

裸燕麦胚性愈伤组织培养及悬浮系的建立

崔 林 范银燕

(山西省农科院高寒作物研究所 大同 037004)

摘 要 裸燕麦成熟胚在 IN_6 培养基上诱导培养, 初始愈伤组织为白色、瘤状、外软内硬、易分化植株的非松脆类型。当在 $IM_1 \sim IM_4$ 培养基上进行循环式调控培养, 经 7~8 个月, 初始愈伤组织转变为浅黄色、小颗粒状、生活力强的松脆型胚性愈伤组织。将胚性愈伤组织置于液体培养基中悬浮培养, 得到分散性好、生长快的悬浮细胞系。悬浮系经分化培养获得了再生植株, 移栽成活率达 95% 以上。

关键词 裸燕麦, 成熟胚, 胚性愈伤组织, 悬浮培养, 再生植株
学科分类号 Q78

在组织和细胞培养过程中会出现多种愈伤组织类型。由于不同类型愈伤组织的活力差异较大, 直接影响着细胞悬浮培养的效果, 也影响着植株再生能力的强弱。王海波曾提出关于组织培养中细胞状态值的调控方程^[1], 随后在小麦上形成了愈伤组织状态调控的技术体系^[2]。本文就裸燕麦近年来在愈伤组织状态调控以及悬浮细胞系培养的研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 培养材料的处理

用裸燕麦 (*Avena nuda* L.): 晋燕 8 号、8343、8330、品 6 号、品 16 号、20-1 的饱满、具有发芽能力的成熟种子, 采取两步消毒法, 即取胚前消毒; 70% 乙醇浸泡 2min 后无菌水冲洗 1 次, 安替福民原液浸泡 2h, 无菌水冲洗 3 次, 无菌水浸泡 14~16h。剥取种胚后第 2 次消毒: 安替福民原液浸泡 30min, 无菌水冲洗 5 次。接种在 IN_6 培养基上 (N_6 附加 3mg/L 2, 4-D, 1mg/L NAA, 0.5mg/L KT), 在人工气候箱中暗培养, 温度 26~28℃。

1.2 愈伤组织培养

成熟胚诱导的初始愈伤组织在改进的 $IM_1 \sim IM_4$ 4 种配方的培养基上继代培养, 每隔 25~30d 继代一次。按照 IM_2 、 IM_3 、 IM_4 、 IM_1 的顺序, 每种培养基继代 4 次后, 转移到下一种培养基上培养。根据松脆性和形态愈伤组织分为: 松脆型(浅黄色、颗粒 < 2mm、结构松散、生长快, 易产生胚状体)、非松脆型(白色、瘤状、外软内硬或致密, 不易分散、生长较快, 易分化幼芽)、中间型(其它各类愈伤组织)。每次继代前统计 3 种类型的愈伤组织百分率, 然后挑选松脆型愈伤组织, 2/4 继续培养、1/4 转移到分化培养基上诱导再生植

山西省自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1996-10-07, 修回日期: 1997-07-07。

株,1/4 进行悬浮细胞培养。

1.3 悬浮培养

选择松脆型胚性愈伤组织 1~2g,置于 250ml 三角瓶中,加 50ml 的液体培养基(每升培养基 MS 附加 150mg 谷氨酰胺、150mg 天冬氨酸、100mg 酵母提取物、5g 甘露醇、3mg 2,4,-D,0.5mg KT),于 120r/min 的恒温旋转摇床上培养,温度为 27~28℃。1 周后用新鲜的液体培养基更换瓶中 1/3 体积的培养液。以后每周一次,用新鲜液体培养基更换培养瓶中 2/3 体积的培养液。

1.4 悬浮细胞的分化和植株再生

悬浮液中形成的细胞团,转移到 IM₂、IM₃ 固体培养基上继代增殖 2 次。然后选择结构致密的小颗粒状愈伤组织,接种到 IM₁ 培养基上待分化出明显的胚状结构后,转入无激素的 N₆ 培养基上获得完整的再生小植株。

2 结果与讨论

2.1 初始愈伤组织状态和调控培养基

裸燕麦成熟胚出愈率各品种差异较大,晋燕 8 号最高,为 95.4%(数据未列)。初始愈伤组织呈白色、外部质地较软,内部有一些较小的愈伤组织硬核,表面为瘤状结构,生长旺盛,易分化出芽(图版 I-1)。此类愈伤组织难以进行细胞悬浮培养。为使初始愈伤组织状态转变为颗粒状、松脆型的胚性愈伤组织,我们以 MS 为基本培养基,通过改进、设计出 IM₁~IM₄ 培养基(表 1)。其特点为从 IM₁ 到 IM₄ 中生长激素含量呈逐渐上升趋势,分裂激素含量呈逐渐下降的趋势。

表 1 愈伤组织继代培养基配方

Table 1 Compositions of media for callus subculture

Combination of hormones	IM ₁	IM ₂	IM ₃	IM ₄
2,4-D	0	3	6	8
NAA	0.5	1	0	0
KT	0	0	0.5	0.5
6-BA	2	1	0	0
KCl	0	0	1000	1000

Note: Major elements were 2/3 of MS; Trace elements and organic compounds were double of MS; Contained 150mg/L glutamine, 150mg/L aspartic acid, 50mg/L yeast extract, 8% agar; other compositions were as much as MS in four media(mg·L⁻¹)

2.2 愈伤组织状态调控

从表 2 看出,初始愈伤组织转移到 IM₂ 培养基,其表面长出少量浅黄色、分散性好、颗粒状态的松脆型愈伤组织。继代 4 次后,松脆型愈伤组织比最初增加了 54.4%。挑选松脆型愈伤组织转移到 IM₃ 培养基上,颗粒状愈伤组织比例大幅度提高,但仍有非松脆型愈伤组织出现。继续选择颗粒状愈伤组织转移到 IM₄ 培养基上,在前 2 次继代中松脆型愈伤组织仍能很好地维持生长,当继代 3~4 次后,愈伤组织生活能力开始衰退,逐渐长

出质地软而韧性大的白絮状愈伤组织,并有部分愈伤组织变褐死亡。经严格挑选生长好的颗粒状愈伤组织转移到 IM_1 培养基上,发现松脆型愈伤组织具有明显的恢复趋势,但在第 3~4 次继代时,松脆型愈伤组织的比例再次下降,一部分愈伤组织转变为非松脆型,随后分化出植株。一般由初始愈伤组织过渡到松脆型愈伤组织达 50% 以上约需 5~6 个月时间,稳定在 95% 以上约需 7~8 个月时间。

表 2 继代过程中愈伤组织状态的变化

Table 2 Variations of callus state during subcultures

Media	No. of subculture	Number of alli	Callus types / %		
			a	b	c
IM_2	1	763	75.3	15.4	9.3
	2	228	36.5	37.4	26.1
	3	253	10.1	23.1	66.8
	4	271	7.2	30.4	62.4
IM_3	1	392	3.8	13.3	82.9
	2	436	3.2	2.1	94.7
	3	474	1.9	2.5	95.6
	4	439	1.6	3.2	95.2
IM_4	1	455	0.0	2.9	97.5
	2	463	0.0	4.7	95.3
	3	418	0.0	13.1	86.9
	4	462	0.0	21.5	78.5
IM_1	1	365	0.0	4.6	95.4
	2	427	0.0	3.8	96.2
	3	351	4.3	12.2	83.5
	4	338	13.4	13.8	72.8

Note: a. Nonfriable state; b. Intermediate state; c. Friable state.

Data were averaged over the three varieties (GY-8, 8343 and 8330)

表 2 结果表明,颗粒状愈伤组织的发生和维持与外源激素含量关系极大。从 IM_2 到 IM_4 培养基中生长激素逐渐增加,分裂激素逐渐减少,当愈伤组织在 IM_4 上继代 4 次后,外源生长激素含量达到高峰,这时愈伤组织内部生长激素由于积累也达到高峰,如果再继续在此培养基上培养,外源激素(主要是 2,4-D)将起到抑制作用,因而愈伤组织生活力开始衰退。当转入 IM_1 培养基上后(继代不超过 2 次),外源生长激素骤减,分裂激素增加,调整了愈伤组织内源生长激素与分裂激素的比例,因而激活了颗粒状愈伤组织的生长。如此循环式调控培养,使松脆型愈伤组织能稳定地维持在 95% 以上(图版 II-2),有效地缓减了愈伤组织生活力衰退的速度。

2.3 体细胞胚胎发生

3 种类型愈伤组织在附加 2mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上培养 8~9 周后,多数松脆型愈伤组织在其表面形成体细胞胚(图版 I-3)。由表 3 可知,不同品种松脆型愈伤组织产生体细胞胚的频率差异较大,晋燕 8 号为 78.3%,品 16 号最低,为 52.9%。将带有体细胞胚的愈伤组织转移到无激素的 N_6 培养基上培养 8~10 周后,获得再生小植株。6 个品种的体细胞胚再生植株频率为 38.9%~43.1%。结果表明,松脆型愈伤组织是具有体细胞胚胎发生能力的胚性愈伤组织,邢登辉等也曾有此论述^[3]。表 3 中非松脆型和中间型

愈伤组织虽然也产生个别体细胞胚,可能是由于这些愈伤组织仍带有胚性细胞所致。

6 个品种经循环培养后,晋燕 8 号、8343、8330 的松脆型愈伤组织稳定地维持在 95% 左右,而 20-1、品 6 号、品 16 号的胚性愈伤组织在 47.9%~71.5% 之间,说明不同基因型具有不同的胚性愈伤组织发生能力。

表 3 不同品种 3 种愈伤组织形成的体细胞胚和再生植株

Table 3 Somatic embryos and plantlets formed from three types of callus in different varieties

Genotype	No. of calli	a			b			c		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
GY-8	85	0	0	0	2	0	0	83	65	28
8343	48	0	0	0	3	1	0	45	29	12
8330	63	1	0	0	2	1	0	60	41	17
20-1	59	6	1	0	11	3	1	42	23	9
P-6	42	6	1	0	9	2	0	27	14	6
P-16	71	15	3	0	22	3	1	34	18	7

Note: 1. Callus types formed by the circulate-culture.

2. Callus with somatic embryos.

3. Plantlets formed from somatic embryos.

a. Nonfriable state; b. Intermediate state; c. Friable state.

2.4 培养时间对植株再生能力的影响

采用循环调控继代的愈伤组织经植株再生能力测定表明(见表 4),培养 96 周后它的再生植株能力没有降低,为 40% 左右。当培养时间延长到 128 周,愈伤组织植株再生率比培养 96 周降低 12.5%,培养到 160 周后下降了 27%,以至培养 192 周后,再生植株的能力完全丧失。愈伤组织经循环调控继代比在 IN₆ 上连续继代的植株再生能力维持时间延长了 1 倍。

表 4 培养时间与愈伤组织植株再生

Table 4 Plant regeneration from different week number of callus cultures

Time/week	Number of calli	Green plantlets		Albino plants	
		Number	%	Number	%
16	254	120	47.2	29	11.4
32	84	33	39.2	12	14.3
48	131	55	42.0	21	16.0
64	145	53	36.6	20	13.8
80	158	59	37.3	24	15.2
96	146	56	38.4	21	14.4
112	152	45	29.6	36	23.7
128	139	36	25.9	45	32.4
144	122	20	16.3	36	29.5
160	142	16	11.4	29	20.4
176	117	6	5.1	13	11.1
192	113	0	0.0	4	3.5

Date were averaged over the three varieties (GY-8, 8343 and 8330).

2.5 悬浮细胞培养和悬浮系的建立

选择颗粒状胚性愈伤组织转移到液体培养基中,经一周的悬浮培养后,整个培养液看

起来比较混浊,并有一些分散的小细胞团变褐死亡。用新鲜的培养液及时更换瓶中的培养液,当更换 3~4 次后,培养物逐渐适应了液体培养条件,并开始生长。在摇床的振荡下不断释放出单细胞和细胞团。用 300 目不锈钢网筛过滤,滤液继续振荡培养,5~7d 更换 1 次培养液,大约 2 月后得到了浅黄色、澄清、均一、由胞质浓厚的细胞组成的悬浮系(图版 I-4,5)。

2.6 悬浮细胞的分化和植株再生

将悬浮培养物接种在 IM₂ 固体培养基上进行培养,当形成 2mm 的愈伤组织后,接种在 IM₃ 固体培养基上。形成颗粒状愈伤组织后,转移到 IM₁ 分化培养基上进行植株分化。约经 1 月左右,在愈伤组织上形成许多浅白色、似心状的胚状体,这些胚状体进一步发育,先由下端产生许多根,然后由顶端分化出幼芽,形成小植株(图版 I-6)。此途径成苗约占再生植株的 80%。另一种途径是在愈伤组织上直接形成很多绿点,随后发育成幼芽。将产生许多幼芽的愈伤组织进行分芽,然后接种在无激素的 N₆ 培养基上约 20d 左右,可获得完整的小植株。

当再生植株长以 4~5cm 时,可出瓶移栽到装有细砂土的小烧杯中。一周左右,当根系进一步发育到健壮时,再移栽到花盆或温室定植。再生植株移栽成活率达 95% 以上。

参 考 文 献

- 1 王海波. 作物杂志, 1991, (3): 3~6
- 2 王海波, 石西平, 范云六. 全国第二届青年农学学术年会论文集, 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 772~775
- 3 邢登辉, 吴琴生, 刘大钧. 生物学通讯, 1994, 29(7): 1~3

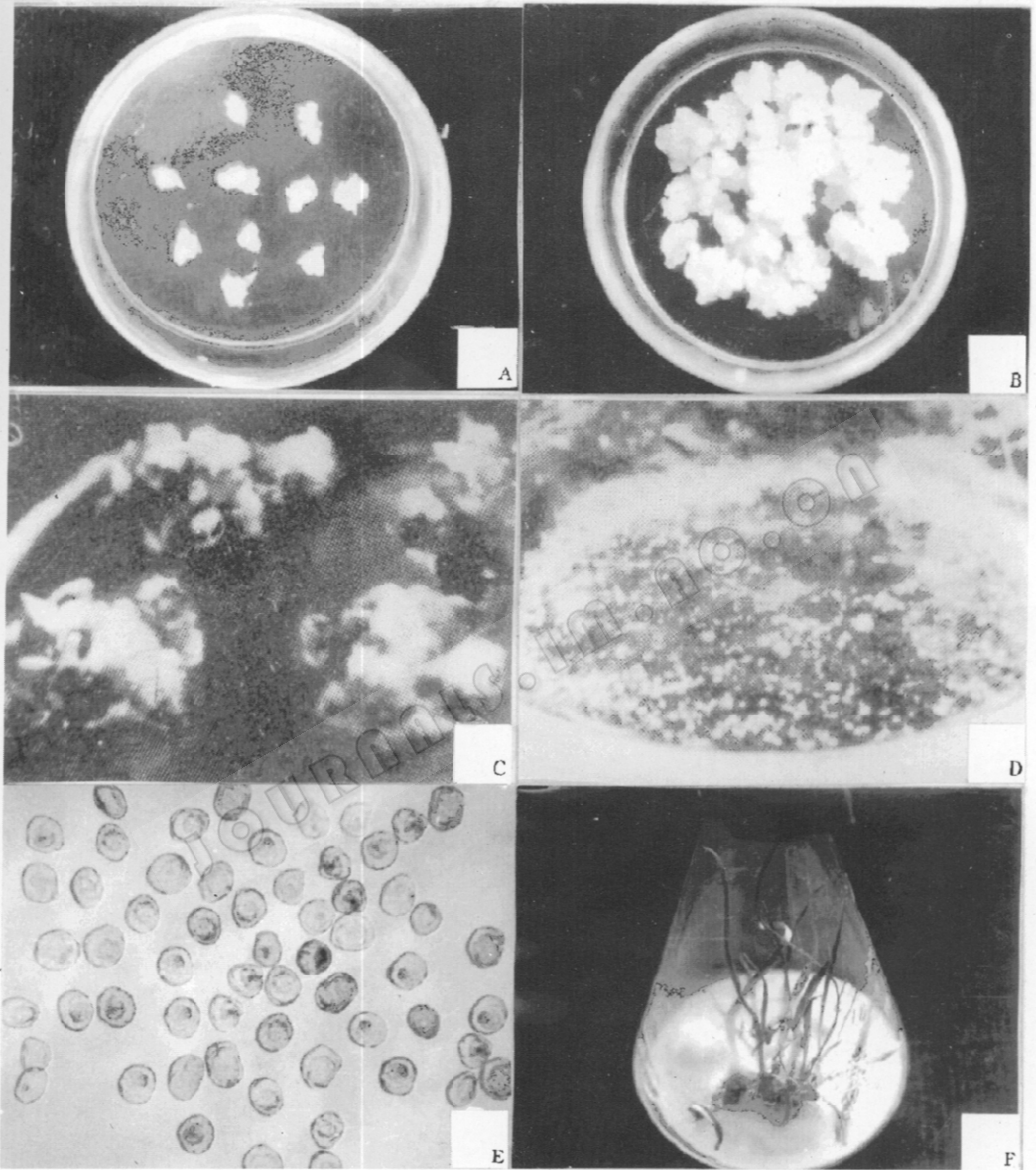
The Culture of Embryogenic Calli and the Establishment of Suspension Cell Line of Naked Oats

Cui Lin Fan Yinyan

(Institute of Cold Crops, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Datong 037004)

Abstract The mature embryos of six naked oats varieties (*Avena nuda* L.) were cultured to induce callus in IN medium. The frequency of callus formation of variety "GY-8" was the highest (95.4%) among the six genotypes. The initial callus from the mature embryos of naked oats was white, nodular, outside soft and inside hard, easier differentiated plantlet. This structure was regarded as nonfriable state. To improve its regeneration properties, the callus was cultured in IM₁, IM₂, IM₃, IM₄ media successively. After seven or eight months, embryogenic callus became wish yellow-white, granular, finely divided, and relatively friable. Frequencies of embryogenic calli were maintained steadily over 95%. However, decline speed of callus vitality was slowed down. The cell suspension cultures were established from friable calli. The plantlets were induced from the suspension cell line in differentiation medium. The survival rate of plantlet transplantation was over 95%.

Key words Naked oat, mature embryos, embryogenic callus, suspension culture, regenerating plants



A. Callus formed *in vitro* from mature embryos of GY-8, B. Embryogenic callus was produced by using circulate-culture. C. Somatic embryos derived from embryogenic callus of GY-8, D. Cell suspension cultures of GY-8 in liquid medium, E. Suspension cell after 8 week liquid culture, F. Green plantlets regenerated from somatic embryos of GY-8.