

沙打旺胚性原生质体培养优化及高频再生植株

罗建平¹ 贾敬芬² 顾月华¹ 刘 兢¹

(¹中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230026) (²西北大学生物系 西安 710069)

摘 要 外植体类型和光照条件决定沙打旺胚性愈伤组织的形成。用生长 10d 的胚性愈伤组织可分离到 1.2×10^6 个/g(原生质体/细胞)活力超过 80%。当原生质体以 1.0×10^5 /mL 的植板密度培养在含 0.6% 琼脂糖附加 1.5mg/L 2,4-D、0.5mg/L BA 和 0.5mol/L 葡萄糖的培养基(无机盐降为 1/4)中植板率为 16.8%。条件培养显著促进原生质体的生长发育。长大的细胞克隆经 2 周 4℃ 低温处理后转到含 0.1mg/L NAA 和 1.0mg/L BA 分化培养基上,体细胞胚胎发生频率高达 70%,每克细胞产生的体细胞胚数在 200 个以上。成熟的体细胞胚转到无激素的 1/2MS 培养基中即分化成苗,再生植株为正常的二倍体。

关键词 沙打旺 胚性愈伤组织 原生质体培养 体细胞胚胎发生 植株再生

中图分类号 Q943 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0017-05

沙打旺(*Astragalus adsurgens* Pall.)是我国特有的牧草、绿肥和水土保持等兼用型多年生草种,具有高生产力、抗逆性强和防风固沙等优点,在我国北方退化、沙化草原和黄土高原沟坡地和农地广为种植。但沙打旺生育期长,花期不集中,兼有自花传粉和异花传粉,种子质量差,产量低,限制了它的推广与应用^[1]。实现沙打旺原生质体培养再生植株可能为利用突变体筛选、体细胞杂交和遗传转化等生物技术改良植物品质拓展一条新途径。有关沙打旺细胞遗传操作的研究只见于下胚轴和愈伤组织原生质体培养的报道^[2,3],但原生质体再生频率很低,迄今还未证实其组织细胞和原生质体的体细胞胚胎发生。由于单细胞分裂形成的原生质体克隆及单细胞起源的、遗传物质保持稳定的体细胞胚胎发生体系为获得非嵌合的突变体提供了保证^[4]。本文获得了沙打旺胚性愈伤组织,再分离原生质体,通过优化原生质体培养条件,最后高频率诱导细胞克隆经体细胞胚胎发生再生植株。

1 材料与方 法

1.1 胚性愈伤组织的诱导和增殖

沙打旺(*Astragalus adsurgens* Pall.)种子按前法诱导无菌苗^[3]。1 周后,切取无菌苗子叶、下胚轴和根为外植体分别接入含 2.0mg/L 2,4-D 和 0.5mg/L BA 的 Murashige 和 Skoog^[5]培养基(MS)

中,于黑暗和光照两种条件下诱导愈伤组织。3 周后统计外植体产生愈伤组织的诱导率,并把愈伤组织从外植体上剥离下来在同样的培养基上分别在黑暗和光照下继代培养,每周转接 1 次。培养条件 $24 \pm 2^\circ\text{C}$,光照时,光照强度为 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$,16h/d。

1.2 原生质体分离

取 1g 沙打旺胚性愈伤组织置于 10mL 酶溶液中,在 $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、黑暗、60r/min 恒温振荡条件下游离原生质体。酶溶液组成同前文^[3]。酶解 16h 后,经 $74 \mu\text{m}$ 孔径的不锈钢筛过滤,离心($70 \times g$,5min)收集原生质体,用 0.52mol/L 蔗糖溶液漂浮纯化($70 \times g$,20min),用原生质体培养基(见下文)洗涤 3 次。随后计数原生质体产率和活力。原生质体活力按荧光双醋酸酯染色法检测。每次分离的原生质体随机检查 20 个视野,每个处理 5 次重复。

1.3 原生质体培养

调节密度后的原生质体包埋在 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ 大小的 0.6% 琼脂糖珠中,然后放入含 1.5mL 液体原生质体培养基的培养皿中培养。起始原生质体培养基是 KMP 基本培养基^[6],附加 1.5 2,4-D、0.5 BA 和 0.5mol/L 葡萄糖。培养过程中,每隔 10d 用葡萄糖浓度减半的原生质体培养基降低渗透压 1 次。30d 后,把形成的细胞克隆转至 MS 培养基上增殖。优化实验均为单因子对比实验。其中条件培养时,取生长 10d 的胚性愈伤组织,按每克细胞分别加入

2、4、6、8、10mL 的 KMP 培养基, 10000 × g 离心 10min 后取上清液作为液固培养中的液体培养基。培养均在 24℃ ± 2℃、暗中进行。分裂频率和植板率分别以培养 7d 时的原生质体数和 21d 时形成的细胞克隆数(≥8 个细胞)占植板的原生质体总数的百分比表示, 每个培养处理至少 3 次重复。

1.4 体细胞胚胎发生与植株再生

将不同类型的愈伤组织切成均匀小块培养在含不同 NAA 和 BA 组合的 MS 分化培养基中, 光照(30μmol/m²·s, 16h/d)下诱导体细胞胚胎发生, 5 周后统计体细胞胚胎的频率(%)和产生的体细胞胚胎数, 并把体细胞胚转至无激素的 1/2MS 培养基上诱发成苗。原生质体克隆直接或经 4℃ 低温处理不同时间后同上法诱导体细胞胚胎发生和植株再生。

1.5 组织学和染色体观察

胚性愈伤组织用 FAA 液(福尔马林:冰醋酸:乙

醇;5:5:90;V/V/V)固定 24h, 常规方法制备石蜡切片(10~12μm), 铁钒苏木精染色。染色体分析时, 取再生苗根尖(3~4mm)用饱和的对二氯苯(Parachlorobenzene)处理 90min, 卡诺固定液(乙醇:冰醋酸, 3:1, V/V)固定 24h, 1mol/L HCl, 60℃ 水解 4min, 1.0% 醋酸洋红染色。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织诱导和体细胞胚胎发生能力的确定

沙打旺外植体在诱导培养基中经 3 周诱导, 可以产生 3 种类型的愈伤组织。外植体类型和光照条件对愈伤组织诱导率和形成的愈伤组织类型影响显著(表 1)。光照下 3 种外植体均可形成 II 型愈伤组织, 其中下胚轴可产生少量的 I 型愈伤组织, 但无 III 型愈伤组织形成。黑暗中下胚轴产生的愈伤组织全部是 I 型的, 诱导频率很高, 子叶和根外植体仅

表 1 外植体类型和光照条件对沙打旺愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of explants and illumination condition on callus induction of *A. adsurgens*

Explant	Frequency of callus induction/%					
	In the light			In the dark		
	Type I	Type II	Type III	Type I	Type II	Type III
Hypocotyl	8.4 ± 1.2	72.6 ± 5.9	0	62.5 ± 1.5	0	0
Cotyledon	0	88.5 ± 2.2	0	0	0	57.1 ± 1.0
Radical	0	74.5 ± 2.5	0	0	0	87.8 ± 2.7

产生 III 型愈伤组织。I 型愈伤组织在暗中为疏松淡黄色, 在光下呈黄绿色的疏松颗粒状, 由大小不等的细胞团组成, 细胞小呈球形, 胞质较丰富, 组织学观察表明这些细胞核质比高, 核仁染色显著(图版 I-1)。刚诱导的 II 型愈伤组织为绿色致密状, 当继代培养 2-3 代后或在黑暗中培养时逐渐转为褐色疏松状, 最后死亡。III 型愈伤组织在黑暗和光照下均呈白色疏松状、含水量高, 由含高度液泡化的长条形或不规则形状的细胞组成。

3 种类型愈伤组织转入不同分化培养基中, 仅 I 型愈伤组织培养 1 周后表面可见球形胚(图版 I-2), 随后发育成心形胚和鱼雷胚(图版 I-3, 4), 培养 4 周发育至子叶胚(图版 I-5)。在含 0.1 NAA 和 1~2mg/L BA MS 分化培养基中体细胞胚胎发生频率在 60%~70% 之间, 平均每克细胞可产生 260 个体细胞胚(图 1)。而 II 型和 III 型愈伤组织无体细胞胚形成。因此, I 型愈伤组织是胚性的, II 型和 III 型愈伤组织是非胚性的。

2.2 胚性愈伤组织生长与原生质体分离

从生长曲线可看出, 沙打旺胚性愈伤组织培养

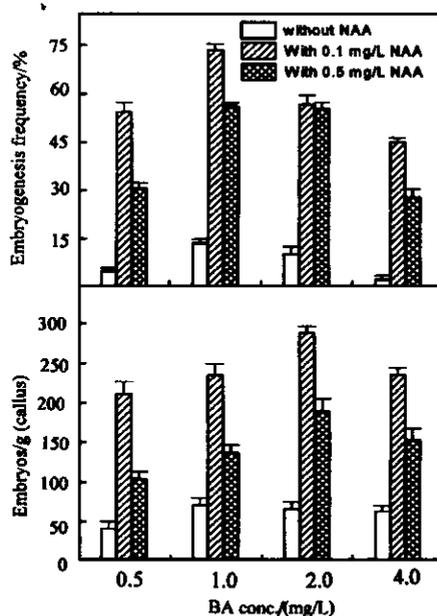


图 1 不同 NAA 和 BA 组合的 MS 培养基对沙打旺愈伤组织体细胞胚胎发生的影响

Fig. 1 Effects of different combinations of NAA and BA on somatic embryogenesis in *A. adsurgens* callus cultures

早期生长缓慢,虽不表现明显的延滞期,但可能和取材的时间间隔较长有关(5d)。培养5d后,愈伤组织开始进入对数生长期,其最大比生长速率 $\mu_{max} = 0.125/d$,倍增时间 $t_d = 5.5d$ (图2)。用对数生长的细胞能获得高产率有活力的原生质体,这可能归于此时期细胞生长快胞壁较薄的缘故,随细胞生长,细胞壁开始加厚,对原生质体游离不利^[7]。图1结果表明继代培养10d左右的胚性愈伤组织最适用来游离原生质体,每克愈伤组织可分离到 1.2×10^6 个原生质体,原生质体活力在80%以上,游离出的原生质体大小在 $20 \sim 45 \mu m$ 之间(图版 I-6)。继代培养周

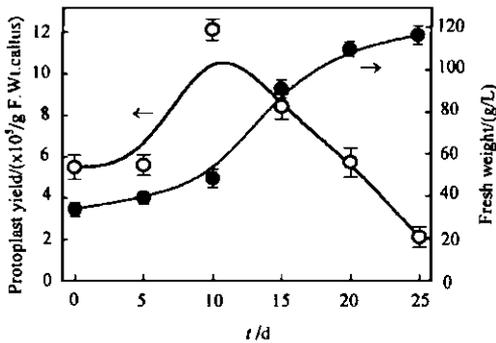


图2 沙打旺胚性愈伤组织生长和原生质体分离的关系
Fig.2 Relationship between growth phase and protoplast isolation of *A. adsurgens* callus

期为21d,因而生长早期的和后期的愈伤组织一样,原生质体的分离效果较差。

2.3 原生质体培养

2.3.1 原生质体植板密度: 原生质体培养24~48h后即见形状开始改变,表明细胞壁已经合成。3d后出现第一次细胞分裂(图版 I-7),1周左右进行第二次细胞分裂(图版 I-8)。统计该时的细胞分裂频率,表明起始培养密度显著影响原生质体再生细胞的早期分裂(图3),以 $1 \times 10^5/mL$ 培养密度效果最佳。2~3周后,原生质体经持续分裂形成8个以

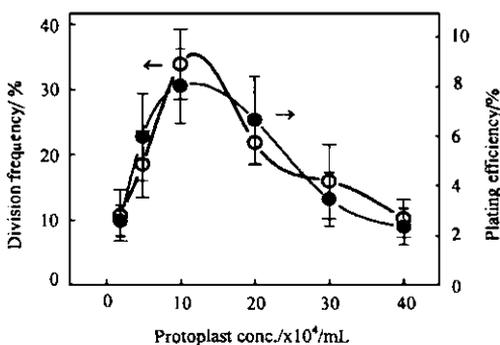


图3 原生质体培养密度对植板率的影响

Fig.3 Effect of protoplast density on the plating efficiency

上细胞组成的克隆(图版 I-9)。原生质体的植板率同样受起始密度的影响,细胞分裂频率最大的培养密度所获的植板率也是最高(图3)。

2.3.2 培养基组分的浓度: 改变 KMP 培养基中无机盐和有机组分浓度明显影响原生质体的植板率(表2)。降低培养基无机盐浓度有效促进原生质体形成细胞克隆,原因之一可能在于降低了的 NH_4NO_3 浓度改善原生质体生长发育的状态。已有许多报道表明高浓度的 NH_4^+ 对原生质体有害^[13]。但降低培养基中有机组分的浓度不利原生质体再生细胞的持续分裂。结果表明在含1/4浓度无机盐的 KMP4 培养基中原生质体植板率最高,约比对照提高80%。

表2 培养基对沙打旺原生质体培养的影响

Table 2 Effect of different media on the plating efficiency of *A. adsurgens* protoplasts cultured in agarose beads

Medium	Plating efficiency/%
KMP: full KMP salts + full KMP organics	9.4 ± 1.2
KMP1: full KMP salts + 1/2 KMP organics	4.7 ± 0.9
KMP2: 1/2 KMP salts + full KMP organics	14.2 ± 1.6
KMP3: 1/2 KMP salts + 1/2 KMP organics	6.5 ± 1.1
KMP4: 1/4 KMP salts + full KMP organics	16.8 ± 1.8
KMP5: 1/4 KMP salts + 1/2 KMP organics	8.6 ± 1.4

2.3.3 条件培养: 条件培养基因含有促进细胞生长和分裂的成分,已在许多植物原生质体培养中使用^[9]。本实验用 KMP 培养基抽提旺盛生长的愈伤组织细胞液为琼脂糖液固培养的液体培养基进行条件培养。结果表明,细胞液稀释比例不同,原生质体植板率也不同,用4mL KMP 抽提的细胞液可使原生质体植板率提高50%,但其它抽提处理对细胞克隆形成的影响与对照相比无显著差异(图4)($P < 0.05$)。

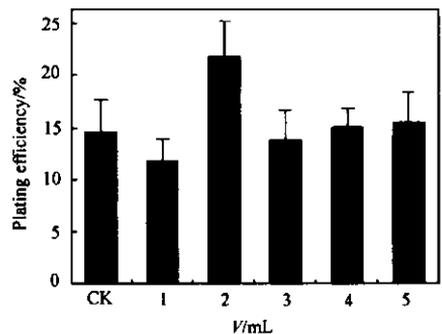


图4 条件培养基对沙打旺原生质体植板率的影响

Fig.4 Effect of conditioning medium on plating efficiency of *A. adsurgens* protoplasts

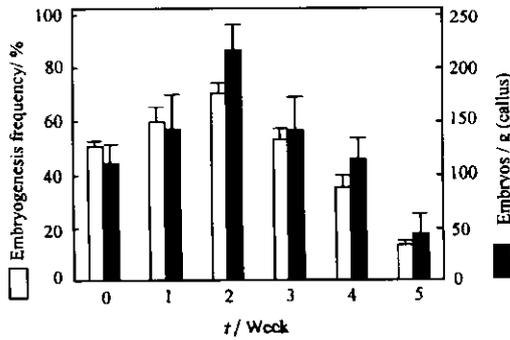


图5 低温(4℃)处理对沙打旺原生质体克隆体细胞胚胎发生的影响

Fig.5 Effect of low temperature (4°C) treatment on somatic embryogenesis of protoplast-derived *A. adsurgens* calli

2.4 原生质体克隆再生植株

长大的原生质体克隆转到分化培养基中,约50%产生体细胞胚,平均每克细胞可产生100个体细胞胚,和愈伤组织相比分别下降了30%和60%(图1和5)。实验发现,适当时间的4℃低温处理显

著促进原生质体克隆体细胞胚胎发生,以2周效果最好,体细胞胚胎发生频率比对照提高近40%,每克细胞产生的体细胞胚数约是对照的2倍。据报道恰当的低温处理利于细胞基因表达程度从脱分化状态转为胚性状态^[10]。5周后把体细胞胚转至无激素的1/2MS培养基上即萌发成小植株(图版I-10)。再生的小植株在新鲜的无激素1/2MS培养基中生长快速,根系发达(图版I-11)。染色体检查表明体细胞胚苗为正常二倍体(图版I-12)。

3 结 论

通过上述的比较研究,以生长10d的胚性愈伤组织为材料,建立起沙打旺高频原生质体体细胞胚胎发生再生植株的实验体系,为细胞遗传操作技术利用沙打旺牧草的优良特性改良其不良性状奠定了基础。该体系的建立也为T-DNA插入标记或转座子标签技术筛选沙打旺体细胞胚胎发育突变体,研究植物体细胞胚胎发生的分子机理创造了条件。

参 考 文 献

- [1] 山 仑,陈国良. 黄土高原旱地农业的理论与实践. 北京:科学出版社,1993, pp.128~144
- [2] 罗希明,赵桂兰,谢雪菊等. 遗传学报,1991,18:239~243
- [3] Luo J P, Jia J F. *Plant Cell Rep*, 1998,17:313~317
- [4] Ponsamuel I, Samson N P, Ganeshan P S et al. *Plant Cell Rep*, 1996,16:210~214
- [5] Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant*, 1962,15:473~479
- [6] Kao K N, Michayluk M R. *Planta*, 1975,126:105~110
- [7] Grezes J, Thomas D, Thomasset B. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1994,36:91~97
- [8] Okamura M, Hayashi T, Miyazaki S. *Plant Cell Physiol*, 1984,25:281~286
- [9] 罗建平,郑光植,甘凡远. 生物工程学报,1995,11:58~62
- [10] Krul W R. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1993,32:271~276

Improved Protoplast-derived Plants of *Astragalus adsurgens* Through Somatic Embryogenesis

LUO Jian-ping JIA Jing-fen¹ GU Yue-hua LIU Jing

(School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

(Department of Biology, Northwest University, Xi'an 710069)¹

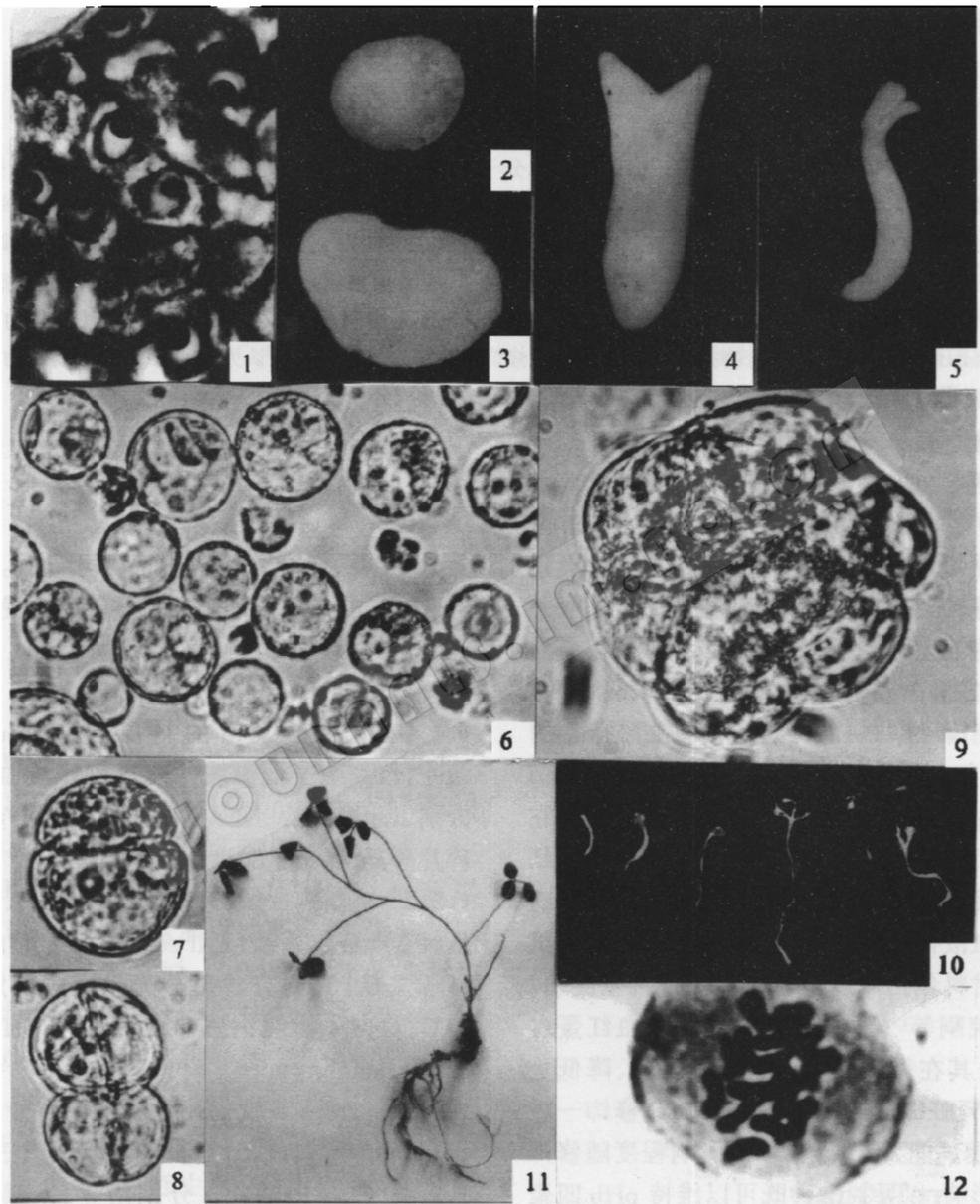
Abstract Embryogenic callus was obtained only from hypocotyl explants of *Astragalus adsurgens* and light inhibited the formation of embryogenic callus. A high yield (1.2×10^6 /g F. Wt.) of protoplasts with high viability (over 80%) could be isolated from 10-day-old embryogenic callus. Protoplasts were induced to undergo sustained division and to form cell colonies when cultured in agarose-solidified medium (KMP) containing 1/4 strength of mineral salts and supplemented with 1.5mg/L 2,4-D, 0.5mg/L BA and 0.5mol/L glucose at a plating density of 1.0×10^5 mL, where the plating efficiency was 16.8%. Conditioning medium significantly improved the formation of cell colonies. When protoplast-derived colonies were maintained at 4°C for 2 weeks and subsequently transferred onto medium (MS) with 0.1mg/L NAA and 1.0mg/L BA, somatic embryogenesis occurred. Frequency of cell colonies producing somatic embryos reached 70%, and the number of somatic embryos per gram cells was over 200. Cultured on hormone-free half-strength MS medium, somatic embryos developed into healthy plantlets with normal chromosome complement.

Key words *Astragalus adsurgens*, embryogenic callus, protoplast culture, somatic embryogenesis, plant regeneration

罗建平等:沙打旺胚性原生质体培养优化及高频再生植株
 LUO Jian-pin *et al*: Improved protoplast-derived plants of *Astragalus adsurgens*
 through somatic embryogenesis

图版 I

Plate I



1. Embryogenic callus, $\times 400$; 2. Globular embryo, $\times 40$; 3. Heart-shaped embryo, $\times 25$; 4. Torpedo-shaped embryo, $\times 25$; 5. Cotyledonary embryo, $\times 16$; 6. Freshly isolated protoplasts, $\times 400$; 7. First division of protoplast-derived cell, $\times 400$; 8. Second division of protoplast-derived cell, $\times 400$; 9. A protoplast-derived cell colony, $\times 250$; 10. Regenerated plantlets at different developmental stages; 11. Plantlet with extensive root system; 12. Somatic metaphase chromosomes ($2n = 16$), $\times 1000$