

继代次数对荔枝胚性愈伤组织体胚诱导及重要有机物代谢的影响

孙秋容^{1,2,3}, 王 果^{2,3}, 高兆银⁴, 王树军^{2,3}, 李焕苓^{2,3}, 张红娜¹, 李晓旭^{2,3*}, 王家保^{3,4*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101; 3. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南海口 571101; 4. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101

摘 要: 长期继代保存会对多种植物的体胚发生效率产生影响, 但目前在荔枝 (*Litchi Chinensis* Sonn.) 上尚未见相关研究报道。本研究旨在明确继代次数对荔枝胚性愈伤组织 (embryogenic callus, EC) 体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis, SE) 的影响, 揭示其胚性衰退的代谢基础, 为提高愈伤组织体胚发生效率提供理论依据。本研究以妃子笑荔枝不同继代次数 (继代 11、22、48、65、86 代) 愈伤组织为材料, 测定其体胚诱导率及表型状态, 分析可溶性糖、有机酸、游离氨基酸及能量物质含量的动态变化。结果显示: 继代次数对荔枝愈伤组织的体胚发生具有显著影响, 体胚诱导率随继代次数的增加呈先升高后降低的趋势, 同时对正常体胚 (单子叶胚、双子叶胚和多子叶胚) 的诱导数量也有显著影响。在 5 组材料中, J22 的体胚诱导率最高, 为 257.33%, 乳白胚数量最多。蔗糖含量与体胚诱导率呈显著正相关, 是荔枝体胚发生的关键碳源, 可溶性糖含量的变化主要源于蔗糖含量的变化。低继代次数材料 (J11 和 J22) 在体胚诱导中后期, 柠檬酸、琥珀酸和苹果酸含量显著下降, 表明其 TCA 循环通量要强于高继代次数材料 (J48、J65 和 J86)。在体胚诱导过程中, 愈伤组织中的总氨基酸含量先上升后趋于平稳, 总体上, 低继代次数材料 EC 总氨基酸含量要高于高继代次数材料。低继代次数材料中 2 种主要氨基酸 (谷氨酰胺和丙氨酸) 含量显著高于高继代次数材料。此外, 腺苷三磷酸 (ATP)、腺苷二磷酸 (ADP)、腺苷一磷酸 (AMP) 含量均表现出先增加后降低的趋势, 其中 AMP 含量最高。低继代次数材料愈伤组织中 AMP 含量在体胚诱导 0~49 d 时均显著高于高继代次数材料, 其中 J22 愈伤组织 AMP 的含量最高。这些结果表明, 继代次数是荔枝愈伤组织体胚发生的关键影响因素。长期继代通过影响能量供应与氨基酸代谢, 导致荔枝愈伤组织胚性衰退。

关键词: 荔枝; 愈伤组织; 继代次数; 体胚发生; 代谢调控

中图分类号: S667.1 **文献标志码:** A

Effects of Subculture Times on Somatic Embryogenesis and Key Organic Substance Metabolism in Litchi Embryogenic Callus

SUN Qiurong^{1,2,3}, WANG Guo^{2,3}, GAO Zhaoyin⁴, WANG Shujun^{2,3}, LI Huanling^{2,3}, ZHANG Hongna¹, LI Xiaoxu^{2,3*}, WANG Jiabao^{3,4*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Institute of Environment and Plant Protection Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Institute of Tropical Crops Germplasm Resources Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

收稿日期 2025-09-21; 接受日期 2025-10-19

基金项目 海南省科技专项 (No. ZDYF2022XDNY253); 国家自然科学基金项目 (No. 32402522); 国家荔枝龙眼产业技术体系项目 (No. CARS-32)。

作者简介 孙秋容 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 荔枝离体再生机制。*通信作者 (Corresponding author): 王家保 (WANG Jiabao), E-mail: wangjiabao@catas.cn; 李晓旭 (LI Xiaoxu), E-mail: lixiaoxu@catas.cn。

Abstract: Long-term subculture preservation significantly impacts somatic embryogenesis (SE) in various plant species. Studies on its effects in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) remain scarce. This study aimed to investigate the effects of subculture times on SE in litchi embryogenic callus (EC) and to uncover the metabolic basis for its decline, thereby providing a theoretical foundation for improving SE efficiency. Using 'Feizixiao' litchi EC materials from different subculture times (denoted as J11, J22, J48, J65 and J86). Somatic embryo induction rate, phenotypic characteristics, and dynamic changes in soluble sugars, organic acids, free amino acids, and energy-related substances were measured. The results showed that subcultures times significantly influenced SE in litchi EC. The embryo induction rate initially increased and then decreased with increasing subculture times, while the yield of normal somatic embryos (monocotyledonous, dicotyledonous, and polycotyledonous embryos) was also significantly affected. Among the five groups, J22 exhibited the highest induction rate (257.33%) and the greatest number of milky-white embryos. Sucrose content showed a significant positive correlation with SE, highlighting its role as the key carbon source for litchi SE. Fluctuations in soluble sugar content were primarily attributed to variations in sucrose. Low-subculture materials (J11 and J22) showed significant decreases in citric acid, succinic acid, and malic acid during the middle-late SE induction stages, indicating a stronger tricarboxylic acid (TCA) cycle flux compared to high-subculture materials (J48, J65, J86). The total amino acid content in EC initially increased and then stabilized during SE induction, with low-subculture materials maintaining higher overall amino acid levels. The contents of two major amino acids (glutamine and alanine) were significantly more abundant in low-subculture materials. Furthermore, the contents of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) initially increased and then decreased, with AMP being the most abundant. Low-subculture materials maintained significantly higher AMP levels during the first 49 days of SE induction, particularly in J22. The results demonstrate that subculture times is a critical factor influencing SE in litchi EC. Long-term subculture induces embryogenic decline by impacting energy supply and amino acid metabolism.

Keywords: *Litchi chinensis* Sonn.; callus tissue; subcultures number; somatic embryogenesis (SE); metabolic regulation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.01.019

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是我国重要的南亚热带特色果树, 因其独特的风味和丰富的营养价值而具有极高的经济价值^[1], 在我国热带地区农业经济中占据重要地位^[2]。当前, 亟需选育丰产、稳产、优质、多抗及不同成熟期的荔枝新品种以满足产业发展的需求^[3-4]。近年来, 随着生物技术的快速发展, 体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis, SE) 技术因其繁殖速度快、嵌合体少等优势^[5], 已经成为利用荔枝基因编辑和遗传转化育种的重要途径^[6]。然而, 体胚分化效率低的问题严重制约了生物育种进程。

体胚诱导受多种因素调控^[7], 其中继代次数是关键影响因素之一^[8]。研究证实, 愈伤组织胚性维持与继代次数密切相关^[9-10], 但长期继代培养会导致胚性愈伤组织 (embryogenic callus, EC) 逐渐丧失体胚发生能力^[11]。例如, 楸树愈伤组织在长期继代过程中难以分化再生, 且生理生化代谢活性降低^[12]; 玉米继代 20 次的愈伤组织相较于继代 10 次的愈伤组织, 其生长量、胚性比率及再生率显著下降^[13]; 薰衣草愈伤组织持续继代培养, 第 5 代后其多能性与全能性下降, 正常形态发生潜能逐渐丧失^[14]; 东方百合组培苗随着继代次数的增加, 繁殖能力先有所递增后又缓慢下降^[15];

棉花胚性愈伤组织的继代时间不宜超过 15 a^[16]; 栓皮栎愈伤组织随着继代次数的增加, 再生体胚能力呈下降趋势^[17]。此外, 甘蔗^[18]、山竹^[19]、刺槐^[20]等植物强胚性的愈伤组织普遍具有高还原糖含量和活跃的蔗糖代谢特征, 其胚性维持与体胚分化受关键有机代谢物质的协同调控。

目前, 荔枝体胚发生研究已涉及内源的氨基酸动态^[21]、多胺变化规律^[22], 外源氨基酸添加^[23]、生长调节剂筛选^[24]以及基因型差异^[25]等方面, 但继代次数对荔枝体胚发生的影响尚未明确。本研究以不同继代次数的妃子笑荔枝愈伤组织为材料, 系统解析继代次数对体胚诱导率的影响, 从蔗糖代谢、TCA 循环、氨基酸代谢和能量供应等方面探讨长期继代荔枝愈伤组织胚性衰退的原因, 为优化荔枝离体再生体系、提高体胚发生效率提供理论依据, 对推动荔枝生物育种具有重要价值。

1 材料与方法

1.1 材料

于每年荔枝花期, 采集妃子笑荔枝铃铛花期雄花花药, 诱导胚性愈伤组织 (EC), 诱导培养基为 L₉ (MS+3 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+0.4 g/L LH+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼

脂)。愈伤组织在 M3 (MS+1 mg/L 2, 4-D) 和 M4 培养基上 (MS+1 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L KT+5 mg/L AgNO₃) 以 30 d 为 1 个周期交替继代保存。本研究启动时, 选取了 2015、2017、2019、2021、2023 年诱导的愈伤组织为试材, 继代次数分别为 11、22、48、65、86 次, 依次编号为 J11、J22、J48、J65、J86。

1.2 方法

1.2.1 荔枝愈伤组织的体胚诱导 所有愈伤组织均在相同条件下培养。将在 M3 培养基上培养 20 d 的 5 份不同继代次数愈伤组织, 分别精确称取 0.5 g, 转接至 10 皿基础体胚诱导培养基 T7 (MS+0.1 mg/L NAA+5 mg/L ZT+0.1 g/L 肌醇+100 mL/L 椰汁+0.4 g/L 水解乳蛋白+60 g/L 蔗糖+10 g/L 琼脂) 上, 49 d 时分别统计愈伤组织诱导获得的各种类型体胚数量。诱导的体胚总量以各类体胚数量之和表示。体胚诱导率(%)=形成的体胚数/接种愈伤组织量×100%。每组材料 10 皿为一个重复, 重复 3 次。

1.2.2 关键生理指标测定 在愈伤组织接种至 T7 培养基 0、20、49 d 时, 挑选状态一致的荔枝

EC 材料置于-80 ℃ 保存。依据植物组织蔗糖、果糖、葡萄糖含量检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 测定样品糖含量; 参考王思威等^[26]、莫亿伟等^[27]的方法, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定愈伤组织有机酸、氨基酸 (AAs) 及腺苷三磷酸 (ATP)、腺苷二磷酸 (ADP)、腺苷一磷酸 (AMP) 含量。可溶性糖含量=蔗糖+果糖+葡萄糖, 能荷=(ATP+0.5×ADP)/(ATP+ADP+AMP)。每指标测定设置 3 次生物学重复。

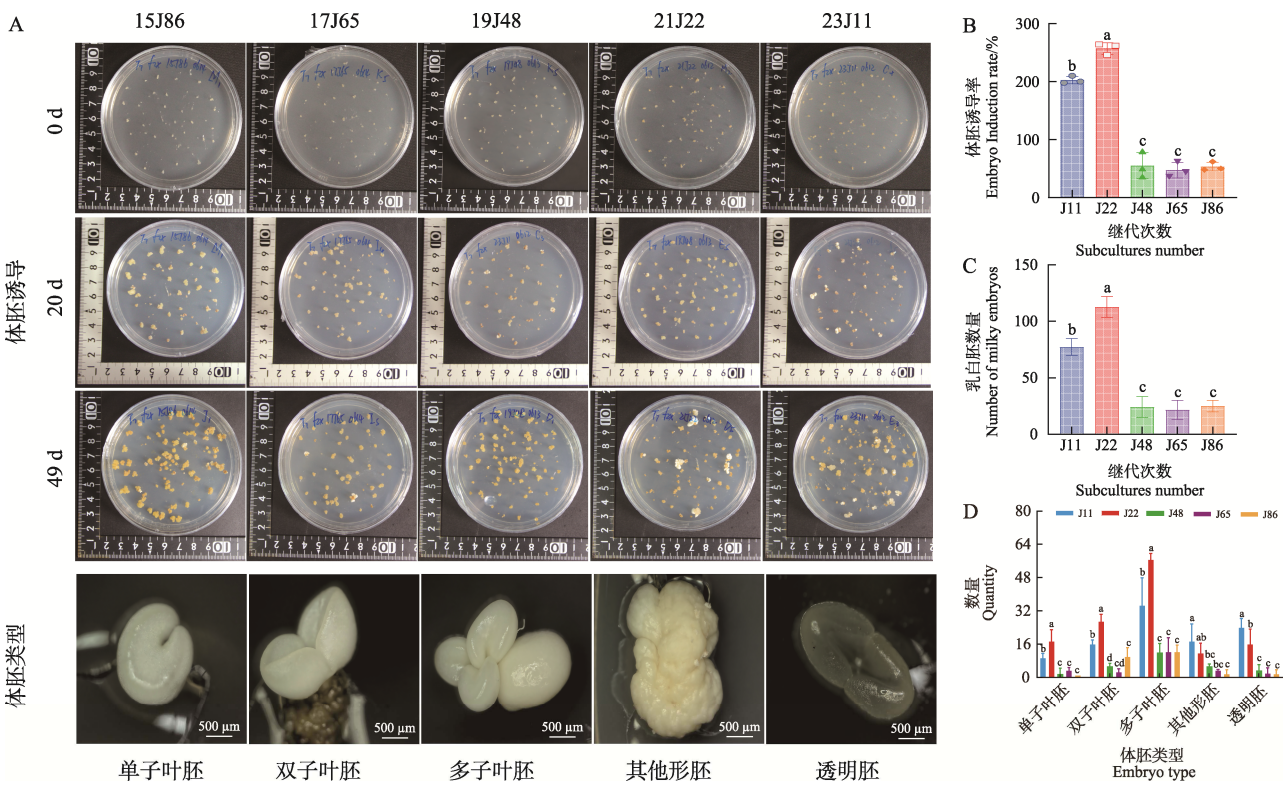
1.3 数据处理

本研究使用 Office 2013 和 SPSS 27.0 软件进行数据统计和单因素方差分析 (ANOVA), 采用 Duncan's 多重比较法进行差异显著性 ($P<0.05$) 测验。采用 Graph pad Prism 10.1.2 和 Adobe Illustrator 2025 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 继代次数影响荔枝愈伤组织的体胚诱导

由图 1 可知, 不同继代次数的愈伤组织的体胚诱导效率存在显著差异。体胚诱导 0 d 时, 5 份不同继代次数的愈伤组织均呈淡黄色颗粒状,



不同小写字母表示不同继代次数间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among different subculture times ($P<0.05$).

图 1 继代次数对荔枝体胚发生的影响

Fig. 1 Effect of subculture times on somatic embryogenesis in litchi

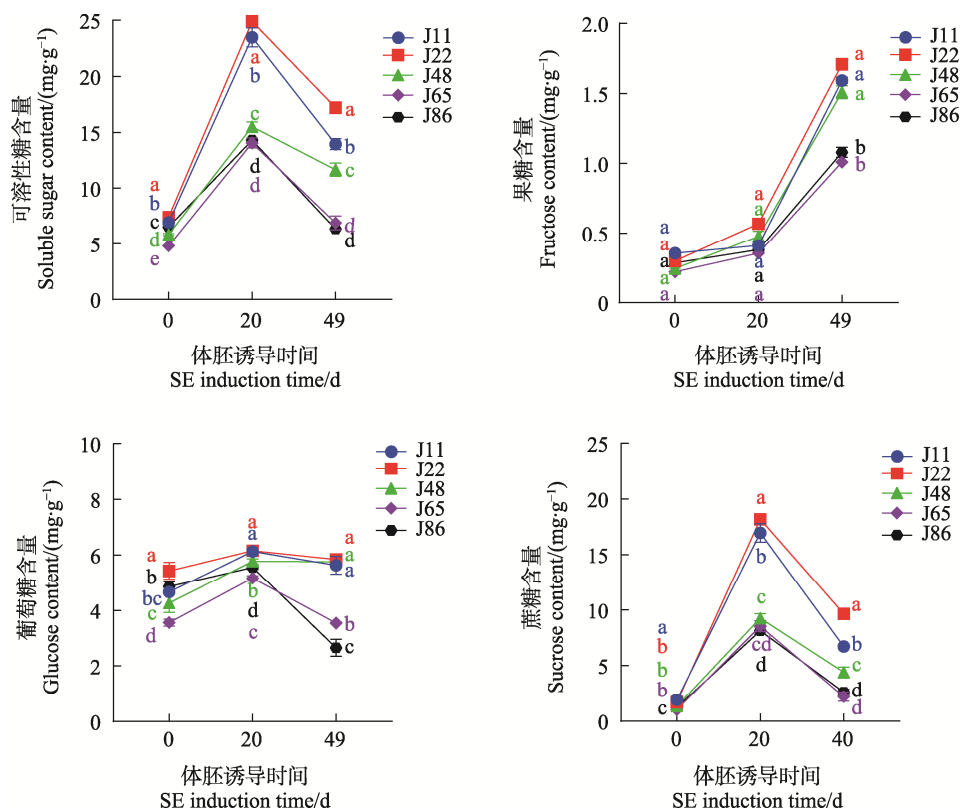
形态一致(图 1A)。体胚诱导 49 d 后, 继代 11、22、48、65、86 次的愈伤组织体胚诱导率分别为 202.67%、257.33%、55.33%、47.33%、53.33%, 继代 22 次的体胚诱导率达 257.33%, 显著高于其他组(图 1B)。此外, 继代次数与体胚诱导率的拟合曲线呈单峰, 体胚诱导率随着继代次数的增加呈先升后降, 最终趋于平缓的趋势, 二者存在显著相关性($R^2=0.9250$)。

不同继代次数的愈伤组织均能诱导出乳白胚(单子叶胚、多子叶胚、双子叶胚和其他形胚)。乳白胚的数量随继代次数的增加呈先增后减的趋势, 其中 J11、J22、J48、J65、J86 的材料分别产生 77、113、24、22 和 25 个乳白胚(图 1C)。具体而言, 单子叶胚数量依次为 17、9、2、3、1 个, 双子叶胚数量依次为 16、27、5、3、10 个, 多子叶胚数量依次为 35、57、12、12、12 个, 畸形胚数量依次为 9、17、2、3、2 个。低继代次数(J22 和 J11)的单子叶胚、双子叶胚、多子叶胚的体胚数量显著高于高继代次数(J48、J65 和 J86) ($P<0.05$), 其中 J22 组的多子叶胚的数量最多,

达 57 个/g(图 1D), 表明继代次数对荔枝 EC 各类型体胚的数量有显著影响。

2.2 不同继代次数愈伤组织中糖含量的变化

植物生长发育的碳源供应主要依赖于可溶性糖。由图 2 可知, 在体胚诱导过程中, 5 种材料的 EC 中可溶性糖含量、葡萄糖、蔗糖含量均先升高后降低, 而果糖含量则持续升高。J22、J11 的 EC 中可溶性糖含量均显著高于 J48、J65、J86 ($P<0.05$), 且体胚诱导 49 d 时可溶性糖含量较体胚诱导 20 d 有所下降, 表明体胚诱导过程需要消耗可溶性糖。体胚诱导过程中果糖含量逐渐增加, 体胚诱导 49 d 时随着继代次数的增加, EC 果糖含量依次为 1.59、1.71、1.51、1.15、1.08 mg/g, 呈先增加后降低的趋势。葡萄糖含量在体胚诱导 20 d 时达到较高水平, 依次为 6.12、6.15、5.77、5.16、5.55 mg/g。蔗糖含量的变化趋势与可溶性糖含量趋势基本一致, 表明在愈伤组织增殖和体胚发生过程中, 可溶性糖含量的变化主要受蔗糖含量影响。在体胚诱导过程中, 5 份不同继代次数愈伤材料中蔗糖含量呈先升后降的趋势。体胚



不同小写字母表示不同继代次数间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among different subculture times ($P<0.05$).

图 2 不同继代次数愈伤组织糖含量变化

Fig. 2 Changes in sugar content of callus with different subculture times

诱导 20 d 时, J22 愈伤材料中的蔗糖含量最高 (18.19 mg/g), J11 (16.95 mg/g) 次之, 二者的蔗糖含量显著高于其余 3 份材料。在体胚诱导 20、49 d 时, 继代次数与蔗糖含量的拟合曲线呈单峰型, 相关性系数分别为 0.9011、0.9414, 蔗糖含量随继代次数增加先升后降, 最终趋于平缓, 说明继代次数影响愈伤组织吸收和转运外源蔗糖。此外, 愈伤材料中的蔗糖含量跟体胚诱导率显著正相关, 在体胚诱导 20、49 d 时相关性系数分别为 0.9833、0.9166, 说明蔗糖可能是荔枝愈伤体胚发生的关键影响因子。综上结果表明, 长期继代过程中, 愈伤对外源蔗糖吸收和转运能力的下降, 可能是其胚性丧失的主要原因。

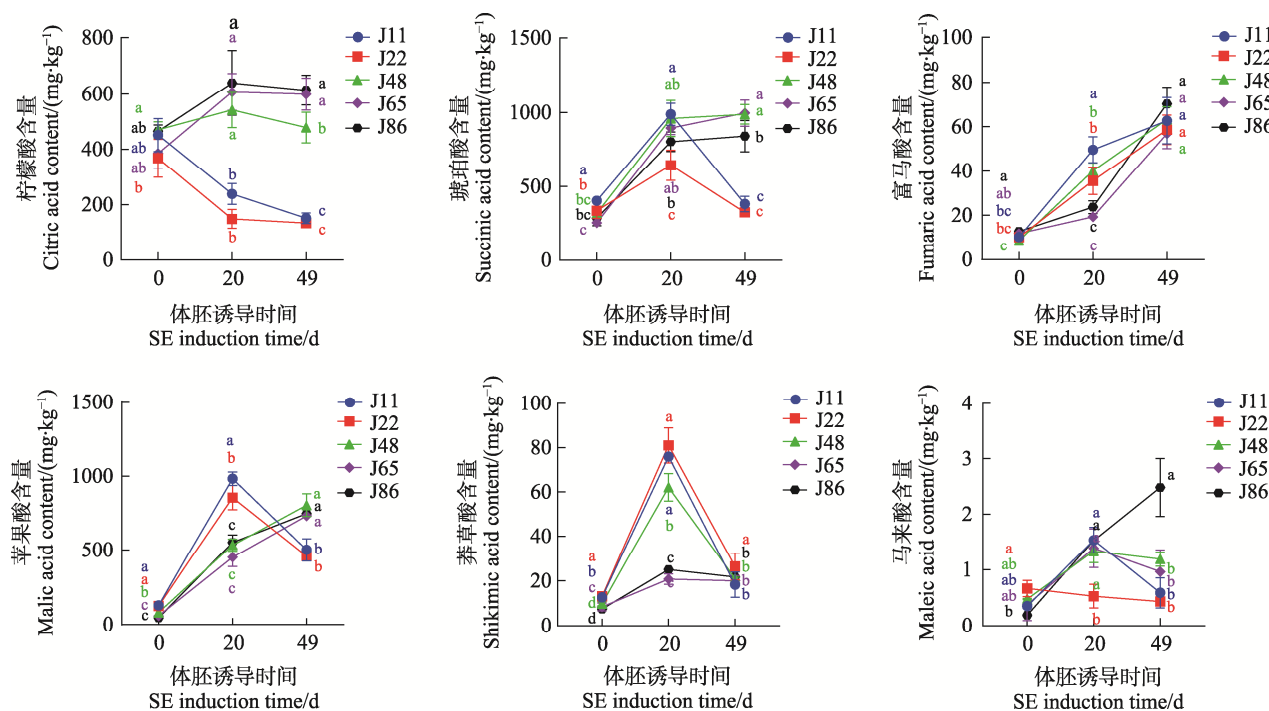
2.3 继代次数对愈伤组织有机酸代谢的影响

蔗糖经水解后进入糖酵解途径, 进而参与三羧酸 (TCA) 循环产生有机酸。体胚诱导期间, 高继代次数愈伤材料 (J48、J65、J86) 的柠檬酸含量呈先升后稳的趋势, 而低继代次数材料 (J11、J22) 持续下降。由图 3 可知, 体胚诱导初期, 5 种愈伤材料柠檬酸含量无显著差异, 而在体胚诱导的中后期, 低继代次数材料的柠檬酸含量显著低于高继代次数材料, 暗示其柠檬酸代谢通量更高, 这有助于维持细胞氧化还原稳态并促进体胚

发生。琥珀酸在高继代次数材料中呈现与柠檬酸相似的先升后降趋势, 而低继代次数材料表现为先升后降。诱导后期, 低继代次数材料的琥珀酸代谢通量显著高于高继代次数组。作为线粒体呼吸链复合物 II (琥珀酸脱氢酶) 的底物, 琥珀酸高代谢通量表明电子传递链活跃, 加速 ATP 生成。所有材料的富马酸含量在诱导期间持续上升。苹果酸在初期/中期显著富集于低继代次数材料 (J11、J22), 但后期此趋势反转; 此时低继代次数材料表现出更高的苹果酸代谢通量。此外, 莽草酸含量呈现出先增加后降低的趋势, 其中 J22、J11 的愈伤组织莽草酸含量显著高于其他 3 个继代次数的愈伤组织 ($P<0.05$), 而马来酸含量无明显规律。综上, 高继代次数愈伤组织因长期继代导致 TCA 循环有机酸代谢衰减, 引发能量供给效率降低及体胚发生能力衰退; 低代次材料则通过维持柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的高代谢通量, 显著增强线粒体能量代谢与氧化还原稳态, 从而有效保留胚性潜能。这表明愈伤组织的胚性维持能力与 TCA 循环代谢活性呈正相关, 关键有机酸动态可作为胚性衰退的代谢标志。

2.4 继代次数对愈伤组织中氨基酸代谢的变化

氨基酸 (AAs) 是体细胞胚胎发生过程中形



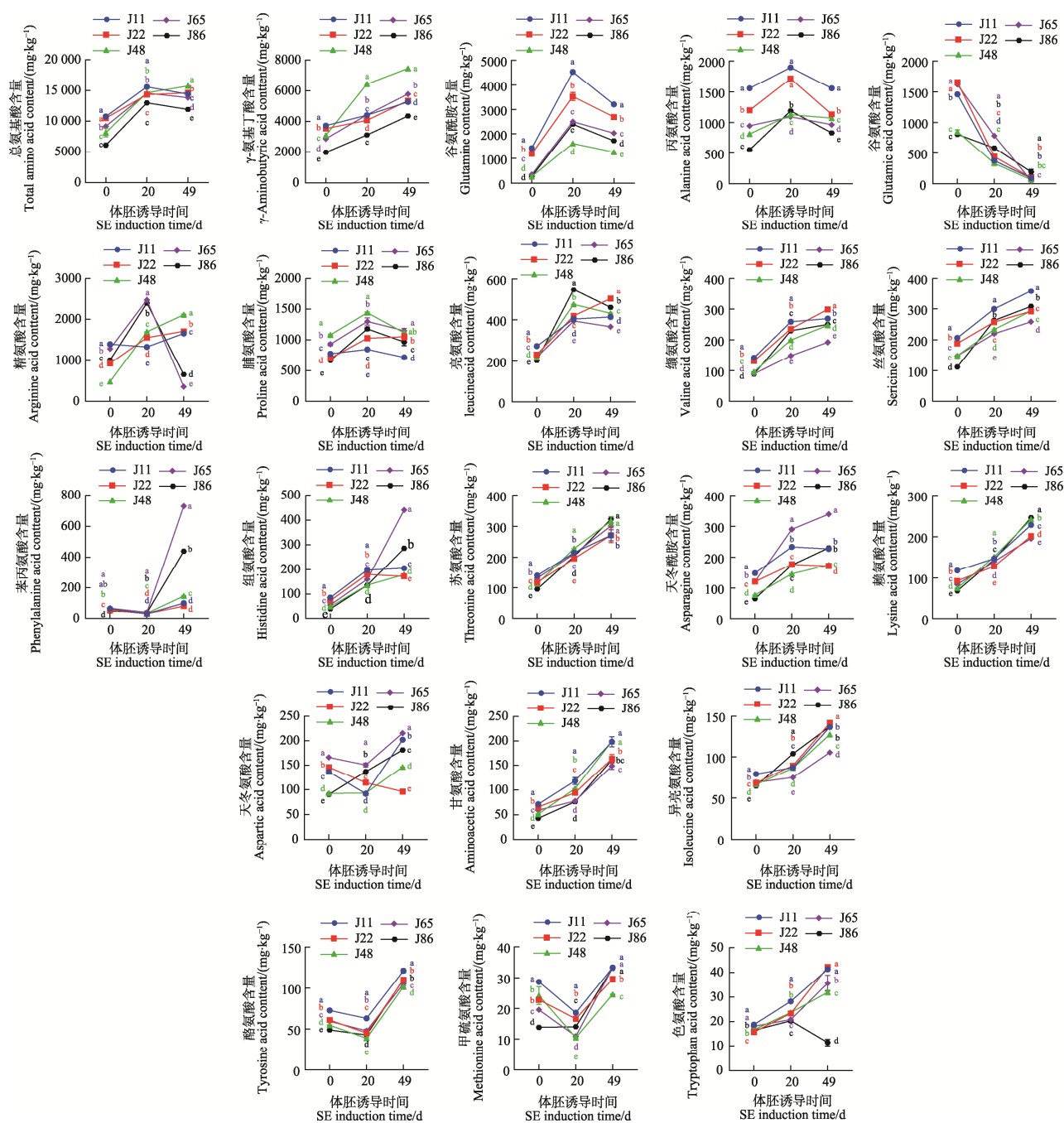
Different lowercase letters indicate significant difference among different subculture times ($P<0.05$).

图 3 不同继代次数愈伤组织有机酸含量

Fig. 3 Changes in organic acid content of callus with different subculture times

态发生的重要调节因子,其分解代谢产生的能量可满足机体日常活动的需要。荔枝愈伤组织的主要氨基酸成分为 γ -氨基丁酸、谷氨酰胺、丙氨酸、精氨酸以及谷氨酸等。由图 4 可知,在体胚诱导过程中,愈伤组织中的总氨基酸含量呈先上升后趋于平稳, γ -氨基丁酸、缬氨酸、丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和色氨酸

含量基本呈逐渐上升趋势,谷氨酰胺、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、亮氨酸、天冬酰胺含量则呈现先升后降的趋势,而苯丙氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸含量则先降低后升高,此外谷氨酸含量则持续降低。不同继代次数材料中的总氨基酸含量存在差异,在体胚诱导的前期(0、20 d),总体表现为继代次数少(体胚发生率高)的含量要



不同小写字母表示不同继代次数间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among different subculture times ($P < 0.05$).

图 4 不同继代次数愈伤组织氨基酸含量变化

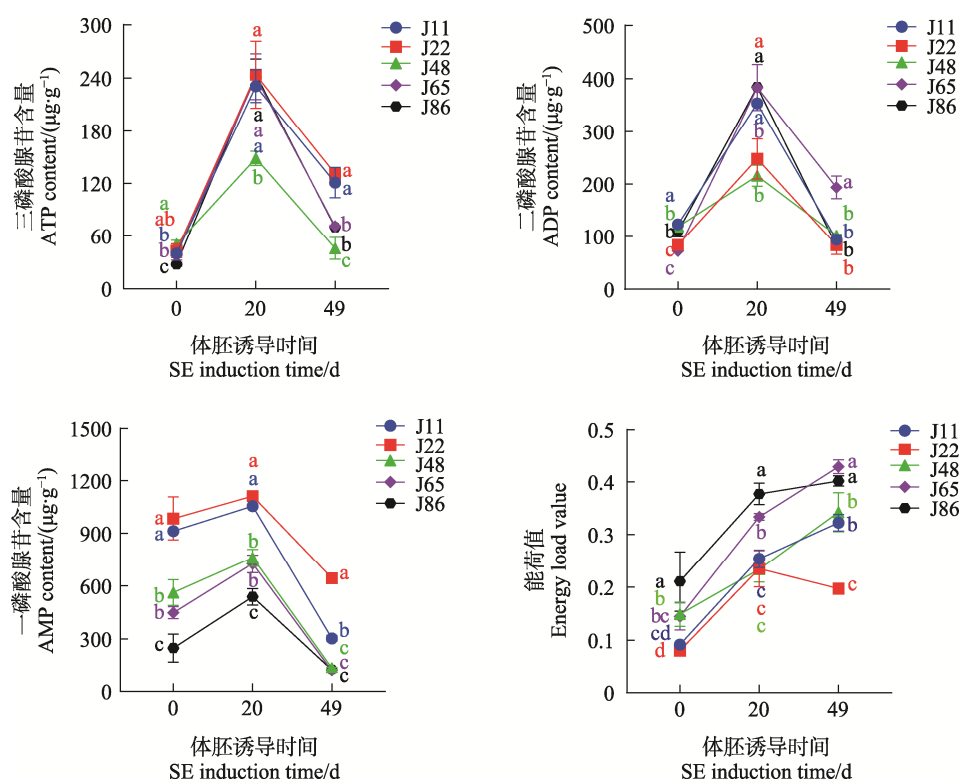
Fig. 4 Changes in amino acid content of callus with different subculture times

高于继代次数多（体胚发生率低）。在体胚诱导的初始阶段（0 d）， γ -氨基丁酸含量随继代次数增加逐渐减少，而在中后期（20、49 d）则与继代次数无显著关联性。值得注意的是，谷氨酰胺和丙氨酸含量则与继代次数有较好的关联性，在体胚诱导的整个时期，继代次数少体胚诱导率高（J11 和 J22）的材料中 2 种氨基酸含量显著高于继代次数多体胚诱导率低的材料（J48、J65、J86），即在长期继代过程中愈伤组织材料中的谷氨酰胺和丙氨酸明显减少。体胚诱导初始阶段（0 d）时，J11 和 J22 总氨基酸、 γ -氨基丁酸、谷氨酰胺、丙氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸、缬氨酸、丝氨酸、组氨酸、赖氨酸、甘氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸含量均显著高于其他 3 个继代次数，与继代次数有较好的关联性。在体胚 20 d 时，随着继代次数的增加，谷氨酰胺、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、组氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、色氨酸含量呈现逐步降低的趋势，而精氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸含量则逐渐降低。至体胚 49 d 时，谷氨酰胺、丙氨酸、缬氨酸、酪氨酸含量随着继代次数的增加逐渐降低。上述结果说明氨基酸代谢可能是长

期继代过程中愈伤组织体胚分化的一个原因。

2.5 继代次数对愈伤组织细胞能量代谢的影响

TCA 循环通量的增强决定了体胚诱导过程中的能量转换效率。ATP 作为细胞内主要的能量媒介，其分解产物 ADP 和 AMP 在细胞能量代谢和信号传导过程中扮演着至关重要的角色。由图 5 可知，在荔枝愈伤组织体胚诱导过程中，随着体胚诱导时间的延长，ATP、ADP、AMP 含量均表现出先增加后降低的趋势，三者中 AMP 含量最高。体胚诱导 0 d 时，ATP、ADP 的含量随着继代次数的增加呈现出先升后降的变化模式，至体胚诱导 20 d 时，ATP、ADP 含量均升高，至体胚诱导 49 d 时，ATP、ADP 都有不同程度的降低。继代次数少胚性强的愈伤组织（J11、J22）AMP 含量在体胚诱导 0、20、49 d 时均显著高于其他继代次数（J86、J65、J48），其中 J22 的愈伤组织 AMP 的含量最高达 1066.16 $\mu\text{g/g}$ 。AMP 含量与继代次数拟合合成单峰曲线，在体胚诱导 0、20、49 d 时相关性系数分别为 0.9858、0.9294、0.9136。能荷值在 T0 d~T20 d 时 5 组材料均有不同程度的增加，而 T20 d~T49 d 时，J22（0.20）和 J11（0.32）



不同小写字母表示不同继代次数间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences among different subculture times ($P < 0.05$).

图 5 不同继代次数愈伤组织能量物质含量

Fig. 5 Changes in energy substances content of callus with different subculture times

的 EC 能荷值则明显降低, 而 J48 (0.34)、J65 (0.43)、J86 (0.40) 的 EC 能荷则显著升高。此时细胞处于高 AMP-低能荷状态, 表明体胚诱导过程中胚性强的愈伤组织需要消耗更多的能量, 继代次数显著影响了愈伤组织的能量代谢。

3 讨论

3.1 继代次数对体胚发生能力的影响

本研究明确了荔枝妃子笑胚性愈伤组织的体胚诱导率随继代次数的增加呈单峰曲线变化(先升后降)。这一规律与湿地松^[28]、红松^[29]、抗性黑松^[8]、俯竹^[30]、苜蓿^[31]、花榈木^[32]等物种中“短期继代促进胚性, 长期继代导致衰退”的现象一致, 说明长期继代导致胚性衰退是植物离体再生的共性问题。荔枝愈伤组织在 J48 次及其后体胚诱导率骤降, 表明其胚性维持存在明显的继代阈值, 仍需进一步研究以确定最佳继代周期。继代次数增加伴随细胞活力降低、褐变与坏死加剧, 直接影响分化潜能。短期培养(如抗性黑松<1.5 年)的愈伤组织具有最优胚性^[8], 可能由于该阶段愈伤组织仍处于增殖适应期, 细胞分裂活跃、胚性细胞比例较高; 而随着继代推进, 细胞逐渐老化, 遗传和表观遗传变异积累, 基因组稳定性下降, 最终导致再生能力丧失。因此, 在荔枝体胚发生中, 合理控制继代次数是维持胚性能力和提升再生效率的关键措施。

3.2 糖及有机酸代谢对不同继代次数愈伤组织体胚发生的影响

蔗糖不仅是愈伤组织中最主要的碳源, 也作为信号分子参与调控胚性维持与体胚发生。荔枝愈伤组织的诱导依赖于碳水化合物代谢, 高蔗糖含量是维持胚性的关键^[33]。在川西云杉胚性愈伤组织中, 淀粉和蔗糖代谢通路基因显著上调(如蔗糖合酶基因), 其通过提供碳源与能量, 并驱动还原糖积累, 支持胚胎发生早期事件^[34]。本研究中, 高蔗糖含量(如 J22 组达 18.19 mg/g)与高体胚诱导率呈显著正相关, 其水解产生的葡萄糖/果糖除提供碳架外, 还作为渗透调节物和信号分子, 激活 SERK 等胚胎发生相关基因的表达^[35], 这一结果与在红松中糖积累维持胚性^[36]以及松树的 EC 较其他细胞系含有更高的糖含量^[37]的结论相同。

在 TCA 循环中琥珀酸、延胡索酸和苹果酸等

有机酸不仅是重要的碳骨架来源^[38], 也直接参与能量代谢与氧化还原稳态的维持。本研究中, 低继代次数的愈伤组织(J11、J22)在体胚诱导中后期消耗柠檬酸生成琥珀酸, 直接促进琥珀酸向延胡索酸(富马酸)的转化, 产生的 FADH₂ 通过呼吸链驱动 ATP 合成, 为体胚形态建成供能。同时, 苹果酸含量在诱导早期增长, 通过“苹果酸-草酰乙酸”穿梭协调胞质与线粒体能量代谢^[39], 保障 TCA 循环效率及糖酵解-线粒体呼吸协同, 间接支撑 ATP 供应支持胚胎发育。相反, 高代次 EC (J48 及以后) TCA 中间产物积累异常, 循环效率低下, 能量供应不足, 最终导致胚性衰退。在棕榈体胚诱导培养基中添加苹果酸前体(L-谷氨酰胺)使成胚率提升, 直接证明苹果酸供给对体胚发生的必要性^[40]。而延胡索酸-苹果酸平衡^[41]则通过 FH 调控, 影响 TCA 循环通量和次级代谢(如苯丙烷途径驱动的植物木质素), 维持氧化还原稳态(NAD⁺/NADH 平衡), 对体胚成熟至关重要。

3.3 氨基酸代谢对不同继代次数愈伤组织体胚发生的影响

氨基酸不仅为蛋白质合成提供氮源, 还作为信号分子和代谢调节物参与体胚发生调控。本研究显示, 总氨基酸、丙氨酸和谷氨酰胺的含量在低继代次数的愈伤组织中较高, GABA 含量则持续增加, 氨基酸含量高的愈伤组织其乳白胚的诱导数量越多, 其中的单子叶、双子叶、多子叶胚也越多。这与课题组前期研究发现的添加氨基酸混合物对促进胚性能力的获得与胚胎发生效率具有极其显著的效果^[23], 以及 Ala、GABA 和 Gln 的氨基酸组合可显著提高体细胞胚胎诱导和发芽效率^[24]的结论相一致, 同时与草莓^[42]、松树^[43]、橡木^[44]、椰子^[45]等物种中的研究结论相似。

3.4 能量代谢对不同继代次数愈伤组织体胚发生的影响

能量状态是决定细胞命运转换的关键信号。本研究在荔枝愈伤组织中发现, AMP 含量在低代次高胚性材料(如 J22)中显著积累, 且能荷值维持在较低水平, 表明细胞处于“低能荷-高响应”状态, 可能通过激活能量感应通路(如 SnRK1 激酶), 上调 PLETHORA (PLT) 等干细胞维持和器官发生相关基因^[46], 进而维持愈伤组织的多能性。值得注意的是, 高代次材料虽然能荷值较高,

但体胚发生能力却显著下降, 表明其能量利用效率低下或能量分配失衡。这一发现提示, 不仅能量状态的水平, 能量代谢的效率和质量同样对体胚发生具有重要影响。这与拟南芥研究中 AMP 通过 PLT 途径调控器官再生^[47]的结论相呼应, 证实了能量状态调控植物细胞命运重编程的保守机制。未来在荔枝中可进一步整合多组学技术, 深入研究外源添加 AMP 对荔枝 EC 体胚诱导效率的影响, PLT 同源基因是否受 AMP 调控、SNRK1-PLT 轴的作用机制, 以及验证拟南芥的 AMP-PLT 通路在荔枝物种中是否具有相似功能。

综上所述, 荔枝愈伤组织的体胚发生能力随继代次数增加而下降是多种代谢过程共同作用的结果, 涉及蔗糖利用障碍、TCA 循环代谢减弱、氨基酸代谢紊乱以及能量代谢失调等多个方面。这些代谢过程相互关联、相互影响, 共同构成了一个复杂的调控网络。

4 结论

本研究发现继代次数显著影响荔枝愈伤组织的体胚诱导效率, 低继代次数的愈伤组织 (J11、J22) 体胚诱导效率显著高于高继代次数的愈伤组织 (J48、J65、J86)。高继代次数愈伤组织蔗糖含量低, AMP 及重要氨基酸含量低, 且在体胚诱导过程中 TCA 循环代谢活性减弱。而低继代次数愈伤组织可溶性糖和蔗糖含量高, 消耗柠檬酸驱动 ATP 合成, 氨基酸含量高使乳白胚数量增多, AMP 含量较高且能荷值较低表明能量利用率高, 说明愈伤组织能量供应与氨基酸代谢发生变化, 可能是导致高继代次数愈伤组织体胚诱导效率降低的重要原因。本研究探讨了长期继代荔枝愈伤组织胚性衰退的原因, 为优化荔枝离体再生体系、提高体胚发生效率提供理论依据, 对推动荔枝生物育种具有重要意义。

参考文献

- [1] 王惠聪, 周志钦. 荔枝种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
WANG H C, ZHOU Z Q. Specifications and data standards for the description of lychee germplasm resources[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006. (in Chinese)
- [2] 陈厚彬, 杨胜男, 苏钻贤, 欧善国, 潘蔚娟, 彭晓丹. 2024 年全国荔枝生产形势分析与管理建议[J]. 中国热带农业, 2024(3): 8-20.
CHEN H B, YANG S N, SU Z X, OU S G, PAN W J, PENG X D. Analysis of the national litchi production in 2024 and management suggestions[J]. China Tropical Agriculture, 2024(3): 8-20. (in Chinese)
- [3] 李浩. 从种业端突破迈向市场端长红[N]. 农民日报, 2025-06-11(006).
LI H. From breakthrough in seed industry to sustained market success[N]. Farmer's Daily, 2025-06-11(006). (in Chinese)
- [4] 卿昊炜, 黎明, 易晨歆, 张树伟, 郭慧勤, 彭宏祥, 丁峰. 荔枝、龙眼育种研究进展[J]. 中国南方果树, 2024, 53(3): 1-6, 15.
QING H W, LI M, YI C X, ZHANG S W, GUO H Q, PENG H X, DING F. Advances in breeding research of litchi and longan[J]. South China Fruits, 2024, 53(3): 1-6, 15. (in Chinese)
- [5] 王诗忆, 黄奕孜, 李舟阳, 黄华宏, 林二培. 植物体细胞胚胎发生及其分子调控机制研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(1): 223-232.
WANG S Y, HUANG Y Z, LI Z Y, HUANG H H, LIN E P. Research progress in plant somatic embryogenesis and its molecular regulation mechanism[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2022, 39(1): 223-232. (in Chinese)
- [6] 秦雅琪. ‘黑叶’荔枝体细胞胚胎再生体系的建立及转基因初步研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
QIN Y Q. Establishment of somatic embryo regeneration system and preliminary study on genetic transformation in *Litchi chinesis* ‘Heiye’[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [7] 龙俊松. 木本植物体细胞胚胎发生的影响因素研究进展[J]. 林业科技通讯, 2025(1): 43-46.
LONG J S. Research progress on influencing factors of somatic embryogenesis in woody plants[J]. Forest Science and Technology, 2025(1): 43-46. (in Chinese)
- [8] 王艳丽, 孙婷玉, 沈李元, 吴小芹, 叶建仁, 朱丽华. 继代培养时间对抗性黑松体胚发生的影响[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2019, 39(2): 78-85.
WANG Y L, SUN T Y, SHEN L Y, WU X Q, YE J R, ZHU L H. Effects of subculture time on somatic embryogenesis of Nematode-resistant *Pinus thunbergii*[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Science Edition), 2019, 39(2): 78-85. (in Chinese)
- [9] 唐丽苹, 李兴国, 张宪省, 苏英华. 体细胞胚胎发生: 植物体细胞命运的重塑[J]. 植物生理学报, 2020, 56(8): 1664-1680.
TANG L P, LI X G, ZHANG X S, SU Y H. Somatic embryogenesis: remodeling of plant somatic cell fate[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(8): 1664-1680. (in Chinese)
- [10] 董静, 段秋笛, 徐艳红, 周美琪, 梁宏伟. 长期继代培养

- 过程中楸树愈伤组织的分化能力[J]. 西北农业学报, 2024, 33(2): 373-379.
- DONG J, DUAN Q D, XU Y H, ZHOU M Q, LIANG H W. Differentiation ability of *Catalpa bungei* callus in long term subculture[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2024, 33(2): 373-379. (in Chinese)
- [11] 赵珊, 董静, 郑帅, 陈发菊, 刘文, 梁宏伟. 长期继代培养的楸树胚性愈伤组织难以分化的成因[J]. 林业科学, 2025, 61(6): 130-138.
- ZHAO S, DONG J, ZHENG S, CHEN F J, LIU W, LIANG H W. Reasons for the difficulty of differentiation of embryogenic callus in long-term subculture of *Catalpa bungei*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2025, 61(6): 130-138. (in Chinese)
- [12] 董静. 继代培养对楸树胚性愈伤组织分化再生能力的影响[D]. 宜昌: 三峡大学, 2023.
- DONG J. The effects of subculture on the differentiation and regeneration ability of embryogenic callus in *Catalpa bungei*[D]. Yichang: China Three Gorges University, 2023. (in Chinese)
- [13] 邓士政, 董中东, 刘桂珍, 郝俊杰, 刘诗慧, 崔党群. 长期继代培育对玉米幼胚愈伤组织的影响[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11236-11237, 11249.
- DENG S Z, DONG Z D, LIU G Z, HAO J J, LIU S H, CUI D Q. Effects of long-term subculture on callus from maize immature embryo[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(32): 11236-11237, 11249. (in Chinese)
- [14] KRUGLOVA N N, SELDIMIROVA O A, ZINATULLINA A E, YEGOROVA N A. Histological aspects of a long-term *in vitro* culture of morphogenic calluses of *Lavandula angustifolia* Mill.[J]. Biology Bulletin, 2025, 52(1). DOI:10.1134/S1062359024608760.
- [15] 蒲秀琴, 王舰, 薛寒青. 不同继代次数对东方百合组培苗分化的影响[J]. 青海农林科技, 2008(1): 55-56.
- PU X Q, WANG J, XUE H Q. Infulence on different successive transfer times to differentiation of oriental lily tissue cultured seedlings[J]. Qinghai Agriculture and Forestry Science and Technology, 2008(1): 55-56. (in Chinese)
- [16] 薛美凤, 郭余龙, 李名扬, 裴炎. 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响[J]. 西南农业学报, 2002(4): 19-21.
- XUE M F, GUO Y L, LI M Y, PEI Y. Effects of long-term subculture on embryogenesis capability of cotton callus and somatic variation[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2002(4): 19-21. (in Chinese)
- [17] 贾小明, 张焕玲, 张存旭. 栓皮栎体胚再生与增殖能力的保持研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(10): 81-86, 93.
- JIA X M, ZHANG H L, ZHANG C X. Studies on regeneration and proliferation of somatic embryos in *Quercus variabilis*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2011, 39(10): 81-86, 93. (in Chinese)
- [18] NADINA N, MAGDALENA S N, MARÍA A B, MARGELYS S, ALFREDO G, JUSTO L G, RAMIRO C. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane[J]. In Vitro Cellular and Development Biology. Plant, 2003, 39(3): 343-345.
- [19] MAADON S N, ROHANI E R, ISMAIL I, BAHARUM S N & NORMAH M N. Somatic embryogenesis and metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic structures in mangosteen[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2016, 127(2): 443-459.
- [20] ARRILLAGA I, TOBOLSKI J J, MERKLE S A. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(3/4): 171-175.
- [21] 王果, 刘耀婷, 王家保, 李焕苓. 氨基酸对荔枝愈伤组织增殖及体胚发生体系优化的研究[J]. 果树学报, 2023, 40(11): 2466-2476.
- WANG G, LIU Y T, WANG J B, LI H L. Study on the optimization of amino acids on proliferation of calli and somatic embryogenesis in *Litchi chinensis* Feizixiao[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(11): 2466-2476. (in Chinese)
- [22] CAO L D, WANG G, YE X X, LI F, WANG S J, LI H L, WANG P, WANG J B. Physiological, metabolic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of proliferation and somatic embryogenesis of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) embryogenic callus promoted by d-arginine treatment[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(7): 3965.
- [23] WANG G, LIU Y T, GAO Z Y, LI H L, WANG J B. Effects of amino acids on the proliferation of litchi callus and optimization of somatic embryogenesis system[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 9(12): 1311.
- [24] 王果, 李焕苓, 王树军, 孙进华, 李芳, 王家保. 不同生长调节剂对‘新球蜜荔’体胚发生的影响及其组织学观察[J]. 热带农业科学, 2020, 40(2): 46-53.
- WANG G, LI H L, WANG S J, SUN J H, LI F, WANG J B. Effects of different plant growth regulators on somatic embryogenesis of litchi 'Xinqiumili' (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Xinqiumili) and the histological observation of the somatic embryos[J]. Chinese Journal Tropical Agricultural, 2020, 40(2): 46-53. (in Chinese)
- [25] 王果. 几个荔枝品种离体再生技术体系的研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- WANG G. Studies on regeneration of three Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars in vitro[D]. Haikou: Hainan Uni-

- versity, 2013. (in Chinese)
- [26] 王思威, 刘艳萍, 王潇楠, 孙海滨. 基于高效液相色谱-三重四极杆串联质谱技术测定鲜荔枝果肉中 10 种有机酸含量[J]. 农药学报, 2019, 21(3): 359-365.
- WANG S W, LIU Y P, WANG X N, SUN H B. Determination of ten organic acids content in fresh litchi based on high performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry technique[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21(3): 359-365. (in Chinese)
- [27] 莫亿伟, 金文龙, 刘锴栋. 高效液相色谱法测定几种热带水果 ATP、ADP 和 AMP 含量[J]. 果树学报, 2013, 30(6): 1077-1082.
- MO Y W, JIN W L, LIU K D. Determination of ATP, ADP and AMP concentrations in several tropical fruits by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(6): 1077-1082. (in Chinese)
- [28] 柯欣, 费琪, 夏馨蕊, 叶建仁, 朱丽华. 抗松针褐斑病湿地松胚性愈伤组织诱导及体胚产量影响因素的研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2025, 49(1): 87-94.
- KE X, FEI Q, XIA X R, YE J R, ZHU L H. The factors influencing the embryogenic callus initiation and somatic embryo yield in *Pinus elliottii* resistant to pine needle brown spot disease[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2025, 49(1): 87-94. (in Chinese)
- [29] 钟玥, 范震宇, 贯春雨, 曹业萍, 李青晨, 梁艳. 红松 EC 非胚性化及体胚分化启动过程的形态与生理特征[J]. 中南林业科技大学学报, 2024, 44(11): 49-57.
- ZHONG Y, FAN Z Y, GUAN C Y, CAO Y P, LI Q C, LIANG Y. Morphological and physiological characteristics of embryogenic callus of *Pinus koraiensis* during non embryogenization and initial somatic embryo differentiation[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2024, 44(11): 49-57. (in Chinese)
- [30] DEEPENDRA S R, TRILOK S R, SHAMIM A A, MOHAMMAD F, ABDULRAHMAN A A, ESLAM M. A-S & ANWAR S. Biochemical changes in embryogenic and non-embryogenic callus of *Bambusa nutans* during somatic embryogenesis[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2023, 155, 127-135.
- [31] KPCZYŃSKA E, OROWSKA A. Profiles of endogenous ABA, bioactive GAs, IAA and their metabolites in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues during induction phase in relation to somatic embryo formation[J]. Planta, 2021, 253(3): 67.
- [32] WU G Y, WEI X L, WANG X, WEI Y. Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2020, 144(3): 505-517.
- [33] 吉训志, 李焕苓, 王果, 高兆银, 孙进华, 王家保. 2 个荔枝品种体胚发生过程中糖含量及相关酶活性变化[J]. 热带作物学报, 2019, 40(4): 675-680.
- JI X Z, LI H L, WANG G, GAO Z Y, SUN J H, WANG J B. Changes of sugar contents and related enzyme activities during somatic embryogenesis of two lychee varieties[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(4): 675-680. (in Chinese)
- [34] 吴高殷, 韦小丽, 王晓, 刘盈盈, 陈胜群. 林木体细胞胚胎发生机理研究进展[J]. 世界林业研究, 2019, 32(5): 9-14.
- WU G Y, WEI X L, WANG X, LIU Y Y, CHEN S Q. Research progress on mechanism of somatic embryogenesis in forest trees[J]. World Forestry Research, 2019, 32(5): 9-14. (in Chinese)
- [35] LI Q F, ZHANG S G, WANG J H. Transcriptome analysis of callus from *Picea balfouriana*[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 553.
- [36] 任毓辉, 聂帅, 彭春雪, 杨玲, 沈海龙. 红松胚性愈伤组织增殖的激素配比、糖源类型和增殖周期效应研究[J]. 植物研究, 2022, 42(4): 704-712.
- REN Y H, NIE S, PENG C X, YANG L, SHEN H L. Effects of hormone combinations, carbon source type and proliferation cycle on embryogenic callus proliferation of *Pinus koraiensis*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2022, 42(4): 704-712. (in Chinese)
- [37] PENG C X, GAO F, TREYYAKOVA I N, NOSOV A M, SHENG H L, YANG L. Transcriptomic and metabolomic analysis of korean pine cell lines with different somatic embryogenic potential[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(21): 13301.
- [38] WEI Z H, XU Y X, XU Q T, CAO W, HUANG H, LIU H. Microbial biosynthesis of l-malic acid and related metabolic engineering strategies: advances and prospects[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 765685.
- [39] 杨文渊, 谢红江, 陶炼, 宦云敏, 陈善波, 林立金, 廖明安. ‘金冠’苹果及其优系(SGP-1)果实发育期间有机酸代谢特征比较[J]. 西北植物学报, 2022, 42(5): 829-836.
- YANG W Y, XIE H J, TAO L, HUAN Y M, CHEN S B, LIN L J, LIAO M A. Comparison of organic acid metabolism characteristics between ‘golden delicious’ apple and its excellent variation material ‘SGP-1’ during fruit development[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2022, 42(5): 829-836. (in Chinese)
- [40] FREITAS E O, MONTEIRO T R, NOGUEIRA G F, SCHERWINSKI-PEREIRA J E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics[J].

- Scientia Horticulturae, 2016, 212: 126-135.
- [41] 杨光凯, 薛诗怡, 李嘉桢, 李汇斌, 高燕, 张小军, 郝燕燕. 红宝石苹果果实有机酸组分及苹果酸代谢酶活性分析[J]. 果树学报, 2023, 40(5): 884-892.
- YANG G K, XUE S Y, LI J Z, LI H B, GAO Y, ZHANG X J, HAO Y Y. Analysis of organic acid components and malic acid metabolizing enzyme activity in Hongbaoshi apple fruits[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(5): 884-892. (in Chinese)
- [42] GERDAKANEH M, MOZAFARI A A, SIOSEH-MARDAH A, SARABI B. Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) [J]. Acta Physiol Plant, 2011, 33: 1847-1852.
- [43] MALABADI R B, VAN STADEN J. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2005, 41: 181-186.
- [44] ALI B N, BENKADDOUR R, RAHMOUNI S, HAMDOUN O, BOUSSAOUDI I, HASSOUN M, AZAROUAL L, BADO C, MARTIN P, LAMARTI A. Influence of exogenous polyamines on the secondary somatic embryogenesis of cork oak (*Quercus suber* L.)[J]. Bioengineered, 2023, 14(1): 1-11.
- [45] MAGNAVAL C, NOIROT M, VERDEIL J L, BLATTES, HUET C, GROSDÉMANGE F, BUFFARD-MOREL J. Free amino acid composition of coconut (*Cocos nucifera* L.) calli under somatic embryogenesis induction conditions[J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 146: 55-161.
- [46] HONG G L, SEO Y J, EUN Y J, SEUNG H C, OK-SUN P, SOON H B, HYUN-SOON K. Adenosine monophosphate enhances callus regeneration competence for de novo plant organogenesis[J]. Molecular Plant, 2023, 16(12): 1867-1870.
- [47] DOHEE K, HONG G L, SOON H B, KYOUNGHEE L, PIL J S. Callus proliferation-induced hypoxic microenvironment decrease shoot regeneration competence in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2024, 3: 395-408.