

杏茎脆散型愈伤组织的获取 及细胞悬浮培养的建立

陈崇顺* Robert Jonard

(Laboratoire de Physiologie végétale appliquée,

Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34095 Montpellier, France)

摘要 对获取两个杏(*Prunus armeniaca* L.)品种‘Canino’和‘Luizet’茎脆散型愈伤组织及建立其细胞悬浮培养进行了研究。结果表明,增加继代培养次数,提高培养基中Ca⁺⁺的加入量,选用未木质化的外植体,配以含有较高浓度的2,4-D和激动素的培养基,能迅速获得100%的脆散型愈伤组织,成功地建立其细胞悬浮培养系统。

关键词 细胞悬浮培养;脆散型愈伤组织;茎;杏

Acquisition of friable calli from stems and establishment of the cell suspension cultures of *Prunus armeniaca* L. cv. Canino and Luizet Chen Chong-Shun and Robert Jonard (Laboratoire de Physiologie végétale appliquée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34095 Montpellier, France), *J. Plant Resour. & Environ.* 1994, 3(3): 22~26

The acquisition of friable calli and the establishment of the cell suspension cultures of the stems of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L. cv. Canino and Luizet) were studied. The results obtained indicated that 100% friable calli can be acquired rapidly in the presence of higher concentrations of 2,4-D and kinetin in the media, by increasing the number of subcultures, raising the addition of Ca⁺⁺ to the media and choosing the non-lignified explants, and the cell suspension cultures have been successfully established.

Key words cell suspension cultures; friable calli; stem; *Prunus armeniaca* L.

植物细胞培养对研究次生代谢物的生物合成是有价值的,而且很可能是最终提供生产上(在药物、香精和色素等方面)重要的植物产物的有效方法^[1]。细胞悬浮培养系统也可作为探讨有关生理生化问题的一种研究模型^[5]。对植物细胞悬浮培养的研究大多集中于草本植物,以木本植物为试材的报道很少^[1-3]。作者以杏的两个品种‘Canino’和‘Luizet’的茎段为试材进行细胞悬浮培养的研究。

1. 材料与方 法

1.1 材料

两个杏(*Prunus armeniaca* L.)品种:‘Canino’(Clone 1343)和‘Luizet’(Clone 665)的茎段取自 Manduel 试验基地(法国)的6年生植株,或取自这两个无性繁殖系的试管幼苗。

收稿日期 1994-04-08

* 现在通讯地址:华南农业大学生物系(广州五山,510642)

1.2 方法

1.2.1 植物材料的灭菌 按照 Chen^[5]的方法。

1.2.2 培养基与培养条件 以 Lepoivre 无机培养基^[7]为基础, 加入 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的维生素 B₁, 4.9 $\mu\text{mol/L}$ 的维生素 B₆, 0.56 m mol/L 的肌醇和 8.1 $\mu\text{mol/L}$ 的烟酸, 及 30 g/L 的蔗糖。固体培养基则加入 6 g/L 的琼脂。培养基的 pH 5.6。培养物在无光、25℃ 的条件下生长。每试验处理含 30 或 40 个茎段或愈伤组织块。培养 4 周后观测试验结果。细胞悬浮培养容器为 250 ml 的三角瓶, 水平式摇床的速度为 100 r/min^[5]。例外情况及所用植物激素的种类和浓度在具体试验结果与讨论中说明。

1.2.3 试验结果的统计分析 参照 Chen^[5]文。所得分析结果用括号内注字母的形式标在相应的表内和图中。那些标有不同字母的处理之间有显著差异(5%)。

2. 结果与讨论

2.1 2,4-D 的浓度对诱导杏茎愈伤组织的影响

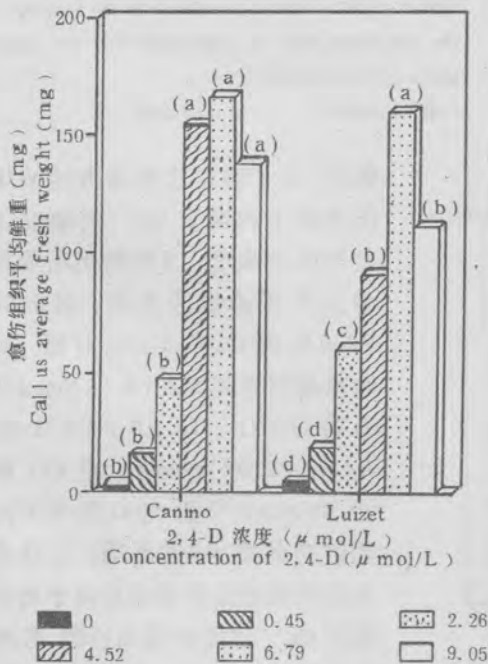


图1 2,4-D 浓度对杏茎愈伤组织生长的影响

Fig 1 Effects of 2,4-D concentrations on the growth of the calli issued from the stem of apricot

表明李属几种植物(包括本研究的‘Canino’、‘Luizet’两个杏品种)茎段形成愈伤组织的质地多数也较坚实。还有一类“海绵型”愈伤组织,其特征为,表面黄白色,质地硬,内部近白色,海绵状,完全没有脆散性,且很难进一步培养。愈伤组织的脆散性取决于该愈伤组织的来源,有

以不同浓度的 2,4-D 与 4.65 $\mu\text{mol/L}$ 的 KT 配合, 观察对诱导 ‘Canino’ 和 ‘Luizet’ 茎段愈伤组织的影响。结果(见图1)表明, 2,4-D 对诱导杏茎段愈伤组织的形成、生长是必需的。没有 2,4-D 的加入, 几乎观察不到愈伤组织的形成。‘Luizet’ 对 2,4-D 的浓度较敏感, 在 6.79 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其愈伤组织的生长量最大。‘Canino’ 对 2,4-D 浓度的敏感性稍弱, 但在 6.79 $\mu\text{mol/L}$ 时, 愈伤组织的生长也最好。因此将 6.79 $\mu\text{mol/L}$ 选定为下述试验中 2,4-D 的使用浓度。不少研究者也曾试验过各种 2,4-D 浓度对愈伤组织生长的影响, 看到浓度过低(在 10^{-9} mol/L 以下)时, 生长缓慢; 而浓度过高(在 10^{-3} mol/L 以上)时, 生长完全受到抑制。对于菊芋块茎、烟草髓、胡萝卜贮藏组织等, 2,4-D 的最适浓度都在 10^{-6} mol/L 左右^[3]。

需要指出的是, 以采自生长于实验基地植株上的茎段为试材, 在上述培养条件下诱导产生的愈伤组织, 其质地都较坚实, 难以直接用于建立细胞悬浮培养。作者的另一个研究^[5]也

的部位产生的愈伤组织易脆散,有的部位则较难^[1]。后一种情况只有通过其他途径获取高脆散性愈伤组织,才有可能建立细胞悬浮培养系统。

2.2 继代培养的次数对杏茎愈伤组织脆散性的影响

愈伤组织的脆散性随着继代培养次数的增加而提高(图2)。当继代培养达5次时,高脆散性愈伤组织的比例可达90%以上。在自然情况下,植株在伤口处所形成的愈伤组织一般坚实紧密、分化程度较高。而在离体培养条件下,继代培养的不断进行,使外植体上形成的愈伤组织逐渐脱离母体的一些影响,转为具有细胞分裂快,结构疏松,缺少有组织的结构等离体条件下愈伤组织生长的特点^[3]。

2.3 培养基中 Ca^{++} 的浓度对杏愈伤组织脆散性的影响

以第3次继代培养的愈伤组织为材料,研究不同浓度 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 对愈伤组织脆散性的影响,结果(见图3)表明,提高培养基中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 的浓度可以显著增强愈伤组织的脆

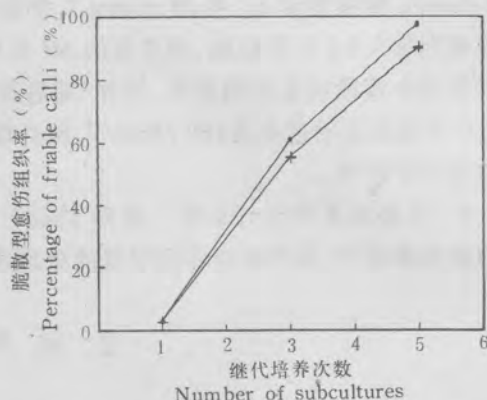


图2 继代培养次数对杏茎(采自生长于试验基地的植株)愈伤组织脆散性的影响

Fig 2 Effects of the number of subcultures on the friability of the calli issued from the stems taken from the apricot plants cultivated *in situ*

—●— 'Canino' —×— 'Luizet'

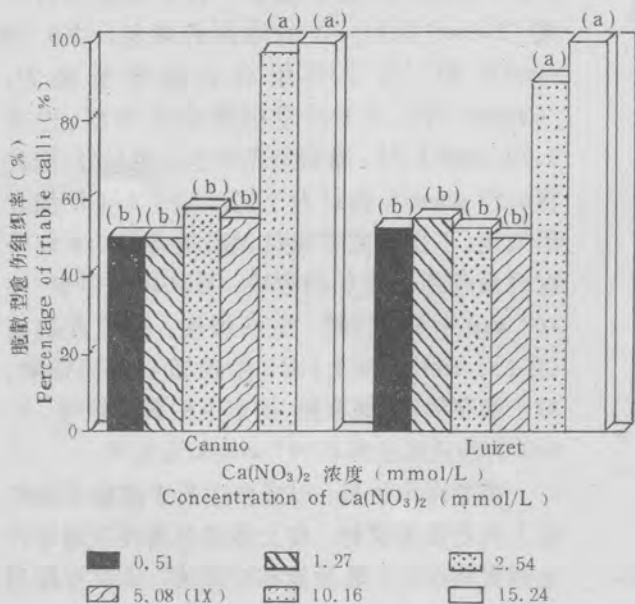


图3 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 浓度对杏愈伤组织脆散性的影响

Fig 3 Effects of the concentrations of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ on the friability of the calli of apricot

散性。为了确定这种脆散性的增强是由于提高了 Ca^{++} 的浓度还是 NO_3^- 的浓度,又以所用培养基中无机营养液为基础,以 5.08 mmol/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 为对照,在培养基中分别加入 10.16 mmol/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 10.16 mmol/L 的 CaCl_2 , 20.32 mmol/L 的 KCl 和 20.32 mmol/L 的 KNO_3 作为不同的试验处理。结果表明,上述愈伤组织脆散性的增强是由于培养基中 Ca^{++} 浓度的提高所致。在培养愈伤组织的过程中,愈伤组织的脆散性与其生长速度呈正相关。愈伤组织生长速度越高,脆散性越高。增加培养基中 Ca^{++} 浓度从而提高愈伤组织的脆散性,可能与这些愈伤组织迅速生长时的需要量及 Ca^{++} 所具有的多种

重要生物功能有关。 Ca^{++} 不仅对多种酶具有调控作用,而且对膜及细胞壁都有着重要稳定作用。同时, Ca^{++} 参与细胞分裂、细胞伸展以及延缓衰老。另一方面,即使浓度高时,钙还是一个非毒性矿质养分,并对解除其他矿质元素在高浓度时的毒害极为有效^[4]。

2.4 最初外植体的木质化程度对愈伤组织脆散性的影响

比较不同木质化程度的外植体(分别取自生长于试验基地的植株和试管的幼苗)在诱导形成脆散型愈伤组织方面的反应,结果(见图4)清楚地表明,培养未木质化的外植体可以更容易地获取高脆散性的愈伤组织。另一方面,需要指出的是,在诱导未木质化的外植体形成愈伤组织时,没有观察到属于“海绵型”的愈伤组织。因此,利用未木质化的植物材料可以获得更多的高脆散性愈伤组织。木质化程度不同的植物材料在生理及结构等方面的差异可能影响其愈伤组织的形成。

2.5 杏愈伤组织的脆散性对建立细胞悬浮培养系统的影响

试验表明,选用未木质化的材料为外植体,在含有较高浓度的2,4-D和激动素及 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 的培养基上诱导培养,能很快获得杏茎100%的脆散型愈伤组织。

本试验具体比较不同脆散性的愈伤组织对建立细胞悬浮培养系统作用的差异。另一方面,确定悬浮培养条件是否影响愈伤组织的脆散性。取“坚实型”和“脆散型”愈伤组织各5g分别置于50ml液体培养基中,设3个重复。每约10天继代一次,继代6次后在荧光显微镜下观察平

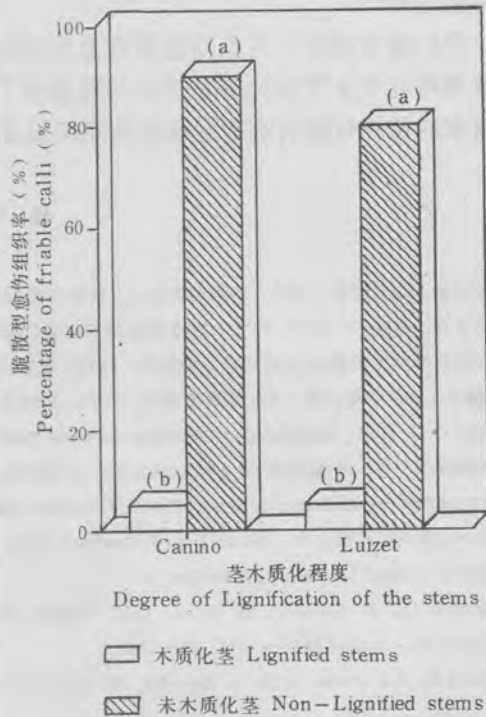


图4 外植体(杏茎)木质化程度对愈伤组织脆散性的影响
Fig 4 Effects of the degree of lignification of the explants (stems of apricot) on the friability of the calli

表1 杏愈伤组织的脆散性对细胞悬浮培养活细胞率的影响
Tab 1 Effects of the friability of apricot calli on the percentage of living cells in the cell suspension cultures

品种 Cultivar	平均活细胞率(%) Average percentage of living cells	
	坚实型 Compact calli	脆散型 Friable calli
'Canino'	4.18 (a)	87.41 (b)
'Luizet'	5.19 (a)	86.55 (b)

均活细胞率。结果(见表1)表明,高脆散性愈伤组织为成功建立细胞培养系统所必需。另一方面,根据观察,悬浮培养条件未能改善置于其液体培养基中愈伤组织的脆散性。所以,要成功建立细胞悬浮培养系统,必须先获得高脆散性愈伤组织。获得高脆散性愈伤组织常常是由固体培养成功过渡到液体培养的决定性条件^[6]。在本试验中,由“坚实型”愈伤组织得到的液体培养为单细胞及细胞小团(除去愈伤组织块)的混合物,非常稀(活细胞率也很低),整体外观呈褐色;而由“脆散型”愈伤组织得到的悬浮培养系统较均一,为单细胞及细胞小团组成的混合物,非常匀稠(活细胞率达85%以上),整体外观呈淡黄色。我们认为,愈伤组织的不同脆散性对建

立细胞悬浮培养的影响可能涉及到悬浮培养系统中细胞的“群体效应”(最低有效密度的临界细胞群体大小)。以“坚实型”愈伤组织为“种子”建立的液体培养中的活细胞及细胞小团的数量比以“脆散型”愈伤组织为“种子”建立的悬浮培养系统中的活细胞及细胞小团的数量少得多。培养一个小群体细胞往往要供给其在培养一个大群体细胞不需要提供的物质,如一些氨基酸等。在一定的条件下,每个无性繁殖系在离体培养时都有一临界的起始细胞密度,低于此值,就不能生长⁽⁸⁾。

我们高效获得了杏茎高脆散性愈伤组织,以及成功建立了其细胞悬浮培养系统,为探讨杏等植物有关生理生化等方面的问题提供了一种新的研究模型。也可为研究迅速获取其他较为困难的植物材料的高脆散性愈伤组织以及建立细胞悬浮培养系统所借鉴。

参 考 文 献

- 1 陈维伦,陶国清等. 1987; 植物生物技术, 科学出版社, 北京. 237.
- 2 李宝健,曾庆平. 1990; 植物生物技术原理与方法, 湖南科学技术出版社, 长沙. 491.
- 3 中国科学院上海植物生理研究所细胞室. 1978; 植物组织和细胞培养, 上海科学技术出版社, 上海. 375.
- 4 [德]H·马斯纳著; 曹一平, 陆景陵等译. 1991; 高等植物的矿质营养, 北京农业大学出版社, 北京. 327.
- 5 Chen C S. 1991; Multiplication Végétative des Deux Cultivars d'Abricotier; Luizet et Canino (*Prunus armeniaca* L.) et de *Prunus marrianna* GF 8-1 et Analyse de l'Incompatibilité au Greffage de Type Localisé chez l'Abricotier, à l'Aide de la Culture *in Vitro*. Atelier National de Reproduction des Thèses, Grenoble. 210.
- 6 Gamborg O L. 1982; In; Wetter L R, F Constabel (eds). Plant Tissue Culture Methods. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon. 9.
- 7 Quoiron M, Ph Lepoivre, Ph Boxus. 1977; Compte Rendu des Recherches, Station des Cultures fruitières et maraichères, Gembloux. Années 1976~1977; 93~117.
- 8 Staurt R, H E Street. 1969; *J. Exp. Bot.* 20; 556~571.

(责任编辑:盛国英)