

建立高质量马铃薯细胞悬浮培养物的研究^{*}

张宁, 戴朝曦

(甘肃农业大学农业生物工程研究所, 兰州 730070)

摘要: 以马铃薯四倍体栽培品种甘农薯2号、布尔班克(Russet Burbank)的块茎和茎段两种外植体为材料, 进行了愈伤组织诱导和继代培养、细胞悬浮培养物的建立及其继代培养的研究。结果表明: 选取良好的愈伤组织经1~3次继代培养后进行细胞悬浮培养, 培养物每5d继代一次, 继代时新旧培养基体积按3:1配置, 能获得较高质量的培养物。在悬浮培养及继代培养过程中, 用高浓度蔗糖溶液或蒸馏水调节该培养液的渗透压, 以及采用与愈伤组织固体培养基成分相同的细胞悬浮培养基和悬浮继代培养基, 可有效地控制悬浮细胞的质壁分离和破碎现象, 有助于建立高质量的细胞悬浮培养物。

关键词: 马铃薯; 愈伤组织; 细胞悬浮培养

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092(2000)04-0195-03

1 前言

马铃薯单细胞培养是突变体筛选、无性系变异、基因转移、次生代谢物生产、人工种子等多项研究工作的基础, 而利用愈伤组织建立细胞悬浮系又是该项培养技术的关键。因为细胞悬浮系有利于在某些诱发突变的理化因子作用下, 产生细胞突变体, 既可以为细胞融合提供有效地选择性标记, 又可在人工施加的选择压力下使育种单细胞化, 大大提高诱变频率和选择效率, 成为作物改良的有效手段。其次, 在植物组织培养中, 常发生体细胞无性系变异现象, 这一特性可以使细胞在保持优良品种基本特性的情况下改良某些性状, 实现品种改良的目标。再次, 建立优质的单细胞悬浮培养物可以为原生质体的分离和培养、遗传转化、种质资源库的建立、人工种子的制备提供良好的实验系统。并且, 由愈伤组织通过振荡的物理方法建立细胞悬浮系操作简便, 不会改变细胞的生理特性, 对正常细胞的生长和分化以及生物合成的研究比较适用^[1]。一个高质量的细胞悬浮培养系必须是悬浮培养物分散性良好, 且细胞和细胞团均一性好, 培养物生长迅速^[2]。在马铃薯细胞悬培养方面, Lam(1975)^[3]

和祁新等(1996)^[4]曾建立了细胞悬浮培养物, 但仅仅从大量的悬浮培养物中筛选了极小部分质量较好的细胞加以培养, 而未有效地控制培养条件, 有意识地培养高质量的细胞悬浮培养物。迄今为止, 对于高效实验系统的建立仍缺乏系统地研究。本文将报道我们对建立高质量的细胞悬浮培养物的有关重要影响因素进行的系统研究结果。

2 材料与方法

2.1 材料来源

所用材料为甘肃农大生物工程所提供的马铃薯四倍体栽培种“甘农薯2号”、“褐皮布尔班克(Russet Burbank)”的试管苗茎段和块茎。选用当年收获的块茎贮存于4℃冰箱中1~2个月备用。

2.2 愈伤组织的诱导

茎段: 剪取继代培养15~20d无菌壮苗的不带腋芽的茎段约0.5cm, 进行接种。

块茎: 将块茎用自来水清洗干净, 削去表皮, 然后置于70%酒精溶液中消毒30s, 再用15%次氯酸钠溶液消毒15min, 无菌蒸馏水冲洗4~5次, 用无菌打孔器切取块茎柱状长条, 滤纸吸干水分后, 削去两端各约2.0cm, 切取约2~3mm厚的块茎圆盘, 接种于愈伤组织诱导培养基上, 置于人工气候箱内, (24±1)℃、黑暗条件下培养。

^{*} 国家“九五”重点扶持攻关及国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 2000-04-15

愈伤组织诱导培养基为 MS 无机盐 + Nitsch, & Nitsch (1979) 有机物基本培养基附加 0.4mg/L IAA、0.8mg/L KT、0.4mg/L GA₃ 和 0.1% CH (水解酪蛋白), 培养基用 0.8kgf/cm² 高压蒸汽灭菌, 但 GA₃ 用过滤灭菌, 待培养基快冷却时加入。

2.3 愈伤组织的继代

选择生长状态良好, 色泽新鲜未褐化的愈伤组织, 以直径 0.5cm 大小的团块进行继代, 在 25℃、2000lx 连续光照下培养。愈伤组织继代培养基为 MS 无机盐 + Nitsch & Nitsch (1979) 有机物基本培养基附加 2.0mg/L 2, 4-D、0.4mg/L IAA、0.4mg/L BAP、0.8mg/L KT、0.4mg/L GA₃ 和 0.1% CH, 消毒方法同前。

2.4 细胞悬浮培养

选择色泽新鲜、生长速度快、质地疏松的幼嫩愈伤组织约 2g, 用镊子轻轻夹碎, 置盛有 40ml 液体愈伤组织继代培养基的三角瓶中, 在恒温摇床上以 120r/min 转速, 25℃、弱光或黑暗条件下进行振荡培养。每隔 5d、10d、15d 换入新鲜液体培养基进行继代。继代时, 新旧培养基体积比为 3:1。测定培养液的 pH 值变化情况和细胞密实体积 (PCV) (即将细胞悬浮液置于 15ml 刻度离心管中, 量出其毫升数, 在 750r/min 下离心 5min, 读出沉淀的细胞毫升数, 用每毫升培养液中细胞的毫升数来表示细胞密实体积)。继代细胞悬浮培养物用 40 目不锈钢细胞筛过滤, 收集筛网下的小细胞团和少量单细胞混合物进行培养, 条件同上。

3 结果与分析

3.1 愈伤组织的诱导

在本实验选用的愈伤组织诱导培养上, 不同基因型及不同外植体获得的愈伤组织在诱导频率、愈

伤组织质地和生长速度等方面均不相同 (见表 1)。实验结果表明, 品种“甘农薯 2 号”的块茎出愈率最高, 所得初生愈伤组织色淡黄, 质地疏松而细胞结构致密, 愈伤组织增殖很快。

3.2 愈伤组织继代次数对细胞悬浮培养物质量的影响

诱导的初生愈伤组织颜色、质地、形状差异很大, 细胞稳定性和一致性不好, 同一个培养系中各细胞渗透压不相同, 同时会出现质壁分离细胞、破碎细胞和完整细胞。一般经过 1~3 次继代的细胞在液体培养基中分散性最好, 细胞分裂旺盛, 镜检表明这些细胞约 80%~90% 以上形状呈圆形或椭圆形, 细胞较小, 胞质浓厚。6 代以后的愈伤组织建立悬浮培养系已不再适宜, 由于多次继代的愈伤组织本身发育为硬质地的板块状或颗粒状, 质地不够松散, 并出现异质性克隆, 如部分褐化、老化等, 约 75% 以上的细胞老化, 形状变为不规则或长条形或柱状, 分裂能力和以后的分化能力严重丧失^[5]。故选取继代 1~3 次的愈伤组织易获得分散、匀质、生长速度快的高质量细胞悬浮培养物^[6]。

3.3 悬浮培养中细胞质壁分离和破碎现象的控制

本实验观察到由愈伤组织建立的薄壁细胞悬浮系也需要近似等渗的培养条件, 因为细胞在液体培养基中, 若培养溶液渗透压太高, 往往会发生严重的质壁分离现象, 若不及时调整, 最终将导致细胞死亡, 死细胞释放出的代谢废物会毒害其余的活细胞, 严重影响最后单细胞的植板率。另外, 在低渗溶液中, 细胞也会崩裂, 吐出一团细胞内含物, 这可能是因为薄壁细胞的壁较薄, 强度不够, 在低渗溶液中无法低挡膨压, 从而造成了细胞的破碎。为了克服细胞质壁分离和破碎现象, 可用高浓度蔗糖溶液或蒸馏水调节该培养物的渗透压^[7]。此外, 本实验采用配制相同成分的愈伤组织固体培养基和细胞悬浮培养基及悬浮细胞继代培养基的方法, 使细胞生长的各个环节都处在相同的渗透压和营养条件下, 能有效地控制细胞质壁分离和破碎现象。

3.4 继代间隔时间对悬浮细胞生长速度和细胞质量的影响

本实验结果是细胞悬浮系每 5d 继代一次 (见图 1), 则可保持细胞处在快速增长阶段, 培养液为清亮、淡黄的正常色。随着继代天数延长, 细胞积累量增多, 培养液逐渐变得混浊, 为深黄色甚至

表 1 基因型和外植体对愈伤组织诱导的影响

基因型	外植体	最早出愈时间 (d)	出愈率 (%)	愈伤组织状态
甘农薯 2 号	茎段	8	82.8b	松散板块状
	块茎	15	98.6a	松散透明状
布尔班克	茎段	9	74.7c	坚硬颗粒状
	块茎	18	83.7b	紧密颗粒状

注: 1. 出愈率 (%) = (形成愈伤组织的外植体数/接种外植体的总数) × 100%

2. Duncan's 氏新复极差测验 (P < 0.05)

整瓶培养基褐化, 细胞活力下降, 生长速度减慢, 倒置显微镜下检查, 部分细胞破碎解体, 胞质不浓厚。另外, 测得培养液的 pH 值一般每 7d 下降 0.4, 那么, 14d 后该培养系的 pH 值就降为 5.0, 已不适于马铃薯细胞的生长。

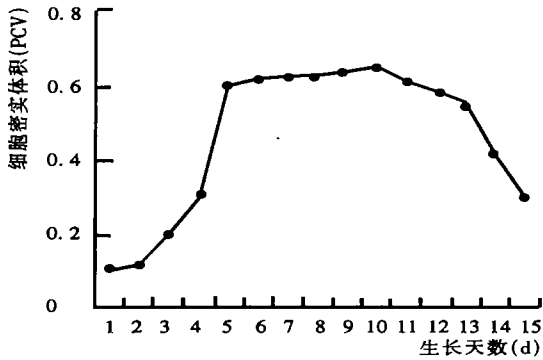


图1 继代时间与细胞悬浮系增殖量的关系

3.5 继代时新旧培养基体积比对悬浮培养系的影响

每次继代细胞悬浮培养物所用的新鲜培养基与原来细胞生长的旧培养基之间应有一定比例, 旧培养基在继代过程中类似条件培养基, 内含某些营养物质, 这些物质对细胞的分裂有促进作用。实验表明, 新培养基与旧培养基比例不应大于 10:1, 这一结论与 Helgeson^[8]的结果一致。二者之间比例为 3:1 左右时, 条件培养基的滋养效果便很明显。

表2 新旧培养基体积比对悬浮培养物的影响

新鲜培养基体积 (ml)	旧培养基体积 (ml)	新旧体积比例	细胞悬浮系状况
40	4	10:1	生长慢, 色清亮
30	10	3:1	生长快, 色清亮
20	20	1:1	生长快, 略褐黄

4 讨论

建立优质的细胞悬浮培养物, 首先要诱导良好的愈伤组织, 但各种材料在诱导培养基上的反应并不相同, 这可能是由于各品种的不同外植体内源物质水平不同, 对外界提供的营养和激素物质等的代谢能力也不相同而造成的^[9]。所以, 材料的选择是十分关键的起始步骤。块茎中含有大量的薄壁细胞, 它们在分化进程上走得还不太远, 故在外界诱导条件下, 很容易分化进入分生状态, 由此获得的愈伤组织增殖速度快, 质地疏松。另外, 这些细胞与母体组织细胞在遗传组成上是一致的, 有利于作

为遗传改良的起始材料。

孙敬三等^[2]认为, 如果一个细胞悬浮系生长速度越快, 在一定的时间内, 细胞分裂的代数也就越多, 产生突变的频率也就越大, 其分化能力也就越易丧失。在本实验中观察到细胞继代次数的增加会导致细胞老化, 形状变得不规则, 因此, 悬浮培养的细胞在进行愈伤组织继代和悬浮培养继代时, 次数不应太多, 以尽量保持悬浮培养物的分化能力。

本研究还发现, 悬浮在液体培养基中的细胞与原生质体培养类似, 也需要外界近似等渗的条件。愈伤组织的薄壁细胞由于生活力不强, 细胞壁脆弱, 在低渗条件下细胞破碎后, 会发生胞质泄露现象, 而在高渗条件下细胞的质壁分离也成为较普遍的现象, 这一问题在其它文献中很少提到。观察到质壁分离轻微的细胞也能分裂, 但经过几次分裂后这种质壁分离越来越严重, 最终导致细胞褐化和死亡。控制方法除仿照原生质体的蒸馏水和高浓度蔗糖溶液调节外^[7], 必须经常保持前后培养液中相同的糖浓度, 才能使细胞处在较好状态。尽管单细胞培养液也需要渗透压调节, 但没有原生质体这种完全脱壁细胞的要求严格, 前者调节的幅度较大。

参 考 文 献

- [1] 周平, 郑光植. 植物单细胞克隆技术. 植物生理学通讯, 1990 (1): 68-70
- [2] 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995, 36-42
- [3] Lam S L. Regeneration of plantlets from single cells in potatoes. *Am patato J*, 1977, 54: 575-580
- [4] 祁新, 王权, 顾德峰等. 马铃薯悬浮细胞培养. 吉林农业大学学报, 1996, 18 (1): 21-24
- [5] 安利佳, 张相歧, 向卫等. 草木樨单细胞培养再生植株. 中国草地, 1995 (4): 33-37
- [6] 张自立, 俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理. 北京: 高等教育出版社, 1990, 158
- [7] Chaoxi Dai, Mertz D, Lambeth V. Improved procedures for the isolation and culture of potato protoplasts. *Plant Sci*. 1987, 50: 79-84
- [8] Helgeson J P. Tissue and cell suspension cultures. *Nicotiana: Procedures for experimental use*. In: Durbin R D ed. USDA Techn. Bull. 1586 US Government Printing Office, Washington, 1979, 52-59
- [9] Komamine A. International symposium on genetic manipulation in crops. Beijing, 1984, 76

马铃薯蕾花果脱落与内源激素和光照的关系

门福义¹, 王俊平¹, 宋伯符², 梁文胜³, 王官茂³, 蒙美莲¹, 郭晓燕¹

(¹ 内蒙古农业大学, 呼和浩特市 010018; ² 中国农业科学院; ³ 内蒙古正丰马铃薯种业公司)

摘要: 以乌 H₄ 的母本 081 和父本 NS40-37 为材料, 通过田间和室内试验, 对马铃薯蕾花果脱落过程中内源激素变化进行研究, 阐明了内源激素的变化规律及 IAA、GA₃、ABA、Z、ZR 对蕾花果脱落的具体作用方式; 同时研究了不同光周期和光照强度与脱落的关系及所引起的内源激素的变化。结果表明, 蕾花果中 ABA 含量升高是引起脱落的主要原因, 不利的外界因素可诱发 ABA 的变化, 而长光周期和充足的光照有助于减少蕾、花、果的脱落。

关键词: 马铃薯; 脱落; 内源激素; 光照

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 04-0198-04

1 前言

马铃薯田间杂交结实率长期以来一直徘徊在 5%~8% 之间, 给育种工作和实生种子在商品薯生产上的应用带来了很大困难。由于杂交结实率太低, 大大增加了 TPS 的生产成本; 育种过程每个组合也不得不做大量的杂交才能获得足够的 TPS 以满足选择的需要。

收稿日期: 2000-08-20

马铃薯花期花蕾和花大量脱落, 使可用于杂交和采粉的花锐减, 花期缩短及杂交后浆果大量脱落是影响结实率的两个主要因素。关于提高马铃薯开花率和杂交结实率的方法, 已有的文献资料报道了不少行之有效的方法, 如将马铃薯的接穗嫁接到番茄砧木上; 双重嫁接; 将马铃薯种植在石头或砖头上后期将块茎挖去; 茎的环切或绑扎; 切茎法; 硫代硫酸银处理花等^[1]。但是人们的研究仅限于方法的寻找上, 迄今尚未有人对造成马铃薯蕾花果脱落

STUDY ON THE ESTABLISHMENT OF HIGH QUALITY CELL SUSPENSION CULTURE IN POTATO

ZHANG Ning and DAI Chao-xi

(Institute of Agrobiotechnology, Gansu Agriculture University, Lanzhou, 730070)

ABSTRACT: Two explants (tuber discs and stem segments) from 2 potato tetraploid cultivars (Gannongshu No. 2 and Russet Burbank) of *Solanum tuberosum* were used as the donors. The experiments of callus induction and subculture, establishment of cell suspension culture and cell suspension subculture were carried out. The results showed that the good quality suspension could be obtained by selecting the calli from the subcultures for 1~3 times, subculturing the suspension for every 5d and refreshing the culture media with 3/4 the same kind newly prepared media. When high concentration sucrose or sterile distilled water was used to adjust the medium osmotic pressure in cell suspension culture, and the same medium was used in callus culture, cell suspension culture and cell suspension subculture, the problems of cell plasmolysis and breakage could be solved effectively. These results are beneficial to establishing the cell suspension culture system with high quality.

KEY WORDS: potato; callus; cell suspension culture