

枸杞胚细胞悬浮培养系统建立的研究*

胡博然^{1,2}, 徐文彪³, 马峰旺¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 宁夏农林科学院 园艺研究所, 宁夏 银川 750002;

3 宁夏银川市园林局, 宁夏 银川 750002)

[摘要] 以宁夏农科院选育的新品种宁杞1号3年生树为试材, 对影响枸杞胚细胞悬浮培养及其再生系统建立的培养基与激素配比进行了研究。结果表明, 以人工授粉后18 d的幼果, 剖取成熟胚作为外植体, 选择MS+6BA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 培养基诱导愈伤组织, 经单细胞悬浮培养建立了稳定的细胞系; MS+6BA 0.2 mg/L 培养基较为适宜枸杞胚状体萌发成苗, 该再生苗转移到MS+NAA 0.2 mg/L 生根培养基上, 诱导生根并获得完整植株; 共移栽成活14株, 成活率达38.8%。

[关键词] 宁夏枸杞; 胚培养; 细胞悬浮培养; 植株再生

[中图分类号] S567.1⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0097-04

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科枸杞属, 是多年生双子叶落叶灌木。原产我国北部, 河北、内蒙古、山西、陕西、甘肃、宁夏、青海、新疆有野生分布, 果实(枸杞子)、叶(天精叶)、根皮(地骨皮)均可入药。约在17世纪中叶引入欧洲, 现在欧洲及地中海沿岸以及北美洲都有种植并成为野生。新品种“宁杞1号”、“宁杞2号”的育成^[1,2], 标志着人们对枸杞产量、果实大小和品质等性状的成功改良。随着我国近年对枸杞药用保健价值的进一步开发, 1999年栽培面积已达2.5万hm², 年产干果2000万kg, 从而对枸杞育种工作提出了更高的要求。

近年来, 国内外学者十分重视枸杞单细胞培养的研究, 张国柱等^[3]以枸杞幼芽和叶片为外植体, 牛德水等^[4,5]以种子下胚轴为外植体, 均获得了单细胞培养的完整植株。本研究首次以枸杞成熟胚为外植体, 进行了单细胞分离悬浮培养, 并诱导形成了完整植株, 从而建立了枸杞单细胞实验体系, 为枸杞品种改良, 特别是为细胞突变体的筛选打下了基础。

1 材料与方法

1.1 供试品种

宁杞1号3年生结果幼树, 选自宁夏农科院园艺研究所试验基地。

1.2 培养基

试验所用培养基为MS固体与液体培养基。

愈伤组织诱导培养基 A₁: MS+2, 4-D 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L; A₂: MS+6BA 0.5 mg/L + BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L; A₃: MS+6BA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L; A₄: MS+6BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L; A₅: MS+蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L。

胚性愈伤组织诱导培养基 A₃培养基+水解酪蛋白CH 500 mg/L。

细胞悬浮培养培养基 (1) 继代培养培养基: A₃培养基(不加琼脂)+CH 500 mg/L; (2) 胚状体分化培养基 I: MS(不加琼脂)+6BA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L; 胚状体分化培养基 II: MS(不加琼脂)+2, 4-D 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L。胚状体分化(固体)培养基, C₁: MS+蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L, C₂: MS+NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L, C₃: MS+NAA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L, C₄: MS+6BA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L; 胚状体生根培养基: MS+NAA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L。

1.3 外植体的获取

将宁杞1号授粉后18 d的幼果, 经体积分数75%的乙醇浸泡3 s, 放入体积分数0.2%的HgCl₂溶液中消毒5 min, 随后用无菌水冲洗3次。在无菌条件下, 借助解剖镜, 用解剖刀将种子从种脊切开,

* [收稿日期] 2002-08-20

[基金项目] 宁夏回族自治区科委重点资助项目(970117014)

[作者简介] 胡博然(1966-), 女, 河北博野人, 副研究员, 在读博士, 主要从事果树生物技术与葡萄酒研究。

将成熟胚取出接种于含不同激素的 MS (附加 30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂) 培养基上进行培养。

1.4 愈伤组织诱导

采用 A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ 5 种含不同激素的 MS 培养基诱导愈伤组织, 每处理接种胚 20 个。培养条件为先暗培养 24 h 后转入正常培养, 培养温度为 25 ~ 28 ℃, 光照 12 h/d, 光照强度 2 000 lx。

1.5 胚性愈伤组织继代培养

取生长致密、白色略透明的愈伤组织块接种到胚性愈伤组织诱导培养基, 每 3 周继代 1 次。2~3 次继代后, 出现疏松颗粒状胚性愈伤组织, 选择颗粒较细的愈伤组织按其生长速度, 加快继代频率(2 周 1 次)。当愈伤组织松散易脆, 颗粒均匀且生长迅速时, 改为 3 周 1 次, 以保持愈伤组织的胚性状态。

1.6 单细胞的分离

取鲜重 1~2 g 上述愈伤组织, 置于盛有 20 mL 培养基的 100 mL 三角瓶中, 用玻璃棒将愈伤组织捣碎, 然后放在振荡速度为 100 r/min 的摇床上暗培养约 3 周, 所用培养基与继代培养基相同。培养温度(26±1) ℃, 然后用直径 ϕ 147 mm 镍丝网过滤, 除去愈伤组织碎片及较大的细胞聚集体。经过滤后获得 95% 左右的单个游离细胞。

1.7 细胞悬浮培养

将上述计算起始密度所剩余的 1/3 上清液倒入离心管中, 并根据需要起始密度, 补充加入新鲜的培养基, 如经过分离过程细胞活性变化不大, 即可将悬浮液继续在 110 r/min 旋转式摇床上振荡培养。暗培养温度(27±1) ℃, 连续 10 d, 每天取样进行细胞密度计数, 并绘制细胞生长曲线。

1.8 悬浮细胞的分化

将悬浮细胞收集转入胚状体分化培养基 I, 继续振荡培养, 并给予弱光照射, 等出现大量胚状体时, 再转入胚状体分化培养基 II 继代培养 20 d, 然后在胚状体分化培养基 I 上进行悬浮培养, 连续培养两代。最后将其转入胚状体分化固态培养基 C₁, C₂, C₃, C₄ 上, 使其萌发成苗。同时筛选出较为适宜枸杞胚状体萌发成苗的培养基。

1.9 单细胞再生苗及其移栽

单细胞再生苗长到 5~7 片叶时, 将其连同三角瓶一起移到阴凉通风处, 取掉封口膜, 向培养基中加入少量水, 进行炼苗。大约 1 周后, 将幼苗连同培养基取出, 用清水将根部培养基洗干净, 移栽到含有沙质土壤的小花盆中, 并用含 MS 大量元素的营养液浇灌。用大烧杯罩住幼苗, 使其保持一定的湿度。以后将花盆每天移到较弱的阳光下进行光照, 并逐渐增加日照时间, 直到幼苗成活。

2 结果与分析

2.1 不同时期幼胚的形态发育

种子的形成过程包括胚和胚乳的生长成熟过程, 通过杂交授粉使两种基因组合, 逐渐形成新的胚体, 同时伴随着营养物质(胚乳)向固态的转化。在盛花期对宁杞 1 号进行人工授粉, 于授粉后 1~20 d 内分别采样, 进行形态解剖观察, 结果见表 1。由表 1 可见, 宁杞 1 号授粉后 15~20 d 后种子饱满, 具成熟胚。因此, 外植体可选择宁杞 1 号人工授粉后 18 d 的幼果, 剖取其成熟胚接种培养。

表 1 授粉后不同时期种子、胚和胚乳的发育形态

Table 1 The morphological differentiation of seeds, endosperm, embryos after the pollination at different periods

人工授粉后时间/d Days after pollination	种子形态 Seed morphology	胚的形态 Embryo morphology	胚乳形态 Endosperm morphology
1~3	球状胚珠 Spherical ovule	胚囊组织 Embryo sac tissue	胚囊组织 Embryo sac tissue
4~8	迅速生长形成种子 Forming seed rapidly	从不规则球形生长成棒状体 Developing from irregularly spherical shape into clubbed like shape	白色黏稠状 With white and mucused like shape
9~14	种皮白色饱满 White and plump seed skin	逐渐形成白色“C”形成成熟胚 Forming mature embryo with white and C shape gradually	紧囊胚逐渐形成干物质 Embryo sac developing into dry mass gradually
15~20	形成饱满种子 Developing plump seed	成熟胚 Mature embryo	白色干物质 White dry mass

2.2 愈伤组织诱导

枸杞成熟胚接种后 5 d, 两端开始膨大, 10 d 后有明显的愈伤组织形成, A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ 5 种固体培养基中以 A₃ 培养基诱导频率最高(表 2)。

接种 30 d 的观察结果表明, 一定质量浓度的

6BA 对幼胚愈伤组织的发生有重要促进作用, 而在 6BA 与 BA 两种激素的共同作用下, 愈伤组织发生率高达 65%, 而不含激素的 MS 培养基中胚接种 3 d 后褐变死亡。胚培养 3 周后, 有大量质地疏松的淡黄色愈伤组织产生, 再经过多次继代培养, 愈伤组织

更加松散, 颗粒小, 分散性好, 是理想的细胞悬浮培养材料。

表 2 不同培养基对诱导愈伤组织的影响

Table 2 Effects of different media on inducing the mature embryo's callus

培养基 Medium	接种胚数 No. of embryos inoculated	愈伤组织发生数 No. of callus	诱导率/% Induction rate
A ₁	20	6	30 c
A ₂	20	10	50 ab
A ₃	20	13	65 a
A ₄	20	9	45 bc
A ₅	20	0	-

注: 表中 a, b, c 表示 $P < 0.05$ 时邓肯氏多重极差测验的显著水平。下同。

Note: a, b, c letters show significance by the Duncan's SSR method at $P < 0.05$. The followings are the same.

表 3 不同激素组合对枸杞胚状体萌发的影响

Table 3 Effects of different hormone concentrations on produced embryo and its germination

培养基编号 No. of medium	胚状体数 No. of embryogenesis	愈伤化胚 Ratio of embryodenesiss callus		成苗数 Ratio of plantlets	
		株数 No.	比率/% Ratio	株数 No.	比率/% Ratio
C ₁	80	7	8.2 c	61	71.8 ab
C ₂	50	31	62.0 b	21	42.0 b
C ₃	50	40	100.0 a	0	-
C ₄	50	40	8.0 c	40	80.0 a

在 C₂, C₃, C₄ 培养基上的细胞胚, 因培养基中的附加激素而发育较快, 15 d 开始成苗。但 C₂ 和 C₃ 上的胚状体愈伤化程度分别达 62.0% 和 100%, 影响了成苗。C₄ 培养基不但能使胚状体萌发而且随着时间的延长, 从芽的基部长出大量丛生芽, 培养 1 个月后, 每芽可得 5~50 株无根苗, 繁殖系数和成苗率都高于其他 3 种培养基。从 4 种培养基的效果来看, C₄ 较为适宜胚状体萌发。等苗长到 2 cm 高时, 从基部切下, 转移到生根培养基上诱导生根, 20 d 后可获得完整植株。

2.5 单细胞再生植株移栽及生长情况

直接从培养基中取出立即移栽的单细胞苗, 一般不易成活, 培养 7 d 后就枯萎死亡。再生苗经过 7 d 炼苗后移栽, 所栽 6 盆 36 株幼苗, 成活 14 株, 成活率为 38.8%。再生苗 20 d 后开始生长, 叶片变绿变厚, 侧枝萌发; 30 d 后主茎杆形成, 开始本质化; 3 个月后形成完整幼树, 可移栽到大田。

3 讨论

枸杞细胞系建立的影响因素包括枸杞细胞悬浮继代培养的时间与温度等^[6,7], 在适宜的情况下, 单细胞培养 6~7 d 以后, 悬浮培养物的鲜重和体积

2.3 悬浮培养细胞系的建立

将 A₃ 培养基上诱导产生的愈伤组织采取半连续式悬浮培养以建立细胞系, 连续培养 29 个无性世代后, 从第 30 代开始, 将一部分悬浮物重新转移到固体培养基上, 以便继代保存。在固体表面继代培养一段时间后, 再次将其转入液体培养基中, 此愈伤组织能很快适应液体环境, 并保持较高的分化频率。

2.4 胚状体萌发完整植株的获得

用胚状体分化培养基 I 与 II 进行悬浮培养, 连续培养两代以上, 将发育成熟的胚状体转移到 C₁, C₂, C₃, C₄ 4 种胚状体分化(固体)培养基上, 观察胚状体的萌发情况。由表 3 可见, 体细胞胚在 M S 培养基上培养时, 胚状体很少愈伤化(仅为 8.2%), 成苗率高达 71.8%, 但繁殖系数低(每个细胞胚只得 1 苗), 且生长缓慢, 1 个月后才开始成苗。

(1 500 r/min, 离心 5 min) 增加 4 倍左右, 平均 36 h 增殖 1 倍, 7 d 以后细胞系增殖速度开始减慢, 10 d 后明显进入静止期, 12~14 d 后悬浮培养物变成灰褐色。因此, 悬浮培养物不宜超过 10 d, 否则细胞生长速度变慢。悬浮继代培养的适宜温度为 24~26℃, 超过这个范围, 特别是当温度连续达到 30~32℃ 时, 悬浮培养物中迅速产生大量的胚状体, 由于比重较大, 胚状体全部集中在培养瓶底部。用沉淀分离的方法, 可以得到含有 60~140 个/mL 胚状体的悬浮液。胚状体的形态多种多样, 在继续培养的情况下, 胚状体顶端逐渐变成绿色, 不能正常分化, 但具有明显的根系。

激素成分及其质量浓度对细胞系诱导分化的影响, 特别是外源激素作为生长调节物质的应用, 使人们可以根据不同植物、不同品种外植体组织、不同培养方式和不同的培养基改变激素组成, 以控制培养材料的生长与分化。细胞分裂素和生长素在调控离体器官发生中起着关键作用, 植物特定器官或细胞能否表现出全能性则取决于外源激素的合理组成和适宜比例。因此, 在组织培养过程中, 一定要根据基因型和外植体类型的不同确定合理的激素配比。

在胚愈伤组织的诱导中, 胚在不含激素的 M S

培养基中培养 3 d 后褐变死亡,而在 MS 培养基中附加不同质量浓度的 2,4-D,6BA 和 BA 后,对愈伤组织的诱导均有明显的促进作用,从而使胚性愈伤组织诱导频率增高。MS+2,4-D 0.5 mg/L 与 MS+6BA 0.5 mg/L 诱导产生的愈伤组织色白、紧密、不易分散,经 30 d 的培养,有的可直接分化出苗,但频率很低。而在 6BA 1.0 mg/L+BA 0.5 mg/L 两种激素的共同作用下,愈伤组织诱导率不但最高,而且所诱导的愈伤组织呈淡黄色、松散型,经多次继代,分散好,而且胚性细胞多,分化频率高。总之,培养基中需添加一定质量浓度的细胞分裂素,并配适当的生长素,才能有效地促进枸杞成熟胚愈伤组织的诱导和分化。

以枸杞成熟胚作为外植体,并在此基础上建立枸杞细胞系。细胞系建立后,单细胞能否分化形成植株,直接关系到这一试验体系的应用范围^[4,8]。本试验结果表明,经过半年以上的悬浮继代培养,枸杞细胞仍有一定的分化能力,能够分化形成完整植株。本研究将单细胞诱导分化的胚状体转移到固体分化培养基表面,体细胞胚继续发育和萌发,最后产生正常绿色小芽胚状体的频率为 40%。当小芽长到 5 mm,从愈伤组织基部切下,在 MS+6BA 0.2 mg/L 培养基上培养一段时间后,转到 MS+NAA 0.2 mg/L 培养基上诱导生根。30 d 后开始生根,可形成完整再生植株并移栽成活,成活率达 38.8%。

[参考文献]

- [1] 胡博然,徐文彪,马峰旺,等.枸杞生物技术研究进展[J].西北植物学报,2001,21(4):811-817.
- [2] 江丽虹,杨汉民.枸杞再生植株不同发育途径中染色体变异的研究[J].兰州大学学报(自然科学版),1992,28(2):141-145.
- [3] 张国柱,王仑山.植物体细胞胚发生的同步控制 I.枸杞细胞悬浮培养系[J].兰州大学学报(自然科学版),1994,30(4):88-91.
- [4] 牛德水,邵启全,秦金山,等.枸杞细胞系的建立及单细胞培养再生植株[J].遗传,1983,5(6):24-26.
- [5] 牛德水,邵启全,张敬,等.枸杞悬浮培养条件下胚状体的发生[J].遗传,1990,12(6):5-7.
- [6] Liu C S. An efficient method for selecting embryogenic callus from *Lycium chinensis* L. cell culture[J]. Plant Science (Limerick), 1979, 1: 99-104.
- [7] Ratushnyak Y, Piven N M, Ruds V A. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 17: 183-190.
- [8] Ratushnyak Y, Ruds V A, Piven N M. Regeneration of *Lycium barbarum* L. plants from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(2): 84-87.

Establishment of the suspension culture on cell line from embryo in *Lycium barbarum* L.

HU Bo-ran^{1,2}, XU Wen-biao³, MA Feng-wang¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Horticulture, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002, China;

3 Forestry and Horticulture Bureau of Yinchuan, Ningxia 750002, China)

Abstract: The three-year-old trees of *Lycium barbarum* L. cv. Ningqi No. 1 were used as plant materials. The MS mediums with different hormone composition were studied to compare their effect on establishment of the suspension culture on cell line from embryo in *Lycium barbarum* L. The results showed that the 18-day-old mature embryos from the fruit pollinated were taken out as explants, and inoculated in the best MS+6BA 1.0 mg/L+BA 0.5 mg/L medium for inducing callus, the stable cell lines by the cell suspension culture were set up, MS+6BA 0.2 mg/L was the suitable medium for produced embryoid's germination and seedling development, MS+6BA 0.2 mg/L as rooting medium was used to culture the formed seedlings and 14 plantlets transferred to the field were obtained, the regeneration efficiency was 38.8%.

Key words: *Lycium barbarum* L.; embryo culture; cell suspension culture; plant regeneration