

白杆体细胞胚悬浮培养的动力学研究

杨金玲¹ 桂耀林² 郭仲琛²

¹(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所 北京 100050)

²(中国科学院植物研究所 北京 100093)

关键词 白杆, 体细胞胚, 悬浮培养, 植株再生

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0218-03

白杆(*Picea meyeri* Rehd. et Wils.)是我国特有的云杉属树种,在林业生产和环境绿化中均具有重要地位。其体细胞胚胎发生的研究,一方面可用于优良种质的大规模快速繁殖,为植树造林和园林绿化提供优质苗木;另一方面可作为遗传转化的再生系统,进行树种遗传品质的改良。我们已经成功地建立了白杆体细胞胚胎发生高频率实验系统^[1]。本文在此基础上探讨了胚性愈伤组织悬浮培养的最佳条件,以及悬浮培养过程中一些生长参数的动态变化,为进一步利用生物反应器进行体细胞胚的大规模培养打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

白杆(*Picea meyeri* Rehd. et Wils.)的球果采自中国科学院植物研究所植物园。

1.2 胚性愈伤组织的诱导

将白杆的成熟合子胚接种在改良 LP + 30 g/L 蔗糖 + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA 固体培养基上,25℃ 下暗培养,30 d 后产生白色半透明的胚性愈伤组织。将胚性愈伤组织转到 MS + 20 g/L 蔗糖 + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KT 固体培养基上,黑暗条件下继代培养。

1.3 悬浮培养系的建立

液体培养基为 MS + 20 g/L 蔗糖 + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KT。在盛有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中分别按照 1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 的比例(以鲜重计)接种胚性愈伤组织,将三角瓶置于摇床(转速为 50、100、150、200 r/min)上,于 25℃、黑暗条件下进行震荡培养,10 d 更新一次培养液。

1.4 生长参数的测定

悬浮培养物的鲜重、干重、pH 值、电导率的测定参照 Lulsdorf 等的方法^[2]。

1.5 体细胞胚的成熟及其植株再生

将悬浮培养物转到 MS + 5 mg/L ABA 固体培养基上光

照下进行体细胞胚的成熟诱导。体细胞胚成熟后转到含 0.5% 活性炭的无激素 1/2 MS 培养基上光照培养以促进根和真叶的生长。

2 结果与分析

2.1 不同初始细胞密度下的胚性愈伤组织增殖及其体细胞胚分化

悬浮培养中初始细胞密度对胚性愈伤组织的增殖有明显的影响^[3-4]。初始细胞密度太小(接种量为 1.0%)时,细胞增殖的延迟期较长,细胞的生长受到抑制,胚性愈伤组织生长率仅为 31%,培养 7 d 后,达到最大值 1.31 g/100 mL。接种量增大至 3.0% 时,细胞增殖的延迟期缩短,很快进入对数生长期,胚性愈伤组织生长率为 182%,培养 9 d 后达到最大值 8.46 g/100 mL。然而初始细胞密度过大,达到 4.0% 时,虽然胚性愈伤组织生长率达 126%,但培养 6 d 后很快结束对数生长期而进入静止期和衰亡期(图 1)。

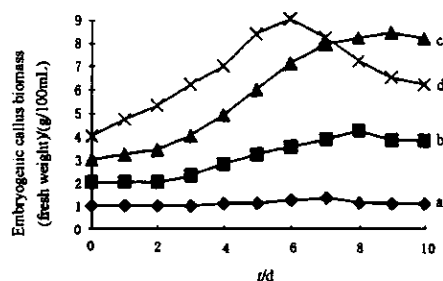


图 1 不同初始细胞密度下白杆胚性愈伤组织的增殖
a. 1.0%; b. 2.0%; c. 3.0%; d. 4.0%

体细胞胚的分化能力受胚性愈伤组织质量的影响。接种量太小,细胞易衰老和自溶,分化能力很低。但接种量太大,细胞分裂快,易形成结构紧密、细胞液泡化的大块愈伤组织团,细胞很快衰老,体细胞胚分化率很低,得到的多数为变

异的畸形胚。胚性愈伤组织接种量为 3.0% 时,其增殖速率快,且最终分化得到的正常体细胞胚数目也较多,达 234 个/g 愈伤组织。因此接种量为 3.0% 最有利于白杆胚性愈伤组织的悬浮培养。

2.2 不同转速下的胚性愈伤组织增殖及其体细胞胚分化

摇床转速低于 100 r/min 时,愈伤组织不易分散开,胚性胚柄团缠绕在一起,细胞生长的延迟期较长,生长较慢,最终分化出来的体细胞胚数目较少。而摇床转速过高,达到 200 r/min 时,细胞进入对数生长期后,很快进入静止期和衰亡期,胚性愈伤组织容易变为褐色而失去分化能力,因此产生的正常体细胞胚也较少。当摇床转速为 150 r/min 时,胚性愈伤组织以较快的生长率 177% 稳定增殖,持续至第 9 天,最终分化出来的正常体细胞胚较多,为 252 个/g 愈伤组织。因此 150 r/min 是最适宜的转速(图 2)。

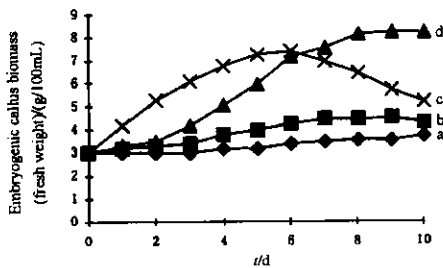


图 2 不同转速下白杆胚性愈伤组织的增殖
a. 50 r/min; b. 100 r/min; c. 200r/min; d. 150r/min

2.3 悬浮培养过程中胚性愈伤组织的鲜重、干重及胚性胚柄团数目的变化

在 3.0% 的接种量、转速为 150 r/min 的条件下建立起白杆胚性细胞悬浮系后,分别测定了鲜重、干重及胚性胚柄团数目等生长参数在培养过程中的变化动态。

由图 2 可知,培养过程中,胚性悬浮培养物第 9 天达到最大鲜重 8.31 g/100 mL,而其干重则是在第 7 天达到最大值 0.42 g/100 mL(图 3)。单位体积胚性悬浮培养物内胚性胚柄团数目在第 6 天就达到最高峰 310 个/mL(图 4)。

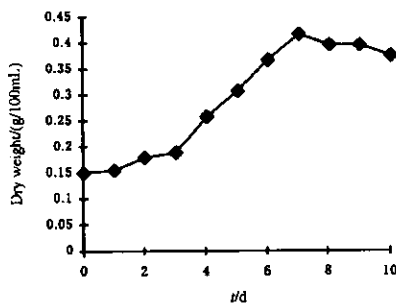


图 3 白杆胚性悬浮培养物在培养周期内的干重变化

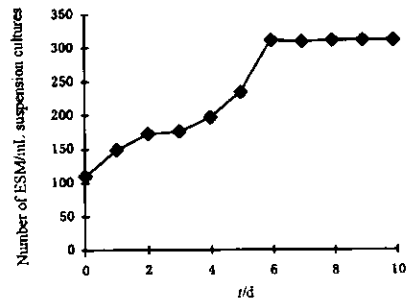


图 4 白杆胚性悬浮培养物在培养周期内的胚性胚柄团数目变化

2.4 悬浮培养过程中 pH 值和电导率的变化

在 10 d 的悬浮培养周期中,每天测定一次 pH 值和电导率,结果如图 5、图 6 所示。

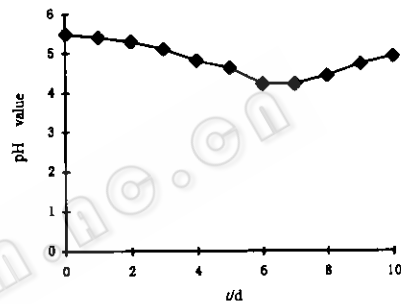


图 5 白杆胚性细胞悬浮培养液在培养周期内的 pH 值变化

由图 5 可知,培养初期培养液的 pH 值便开始下降,但前 2 d 下降较慢,随着细胞的生长,pH 值的下降逐渐加快,至第 6 天到达最低点 4.2,而到了第 8 天 pH 值又开始回升。图 6 中的结果表明,培养过程中培养液的电导率与 pH 值的变化趋势基本一致,但电导率在第 8 天到达最低点 4.8,比 pH 值的最低点落后 2d,第 10 天电导率又迅速回升。

2.5 体细胞胚的成熟及其植株再生

将悬浮培养物转到 MS+5 mg/L ABA 固体培养基上光照培养,30 d 后产生大量的成熟子叶期体细胞胚(每克鲜重的愈伤组织最多可产生 252 个体细胞胚)。成熟的体细胞胚转到含 0.5% 活性炭的无激素 1/2MS 培养基上光照培养,20d 继代一次,60d 后长成形态正常的多子叶小苗(图 7)。体细胞胚的成苗率为 38%。

3 结 论

本研究得出白杆体细胞胚悬浮培养的最佳条件为:初始细胞密度 3.0%,摇床转速 150 r/min。悬浮培养过程中鲜重、干重、胚性胚柄团数目、pH 值、电导率等参数的变化可以准确地反映悬浮细胞的生长状况^[5]。白杆胚性愈伤组织悬

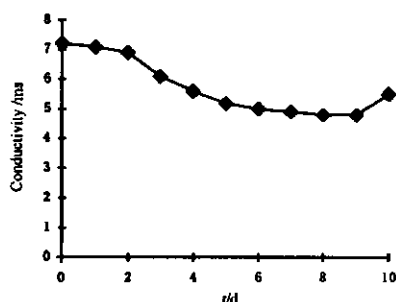


图6 白杆胚性细胞悬浮培养液在培养周期内的电导率变化

悬浮培养过程中,这几个生长参数间还有明显的相关性。因此,通过测定一些培养过程中的非损伤性参数,如电导率、pH值等来推知生物量及胚性胚柄团数目,在实践中具有重要的实际意义^[6]。白杆胚性细胞悬浮系在培养6~8d后, pH值

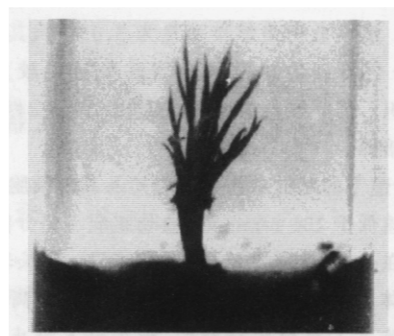


图7 白杆体细胞胚的再生植株

和电导率达到最低点,反映了此时培养液中的营养物质已基本消耗完,其中的胚性细胞开始衰老、自溶,所以悬浮培养物的干重、鲜重及胚性胚柄团数目依次到达高峰后出现逐渐减小的趋势。King和Street的研究结果表明,在对数生长期结束前更新培养基对悬浮细胞的生长最有利^[7]。因此白杆胚性悬浮细胞的最佳继代培养间隔时间为7 d。

参 考 文 献

- [1] 杨金玲,桂耀林,郭仲聚等. 植物学报, 1997, 39(4): 315~321
- [2] Lulsdorf M M, Tautorius T E, Kikcio S I et al. *Plant Science*, 1992, 82: 227~234
- [3] Tatsubito F, Atushi K. *New Phytol.*, 1980, 86: 2213~2218
- [4] Tremblay F. M. *Can J Bot*, 1990, 68: 236~242
- [5] Preil W. In: *Micropropagation*, Deberch Y, Zimmerman R H (Eds.), London: Academic Press, 1990, pp. 425~445
- [6] 刘春朝,王玉春,欧阳藩等. 西北植物学报, 1998, 18(2): 155~159
- [7] King P J, Street H E, Street H E (Ed). *Plant Tissue and Cell Culture*, Blackwell, Oxford, 1997, pp. 307~387

Studies on Kinetics of Somatic Embryo Suspension Culture in *Picea meyeri* Rehd. et Wils.

Yang Jin-Ling¹ GUI Yao-Lin² GUO Zhong-Chen²

¹(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

²(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract Embryogenic calli were produced from mature zygotic embryos of *Picea meyeri* Rehd. et Wils. which were cultured on modified LP medium containing 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L 6-BA. The growth rate of embryogenic calli could be improved by way of suspension culture in medium MS containing 20 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L KT. The optimum values of initial cell density and shake rate of flask in suspension culture were 3.0% (fresh weight) and 150 r/min respectively. Several parameters which might be correlated with growth were determined over a 10 day period. Maximum growth in terms of fresh weight, dry weight and number of ESM occurred during 6~10 day. pH and conductivity attained the lowest point during 6~8 day. A lot of somatic embryos were obtained following transfer of the suspension cultures to medium MS containing 5 mg/L ABA. Mature somatic embryos grew into plantlets with well developed cotyledons after being cultured on 1/2 MS medium supplemented with 0.5% activated charcoal but without hormone.

Key words *Picea meyeri*, somatic embryo, suspension culture, plantlet regeneration