

## 骆驼刺发根农杆菌转化系的原生质体培养和植株再生

张改娜<sup>1,2</sup>, 贾敬芬<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>河南科技大学农学院, 河南洛阳 471000; <sup>2</sup>西北大学生命科学学院, 西安 710069

**摘要:** 从发根农杆菌A4转化的荒漠植物——骆驼刺毛状根愈伤组织中分离的原生质体培养的结果表明, 酶解新转代7~10 d的淡黄色松软愈伤组织, 可获得大量有活力的原生质体。原生质体在附加有 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D、0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、0.3 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇、2% (W/V)蔗糖和 500 mg·L<sup>-1</sup>水解酪蛋白的DPD培养基中进行液体浅层培养可持续分裂。培养基的最适渗透压为(450±3) mOsm·kg<sup>-1</sup>, 原生质体的最适植板密度为4×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>。制备原生质体的愈伤组织以低温(4℃)预处理后, 原生质体的产率和分裂频率均提高, 分裂频率最高可达50%。原生质体分裂形成的愈伤组织转移在附加1~2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA(或KT)和0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA的MS培养基上培养后, 可以分化并获得再生植株。纸电泳检测表明, 原生质体再生的愈伤组织和分化植株仍然含有毛状根转化系的特异产物——冠瘿碱。

**关键词:** 骆驼刺; 发根农杆菌A4转化系; 原生质体培养

## Protoplast Culture and Plantlet Regeneration from Cell Line of *Agrobacterium rhizogenes* A4-transformed *Alhagi pseudalhagi* Desv

ZHANG Gai-Na<sup>1,2</sup>, JIA Jing-Fen<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract:** The protoplasts were isolated from calli which were induced from hairy root segments of *Agrobacterium rhizogenes* A4-transformed *Alhagi pseudalhagi*. After cultured in the DPD medium supplemented with 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.3 mol·L<sup>-1</sup> mannitol, 500 mg·L<sup>-1</sup> casein hydrolysate (CH) and 2% (W/V) sucrose, the protoplasts underwent sustained divisions and formed calli. The protoplast density of 4×10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup> and (450±3) mOsm·kg<sup>-1</sup> osmotic pressure in culture medium were proved to be appropriate for obtaining higher division frequency of protoplasts. A lot of protoplasts could be obtained by the enzymatic hydrolysis of yellowish subcultured calli after cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 500 mg·L<sup>-1</sup> CH and 2% (W/V) sucrose for 7–10 d. Lower temperature (4℃) pretreatment of subcultured calli enhanced ratios of protoplast isolation and subsequent divisions. The division frequency of protoplasts was about 50%. After transferred on the MS medium added with 1–2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA (or KT) and 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA, the protoplast-derived calli differentiated and formed the regenerated plantlets. Paper electrophoresis analysis indicated that the protoplast-derived calli and regenerated plantlets still contained special product—opine in transgenic root hairs.

**Key word:** *Alhagi pseudalhagi*; *Agrobacterium rhizogenes* A4-transformed cell line; protoplast culture

骆驼刺是一种耐盐抗旱性很强的半灌木豆科植物, 在干旱荒漠区广泛分布(董志国 2000), 骆驼刺原生质体的培养尚未见报道。我们研究室曾成功地获得了高效的骆驼刺离体再生体系(步怀宇等 2000a)和发根农杆菌A4转化的骆驼刺毛状根转化系, 并再生植株(步怀宇等 2000b)。发根农杆菌转化系再生能力较强, 是很好的体细胞杂交材料; 且具有激素自主型生长和产生特异产物——冠瘿碱等特征, 可为远缘体细胞杂交提供筛选和鉴别标记。本文以骆驼刺的毛状根转化系诱导的愈伤组织为材料, 从中分离的原生质体持续分裂后, 获得

的愈伤组织长成完整的再生植株, 从而为将骆驼刺的耐盐抗旱性状通过体细胞杂交技术转移到其它牧草中的遗传操作建立了实验基础。

### 材料与方法

取我们研究室离体再生骆驼刺(*Alhagi pseudalhagi* Desv)的茎切段(0.5 cm)与发根农杆菌

收稿 2009-01-09 修定 2009-03-25

资助 国家自然科学基金(30671082)。

\* 通讯作者(E-mail: zgnluck1@163.com; Tel: 0379-64282340)。

共培养获得的毛状根, 切成 0.5 cm 左右的小段, 接种到附加 1.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA、1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、500 mg·L<sup>-1</sup> 水解酪蛋白(CH)、3% 蔗糖和 0.65% 琼脂粉的 MS 培养基上, 诱导愈伤组织。经继代培养 4 次后获得质地疏松的淡黄色微粒状愈伤组织, 用于制备原生质体。

将转代培养 8~12 d 之间的松软的淡黄色愈伤组织在 4 °C 条件下分批处理 0、3、5、8、10 h, 各取 2 g, 按照张改娜等(2006)文中方法分离与纯化原生质体。

将以低温处理 5 h 的愈伤组织获得的纯化的原生质体悬浮于附加不同植物生长物质和渗透压的 DPD 液体培养基(Durand等1973)中, 调整其密度至 4×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 置入直径 6 cm 的灭菌培养皿中, 每皿放 2 mL。于(25±2) °C、黑暗下进行液体浅层培养。每天轻轻摇动培养皿 2 次。定期观察培养过程中原生质体的生长分裂状况。试验比较了不同植物生长物质和渗透压对原生质体培养的影响; 并在附加成分均为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D、0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、500 mg·L<sup>-1</sup> CH、2% 蔗糖和 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 甘露醇条件下, 还比较了 B<sub>5</sub> 培养基(Gambory等1968)和 DPD 培养基对原生质体培养的影响。培养过程中每隔 10 d 向每个培养皿中添加 0.5 mL 新鲜培养基, 直至出现肉眼可见的大细胞团。相对分裂频率以培养 15 d 时发生分裂的原生质体数占植板的存活原生质体总数的百分数表示。每次随机检查 20 个视野。每个处理至少重复 3 次。原生质体的活力用酚酞花红染色法(Widholm 1972)检查。

将原生质体分裂形成肉眼可见的小细胞团转入不加外源生长物质的 MS 培养基上进行扩增, 以获得大量的愈伤组织。为了诱导分化, 还将获得的愈伤组织转移到含 2,4-D、6-BA、NAA、GA<sub>3</sub> 和 KT 等不同生长物质组合的 MS 固体培养基上, 在(25±2) °C、120 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 光照强度、光照 12 h·d<sup>-1</sup> 的条件下诱导苗的分化。获得再生幼苗后, 转至含 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NAA 的 MS 培养基中诱导生根。将含完整植株的培养瓶打开盖子, 移入空气湿度为 60%、温度 28 °C 的人工气候室炼苗 7 d, 然后移栽到花盆土中。

参考 Ohara 等(2000)的方法检测转化组织中特异产物甘露碱的存在, 以未经转化的正常愈伤组织为对照。取 1 g 待测的组织在 1 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的

HCl 中研磨, 以 1 000×g 离心 10 min, 取 10 μL 上清液点样于新华 1 号滤纸上, 在 400 V 条件下电泳 50 min。电泳时的缓冲液为甲酸:乙酸:水=30:60:90 (V/V/V)。电泳结束后, 取出滤纸吹干, 以碱性 AgNO<sub>3</sub> 法染色(Wang 等 2001)并照相。

## 结果与讨论

### 1 毛状根转化系的愈伤组织生长状态与原生质体产率的关系

用于制备原生质体的愈伤组织状态对原生质体的产率和活力有很大影响。毛状根切段在含 2,4-D 的 MS 培养基上诱导的初始阶段, 其愈伤组织质地坚硬, 且愈伤组织细胞中含有大量的淀粉颗粒, 分离的原生质体量很少。但在附加 NAA (1.5 mg·L<sup>-1</sup>) 和 6-BA (1 mg·L<sup>-1</sup>) 的 MS 培养基上经过多次继代培养后, 转化系的愈伤组织逐渐变成淡黄色颗粒状, 淀粉粒大量减少, 具有胚性愈伤组织的特征。实验发现该状态的愈伤组织是分离原生质体的适宜材料。愈伤组织转入新鲜的同一种培养基上后, 取材时间对分离原生质体的效果至关重要。图 1 结果显示, 转代后生长 10 d 左右的愈伤组织分离原生质体的产量较高, 每克鲜重愈伤组织可分离出 3×10<sup>6</sup> 个原生质体, 有活力的原生质体在 80% 以上。这可能是由于这一阶段的愈伤组织处于旺盛生长期和细胞处于增殖期所致。而转入新培养基生长时间较短或生长时间较长(15 d 以上)的愈伤组织, 其分离

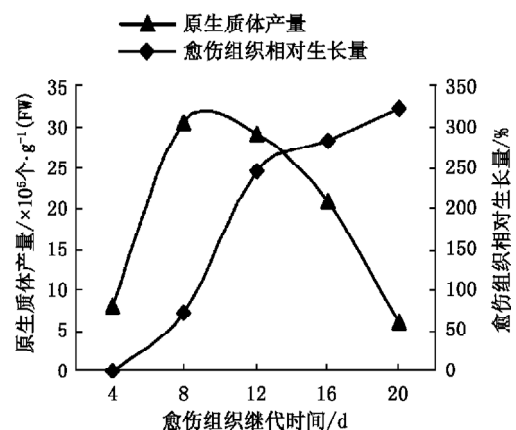


图1 骆驼刺发根农杆菌转化系愈伤组织相对生长量与原生质体产量的关系

Fig.1 Relationship between calli relative growth and protoplast yield in cell line of *A. rhizogenes* A4-transformed *A. pseudalhari*

原生质体的产率都较低。这表明,只有处于旺盛增殖期的愈伤组织才能分离出大量的原生质体。

## 2 转化系毛状根愈伤组织的低温预处理与其原生质体分裂的关系

未经处理的毛状根转化系诱导的愈伤组织分离出来的原生质体数量很少,分裂频率也不高,但愈伤组织经过一定的低温处理分裂频率明显提高。从表1可以看出,4℃处理3~8h的愈伤组织,其分离的原生质体第一次分裂的启动时间虽然晚了一些,但分裂频率都明显提高,其中处理5h的分裂频率为最高,可达到45.7%。未经低温处理的或处理时间过长(10h),其分离的原生质体,分裂频率明显较低。

表1 低温预处理对骆驼刺发根农杆菌转化系愈伤组织原生质体分裂频率的影响

Table 1 Effects of low temperature pretreatment of hairy root calli on the division frequency of protoplasts in cell line of *A. rhizogenes* A4-transformed *A. pseudalhari*

预处理时间/h	原生质体活力/%	第一次分裂起始时间/d	原生质体分裂频率/%
0	29.1±2.8	2	21.8±0.9
3	44.8±1.3	4	29.2±1.2
5	78.3±3.3	4	45.7±1.7
8	71.4±2.7	6	39.6±1.1
10	39.8±1.9	6	16.2±1.1

预处理温度为4℃,培养第10天的分裂频率。

## 3 基本培养基对转化系愈伤组织原生质体分裂频率的影响

培养基是维持离体细胞生活和生长最基本的营养条件。原生质体是脱壁细胞,一般来说,其所用培养基的营养成分比植物组织或细胞培养所用的培养基要丰富。我们在附加物相同的条件下,比较B<sub>5</sub>和DPD两种基本培养基对原生质体培养影响的结果表明:在用液体浅层培养到第10天时,B<sub>5</sub>培养基中极少有原生质体分裂,大部分细胞破碎死亡。DPD培养基中原生质体的相对分裂频率大约为45%。显示DPD培养基更适合于骆驼刺原生质体的培养。

## 4 培养基渗透压对原生质体分裂频率的影响

在培养基中其它成分相同的条件下,采用附加不同浓度的甘露醇,用Vapro的Pression Osmometer仪(德国Eppendorf公司)渗透压计测量了培养基的

渗透压,比较了不同渗透压下原生质体存活状况和分裂频率。表2结果表明:骆驼刺转化系的原生质体在渗透压为430~700 mOsm·kg<sup>-1</sup>的范围内均可以存活和分裂。渗透压为(540±3) mOsm·kg<sup>-1</sup>时,分裂频率最高(45.3%)。渗透压小于430 mOsm·kg<sup>-1</sup>时,转化系的一部分原生质体破裂,存活率和分裂频率明显较低。而渗透压高于700 mOsm·kg<sup>-1</sup>,多数原生质体皱缩,存活率很低。可见,细胞内外的渗透压值保持一定的平衡程度,也是保证原生质体高存活率和分裂频率的一个必需条件。

表2 不同渗透压对原生质体分裂频率的影响

Table 2 Effects of different osmotic pressures on protoplast division frequency

甘露醇浓度/ mol·L <sup>-1</sup>	渗透压/ mOsm·kg <sup>-1</sup>	存活率/ %	分裂频率/ %
0.2	430±3	11.1±3.4	4.1 (多数破裂)
0.3	540±3	79.8±2.7	45.3
0.4	610±3	70.5±4.7	34.8
0.5	700±3	19.8±3.6	11.8 (多数皱缩)

## 5 原生质体的分裂及其愈伤组织的形成和分化

原生质体在附加1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D、0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、0.3 mol·L<sup>-1</sup> 甘露醇、2% (W/V)蔗糖和500 mg·L<sup>-1</sup> CH的DPD培养基中,起始时间培养密度为4×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>,培养5~6d后开始出现第一次分裂(图2-a、b)。原生质体的一次和二次分裂都有对称分裂、不对称分裂和出芽现象。不对称一次分裂产生两个不等细胞(图2-c)。出芽分裂很少能持续分裂形成细胞团。二次分裂也有多种情况,对称分裂产生的两个等大细胞,有同步(图2-d),也有不同步分裂(图2-c)。典型的二次分裂中,第二次分裂垂直进行,但也存在平行分裂,产生一串细胞(图2-f)。

原生质体培养3周后可形成小细胞团(图2-h)。持续分裂形成肉眼可见的小愈伤组织。此时将培养物移至40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>光下培养,可进一步形成结构紧密的胚性愈伤组织(图2-i)。胚性愈伤组织扩增培养后,转至不同生长物质组合的MS培养基(表3)上,培养一段时间(25d)后,在6-BA(1~2 mg·L<sup>-1</sup>)与NAA(0.2 mg·L<sup>-1</sup>)组合和KT(2 mg·L<sup>-1</sup>)与NAA(0.2 mg·L<sup>-1</sup>)组合中,逐渐由淡黄绿色变为深绿色,并有许多芽点和少许幼芽出现(图2-j)。在培养

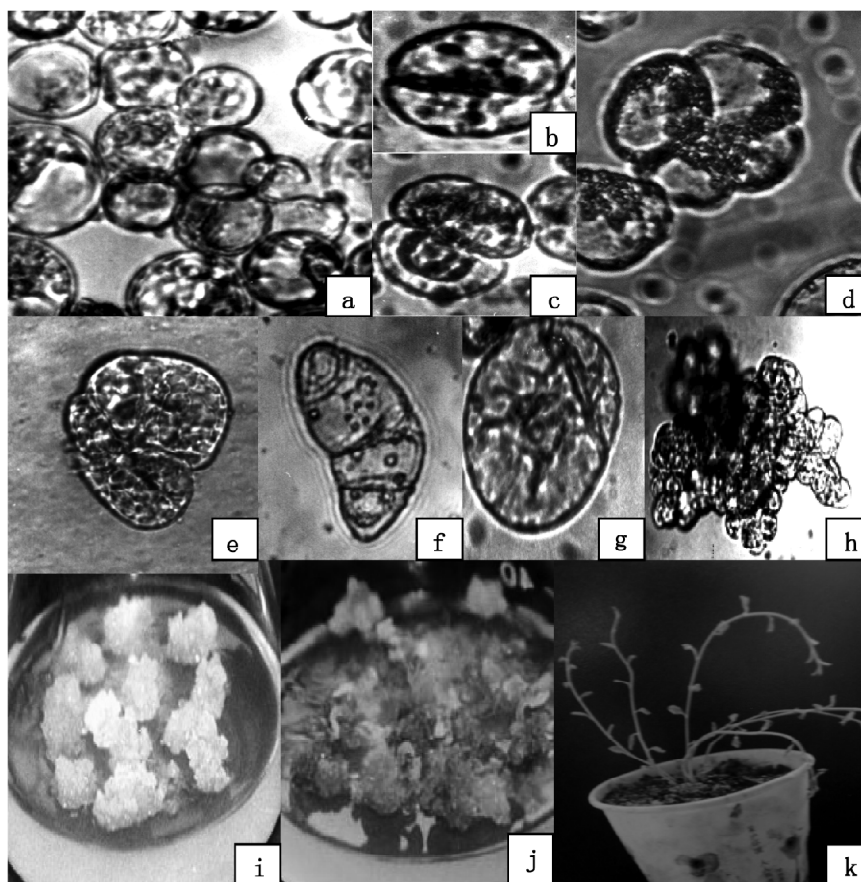


图2 骆驼刺原生质体培养

Fig.2 Protoplast culture of *A. pseudalhagi*

a: 骆驼刺愈伤组织游离的原生质体; b: 骆驼刺原生质体的对称分裂; c: 原生质体一次对称分裂后的不同步分裂; d: 原生质体一次对称分裂后的同步分裂; e: 原生质体一次不对称分裂后的同步分裂; f: 原生质体平行分裂; g: 原生质体不对称分裂; h: 肉眼可见的小愈伤组织; i: 原生质体细胞来源的愈伤组织; j: 原生质体来源愈伤组织分化的芽; k: 原生质体来源的骆驼刺转化系再生植株。

表3 不同植物生长物质组合对愈伤组织分化的影响

Table 3 Effects of different plant growth substances on callus differentiation

植物生长物质/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				接种愈伤 组织数/块	分化愈伤 组织数/块	芽的分化率/%
6-BA	KT	NAA	$\text{GA}_3$			
1	0	0.2	0	67	8	11.94
1	0	0.2	0.1	82	29	35.37
1	0	1.0	0	86	20	23.26
2	0	0.2	0	82	17 (弱)	20.73
2	0	1.0	0	94	10 (玻璃化苗)	10.64
0	2	0.2	0	90	23	25.56
0	2	0.2	0.1	86	26	30.23
0	4	0.2	0	80	0	0

基本培养基: MS+3% 蔗糖 +0.7% 琼脂, pH 5.8~6.2。

基中加入  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ GA}_3$ , 愈伤组织的分化率可显著提高。再生幼苗在不附加任何生长物质的 1/2MS

生根培养基上培养50 d后, 经炼苗移栽至土中成活(图 2-k)。

最后,我们还检测了冠瘿碱,以纸电泳检测农杆菌和甘露碱合成酶活性的结果表明,经发根农杆菌转化愈伤组织制备的原生质体再生的愈伤组织中能检测出农杆菌和甘露碱,未经根癌农杆菌转化的骆驼刺愈伤组织中则未检测到冠瘿碱(图3)。这表明发根农杆菌 A4 的 Ri T-DNA 在骆驼刺原生质体形成的愈伤组织中可稳定遗传。

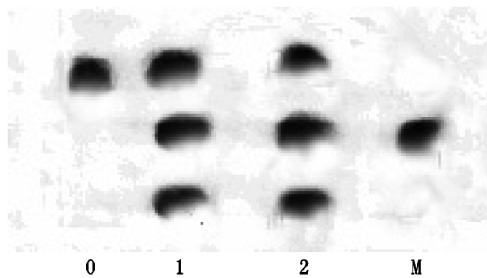


图3 纸电泳图谱

Fig.3 Paper electrophoretic pattern

0: 未经根癌农杆菌转化的骆驼刺愈伤组织; 1: 发根农杆菌转化系形成的愈伤组织; 2: 经发根农杆菌转化愈伤组织制备的原生质体再生的愈伤组织; M: 甘露碱。

### 参考文献

步怀宇, 贾敬芬, 郝建国(2000a). 骆驼刺高效离体植株再生体系

- 的建立. 西北大学学报(自然科学版), 30 (6): 505~508
- 步怀宇, 景建洲, 郝建国, 贾敬芬(2000b). 不同理化因子对发根农杆菌 Ri 质粒转化骆驼刺的影响. 西北植物学报, 20 (4): 577~584
- 董志国(2000). 干旱荒漠区骆驼刺的经济价值及其利用. 塔里木农垦大学学报, 12 (3): 58~60
- 谷文英, 维纳汗, 周建民, 哈地夏, 萨利娜(1997). 骆驼刺下胚轴组织培养和植株再生研究. 草业科学, 14 (3): 32~33
- 张改娜, 王瑛华, 王学仁, 何涛, 郝建国, 贾敬芬(2006). 鹰嘴紫云英甲硫氨酸抗性系原生质体培养及植株再生. 分子细胞生物学报, 39 (3): 191~197
- Durand J, Potrykus I, Donn G (1973). Plants from protoplasts of petunia. Z Pflanzenphysiol, 69: 26~34
- Gambory OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50: 151~158
- Ohara A, Akasaka Y, Daimon H, Mii M (2000). Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria juncea* L.. Plant Cell Rep, 19: 563~568
- Widholm JM (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining the viability of cultured cells. Stain Technol, 47: 189~194
- Wang YM, Wang JB, Luo D, Jia JF (2001). Regeneration of plants from callus tissues of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagi pseudoalhagi*. Cell Res, 11: 279~284