发生能力。利用该胚性细胞系，已先后建立了龙眼胚性悬浮细胞系、单细胞克隆、原生质体高效再生体系，并作为受体系统获得了龙眼（Ri质粒）遗传转化植株（Lai et al 2000a, 2000b, 赖钟雄 1997, 曾黎辉 1998）。

2. 龙眼高频率体细胞胚胎发生与植株再生

有关龙眼体胚发生的研究，魏文雄等（1981）首先报道：由东壁和红核子两个品种的幼胚子叶培养形成愈伤组织，并通过体细胞胚胎发生的方式获得了再生植株。以后关于龙眼花粉植株诱导（杨永青等 1984）、焦核胚胎挽救（杨永青等 1987）、叶片培养（Litz R 1988）、原生质体培养等，都是通过体胚发生方式再生植株。但是，存在体胚发生频率偏低以及大量存在畸形胚等问题。赖钟雄等（1997，1995）利用其建立的胚性细胞系，获得了高频率的体细胞胚胎发生。在体胚分化培养基上，每克鲜重的龙眼胚性愈伤组织和胚性悬浮细胞可分别诱导出高达1万个和14万个以上的体细胞胚胎（胚状体），诱导频率100%，体胚发生同步化程度高。采用特殊的体胚“成熟”处理，龙眼体胚的玻璃化现象可100%克服，并且萌发率可高达90%以上（赖钟雄等 1998，1997）。龙眼如此强烈的体细胞胚胎发生能力和植株再生能力，在本本植物的体胚发生中是十分罕见的。

3. 龙眼单细胞、原生质体与转化毛状根的直接胚胎发生

龙眼单细胞培养、原生质体培养都有一定比例的细胞（原生质体）直接胚胎发生，但如何控制直接胚胎发生的比例，还需进一步研究（赖钟雄 1997），Ri质粒转化毛状根在分化培养基上也能直接形成胚状体。

第二节 龙眼基因工程

龙眼基因工程的研究，始于龙眼体胚高频率再生体系的建立。优良的再生系统，为龙眼基因工程育种奠定了重要基础。利用我们所建立的高效再生系统，曾黎辉（1998）首先获得了Ri质粒转化植株；最近，华南农业大学借助根癌农杆菌介导法获得了抗性芽。我们利用基因枪法，用带有*gus*和*hpt*基因的pCambia1301质粒轰击龙眼胚性愈伤组织，获得胚性愈伤组织的GUS瞬时表达。同时，我们以龙眼松散型胚性愈伤组织为受体，正开展通过根癌农杆菌介导法将具有抗真菌作用的辣椒倍半萜环化酶基因（*PEAS*）导入龙眼的研究，目前已获得抗性愈

伤组织。

从龙眼自身克隆目的基因，能够更有效地发挥龙眼基因工程育种的作用，或者为其他生物的基因工程研究提供有价值的目的基因。作者所在实验室的林同香（1998）首先克隆了龙眼 *rbcL* 基因和 *atpB* 基因的部分片段。最近，我们采用 mRNA 差别显示法进行龙眼胚性愈伤组织体胚发生过程中特异表达基因的克隆，获得了 1 个具有完整 ORF、可能是 VitC 过氧化物酶基因（*APX*）的 cDNA 序列和 2 个具有完整 ORF 的 cDNA 新序列。此外，我们也期望从蛋白质入手，克隆龙眼体胚发育相关基因，目前已采用水平 SDS-PAGE 分析发现了在龙眼体胚成熟过程中出现的 2 个小分子量（*Mr* 分别为 6.2 KD 和 6.9 KD）特异蛋白（多肽），这是在植物体胚发生研究中从未报道过的；同时，我们建立了龙眼胚性培养物水平双向电泳技术，为更有效地分离龙眼体胚发生过程中的特异蛋白提供了技术平台。

第三节 龙眼细胞与分子生物学

一、龙眼细胞生物学研究

所有已知的天然龙眼品种类型，皆为二倍体（ $2n=2x=30$ ）。长期继代的龙眼胚性愈伤组织，绝大多数的胚性愈伤组织团细胞染色体数目为正常二倍体；个别细胞团的部分细胞出现染色体数目为 $2n=31\sim61$ 的情况，以 $2n=45$ 和 $2n=60$ 的居多。在离体培养物中，染色体数目异常是一个普遍现象。染色体丢失或多倍化是最常见的情况。但在我们的研究中发现有三倍体的细胞出现，而且在染色体异常细胞中所占比例较大，这在以往鲜有报道。根据我们掌握的资料，目前仅在小麦上有过报道。其形成机理可能较为复杂。关于这些染色体畸变规律以及染色体畸变细胞突变体筛选的详细研究工作正在进一步进行之中（赖钟雄等 2001）。

关于体胚发生过程中的细胞生物学研究，主要是石蜡切片观察、扫描电镜观察和透射电镜观察，进行龙眼体胚发生的起源、细胞与亚细胞结构变化研究，并分析了龙眼体胚发生过程中的内源激素、多胺、同工酶等的变化（陈春玲、赖钟雄 2001）。

二、龙眼分子生物学研究

福建农林大学亚热带果树研究所在 20 世纪 90 年代中期率先开展了龙眼的分子生物学研究，进行了 DNA 与 RNA 提取方法研究；克隆了龙眼叶绿体 *rbcL* 基因和 *atpB* 基因，并分析了龙眼 *rbcL* 基因和部分 *atpB* 基因序列的结构；找到了与 *atpB* 基因 5' 功能区特异结合的叶绿体蛋白质，紫外交联实验证实不同龙眼品种的结合蛋白具有品种特异性；采用 RAPD 技术对龙眼的主栽品种进行亲缘关系分析。

近年来，我们主要集中进行龙眼体胚发生的分子生物学研究。通过大量比较，探索出一种适宜于龙眼胚性培养物 DNA 和 RNA 提取的简便、快捷方法。采用 mRNA 差异显示法对龙眼松

散型胚性愈伤组织 (friable embryogenic callus, FEC) 体胚发生过程中各阶段胚性培养物基因的差异表达进行了研究。初步研究表明, 龙眼体胚发生过程中存在着大量阶段特异性表达的基因。现已获得了70多个差异cDNA片段, 并克隆了近30个有代表性的cDNA差异片段。通过cDNA特异性的斑点杂交、Northern杂交等鉴定与测序, 获得了3个特异性表达的cDNA序列: 1个为402 bp的cDNA片段, 与番茄*APX*有94%同源性; 另外2个为新序列, 并通过RACE方法获得了3个具有完整ORF的特异性表达的cDNA序列。其他片段的检测鉴定、进一步的RNA原位杂交、全长cDNA克隆以及功能鉴定正在进行之中 (王凤华、赖钟雄等 2002)。

使用Pharmacia 多功能电泳仪, 采用半干电泳技术, 进行水平SDS-PAGE、IEF、2-D电泳, 对龙眼体细胞胚胎发生过程中的特异蛋白的分析表明, 与mRNA的表达情况类似, 龙眼体胚发生各个阶段存在特异表达的蛋白质。其中, SDS-PAGE表明: 在龙眼子叶形胚时期存在一组*Mr*从几KD到十几KD的LMW蛋白质, 在植物体胚发生研究中未见报道 (在成熟子叶形胚新出现的*Mr*为6.2KD、6.9KD特异蛋白) 或极少见到报道, 可能与龙眼这类具大核种子 (顽拗性类型) 的本本植物的胚胎发育特性有关 (陈春玲、赖钟雄 2001, 王凤华、赖钟雄等 2002)。

第二章 龙眼松散型胚性愈伤组织系的建立与保持

在植物生物技术研究中,对于顽拗型(recalcitrant)植物,建立具有再生潜力的松散型愈伤组织系,是进一步进行细胞工程以及遗传转化研究的第一步基础工作。龙眼属顽拗型植物,其离体再生往往是通过体细胞胚胎发生途径实现的。因此,建立龙眼松散型胚性愈伤组织(friable embryogenic callus, FEC)系,并使之长期保持,是龙眼生物技术的最重要基础工作,特别是龙眼高频率体胚发生体系、悬浮细胞培养、单细胞克隆、原生质体培养以及转基因研究的工作基础。

许多离体培养顽拗型植物(部分木本植物、禾谷类作物等)的高频率体胚发生、悬浮细胞培养、原生质体培养及其遗传操作的突破,关键技术环节之一就是由松散型胚性愈伤组织或由之建立起的胚性悬浮细胞系为起始材料。分离高质量的原生质体或建立胚性悬浮细胞系的胚性愈伤组织,要求愈伤组织的细胞分裂能力强、增殖速度快,并且保持强烈的胚性。这种胚性愈伤组织往往是一种疏松、颗粒细小的结构。龙眼的胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC)培养,在相关的离体培养研究中虽然有一些报道(陈容茂等 1993, Litz 1988, 杨永青和陈志锋 1987, 杨永青和魏文雄 1984, 魏文雄和杨永青 1981),但他们都未能得到稳定的松散型胚性愈伤组织系,当然也无法建立起胚性悬浮细胞系,影响了龙眼的细胞工程和基因工程的研究。我们从龙眼的幼胚或花药培养中筛选出松散型胚性愈伤组织系,并使之稳定保持,以便于进一步建立 FEC 高频率体胚发生系统、胚性悬浮细胞和单细胞培养系统、原生质体培养及其遗传操作系统。

第一节 龙眼松散型胚性愈伤组织系的建立

一、起始材料

从红核子、东壁、九月乌、乌龙岭、十二月龙眼、油潭本等福建省龙眼主栽或稀优品种的幼胚诱导 EC; 为扩大材料来源, 也采用东壁等品种的花药培养诱导 EC。

二、方法与程序

1. 龙眼幼胚培养与愈伤组织诱导

取龙眼开花后 40~50 d 的幼果, 经常规表面消毒后, 在无菌条件下细心取出幼胚, 注意不要碰伤。此时幼胚一般处于子叶形时期, 多数直径 2~3 mm, 也有少数很小或很大的。将幼胚接种于固体培养基 (M_0 ~ M_{14} 培养基, 表 2-1) 进行培养。以红核子品种为主要试材, 比较生长调节剂 (2,4-D、NAA、IAA、KT、BA、ZT 等)、 $AgNO_3$ 和活性炭、碳源 (蔗糖和葡萄糖)、基本培养基 (MS、mMS 和 White)、光照强度、胚发育时期对龙眼幼胚培养诱导胚性愈伤组织的效应, 同时, 也对不同品种 (基因型) 幼胚的培养反应进行比较。除特别指明外, 采用的基本培养基为 MS (Murashige and Skoog 1962) 培养基, 蔗糖浓度 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂浓度 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 为 5.8, 培养基在 121°C 、 107.87 kPa 消毒 20 min; 幼胚发育时期为直径 2.0~3.5 mm 中等大子叶形胚; 培养条件为黑暗、 $25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ 。每个组合接种 10 瓶, 一般每瓶接种 3 个幼胚, 培养 42 d 时统计试验结果, 观察愈伤组织诱导率和类型或胚状体的形成情况。试验于 1994 年进行, 1995 年重复一次, 取两年数据的平均值, 对接种、成活、形成愈伤组织或胚状体的外植体个数等数据只取整数。

表 2-1 生长调节剂对龙眼幼胚培养的影响¹⁾

培养基代号	生长调节剂/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$						接种 个数	成活 个数	形成愈 伤组织 幼胚数	形成胚 状体幼 胚数	诱导率(%)		愈伤 组织 类型 ²⁾	褐变 程度 ³⁾
	2,4-D	IAA	NAA	KT	BA	ZT					愈伤 组织	子叶形 胚状体		
M_0	0.0						30	30	6	3	20.00	10.00	CI	0
M_1	0.1						30	28	20	0	66.67		CIla	0
M_2	1.0						30	28	21	0	70.00		CIlb	0
M_3	2.0						30	27	22	0	73.33		CIH	+
M_4	4.0						30	27	16	0	53.33		CIH	++
M_5				1.0			30	29	0	10				0
M_6					1.0		30	28	0	4		33.30		0
M_7							30	28	0	9		13.33		0
M_8	1.0						30	28	9	0	30.00	30.00	CIlb	+
M_9	2.0			1.0			30	27	5	0	16.67		CIlb	+
M_{10}	2.0				1.0		30	27	7	0	23.33		CIlb	+
M_{11}	2.0					1.0	30	30	0	17				0
M_{12}		1.0					30	30	0	18		56.67		0
M_{13}			0.5				30	29	0	16		60.00		0
M_{14}		1.0		1.0			30	29	0	15		53.33		0
						1.0 1.0						50.00		

1) 供试品种为红核子; 基本培养基为 MS。

2) 愈伤组织类型: CI: 白色紧实, 质地较硬, 一般为块状; CIla: 淡黄色、质地硬、松散、颗粒很粗, 有许多原胚分化; CIlb: 淡黄色、质地较硬、松散、颗粒较粗, 有少数原胚混杂; CIH: 淡黄色、松散、颗粒细小 (下同)。

3) 褐变程度: 0: 无褐变; +: 轻度; ++: 较严重; +++: 严重; ++++: 全部褐变死亡 (下同)。

2. 龙眼花药培养与愈伤组织诱导

从约 10 年生的成年龙眼嫁接树取花药呈黄白色、直径 3~4 mm 的花蕾，经常规表面消毒后，在无菌条件下细心夹出花药，并注意去除花丝。将花药接种于固体培养基 MH₁ 和 MH₂，诱导愈伤组织。诱导培养基基本参照杨永青和魏文雄（1984）花药培养的配方，即基本培养基为 MS 培养基，附加 2 mg·L⁻¹ 2,4-D、1 mg·L⁻¹ KT、7 g·L⁻¹ 琼脂、50 g·L⁻¹ 蔗糖，pH 为 5.8，并比较添加活性炭(AC)和光照条件对花药培养结果的影响。每个组合接种 20 瓶，每瓶接 15~20 个花药，培养温度为 25℃±2℃。培养 60 d 时统计试验结果。试验于 1994 年进行，1995 年重复一次。数据处理方法同幼胚培养。

3. 松散型胚性愈伤组织的筛选

将幼胚培养和花药培养诱导出的各类型愈伤组织继代增殖 2 代后，各取一部分材料在含 50 mL·L⁻¹ 椰子汁(CW)的 MS 固体培养基内检测愈伤组织的体胚发生能力，并做原生质体分离和悬浮细胞系建立的适宜性比较。分离原生质体的酶解液为含 10 g·L⁻¹ 纤维素酶(qnozuka R-10)、10 g·L⁻¹ 果胶酶(serva)、0.7 mol·L⁻¹ 甘露醇的 CPW 溶液。建立悬浮细胞系的培养基为含 2 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS 液体培养基，振荡速度为 120 r·min⁻¹。在继代增殖过程中，筛选出体胚发生能力强、适宜于分离原生质体和建立悬浮细胞系的愈伤组织类型。继代培养条件为黑暗、25℃±2℃。

4. 松散型胚性愈伤组织的保持

选择合适的继代培养基和继代方法，使筛选出来的松散型胚性愈伤组织能长期继代保持。一般每个组合 10 瓶，每瓶接种 3 团愈伤组织，每团约 0.15 g，以鲜重和干重的生长增长率来衡量愈伤组织的生长量，计算公式为：鲜重增长率=[(培养后的鲜重-接种时的干重)/接种时的鲜重]×100%；干重增长率=[(培养后的干重-接种时的干重)/接种时的干重]×100%。3 次重复，从外观观察愈伤组织细胞形态的变化。体胚发生能力、建立悬浮细胞系和分离原生质体的适宜性的测定方法同上。培养条件为黑暗、25℃±2℃。

三、龙眼 FEC 的建立

1. 龙眼幼胚愈伤组织的诱导

通过比较植物生长调节剂(plant growth regulators, PGR 或激素)、AgNO₃、活性炭、碳源、基本培养基、光照强度、胚发育期、基因型等因素对龙眼幼胚诱导 EC 的影响，建立了龙眼幼胚诱导 EC 的技术体系。

(1) 生长调节剂对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响

在附加不同生长调节剂的 MS 培养基(M₁~M₁₄)上，对红核子等龙眼品种的幼胚愈伤组织诱导试验表明：单独附加高浓度的 2,4-D 或 2,4-D 与 KT、BA、ZT 配合，诱导出愈伤组织；分别单独使用 NAA、IAA、KT、BA、ZT，以及 NAA、IAA 与 KT 配合，直接从幼胚诱导出子叶形胚状体，未能形成愈伤组织；不附加任何生长调节剂(M₀培养基)，有的幼胚则直接形成子叶形胚状体，但诱导率低(表 2-1)。在不同生长调节剂组合中，形成的愈伤组织类型也有所不同：在无生长调节剂的 M₀培养基上形成的愈伤组织为白色、紧实类型(CI 类型)，生长较为缓慢，且一般为块状；单独附加 2.0~4.0 mg·L⁻¹ 的高浓度 2,4-D(M₃、M₄培养基)，诱导出的愈伤组织为淡黄色、生长旺盛、颗粒细小且松散的类型(CIII 类型，或称松

散型, 图 2-1); 单独附加较低浓度 ($0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 2,4-D 或高浓度 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 2,4-D 与细胞分裂素配合的组合, 形成的愈伤组织为生长旺盛、淡黄色、松散、颗粒粗的类型 (CII 类型, 或称粗粒型); 其中在含 2,4-D 浓度很低 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 M_1 培养基上的混合培养物颗粒很粗, 质地硬, 有许多原胚分化, 称 CIIa 类型; 其余培养基上形成的愈伤组织颗粒较粗, 质地也较硬, 有少量原胚混杂, 称 CIIb 类型; CII 类型实为愈伤组织和原胚的混合物。由此可见, 龙眼幼胚培养诱导愈伤组织, 生长调节剂不是必需的, 但要获得松散的愈伤组织类型, 必须附加一定浓度的 2,4-D, 且以单独使用为佳。

关于愈伤组织的诱导率, 除了仅直接形成子叶形胚状体的组合外, 无生长调节剂的 M_0 组合诱导率最低, 仅 20.00%; 单独附加 2,4-D, 在 $0.1 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 诱导率随浓度增加而升高, 并在 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到 73.33% 的最高值。但是, 2,4-D 浓度太高, 诱导率反而下降, 试验中发现, 高浓度 2,4-D (即使与其他生长调节剂配合) 会导致幼胚外植体褐变, 在浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时褐变程度尚较轻, 但达到 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 褐变较严重, 降低了愈伤组织的诱导率。此外, 当 2,4-D 与细胞分裂素配合时, 诱导率大大下降, 且得到的仅是愈伤组织与原胚的混合培养物。

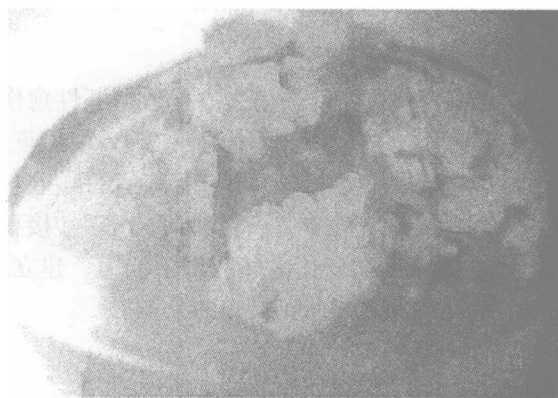


图 2-1 龙眼松散型胚性愈伤组织(FEC)

(2) AgNO_3 和活性炭对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响

在 MS 基本培养基单独附加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D (M_3) 或与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 配合 (M_8) 的培养基上比较了 AgNO_3 和活性炭对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响 (表 2-2)。结果表明, 在单独附加 2,4-D ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的组合里添加 $5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 , 形成的愈伤组织仍为 CIII 类型, 但诱导率稍有下降; 在同时含有 2,4-D 和 KT 的组合里加入 $5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 , 诱导出的愈伤组织不是 CIIb 类型, 而是 CIII 类型愈伤组织, 诱导率未见明显改变, 表明 AgNO_3 有抑制原胚分化的作用; 在单独附加 2,4-D 或 2,4-D 与 KT 配合的培养基里附加活性炭 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 则不仅诱导率降低, 而且得到的愈伤组织只是紧实的 CI 类型。这可能是由于活性炭对生长调节剂吸附作用的结果。不过, 加入活性炭可以大大减轻因损伤而造成的外植体褐变现象。

由此, 我们认为, 在龙眼幼胚愈伤组织诱导中, 在单独附加较高浓度的 2,4-D 时, 没必要再加入 AgNO_3 ; 在同时加入 2,4-D 和 KT 的组合里, 有必要加入 AgNO_3 , 以促使形成 CIII 类型愈伤组织; 并且, 在一般情况下, 以不加活性炭为宜, 否则难以得到松散细粒型的愈伤组织。

表 2-2 AgNO₃ 和活性炭对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响¹⁾

培养基成分	附加成分		接种 个数	成活 个数	形成愈 伤组织 幼胚数	形成胚 状体幼 胚个数	诱导率（%）		愈伤组织 类类型	褐变 程度
	活性炭 ²⁾ (g·L ⁻¹)	AgNO ₃ (mg·L ⁻¹)					愈伤 组织	子叶形 胚状体		
M ₃			30	27	22	0	73.33		CIII	+
M ₃		5.0	30	27	19	0	63.33		CIII	+
M ₃		10.0	30	28	18	0	60.00		CIII	+
M ₃	5.0		30	30	6	3	20.00	10.00	CI ⁽²⁾	0
M ₈			30	28	9	0	30.00		CIIb	0
M ₈		5.0	30	29	8	0	26.67		CIII	+
M ₈		10.0	30	27	7	0	23.33		CIII	+
M ₈	5.0		30	30	5		16.67		CI ⁽²⁾	0

- 1) 供试品种为红核子；基本培养基为 MS，分别在单独含 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D、2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 与 1.0 mg·L⁻¹ KT 配合情况下比较 AgNO₃ 和活性炭的影响。
- 2) 加入活性炭的组合，外植体损伤引起的褐变大大减轻，但愈伤组织一般为块状。

(3) 碳源对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响

在单独附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基上比较了不同碳源对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响(表 2-3)。结果表明，蔗糖和葡萄糖都是适宜的碳源；蔗糖浓度以 30 g·L⁻¹ (0.09 mol·L⁻¹) 为佳，如浓度太高，则加重外植体褐变，降低诱导率，愈伤组织质地也变得较硬；在 17 g·L⁻¹ 葡萄糖上诱导的愈伤组织类型及其诱导率，与 30 g·L⁻¹ 蔗糖无明显差异。

表 2-3 碳源对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响¹⁾

碳源 ²⁾ (g·L ⁻¹)		接种个数	愈伤组织 ³⁾		褐变程度
蔗糖	葡萄糖		诱导率(%)	类型	
30		30	73.33	CIII	+
50		30	43.33	CIII	++
70		30	6.67	CIII ³⁾	++
	17	30	66.67	CIII	+

- 1) 供试品种为红核子。
- 2) 除碳源外，均为附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 M₃ 培养基成分。
- 3) 愈伤组织生长缓慢，质地稍硬。

(4) 基本培养基对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响

在分别单独附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS、mMS (大量元素减半)、White 培养基上的龙眼幼胚愈伤组织诱导结果见表 2-4。由表 2-4 可以看出，MS 培养基的愈伤组织诱导率最高；降低了无机盐的 mMS 培养基的愈伤组织诱导率大大下降；低无机盐的 White 培养基上外植体

褐变严重, 未见愈伤组织形成。可见, 低无机盐培养基不适宜龙眼幼胚愈伤组织的诱导。

表 2-4 基本培养基对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响¹⁾

基本培养基 ²⁾	接种幼胚个数	成活幼胚个数	愈伤组织诱导率(%)	愈伤组织类型	褐变程度
MS	30	27	73.33	CIII	+
mMS ³⁾	30	26	36.67	CIII	+++
White	30	23	0.00		+++

1) 供试品种为红核子。

2) 附加成分同 M₃ 培养基, 含 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D。

3) MS 大量元素减半。

(5) 光照强度对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响

在单独附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基上比较了不同光照强度对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响(表 2-5)。结果表明, 光照使龙眼幼胚褐变加重, 愈伤组织诱导率下降, 当光照强度达到 1 100 lx 时, 无法形成愈伤组织, 以后外植体逐渐变褐死亡。因此, 龙眼幼胚培养诱导愈伤组织, 最好暗培养。

表 2-5 光照强度对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响¹⁾

光照强度 ²⁾ (lx)	接种胚数	成活胚数	愈伤组织诱导率 (%)	愈伤组织类型	褐变程度
0	30	27	73.33	CIII	+
300	30	23	30.00	CIII	++
1100	30	20	0.00		+++

1) 供试品种为红核子, 培养基为附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 M₂ 培养基。

2) 光照时间为 12 h/d。

(6) 胚发育期对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响

取红核子龙眼不同大小的幼胚, 分别接种在单独附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS 培养基上, 比较不同胚发育期对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响(表 2-6), 结果表明, 以大小为 2.0~3.5 mm 的子叶形胚为佳, 愈伤组织诱导率最高; 低于 0.5 mm 的幼胚, 未能培养成活; 大于 5.0 mm 的幼胚, 由于取出时易碰伤, 在无活性炭的培养基里, 因褐变而致死; 在幼胚为 0.5~5.0 mm 的范围内, 虽然愈伤组织的诱导率有差别, 但其形成的愈伤组织类型相同。

表 2-6 胚大小对龙眼幼胚愈伤组织诱导的影响¹⁾

胚大小 (mm)	接种 (个数)	成活 (个数)	愈伤组织诱导率 (%)	类型	褐变程度
<0.5	30	0	0.00		++++
0.5~1.9	30	11	26.67	CIII	+++
2.0~3.5	30	27	273.33	CIII	+
3.6~5.0	30	13	40.00	CIII	+++
>5.0	30	0	0.00		++++

1) 供试品种为红核子, 培养基为附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 M₂ 培养基。