

· 技术方法 ·

手指柠檬茎段离体再生体系建立

谢纯刚^{1,2}, 刘哲¹, 章书声³, 胡海涛^{1*}

¹浙江师范大学生命科学学院, 金华 321004; ²金华市自然资源和规划局野生动植物保护管理站, 金华 321052

³浙江省乌岩岭国家级自然保护区管理中心, 泰顺 325500

摘要 以手指柠檬(*Citrus australasica*)茎段为外植体, 通过离体器官发生途径诱导形成不定芽, 探讨不同植物生长调节剂组合、培养基类型以及暗培养时间对其愈伤组织诱导和植株再生的影响, 建立手指柠檬离体再生体系。结果表明, 1/2MS+4.0 mg·L⁻¹ ZT+30.0 g·L⁻¹蔗糖为手指柠檬茎段不定芽诱导的最佳配方, 14天暗培养后转移到光下培养效果最好, 愈伤组织及不定芽诱导率均为100%, 每外植体平均再生不定芽数达4.83。诱导不定根的适宜培养基配方为1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA, 生根率达94.43%, 平均再生根数为3.9; 在草炭:珍珠岩:蛭石=2:1:1 (v/v/v)的混合基质中组培苗长势最好, 成活率在90%以上。该研究建立了手指柠檬茎段离体再生体系, 为手指柠檬的遗传改良和优良品种快繁奠定了基础。

关键词 手指柠檬, 茎段, 组织培养, 离体再生

谢纯刚, 刘哲, 章书声, 胡海涛 (2023). 手指柠檬茎段离体再生体系建立. 植物学报 58, 926–934.

手指柠檬(*Citrus australasica*)又称指来檬、指橙和澳洲指橙, 原产于澳大利亚东部和新几内亚东南部, 为芸香科柑橘属一种多刺灌木或小乔木果树, 也是半野生状态的柑橘属果树, 以果肉像鱼子酱状的汁囊而闻名, 被誉为水果界的鱼子酱(Cioni et al., 2022)。手指柠檬富含柠檬酸、维生素C和黄酮类等多种天然抗氧化物质, 其果肉风味独特, 可作为高级菜肴和饮料的佐料, 因而受到人们的关注和喜爱, 对其果实的需求量呈指数级增长。近年来, 各国对手指柠檬的种植逐年增加, 许多国家都已引种栽培。我国于1977年从美国引种手指柠檬, 开始试验性栽培。

随着全球手指柠檬市场需求量的快速扩大, 对手指柠檬商业化栽培种苗的需求量逐年增加。目前, 手指柠檬种苗繁育以扦插和嫁接为主, 但这些繁育方式存在繁殖系数低、繁育周期较长、受气候和环境因素影响大等缺点; 且经多代繁殖后, 易造成病原微生物积累, 影响手指柠檬种苗质量以及后续果实的产量和品质。因此, 传统的手指柠檬种苗繁育方式无法满足大面积种植的需求。植物组织培养具有繁殖效率高、生长周期短、种苗繁育不受地域与时间限制以及可保持母本优良性状等优点, 已广泛应用于多种园艺作物

种苗的快速繁育(Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018; 任露露等, 2023)。因此, 利用植物组织培养技术建立手指柠檬离体再生体系对于手指柠檬优质种苗规模化繁育、种质资源保存以及优良品种快速推广具有重要意义。目前, 手指柠檬相关研究集中在果实营养成分分析, 对其离体再生和遗传改良的研究极少。本研究以手指柠檬无菌苗茎段为外植体, 通过诱导愈伤组织增殖、诱导不定芽以及不定芽生根, 建立了高效稳定的手指柠檬再生体系, 以期为其种苗快繁及生物技术育种奠定基础。

1 植物材料

实验材料绿水晶手指柠檬(*Citrus australasica* F. Muell.)种子采自海南春蕾天涯果业有限公司基地。人工洗净种子表面的黏液, 于阴凉处自然晾干, 贮藏于4°C冰箱备用。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体处理

取绿水晶手指柠檬种子, 在超净工作台上先用75%乙

收稿日期: 2023-05-12; 接受日期: 2023-09-19

基金项目: 浙江省自然科学基金(No.LY19C130003)

* 通讯作者。E-mail: haitao-hu@zjnu.cn

醇消毒1分钟, 然后用0.1% HgCl₂消毒20分钟, 最后用无菌水冲洗5次。将消毒后的种子接种到配方为MS+30.0 g·L⁻¹蔗糖的培养基上, 置于(25±2)°C组培室内培养60天。选择长势良好的无菌苗, 用解剖刀切取长度为0.5–1 cm茎段用于愈伤组织诱导培养。

2.2 不定芽诱导

待无菌苗长至3–5 cm时, 用无菌解剖刀切取0.5–1 cm茎段。将茎段接种到分别添加NAA (0、0.1和0.5 mg·L⁻¹)与6-BA (0.1、0.5、1.0、2.0和4.0 mg·L⁻¹)以及NAA (0、0.1和0.5 mg·L⁻¹)与玉米素(zeatin, ZT) (0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0和6.0 mg·L⁻¹)不同浓度组合配比的1/2MS培养基上, 以接种到不添加任何激素的1/2MS培养基为对照。每皿接种6个外植体, 实验重复3次。3周后统计茎段愈伤组织再生率, 5周后统计不定芽再生率及每外植体平均再生不定芽数。所有培养基在全自动高压灭菌锅121°C、105 kPa条件下灭菌20分钟。培养条件: 14天暗培养, 再转入(25±1)°C、光照强度为100 μmol·m⁻²·s⁻¹、光周期为16小时光照/8小时黑暗条件下培养。

愈伤组织形成率=(形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100%;

不定芽再生率=(再生不定芽外植体数/接种外植体数)×100%;

每外植体平均再生芽数(个)=外植体再生不定芽总数/再生外植体总数。

2.3 培养基种类对不定芽形成的影响

取5周苗龄的无菌苗茎段, 分别接种到1/2MS、MS、MT、White和WPM五种不同的基本培养基上。5种基本培养基中均添加4.0 mg·L⁻¹ ZT、30.0 g·L⁻¹蔗糖和7.0 g·L⁻¹琼脂(pH5.8)。每皿接种6个外植体, 实验重复3次。5周后统计不定芽再生率及每外植体平均再生不定芽数。

2.4 暗培养时间对不定芽形成的影响

取5周苗龄的无菌苗茎段, 接种到配方为1/2MS+4.0 mg·L⁻¹ ZT+30.0 g·L⁻¹蔗糖的培养基上, 分别进行7、14、21和28天暗培养后转入光下培养, 以不进行暗培养为对照。每皿接种6个外植体, 实验重复3次。5周后统计不定芽再生率及每外植体平均再生不定芽数。

2.5 生根诱导及炼苗移栽

取长度为1.5–2 cm的不定芽, 接种于添加NAA (0.05、0.1、0.3、0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹)和30.0 g·L⁻¹蔗糖的1/2MS培养基(pH5.8)上, 以空白培养基作为对照。每个培养瓶接种6个外植体, 实验重复3次。4周后统计不定芽的生根率及平均再生不定根数。

不定芽生根率=(生根的植株数/接种植株总数)×100%;

平均再生不定根数(个)=再生不定根总数/生根芽数。

待再生植株的根长至3–5 cm时进行炼苗移栽。先打开封口膜, 在培养室内炼苗3天, 然后将培养瓶置于自然环境中炼苗4天。用镊子从培养瓶中取出苗, 洗净根上残留的培养基, 移栽至纯泥炭土、泥炭土:珍珠岩=2:1:1 (v/v/v)、泥炭土:珍珠岩=3:1 (v/v)以及泥炭土:蛭石=2:1 (v/v) 4种不同基质中, 置于(25±2)°C、光周期为12小时光照/12小时黑暗的培养箱中培养。每处理移栽12株苗, 实验重复3次。5周后统计移栽成活率及幼苗生长状况。

移栽成活率=(成活苗数/移栽苗数)×100%。

2.6 数据分析

采用Microsoft Excel软件进行数据处理。用SPSS 20.0软件进行差异显著性分析。

3 结果与讨论

3.1 不同激素组合对不定芽诱导的影响

细胞分裂素与生长素的浓度及配比是影响植物离体再生的关键因素。本研究采用不同浓度6-BA和NAA组合(表1)对手指柠檬茎段(图1A)进行离体不定芽诱导, 考查不同浓度细胞分裂素与生长素配比下茎段离体再生状况。结果表明, 在添加不同浓度6-BA和NAA的1/2MS培养基上, 手指柠檬茎段切口部位2周后开始膨大, 并有愈伤组织形成(图1B)。3周后, 外植体脱分化形成的愈伤组织紧致且颜色呈淡黄色, 并开始形成再生芽(图1C); 5周后诱导出大量不定芽(图1D)。当NAA浓度为0 mg·L⁻¹、6-BA浓度为0.5 mg·L⁻¹和1.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织形成率达100%。当添加0 mg·L⁻¹ NAA和1.0 mg·L⁻¹ 6-BA时, 5周后不定芽形成率最高达94.43%, 每外植体平均再生芽数为2.53 (表1)。与

表1 不同浓度NAA与6-BA配比对手指柠檬茎段愈伤组织诱导及不定芽增殖的影响**Table 1** Effects of NAA and 6-BA ratio at different concentrations on *Citrus australasica* callus induction and adventitious bud proliferation

No.	NAA (mg·L ⁻¹)	6-BA (mg·L ⁻¹)	3 weeks		5 weeks		Growth condition
			Callus induction rate (%)	Rate of adventitious bud differentiation (%)	Frequency of bud differentiation		
1	0	0	61.11	55.57±5.57 cde	1.57±0.29 bc	++	
2	0	0.5	100.00	72.23±5.53 efg	2.08±0.08 de	++++	
3	0	1.0	100.00	94.43±5.57 g	2.53±0.03 e	++++	
4	0	2.0	91.67	55.57±5.57 cde	1.19±0.10 ab	++	
5	0	4.0	58.33	27.73±5.57 abc	1.17±0.17 ab	+	
6	0.1	0.5	58.33	61.13±5.57 def	2.36±0.07 de	+++	
7	0.1	1.0	66.67	44.43±5.57 bcde	1.89±0.11 bce	++	
8	0.1	2.0	75.00	44.47±11.17 bcde	2.00±0.29 bce	++	
9	0.1	4.0	41.67	16.70±0.00 a	1.17±0.29 ab	+	
10	0.5	0.5	66.67	55.57±5.57 cde	2.33±0.19 de	+++	
11	0.5	1.0	91.67	66.67±9.61 ef	2.57±0.23 e	+++	
12	0.5	2.0	33.33	33.33±9.61 abcd	1.61±0.20 bc	++	
13	0.5	4.0	33.33	22.23±5.53 ab	1.17±0.17 ab	+	

+: 长势差; ++: 长势一般; +++: 长势好; ++++: 长势非常好。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

+: Poor; ++: General; +++: Good; ++++: Particularly good. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

对照相比, 添加高浓度6-BA对手指柠檬不定芽形成无显著促进作用, 甚至抑制愈伤组织及不定芽的形成(表1)。

不同浓度ZT对手指柠檬茎段离体再生芽的诱导及增殖效果优于6-BA(图1E-H; 表2), 当培养基中不添加NAA或添加0.1 mg·L⁻¹ NAA、ZT浓度为4.0 mg·L⁻¹时愈伤组织形成率达100%, 不定芽再生率达100%, 每外植体平均再生芽数可达4.43, 且丛生芽长势强, 苗健壮, 叶色浓绿(图1H)。添加NAA对手指柠檬茎段愈伤组织和再生芽的诱导效果不明显, 较高浓度的NAA反而会抑制不定芽再生。综上, 以1/2MS为基本培养基、添加4.0 mg·L⁻¹ ZT为手指柠檬茎段离体不定芽诱导的适宜培养基。

3.2 不同培养基种类对不定芽形成的影响

基本培养基成分对手指柠檬不定芽再生率及每外植体平均再生不定芽数有显著影响(表3)。其中1/2MS培养基对手指柠檬茎段离体再生芽的诱导效果最好, 诱导率达100%, MS和MT次之, White最差。培养5周后, 在1/2MS培养基上, 再生不定芽数达4.57, 不定芽生长健

壮, 叶片嫩绿、舒展且无卷曲。基于不定芽的再生率及生长情况, 我们选择1/2MS为适宜的基本培养基。

3.3 暗培养时间对不定芽形成的影响

前期预实验显示, 一定时间的暗培养对手指柠檬离体再生不定芽具有明显的促进作用。因此, 我们设置了暗培养时间梯度, 考查暗培养对手指柠檬不定芽形成的影响。结果显示, 暗培养有利于手指柠檬愈伤组织的生长, 且诱导出的愈伤组织较对照形成早、量大、颜色浅。但在暗培养过程中手指柠檬外植体形成的不定芽数量少, 长势一般。当暗处理结束后转到光下4-5天, 愈伤组织颜色变深, 接近对照, 2周后开始有不定芽分化, 长势优于不经暗处理的外植体。其中, 暗培养14天效果最好, 5周后不定芽形成率达100%, 平均芽数为4.83。当暗培养时间延长到28天, 不定芽形成率降低到38.87%, 平均再生芽数降为2.33(表4)。

在上述优化后的培养基上, 先经过14天暗培养, 然后转到光下培养, 手指柠檬茎段愈伤组织诱导率及不定芽再生率均达到100%, 再生不定芽数达4.83(图2A, B)。

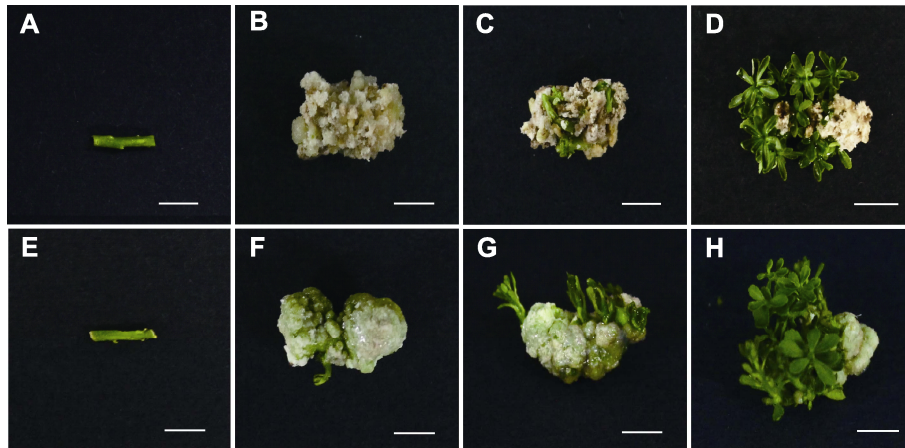


图1 手指柠檬愈伤组织诱导及不定芽分化

(A)–(D) 手指柠檬茎段在添加6-BA的1/2MS培养基上的离体再生过程 (A) 手指柠檬茎段外植体; (B) 培养3周后, 茎段诱导出愈伤组织; (C) 培养4周后, 愈伤组织分化出不定芽; (D) 培养5周后, 诱导出大量不定芽; (E)–(H) 手指柠檬茎段在添加ZT的1/2MS培养基上的离体再生过程 (E) 手指柠檬茎段外植体; (F) 培养3周后, 茎段分化出愈伤组织; (G) 培养4周后, 愈伤组织分化出不定芽; (H) 培养5周后, 诱导出大量不定芽。Bars=0.5 cm

Figure 1 Callus induction and adventitious bud differentiation of *Citrus australasica*

(A)–(D) *In vitro* regeneration process of *C. australasica* on 1/2MS medium with 6-BA (A) Stem explant of *C. australasica*; (B) The stem segments differentiated into callus after 3 weeks; (C) Adventitious buds were induced from the callus after 4 weeks; (D) Adventitious buds were induced after 5 weeks; (E)–(H) *In vitro* regeneration process of *C. australasica* on 1/2MS medium with ZT (E) Stem explant of *C. australasica*; (F) The stem segments differentiated into callus after 3 weeks; (G) Adventitious buds were induced from the callus after 4 weeks; (H) Adventitious buds were induced after 5 weeks. Bars=0.5 cm

表2 不同浓度NAA与ZT配比对手指柠檬茎段愈伤组织诱导及不定芽增殖的影响

Table 2 Effects of NAA and ZT ratio at different concentrations on *Citrus australasica* stem callus induction and adventitious bud proliferation

No.	NAA (mg·L ⁻¹)	ZT (mg·L ⁻¹)	3 weeks		5 weeks		Growth condition
			Callus induction rate (%)	Rate of adventitious bud differentiation (%)	Frequency of bud differentiation		
1	0	0	61.11	55.57±5.57 b	1.56±0.29 a	++	
2	0	0.5	77.80	77.76±5.53 c	3.53±0.42 cdef	+++	
3	0	1.0	83.30	88.87±5.57 c	3.63±0.75 cdef	++++	
4	0	2.0	100.00	100.00±0.00 c	3.94±0.92 def	++++	
5	0	3.0	100.00	100.00±0.00 c	3.94±0.53 defg	+++	
6	0	4.0	100.00	100.00±0.00 c	4.43±0.50 fg	++++	
7	0	5.0	100.00	100.00±0.00 c	4.24±0.20 fg	+++	
8	0	6.0	83.33	77.77±5.53 c	3.19±0.19 bcdef	+++	
9	0.1	0.5	88.90	77.76±5.53 c	2.50±0.30 abcde	++	
10	0.1	1.0	100.00	100.00±0.00 c	3.55±0.48 cdef	++++	
11	0.1	2.0	100.00	100.00±0.00 c	3.28±0.79 cdef	+++	
12	0.1	3.0	100.00	100.00±0.00 c	3.28±0.46 bcdef	+++	
13	0.1	4.0	94.44	94.43±5.57 c	4.21±0.45 efg	++++	
14	0.1	5.0	94.44	88.87±5.57 c	3.42±0.14 cdef	+++	
15	0.1	6.0	66.67	61.10±5.55 b	2.69±0.26 abd	+++	
16	0.5	0.5	100.00	72.20±11.10 bc	1.49±0.16 ab	++	
17	0.5	1.0	85.70	33.33±8.33 a	1.50±0.50 ab	++	
18	0.5	2.0	88.90	50.00±9.64 ab	1.83±0.29 abc	++	
19	0.5	3.0	88.89	50.00±9.64 ab	1.83±0.17 ab	++	

表2 (续)

Table 2 (continued)

No.	NAA (mg·L ⁻¹)	ZT (mg·L ⁻¹)	3 weeks		5 weeks		Growth condition
			Callus induction rate (%)	Rate of adventitious bud differentiation (%)	Frequency of bud differentiation		
20	0.5	4.0	83.33	88.87±5.57 c	2.86±0.17 abcde	+++	
21	0.5	5.0	50.00	44.43±5.57 ab	2.27±0.37 abc	++	
22	0.5	6.0	33.33	27.77±5.53 a	2.11±0.11 abc	+	

ZT: 玉米素。+, ++, +++和++++同表1。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

ZT: Zeatin. +, ++, +++ and ++++ are the same as shown in Table 1. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

表3 不同基本培养基对手指柠檬茎段愈伤组织诱导及不定芽增殖的影响

Table 3 Effects of different basic media on callus induction and adventitious bud proliferation of *Citrus australasica*

No.	Different media	3 weeks		5 weeks		Growth condi- tion
		Callus induction rate (%)	Rate of adventitious bud differentiation (%)	Frequency of bud differentiation		
1	1/2MS	100.00	100.00±0.00 a	4.57±0.33 a	++++	
2	MT	83.30	61.13±5.57 b	3.57±0.24 b	+++	
3	MS	100.00	88.87±5.57 ab	3.64±0.38 b	+++	
4	WPM	83.30	72.23±5.53 bc	2.83±0.17 bc	+++	
5	White	66.70	33.33±0.00 e	1.56±0.29 c	+	

+, +++和++++同表1。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

+, +++ and ++++ are the same as shown in Table 1. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

表4 暗培养处理对手指柠檬茎段愈伤组织诱导及不定芽增殖的影响

Table 4 Effects of dark treatment on callus induction and adventitious bud proliferation of *Citrus australasica*

No.	Dark treatment (day)	3 weeks		5 weeks		Growth condition
		Callus induction rate (%)	Rate of adventitious bud differentiation (%)	Frequency of bud differentiation		
1	0	55.57±5.57 a	44.43±5.57 a	2.28±0.15 a	++	
2	7	88.87±5.57 b	83.33±9.61 bc	3.50±0.21 b	+++	
3	14	100.00±0.00 b	100.00±0.00 c	4.83±0.38 c	++++	
4	21	94.43±5.57 b	66.70±0.00 b	2.75±0.38 a	++	
5	28	100.00±0.00 b	38.87±5.57 a	2.33±0.33 a	++	

++, +++和++++同表1。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

++, +++ and ++++ are the same as shown in Table 1. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

3.4 生根培养与炼苗移栽

取生长健壮且长势一致的手指柠檬再生不定芽, 接种到添加不同浓度NAA的1/2MS生根培养基上进行不定根诱导。结果显示, 不同浓度NAA处理对手指柠檬不定根诱导的影响显著(表5)。手指柠檬再生芽在未添加NAA的培养基上生根率很低。在添加NAA培养基上培养2周后不定芽开始生根, 根系细长, 多数为白色, 部分为黄色(图3A, B)。培养4周后, 随着NAA浓度的增加, 不定根诱导率呈现先升高后降低, 当NAA浓

度为0.5 mg·L⁻¹时, 生根率最高为94.43%, 平均生根数为3.9。结果表明, 添加一定浓度的NAA对手指柠檬不定根诱导有显著的促进作用, 其中以0.5 mg·L⁻¹ NAA处理下生根率和平均根数最高, 且不定根长势较好(图3C)。再生不定芽生根后进行炼苗移栽, 先打开培养瓶的瓶盖, 于温室内炼苗1周, 洗净再生植株根部的培养基, 移植到装有草炭:珍珠岩:蛭石=2:1:1 (v/v/v)混合基质的营养钵中, 用塑料袋套住营养钵以保温保湿, 30天后移栽成活率在90%以上(图3D)。

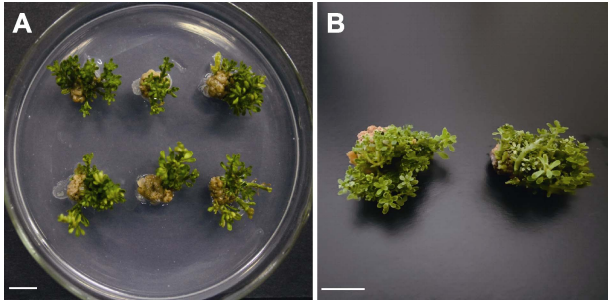


图2 手指柠檬茎段在优化后的培养基上不定芽再生状况
手指柠檬茎段在配方为 $1/2MS+5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的优化培养基上暗处理14天, 光下培养5周(A)和8周(B)离体不定芽的再生情况。ZT: 玉米素。Bars=1 cm

Figure 2 Adventitious buds from stem explants of *Citrus australasica* on optimized medium

After 14 days dark treatment, adventitious buds from stem explants of *C. australasica* on $1/2MS+5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, 5 weeks (A) and 8 weeks (B) in the light. ZT: Zeatin. Bars=1 cm

表5 不同浓度NAA对手指柠檬不定芽生根的影响

Table 5 Effects of NAA concentration on rooting induction of *Citrus australasica* adventitious buds

No.	NAA concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rooting rate (%)	Average rooting number	Growth condition
1	0	16.70±0.00 d	0.97±0.21 d	+
2	0.05	38.87±9.64 c	2.02±0.24 c	++
3	0.1	44.43±9.64 c	2.07±0.15 c	++
4	0.3	77.77±9.58 b	3.03±0.13 b	++
5	0.5	94.43±9.64 a	3.90±0.20 a	++++
6	1	61.13±9.64 c	2.35±0.40 c	+++

+, ++, +++和++++同表1。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

+, ++, +++ and ++++ are the same as shown in Table 1. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

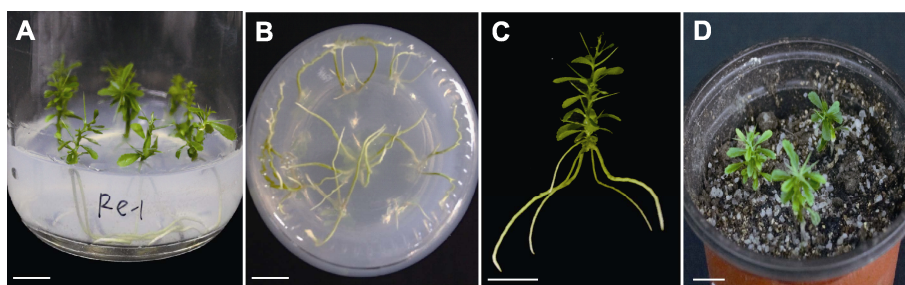


图3 手指柠檬再生植株的生根与移栽
(A), (B) 不定根诱导; (C) 再生植株; (D) 移栽成活的植株。Bars=1 cm

Figure 3 Rooting and transplanting of *Citrus australasica* regenerated plants

(A), (B) Adventitious root induction; (C) Regenerated plants; (D) Transplant survived plants. Bars=1 cm

3.5 讨论

植物离体培养体系的构建对种质资源保护、品种改良以及优质种苗的快速繁殖均具有重要意义(逯锦春等, 2022; Long et al., 2022)。目前, 柑橘属植物的组织培养研究较为广泛, 但有关手指柠檬组织培养的研究较少。本研究从植物生长调节剂组合、培养基类型、蔗糖浓度及暗培养时间等因素对手指柠檬茎段的离体再生进行研究, 建立了手指柠檬离体再生体系, 该体系为手指柠檬种苗繁育及遗传转化奠定了基础。

众所周知, 外源细胞分裂素和生长素在植物离体再生中发挥关键作用(Bernula et al., 2020; Raspor et al., 2021)。细胞分裂素与生长素协同作用促进离体细胞的增殖, 高细胞分裂素/生长素比值促进不定芽的形成(Skoog and Miller, 1957; Long et al., 2022)。6-BA常被用于柑橘属植物离体诱导不定芽的分化(Poles et al., 2020; Conti et al., 2021)。Huang等(2002)

研究表明,添加6-BA是柚子(*C. maxima*)叶片不定芽再生的必要条件;在未添加6-BA的培养基上,脱分化的愈伤组织未分化出不定芽。Peña等(2004)在卡里佐枳橙的间接器官发生实验中发现,培养基中添加6-BA明显促进其脱分化响应和不定芽的形成。Jardak等(2020)在构建突尼斯血橙的离体再生和遗传转化体系时,发现适宜的6-BA与IAA浓度比例可使再生不定芽的诱导效果达到最佳,4.0 mg·L⁻¹ 6-BA与0.3 mg·L⁻¹ IAA配比时用茎段诱导的不定芽数达25.0。本研究选择6-BA和ZT分别与NAA组合处理,结果发现6-BA对手指柠檬茎段愈伤组织诱导和不定芽分化有促进作用。但在添加6-BA的培养基上诱导出的不定芽叶色泛黄且叶片边缘卷曲。我们推测6-BA对手指柠檬茎段不定芽的诱导有促进作用,但是对不定芽的后期生长有一定程度的影响。ZT与NAA组合诱导结果显示,在添加4.0 mg·L⁻¹ ZT的1/2MS培养基上手指柠檬愈伤组织的诱导率、不定芽形成率和每外植体平均再生芽数显著优于其它梯度组合,且再生不定芽长势好,叶色浓绿,茎秆粗壮。上述结果表明,在手指柠檬离体再生诱导中,ZT的诱导效果优于6-BA。

在光照条件下,外植体中的酚类物质易被多酚氧化酶氧化,导致组织褐变,对植物组织的离体再生产生不利影响(Long et al., 2022)。本研究表明,14天暗培养有利于手指柠檬茎段愈伤组织的诱导。暗培养有利于植物离体器官形成已在多种植物中被证实,如冰糖橙(*C. sinensis*) (范永梅等, 2003)、猕猴桃(*Actinidia chinensis*) (林颖等, 2012)、百合(*Lilium brownii*) (张旭红等, 2018)、欧李(*Cerasus humilis*) (张郎郎等, 2022)及苹果(*Malus pumila*) (常贝贝等, 2023)。研究表明,暗培养可能有助于维持外植体细胞内较高的生长素/细胞分裂素比值,促进外植体愈伤组织的形成(Zenser et al., 2001)。此外,暗培养导致外植体的细胞壁变薄和细胞壁沉积物减少,从而有利于外源激素进入细胞(Dai and Castillo, 2007)。

NAA已广泛应用于植物离体再生不定芽生根诱导。本研究表明,不同浓度NAA处理对手指柠檬不定芽生根诱导有显著影响。培养3周后,添加0.5 mg·L⁻¹ NAA的培养基上生根率达94.43%,根系较粗壮,平均根数为3.9。移栽基质的选择对于组培苗能否成活非常关键,不同植物对栽培基质的要求不同(张秀英等, 2022)。研究发现,最适合手指柠檬组培苗移栽的

基质为草炭:珍珠岩:蛭石=2:1:1 (v/v/v)的混合基质,移栽成活率在90%以上。草炭质地松软,并夹杂植物纤维,有机质和腐殖质含量高(杨圣涛等, 2021);蛭石可以增加基质的透气性,加速根系呼吸,为幼苗生长提供良好的环境(魏佳等, 2022)。

本研究以手指柠檬无菌苗茎段为外植体,通过优化不同浓度配比的植物生长调节剂组合、基本培养基类型及暗培养时间,建立了手指柠檬的离体再生体系。该体系的建立可有效解决手指柠檬规模化生产种苗资源紧缺的难题,为今后通过生物技术手段进行手指柠檬遗传改良奠定了基础。

参考文献

- 常贝贝, 屈宜宝, 王智宇, 程晓帆, 杜晓云, 于晓丽, 赵玲玲, 张硕 (2023). 2个苹果新品种高效再生体系建立. 分子植物育种. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220722.1647.008.html>.
- 范永梅, 甘霖, 邓秀新 (2003). 冰糖橙胚性愈伤组织的诱导与植株再生. 华中农业大学学报 22, 399–402.
- 林颖, 龙自立, 张璐, 叶庆富, 刘永立 (2012). 猕猴桃胚乳再生植株体系的优化. 核农学报 26, 257–261, 310.
- 逯锦春, 曹丽娜, 佟冠杰, 王鑫颖, 张利英, 喻铨, 李荟芳, 李彦慧 (2022). 大花银莲花愈伤组织诱导及再生体系的建立. 植物学报 57, 217–226.
- 任露露, 张有泽, 黄克林, 宛晓春, 张照亮, 朱木兰, 韦朝领 (2023). 茶树茎段不定芽高效发生体系的建立. 植物学报 58, 308–315.
- 魏佳, 路天宇, 王朝胜, 张红叶, 张晶, 王顺利, 李润芝 (2022). 不同粒级园艺基质原料物理性质差异分析. 北京农学院学报 37(4), 13–18.
- 杨圣涛, 吕岩, 贺元源, 刘婷婷, 马晓祯 (2021). 基于CT扫描的草炭土孔隙结构分析及渗流模拟. 工程地质学报 29, 1354–1365.
- 张郎郎, 张洁, 吕虹霖, 谭彬, 王伟, 程钧, 冯建灿 (2022). 欧洲李叶片再生体系的建立. 果树学报 39, 1945–1953.
- 张秀英, 鲁兴凯, 程安富, 胡志芳, 马勉娣, 张丹, 黄国嫣, 陈晨, 全勇, 汪琼 (2022). 基质对苹果砧木M26脱毒组培苗移栽成活率和生长的影响. 中国南方果树 51(5), 150–153.
- 张旭红, 王嶙, 梁振旭, 孙美玉, 张金政, 石雷 (2018). 欧洲百合愈伤组织诱导及植株再生体系的建立. 植物学报 53, 840–847.
- Bernula D, Benkő P, Kaszler N, Domonkos I, Valkai I,

- Szöllősi R, Ferenc G, Ayaydin F, Fehér A, Gémes K** (2020). Timely removal of exogenous cytokinin and the prevention of auxin transport from the shoot to the root affect the regeneration potential of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **140**, 327–339.
- Cioni E, Migone C, Ascrizzi R, Muscatello B, De Leo M, Piras AM, Zambito Y, Flamini G, Pistelli L** (2022). Comparing metabolomic and essential oil fingerprints of *Citrus australasica* F. Muell (Finger Lime) varieties and their *in vitro* antioxidant activity. *Antioxidants (Basel)* **11**, 2047.
- Conti G, Xoconostle-Cázares B, Marcelino-Pérez G, Hopp HE, Reyes CA** (2021). *Citrus* genetic transformation: an overview of the current strategies and insights on the new emerging technologies. *Front Plant Sci* **12**, 768197.
- Dai WH, Castillo C** (2007). Factors affecting plant regeneration from leaf tissues of buddleia species. *HortScience* **42**, 1670–1673.
- Huang T, Peng SL, Dong GF, Zhang LY, Li GG** (2002). Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): effects of auxins in callus induction medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **69**, 141–146.
- Jardak R, Boubakri H, Zemni H, Gandoura S, Mejri S, Mliki A, Ghorbel A** (2020). Establishment of an *in vitro* regeneration system and genetic transformation of the Tunisian 'Maltese half-blood' (*Citrus sinensis*): an agro-economically important variety. *3 Biotech* **10**, 99.
- Long Y, Yang Y, Pan GT, Shen YO** (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Front Plant Sci* **13**, 926752.
- Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N** (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Plant Cell Culture Protocols*. New York: Humana Press. pp. 3–13.
- Peña L, Pérez RM, Cervera M, Juárez JA, Navarro L** (2004). Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Ann Bot* **94**, 67–74.
- Poles L, Licciardello C, Distefano G, Nicolosi E, Gentile A, La Malfa S** (2020). Recent advances of *in vitro* culture for the application of new breeding techniques in citrus. *Plants (Basel)* **9**, 938.
- Raspor M, Motyka V, Kaleri AR, Ninković S, Tubić L, Cingel A, Čosić T** (2021). Integrating the roles for cytokinin and auxin in *de novo* shoot organogenesis: from hormone uptake to signaling outputs. *Int J Mol Sci* **22**, 8554.
- Skoog F, Miller CO** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118–130.
- Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J** (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11795–11800.

Establishment of *In Vitro* Regeneration System of *Citrus australasica*

Chungang Xie^{1,2}, Zhe Liu¹, Shusheng Zhang³, Haitao Hu^{1*}

¹College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ²Wildlife Protection and Management Station, Jinhua Municipal Bureau of Planning and Natural Resources, Jinhua 321052, China; ³The Management Center of Wuyanling National Natural Reserve in Zhejiang, Taishun 325500, China

Abstract In order to establish the regeneration system of *Citrus australasica*, the effects of different plant growth regulators combinations, medium types and dark culture time on callus induction and plant regeneration of *C. australasica* were studied using stem segments as explants. The results showed that the best medium for adventitious bud induction was 1/2MS+4.0 mg·L⁻¹ ZT+30.0 g·L⁻¹ sucrose. Dark culture for 14 days and then light culture had the best promoting effect. The induction rate of callus and adventitious bud was 100%, and the average number of adventitious bud regeneration per explants was 4.83. The optimal rooting medium was 1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA, and the regenerated plants with the 94.43% rooting rate were obtained, and the average number of roots was 3.9. In the mixture of grass carbon:perlite:vermiculite=2:1:1 (v/v/v), tissue culture seedlings had the best growth, and the survival rate was more than 90%. This study established *in vitro* regeneration system of *C. australasica*, which laid the foundation for the genetic improvement and rapid propagation of *C. australasica* fine varieties.

Key words *Citrus australasica*, stem segment, tissue culture, *in vitro* regeneration

Xie CG, Liu Z, Zhang SS, Hu HT (2023). Establishment of *in vitro* regeneration system of *Citrus australasica*. *Chin Bull Bot* **58**, 926–934.

* Author for correspondence. E-mail: haitao-hu@zjnu.cn

(责任编辑: 白羽红)