

油松胚珠愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立

杨远媛 贺窑青 郑彩霞*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

提要 雌配子体处于游离核时期的油松胚珠以含不同浓度和配比生长调节剂的培养基诱导产生愈伤组织, 并建立了悬浮细胞系。这一悬浮细胞系生长快, 分散性好, 稳定均一, 适用于研究其生理、生化和细胞周期调控。

关键词 油松胚珠; 愈伤组织; 悬浮细胞系

Induction of Callus from the Ovule of *Pinus tabulaeformis* Carr and Establishment of Suspension Cell Line

YANG Yuan-Yuan, HE Yao-Qing, ZHENG Cai-Xia*

College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract Ovule callus of *Pinus tabulaeformis* Carr, which female gametophytes were on the mitosis of the free nuclei, was induced on MS media with different concentrations and combinations of hormones and the suspension cell line was established. The suspension cell line grew rapidly and was fairly homogenous. It was suitable to be studied on the mechanisms of the plant physiology, biochemistry and the regulation of cell cycle.

Key words ovule of *Pinus tabulaeformis* Carr; callus; suspension cell line

雌性不育现象在高等植物中普遍存在, 由于不育原因复杂和研究材料的困难, 其生理生化机制研究较为迟缓。我们实验室曾报道, 辽宁兴城油松种子园的油松(*Pinus tabulaeformis* Carr)雌性不育株(28号无性系)表现为不结实, 此种败育可能与遗传因素有关^[1,2]。我们以前的工作还证明这一无性系存在特异的DNA片段和蛋白质^[3,4], 其雌性不育的原因可能是雌配子体的游离核在休眠之后停止分裂之果^[5]。为进一步从细胞生物学水平上探索游离核停止分裂的原因, 需要建立油松胚珠(处于游离核时期)悬浮细胞系。一般油松多以封顶芽^[6]、种胚^[7]、雌配子体(已成为多细胞结构)^[8]等为外植体进行离体培养, 而用细胞悬浮培养尚未见报道。本文以处于游离核时期的油松胚珠为材料, 探讨了愈伤组织诱导和继代培养的条件, 并建立了悬浮细胞系。现报道如下。

材料与方法

实验材料采自我校校园内的成年油松(*Pinus tabulaeformis* Carr), 雌配子体处于游离核时期的胚珠。

诱导胚珠愈伤组织时, 取油松大孢子叶球,

经70%酒精消毒5 s后再以2%的次氯酸钠消毒5 min, 用无菌水冲洗3次。剥出胚珠, 接种在附加不同浓度和配比生长调节剂的MS培养基上, 置于培养室中暗培养, 温度25~28℃。

培养30 d后, 挑选无褐化现象的愈伤组织, 接种到经正交设计的继代培养基上暗培养。20 d后, 统计鲜重和褐化率, 计算各处理的相对生长量(愈伤组织实际增重/愈伤组织接种量), 重复3次求平均值, 并对试验结果进行方差分析。

愈伤组织制片参照文献8的方法, 用卡诺固定液(酒精:冰醋酸=3:1)固定24 h, 用盐酸、95%酒精各半的溶液水解, 卡宝品红染色、压片、镜检。

将培养5个月的愈伤组织转移到液体培养基中, 置于摇床上, 在光照条件(光照度为20~30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下, 振荡(100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)培养。继代培养初期, 采用直接倾倒法, 经过5~7代后每天用200目不锈钢筛过滤1次, 以获得均一的悬浮

收稿 2005-02-05 修定 2005-06-20

资助 国家自然科学基金(30371144)。

*通讯作者(E-mail: zhengcx@bjfu.edu.cn, Tel: 010-62337717)。

细胞。

参照文献9的方法测定继代以后稳定悬浮培养物的密实体积、细胞干重, pH值用雷磁PHSJ-3F实验室pH计直接测定。所有实验均重复3次。

实验结果

1 愈伤组织的诱导

接种于诱导培养基上的部分胚珠, 3 d左右开始膨大, 颜色逐渐由白变黄。1周后, 膨大的胚珠愈伤组织突破胚珠壁向外生长。1个月后统计的结果表明, 在不加生长调节剂的MS培养基上, 胚珠愈伤组织诱导率极低, 在2~6号培养基上均诱导出不同颜色、不同质地的愈伤组织, 特别是在2号和6号培养基上诱导率高达73%和80%(表1)。2号培养基上的胚珠愈伤组织质量良好, 生长迅速; 而6号培养基上的愈伤组织后期出现了严重褐化、萎缩等现象, 不利于继续培养。根据愈伤组织诱导率和生长情况, 我们认为2号为最佳的诱导培养基。

2 愈伤组织继代培养基的筛选

选择NAA、IBA、6-BA 3种生长调节剂, 分别用3种不同浓度进行正交实验设计(表2), 筛选最佳继代培养基。如表2所示, NAA、IBA、6-BA对愈伤组织增殖的影响都达到差异极显著水平, 其影响的大小顺序为: 6-BA>NAA>IBA。各处理间的褐化率相差极大(表3)。这些说明油松胚珠愈伤组织继代培养时, 应当降低生长素和分裂素的浓度, 以促进愈伤组织生长, 抑制褐化、水渍化和生活力降低等现象。综合上述结果, 我们认为最佳继代培养基为6-BA 0.1+NAA 0.5。

经过几次继代培养后, 愈伤组织在后期逐渐出现差异分化, 形成4类明显可辨的愈伤组织。第1类是浅黄色、疏松、有粘性的愈伤组织。显微观察证明这类愈伤组织细胞排列规则, 细胞核较大, 细胞质丰富(图1-a)。第2类是白色透明的疏松愈伤组织。这类愈伤组织细胞较大, 细胞形状及排列不规则, 细胞核较小, 存在死细胞(图1-b); 第3类是绿色、紧密的颗粒状愈伤组织,

表1 不同生长调节剂组合对胚珠愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different combinations of growth regulators on ovule callus induction

| 试验编号 | 生长调节剂/mg·L ⁻¹ | 外植体数 | 出愈数 | 诱导率/% | 生长状况 |
|------|----------------------------|------|-----|-------|------|
| 1 | 0 | 30 | 2 | 7 | 差 |
| 2 | 6-BA 0.2+IBA 0.2+NAA 1.0 | 30 | 22 | 73 | 好 |
| 3 | 6-BA 0.1+IBA 0.1+NAA 0.5 | 30 | 13 | 43 | 较差 |
| 4 | 6-BA 0.2+IBA 0.2+2,4-D 0.5 | 30 | 20 | 67 | 较好 |
| 5 | 6-BA 0.1+IBA 0.1+2,4-D 0.5 | 30 | 14 | 47 | 较差 |
| 6 | KT 0.2+IBA 0.2+NAA 1.0 | 30 | 24 | 80 | 较差 |

表2 愈伤组织继代培养基的正交实验设计和结果

Table 2 The orthogonal design of the subculture and the results

| 试验编号 | N A A | 6-BA | IBA | 相对生长量 |
|------|----------|----------|----------|-------|
| 1 | 0.5 | 0.1 | 0 | 5.8 |
| 2 | 0.5 | 0.5 | 0.2 | 2.6 |
| 3 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 3.4 |
| 4 | 1.0 | 0.1 | 0.2 | 3.7 |
| 5 | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 1.74 |
| 6 | 1.0 | 1.0 | 0 | 3.4 |
| 7 | 1.5 | 0.1 | 0.5 | 3.8 |
| 8 | 1.5 | 0.5 | 0 | 2.4 |
| 9 | 1.5 | 1.0 | 0.2 | 2.0 |
| F值 | 139.02** | 424.17** | 115.42** | |

**表示差异极显著。

表3 不同处理的愈伤组织褐化率

Table 3 The browning rates of callus in different experimental designs

| 试验编号 | 褐化率/% |
|------|-------|
| 1 | 25 |
| 2 | 50 |
| 3 | 72 |
| 4 | 67 |
| 5 | 80 |
| 6 | 60 |
| 7 | 71 |
| 8 | 86 |
| 9 | 77 |

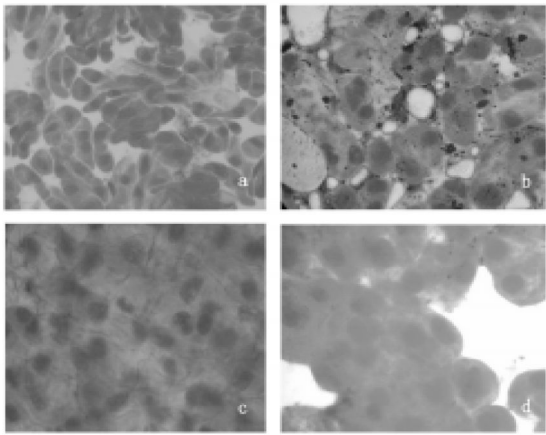
图1 4种类型的胚珠愈伤组织($\times 450$)

Fig. 1 Four types of callus of the ovule

a: 第1类愈伤组织; b: 第2类愈伤组织; c: 第3类愈伤组织; d: 第4类愈伤组织。

愈伤组织细胞排列非常紧密, 细胞核大(图1-c)。此类愈伤组织生长慢, 分化能力强, 能分化出茎状突起, 但后期易褐化死亡。第4类是黄色的片状水渍化愈伤组织, 其细胞核大(图1-d)。这类愈伤生长快, 在光下易褐化死亡, 不适合继续增殖培养。

3 悬浮细胞系的建立

根据我们的试验, 可以明确以下几点:

(1) 悬浮细胞系建立的关键是挑选适合于悬浮培养的愈伤组织。将继代培养的不同类型的愈伤组织系分批转移到液体培养基中, 最终只在第1类型的2个愈伤组织系中形成了悬浮细胞系, 其余的均在5 d内褐化死亡。证明油松胚珠诱导的第1类型的愈伤组织适用于细胞悬浮培养。

(2) 设计了6-BA (0.1~0.5)、IBA (0~0.2)、NAA (0.5~1.0) 多种生长调节剂组合的14种液体培养基。通过单因子试验发现, MS+6-BA 0.3+NAA 0.6组合诱导的悬浮细胞生长旺盛、分散性好、呈浅绿色。在其他组合中, 愈伤组织分别在1~5 d内出现褐化现象, 特别是在IBA单因子试验中发现, IBA浓度越高, 褐化现象出现越早。由此可见, 在油松细胞悬浮培养中不宜使用IBA。

(3) 一般认为, 悬浮培养体系中细胞密实体积反映了细胞生长情况, 而细胞干重在一定程度反映了细胞的质量。在培养过程中, 油松细胞的密实体积和干重的变化曲线均呈“S形”, 明显分

为3个阶段: 延迟期(0~3 d)、指数生长期(4~6 d)、静止期(7~9 d)。观察处于指数生长期的悬浮细胞, 结果表明, 单细胞分散性较好(图3), 细胞活力达到80%以上。在整个生长周期中, 悬浮细胞生长速度较快, 细胞干重增长8倍左右, 但在培养第8天悬浮细胞出现褐化现象, 因此认定悬浮培养的最佳继代时间为6 d。

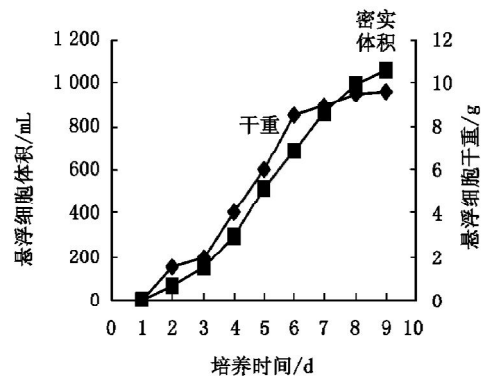
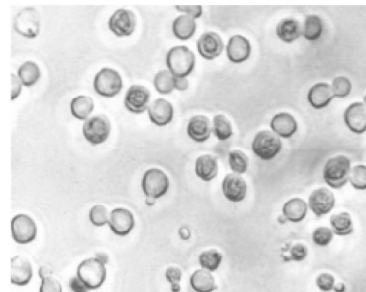


图2 油松悬浮细胞的生长周期

Fig. 2 Growth course of suspending cells of *P. tabulaeformis*图3 油松悬浮细胞($\times 450$)Fig. 3 The suspending cells of *P. tabulaeformis*

(4) 在培养过程中, 细胞培养液的pH值也发生变化(图4)。其变化规律与喜树等细胞悬浮培养液的pH值变化规律相似^[10], 这可能与细胞代谢活动有关。测定细胞生物量增长率、pH值和细胞活性的结果表明, 这一悬浮细胞系生长较快, 分散性好, 稳定均一, 适用于生理、生化和细胞周期调控的研究。

讨 论

已有报道认为细胞分裂素和生长素比值小于1时, 容易诱导离体培养的针叶树产生愈伤组织,

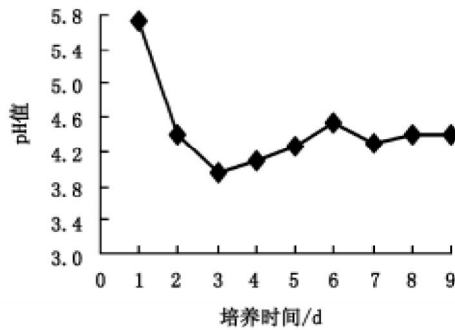


图4 细胞悬浮培养液中pH值的变化

Fig. 4 Change in pH value of suspending culture medium

促进嫩梢和针叶的分化^[6]。从本文中结果来看,适当配比的细胞分裂素与生长素对油松胚珠的离体培养明显起作用。另有报道认为油松休眠芽离体培养中,6-BA效果较好,但浓度不宜过高,若配以少量IBA则有利于诱导分化^[11]。本文结果与此结论基本上一致,但我们认为在愈伤组织继代培养和细胞悬浮培养过程中,低浓度IBA和高浓度NAA容易引起褐化和产生水渍化现象,且不利于愈伤组织的增殖,因此,在继代培养基和细胞悬浮培养基中应除去IBA,采用低浓度NAA和6-BA的组合。

油松组织培养中的最大问题是褐化严重,前人曾尝试在培养基中加入活性炭等物质以消除褐化^[12],但效果都不十分理想。为减轻愈伤组织继代培养过程中的褐化作用,本文采用挑选未褐化的愈伤组织块继代和缩短继代培养周期的方法,效果较好。值得注意的是,当把发育后期已成为多细胞结构的雌配子体(也称为胚乳)接种于胚珠愈伤组织块上进行看护培养时,雌配子体有一定程度的增大,但不产生愈伤组织;而愈伤组织块增殖加快,且褐化现象得到明显的抑制。这说明油松胚乳对胚珠愈伤组织的增殖有促进作用,而对褐化有抑制作用,其机制尚需进一步探讨。另外,前人曾在火炬松胚性细胞悬浮培养基中加入一定量火炬松种子胚乳粉的方法^[13],对防止褐化也有一定的效果。因此这一措施似值得考

虑。

油松胚珠的生长发育是一个漫长而复杂的过程,其中既有生殖细胞和相关细胞的频频分裂增殖,又有它们的不断发育、分化和死亡。这些发育过程常会受各种特定因素影响而受阻,最终导致雌性不育或种子败育。针对油松28号无性系因游离核在早期停止分裂而导致的雌性不育现象,我们选择处于游离核时期的油松胚珠进行离体培养,建立其悬浮细胞系,从细胞周期调控机制入手,探索离体培养条件下胚珠细胞发育和周期规律,探究导致游离核停止分裂的原因,解决了活体材料难以取得和影响条件难以控制的实际问题,这对揭示胚珠生长发育的细胞分子生物学机制来说显然是有意义的。

参考文献

- 1 李凤兰,沈熙环,李悦.油松雌性不育无性系的发现及其原因分析.河北林学院学报,1992,7(2):93~98
- 2 李凤兰,郑彩霞.油松胚珠后期败育问题初探.北京林业大学学报,1993,14(1):46~56
- 3 李敏俐,郑彩霞.油松雌性不育系(28号无性系)的RAPD分析.北京林业大学学报,2002,24(4):35~38
- 4 丁坤善,郑彩霞,包仁艳.油松雌性不育系的POD同工酶和蛋白质多肽分析.西北植物学报,2004,24(1):17~20
- 5 Cheng PJ, Li FL, Zheng CX. The anatomic study of the female sterility of *Pinus tabulaeformis* Carr. 中国林业研究,2003,51:21~24
- 6 齐力旺,杨云龙,韩素英等.油松封顶芽的组织培养.植物生理学通讯,1995,31(1):40~41
- 7 郑均宝,王进茂,杜克久等.油松体细胞无性系的建立.遗传学报,1996,23(4):307~314
- 8 顾淑荣,朱至清,赵敬芳等.白皮松和油松雌配子体愈伤组织的诱导和分化.植物学报,1995,37(3):217~221
- 9 汤章城,魏家绵,陈因等主编.现代植物生理学实验指南.北京:科学出版社,1999.38~40
- 10 高桂珍,周吉源.喜树细胞悬浮培养中生理生化指标的测定.武汉植物学研究,2003,21(3):259~261
- 11 韩素英,齐力旺,杨云龙等.几种针叶树种离体培养条件的研究.林业科技通讯,1995,10:20~22
- 12 郑均宝,潘冬梅,陈正华.油松离体胚子叶的组织分化和无根试管苗的形成.河北林学院学报,1994,9(2):97~101
- 13 唐巍,欧阳藩,郭仲琛.火炬松胚性细胞悬浮培养物的生长参数变化.热带亚热带植物学报,1998,6(1):30~34