维普资讯 http://www.cqvip.com

果 树 学 报 2006,23(1): 142~144
Journal of Fruit Science

转 *rol*A、B、C 基因枳橙快繁技术

胡春华,谢玉明,黄训才,郭 琛,焦 徕,吴芯茹,邓子牛*

(湖南农业大学园艺园林学院,长沙 410128)

摘 要:通过对转 *rol* 基因枳橙 B、D、E 系及对照的高接植株春梢茎段进行萌芽诱导、增殖及试管苗生根成苗的试验,摸索出适宜枳橙快繁各种培养基配方及培养条件。结果表明,以 MS+6-BA 1 mg/L 的培养基适合于芽萌发,以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的培养基适合于芽增殖,生根则以 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+0.2%活性炭的组合最佳,转基因各系生根率均在 93.3%以上,显著高于对照生根率(66.7%)。快繁苗移栽成活率可达 90%,目前生长良好。

关键词:*rol* ABC 基因;转基因枳橙;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S666 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-9980(2006)01-142-03

In vitro propagation of *rol* A,B,C transgenic citrange

HU Chun-hua, XIE Yu-ming, HUANG Xun-cai, GUO Chen, JIAO Lai, WU Xin-ru, DENG Zi-niu*

(Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128 China)

Abstract: *In vitro* propagation makes it possible to speed the multiplication of the *rol* A,B,C transgenic citrange plants, so it is possible to quickly evaluate this new rootstock. Using bud sticks of the transgenic clones (B, D, E) and the control citrange as explants, culture media containing various plant growth regulators were tested for bud burst, shoot multiplication and rooting. The results indicated that MS medium containing 1 mg/L 6-BA resulted in fastest bud bursting, MS added with 6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.05 mg/L was the best choice for shoot multiplication, and 1/2MS supplied with NAA 0.5 mg/L and 0.2% activated charcoal showed quite suitable for rooting. The transgenic clones had significantly higher rooting percentage (93.3%) than that of the control (66.7%).

Key Words: *rol* A,B,C genes; Transgenic citrange; Tissue culture; Micropropagation

转 *rol* 基因枳橙表现出顶端优势减弱、分枝增多、节间缩短、整个树冠变得紧凑,矮化[1],有望成为柑橘新的矮化砧木资源。为了能尽快形成转基因系群体,以便进行砧木选育,需对转 *rol* 基因枳橙进行快速繁殖研究。柑橘离体培养在国内外进行过长期研究,在快速繁殖方面,利用实生苗胚轴、子叶或嫁接苗茎尖培养,有过不少报道[2-5],但大多以实生苗为材料,并且各类之间还存在较大差异。用嫁接苗枳橙茎段作外植体及转基因柑橘快繁研究未见报道。本研究以转 *rol* 基因枳橙及对照高接带芽茎段为材料,以期优化转基因柑橘快繁技术,获得成批遗传稳定的转基因枳橙快繁苗,并初步研究 *rol* 基因对枳橙根系的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为转 *rol* 基因枳橙 B、D、E 3 个系[1],以未经转化的通过相同再生体系获得的枳橙植株为对照。材料采自高接在 10 年生枳砧温州蜜柑尾张树的枝条。

1.2 培养方法

芽萌发、增殖基本培养基为 MS,附加 BA,浓度设为 0,1,2,5 mg/L,3%蔗糖、0.8%琼脂、pH5.8。生根培养基为 1/2MS,2%蔗糖、0.8%琼脂、pH5.8, 附加 0.2%活性碳(AC)。培养温度(24±2)℃,连续光照 12 h/d,光照强度为 1000~1500 Lx。

枝条去叶、刺后,剪成约 5 cm 长的茎段,自来水冲洗 60 min, 超净工作台上用 70%酒精表面消毒 1 min,再用 0.1%的升汞溶液消毒 12 min,无菌水冲洗 3~4 次,切成 1.5 cm 长的单节带芽茎段,然后芽眼朝上平放于培养基上进行培养。当芽萌发后,将嫩芽从基部切下,进行芽增殖培养,每月继代 1 次。每代选取部分健壮芽进行生根培养。试管苗经过炼苗后转入白砂土与发酵棉籽壳(1:1)的基质中,继续在

收稿日期:2005-04-11 接受日期:2005-11-18

基金项目:国家转基因专项资助项目(JY04-B-02);湖南农业大学引进人才基金项目(03YJ09)。

作者简介:胡春华,男,在读博士研究生。Tel:0731-4635302

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel:0731-4635302, E-mail:deng7009@163.com

致谢:本试验在湖南农业大学细胞工程重点实验室完成。特致谢意!

维普资讯 http://www.cqvip.com

温室中生长。

2 结果与分析

2.1 BA 对枳橙茎段芽萌发的影响

在 MS+BA 1 mg/L 培养基萌发效果最好，接种 7 d 芽全部萌发，嫩芽整齐、健壮，生长速度快，15 d 可达 1.5~2.0 cm 高。BA 浓度达 2 mg/L 时，也能诱导芽萌发，但芽生长不整齐，甚至芽停止生长，最后水滞样死亡。BA 浓度达 5 mg/L 时，几乎无芽萌发，外植体最后褐化死亡。不加 BA 时，外植体仅有部分萌发，芽生长速度慢、不整齐、生长势弱。

2.2 芽的增殖

2.2.1 *植物生长调节剂对芽增殖的影响*　从表 1 中可以看出，以 MS+BA 0.5 mg/ L+NAA 0.05 mg/L 的培养基配方最适合于枳橙芽的增殖，其增殖系数分别达到 2.4 和 2.0。BA 浓度对芽的增殖影响很大，浓度增加或者减少，增殖系数均减少。这与 Jameel 等[6]的研究结果相似。NAA 对芽的增殖影响不及 BA，但适当浓度的 NAA 有利于芽的生长，BA 浓度为 0.5 mg/ L 时，NAA 由 0 增加到 0.05 mg/L 时，芽生长情况、增殖系数有所提高。提高到 0.1 mg/ L 时，致使外植体产生愈伤组织，增殖系数下降。

表 1　不同植物生长调节剂及浓度对枳橙芽增殖的影响
Table 1 Effects of plant growth regulators on shoot multiplication of the transgenic and the control citrange

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种芽个数 Explant No.	增殖系数 Multiplication ratio	
			转基因 Transgenic clones	对照 Control
0.0	0.05	30	1.0 d	1.0 c
0.2	0.05	30	1.5 b	1.2 c
0.5	0.05	30	2.4 a	2.0 a
1.0	0.05	30	2.1 a	1.6 b
1.5	0.05	30	1.4 b	1.3 c
0.5	0.00	30	1.3 c	1.0 c
0.5	0.10	30	1.8 a	1.3 c

注：同列中不同字母表示差异显著性($P<0.05$)。下同。

Note: The different letters in the same column means significant difference at 0.05 level by Duncan's. The same as below.

2.2.2 *不同继代培养次数对枳橙芽增殖的影响*　第 1 代培养过程中，各转 *rol* 基因枳橙系及对照都出现不同程度试管脱落现象，但经过第 1 代驯化后，叶片不再脱落，芽基部产生大量丛芽，芽梢长势好，叶色浓绿，有效新梢多。第 1 代到第 4 代，芽增殖系数逐步提高，第 4 代达到最大值，其中对照由 2.06 增加到 2.86，转基因 B、D、E 各系由 2.43~2.66 增加为 4.36~4.83。增殖芽无畸形，几乎没有愈伤组织形成，生长势旺。转基因各系新梢与田间苗一样，表现出矮化性状，一般新梢长度在 2 cm 左右，而对照达到 3~4 cm(图版-3,4)。到第 5 代，少数外植体基部形成一层较薄的愈伤组织。

影响了芽的质量和芽的增殖系数。为了解决此问题，第 6 代继代时，先将继代芽转入 MS 无激素培养基培养 10 d，以降低体内激素浓度水平，然后再转入增殖培养基继续继代培养，从而有效地避免了愈伤组织的产生，保持了转基因各系每1 代增殖系数在 3.5 以上，对照增殖系数在 2.7 以上。

2.2.3 *转基因与对照芽增殖的差别*　转基因各系与对照的芽增殖存在着明显的差异。在继代培养中，转基因各系形成的芽多、芽梢短，叶片小，叶柄短，与转基因田间植株的表现相似。同时，由于腋芽生长多而快，芽增殖系数各代都比对照要高，特别是第 4 代，B 系增殖系数达到 4.83，而对照只有 2.86。

2.3 生根培养与移栽

2.3.1 *不同培养基配方对枳橙生根的影响*　从表 2 可以看出，最适合于生根的培养基配方为 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+0.2% AC 培养基，转基因 D 系生根率达到 100%，对照为 66.7%。根健壮，白色，根数 2~4 条，根长 3~6 cm。部分根长出多条侧根，芽苗长势好，其次为 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+0.2%AC 培养基。1/2 MS+NAA 0+0.2%AC 培养基的生根效果最差，对照不生根，转基因系生根率只有 30%。

NAA 对枳橙生根有着显著的影响。当 NAA 浓度由 0 升至 0.5 mg/L 时，对照生根率由 0 升至 66.7%，转基因枳橙 D 系由 30%提升至 100%。对照枳橙在无 NAA 培养基上不能生根，转基因枳橙也只有部分芽能诱导出根，但根细、褐色、老化，芽苗生长势差，生长慢。

此外，活性炭(AC)也能显著促进根的诱导和生长，1/2 MS+NAA 0.5 mg/L 培养基不加活性炭，生根率显著降低，原因可能是活性炭的加入造成了培养基的黑暗，使其更接近自然土壤的黑暗条件，从而适合于生根培养；也可能是吸收了切芽分泌的不利于根生长的代谢产物，从而有效地促进生根。

2.3.2 *转基因枳橙与对照生根差异*　转基因枳橙与对照生根存在显著的差异。在相同的培养条件下，无论是生根率还是单芽平均根数，前者都显著高于后者(表 2)。在 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+0.2% AC 生根培养基中，转基因苗诱导 15 d 即有根产生，对照要滞后 4~6 d，转基因枳橙生根率达到 93.3%、单芽平均根数 2.1 条以上，部分根还分化出多条侧根。对照生根率只有 66.7%，单芽平均根数 1.5，无侧根(图版-5)。另外，转基因苗还能在无激素生根培养基上诱导

维普资讯 http://www.cqvip.com

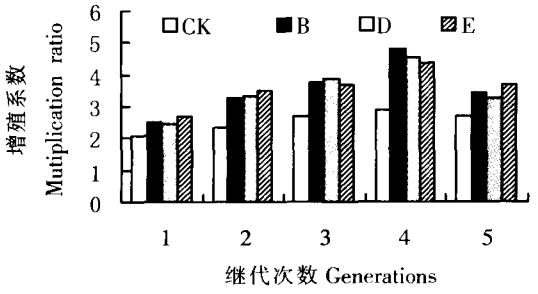

图1 不同继代培养次数对转 *rol* 基因枳橙芽增殖的影响

Fig. 1 The effects of subculture times on shoots multiplication of the transgenic and the control citrange plants

生根,甚至还能在增殖培养基中生根,这在对照中却没有此现象,表明 *rol* ABC 基因具有很强的诱根效果,转基因枳橙表现出很强的生根能力,这与转 *rol* 基因促进生根的结论相同[7-9]。

2.3.3 试管苗移栽 生根培养30~35 d后,将苗小心从瓶中取出,彻底洗净根上培养基,移栽到白沙土:棉籽壳=1:1的基质中,薄膜覆盖30 d保湿。成活率在90%以上。目前已有500多株转基因苗及100多株对照的试管苗移栽入温室(图版-6)。

表2 转基因与对照枳橙生根差异

Table 2 The difference between transgenic citrange and the control on rooting induction

培养基 Medium	外植体 Explant	接种芽数 Explant No.	单芽平均根数 Root No.per shoot	生根率 Rooting rate(%)
1/2MS+NAA 0.5 mg/L+0.2%AC	B系 Clone B	30	2.4 a	96.7 a
	D系 Clone D	30	2.3 a	100.0 a
	E系 Clone E	30	2.1 a	93.3 a
	对照 Control	30	1.5 b	66.7 b
1/2MS+NAA 0.2 mg/L+0.2%AC	B系 Clone B	30	2.1 a	93.3 a
	D系 Clone D	30	1.9 a	90.0 a
	E系 Clone E	30	2.2 a	93.3 a
	对照 Control	30	1.1 b	63.3 b
1/2MS+NAA 0+0.2%AC	B系 Clone B	30	1.0 a	30.0 a
	D系 Clone D	30	1.0 a	26.7 a
	E系 Clone E	30	1.0 a	33.3 a
	对照 Control	30	0.0 b	0.0 b
1/2MS+NAA 0.5 mg/L	B系 Clone B	30	2.0 a	80.0 a
	D系 Clone D	30	2.1 a	73.3 a
	E系 Clone E	30	2.2 a	83.3 a
	对照 Control	30	1.0 b	46.7 b

3 讨 论

转 *rol* A、B、C 基因枳橙同其他转基因柑橘一样,是通过卡那霉素抗性筛选而获得的。而具有卡那霉素抗性的转基因芽难以生根的现象已有报道[10]。通常转基因柑橘的再生都避开生根过程,直接嫁接到砧木上,结果是很难得到自根的转基因植株。本试验结果表明,转 *rol* A、B、C 基因枳橙虽然同样具有卡那霉素抗性,但却表现出很强的生根能力,并成功获得了批量的转基因自根苗。

同时,对转 *rol* A、B、C 基因枳橙芽将近1年的增殖继代培养,继代芽能保持较高的增殖率并有效地避免了愈伤组织成苗途径。通过对高接枳橙带芽茎段的芽萌发、芽增殖、生根及试管苗移栽等4个环节的试验,初步得出了1套关于转基因枳橙的快繁技术,大大提高了转基因枳橙的繁殖效率,为柑橘工厂化育苗提供了技术参考,加快了对转基因及新选育品种的繁殖速度,进而加速了选育种的进程。(本文图版见封底)

参考文献 References:

[1] Gentile A, Deng Z N, Malfa SLa, et al. Morphological and Physiological Effects of *rol* ABC Genes into Citrus Genome[J]. Proc XLVI Italian Soc. Agr. Genetics, 2002, 1~8.

[2] CHEN Q Y, SONG R L, CHEN J Y, et al (陈菁瑛, 宋瑞琳, 陈景耀, 等). A study on shoot tip culture and inducing proliferation of trifoliate orange and citrange[J]. Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences(福建省农科院学报), 1991(6): 53~59. (in Chinese)

[3] CHEN Q Y, SONG R L, CHEN J Y, et al (陈菁瑛, 宋瑞琳, 陈景耀, 等). Studies on shoot tip culture of citrus Ⅰ. Shoot tip culture and its propagation[J]. Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences(福建省农科院学报), 1994, 9(3): 1~6. (in Chinese)

[4] WANG R X, GAO C W, LI J R, et al (王任翔, 高成伟, 李洁荣, 等). Tissue culture of citrus CV.Olinda in ivtro[J]. Journal of Guangxi Normal University(广西师范大学学报), 2003(6):71~74. (in Chinese)

[5] WANG R X, LIANG Q H, CHEN T T, et al (王任翔, 梁倩华, 陈腾土, 等). Tissue culture of citrus grandis[J]. Chinese Bulletin of Botany(植物学通报), 1996, 13(增刊): 70~71. (in Chinese)

[6] Jameel M. Al-Khayri, Abdulaziz M. Al-Bahrany. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime)[J]. Current Science, 2001, 81: 1242~1246.

[7] Casanova E, Trillas M, Moysset L, et al. Influence of *rol* genes in floriculture[J]. Biotechnol Adv, 2005, 23(1): 37~39.

[8] Ben-Hayyim G, Damon J P, martin-Tanguy J, et al. Changing root system architecture through inhibition of putrescine and feruloyl putrescine accumulation[J]. FEBS Lett, 1994, 342(2): 145~148.

[9] Radia Ayadi, Jocelyne. Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba*[J]. Tree Physiology, 2003, 23: 713~718.

[10] CHEN S C, ZHANG J R, HUANG Z R, et al (陈善春, 张进任, 黄自然, 等). Studies on *Agrobacterium*-mediated Antibacterial Peptide D gene transfer in citrus[J]. Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学), 1997, 30(3): 7~13. (in Chinese)

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 版 说 明

1.对照的萌发芽；2.转基因 D 系的萌发芽；3.对照的丛芽；4.转基因 D 系的丛芽；5.对照及转基因在 I 号培养基诱导的根；6.移栽成活的转基因及对照试管苗

Explanation of plates

1.Control bud germination; 2.Transgenic clone bud germination; 3.Multple buds of the control; 4.Multple buds of the D clone; 5.Rooting of the transgenic and control plants on I medium; 6.Transplanted *in vitro* propagated plants

公开发行　刊号：ISSN 1009-9980 / CN 41-1308/S　国外代号：BM1107　国内邮发代号：36-93　广告经营许可证：4100004000059　国内定价：15.00 元