

苹果体细胞悬浮培养及植株再生研究

李玉生, 吴永杰, 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 陈 龙

(河北省农林科学院 昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

摘 要:以苹果试管苗叶片的再生不定芽嫩叶为试材,对苹果体细胞悬浮系的建立及植株再生的影响因素进行了研究。结果表明:在 MS+NAA 0.5 mg/L+BA 2.0 mg/L 培养基上可诱导获得高活力的愈伤组织。将该愈伤组织转入 MS+2,4-D 2.0 mg/L+BA 1.0 mg/L 液体培养基中培养,采用无菌筛网分离获得含单个细胞和少于 8~10 个细胞的小细胞团进行继代培养,建立体悬浮细胞培养系。将悬浮细胞转到 MS+2,4-D 2.0 mg/L+BA 1.0 mg/L 的固体增殖培养基上暗培养 25 d 后,可形成微型愈伤组织,将该愈伤组织转到 MS+BA 5.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的植株再生培养基上暗培养 30 d 后转入光下,光照培养 30 d 后 53% 的愈伤组织可再生植株。该研究建立的苹果体细胞悬浮培养技术,不仅可用于细胞融合及遗传转化过程中杂种细胞和转化细胞的分离及植株再生研究,而且对于利用组织培养技术筛选变异株系也具有重要意义。

关键词:苹果;愈伤组织;悬浮培养;植株再生

中图分类号:S 661.1 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)19-0103-04

苹果的常规杂交育种年限长,难度较大,其主要原因在于苹果是高度杂合的木本植物,杂交后代广泛分离,且童期较长。细胞融合技术及基因工程则为快速定向改良苹果新种质开辟了一条崭新的途径。以细胞融合为目的的苹果原生质体和细胞培养技术研究始于

20 世纪 80 年代,迄今已在一些基因型上获得再生植株^[1],但由于基因型间的差异以及单细胞再生技术的不成熟,目前尚无苹果融合细胞再生植株的报道。

1989 年 James 等^[2]首次获得苹果的转化植株,现在一些功能基因如 *rolB* 基因等已经转入到苹果中^[3]。然而由于受到转化效率低的制约,苹果基因工程育种也进展缓慢。在研究中发现由于抗性筛选对苹果转化植株再生的抑制,导致获得转化的愈伤组织容易,获得转化植株困难,从而极大地限制了苹果转化效率的提高^[4]。若降低筛选压,则会出现大量逃逸植株和嵌合体^[5]。因此如何从嵌合体中分离转化细胞并再生植株成为提高苹果转化效率的关键因素。

第一作者简介:李玉生(1980-),男,硕士,助理研究员,现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail:showersound_1980@126.com。

责任作者:吴永杰(1972-),男,博士,副研究员,现主要从事果树遗传育种与分子生物学研究工作。E-mail:wuyongjie007@163.com。基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2007000968)。

收稿日期:2011-07-18

[13] 李丽淑,黄金艳,张向军,等.一种快速提取野生稻总 DNA 的方法(英文)[J].广西农业科学,2005,36(3):189-192.

[14] 穆春华,张发军,李文才,等.玉米叶片基因组快速提取方法研究[J].玉米科学,2010,18(3):170-172.

[15] 应天玉,杨有,袁玉峰.一种快速的植物 DNA 制备方法[J].东北林业大学学报,2003,31(2):61-62.

[16] 吴秋云,罗文彬,邱永祥,等.一种快速提取甘薯基因组 DNA 方案的建立[J].山西农业大学学报(自然科学版),2006,26(2):119-124.

Rapid DNA Extraction Method from Xinjiang Yili Wild Walnut for SSR-PCR

WANG Zhao-yan, DONG Yu-zhi, CHEN Hong, WANG Rui-fen

(College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

Abstract: The DNA from Xinjiang wild walnut leaves was extracted through high salt and low pH method was improved by active charcoal and improved CTAB method. The results showed that the quality of the extracted DNA from the two method was tested had no difference obviously. In addition to time of grinding samples, completing the rapid extraction method once need spent 35 minutes that was about 1/3 of CTAB method spending. It spent 7.8 Yuan that was about 40% of CTAB method spending that using rapid extraction method extracted 100 samples' DNA. The research laid solid foundation for analysis the genetic diversity of Xinjiang wild walnut. Meanwhile, it was for offering technical support that was extraction DNA of the large-scale samples.

Key words: active charcoal; rapid DNA extraction; wild walnut

植物细胞悬浮培养系统具有效率高、同步性和重复性好的特点,不仅可用于细胞突变体的诱发和筛选,而且可为遗传工程提供细胞水平的理想试材。然而在苹果上,由于相关的研究报道很少,迄今尚未建立成熟的体细胞悬浮培养和再生植株技术体系。该研究拟通过调控材料生理状态,诱导获得高活力的愈伤组织,并利用筛网分离来源均一的小细胞团,建立苹果体细胞悬浮培养及植株再生技术。该技术体系不仅对于推动苹果细胞工程育种和诱变育种的发展具有重要意义,而且可用于苹果转基因嵌合体中转化细胞的分离和植株的再生,从而极大提高苹果的转化效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

取苹果栽培品种“嘎啦”(Malus domestica Borkh. cv. Gala)继代培养 20 d 的试管苗顶部 3 片刚展开嫩叶以及中部成熟叶片,横切三刀以远轴面贴近培养基方式接种在 MS+TDZ 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+BA 3.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.2 g/L 上,黑暗条件下培养 20 d,诱导叶片再生不定芽,将不定芽转入和上述相同的新鲜培养基上,置光下培养 7~15 d,取不定芽上长出的嫩叶备用。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 取继代培养 20 d 的试管苗中部成熟叶片、顶部 3 片刚展开嫩叶或再生不定芽嫩叶,采用上述方式切伤并接种在愈伤组织诱导培养基 MS+NAA 0.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.2 g/L 上。在(25±2)℃下暗培养诱导愈伤组织,观察记录愈伤组织的诱导时间、频率以及其生理状态。

1.2.2 悬浮细胞系的建立 选取生长旺盛的愈伤组织,转移到液体悬浮培养基 MS+2,4-D 2.0 mg/L+BA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L 中,置于摇床上进行悬浮培养,转速为 120 r/min。培养 15 d 后,培养液中即有悬浮单细胞或小细胞团(含有 8~10 个单细胞)出现。为获得生长状态均一的悬浮细胞系,将悬浮培养物先用 200 目的无菌网筛过滤,滤液以 3 000 r/min 速度离心,去上清,将沉淀转到新鲜的液体培养基进行悬浮培养,建立悬浮细胞培养系。悬浮培养的细胞每隔 15 d 继代 1 次,继代时首先将悬浮培养物用 200 目的无菌网筛过滤,除去大的细胞团,滤液以 3 000 r/min 速度离心,去上清,沉淀转到新鲜的液体培养基进行悬浮培养。细胞继代培养和增殖培养的不同时期,吸取细胞悬液,滴加到血球计数板上,在显微镜下统计细胞的个数。将细胞用新鲜配置的 FDA(二乙酸荧光素)溶液染色 5 min,然后用滤纸吸去染色液,滴加蒸馏水,在 Olympus(BH-2)倒置荧光显微镜上,在紫外光(490

nm)下观察细胞活力。

1.2.3 悬浮细胞的固定化增殖培养 将继代培养 12 d 的悬浮细胞培养物用 200 目的无菌网筛过滤,滤液以 3 000 r/min 速度离心,去上清液,沉淀用适量新鲜液体培养基稀释成浓缩细胞悬浮液(1.7×10^5 个/mL),将细胞悬浮液按不同铺板密度滴加到固体增殖培养基上,然后用无菌涂棒均匀铺平。固体增殖培养基除添加琼脂外,其它含量与液体悬浮培养基相同,培养温度为(25±2)℃,暗培养。

1.2.4 愈伤组织植株再生 将固体增殖培养基上获得的微型愈伤组织接种到植株再生培养基上诱导植株再生。为了研究生长调节类物质对植株再生的影响,设计了以下处理:①BA 0.5 mg/L;②BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L;③BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L;④BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L;⑤BA 2.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L;⑥BA 5.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L;⑦BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L;⑧BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L;⑨BA 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L;⑩BA 5.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L。基本培养基为 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.2 g/L。培养温度为(25±2)℃,愈伤组织暗培养 30 d 后转入光下诱导植株再生。在光下培养 60 d 后观察统计植株再生情况。

2 结果与分析

2.1 外植体来源对愈伤组织诱导及植株再生的影响

由表 1 可知,外植体来源或叶片生理状态,对愈伤组织的诱导及其植株再生能力影响显著。成熟的试管苗叶片在暗培养 25 d 后才有愈伤组织生成,愈伤组织诱导率只有 26%,且诱导获得的愈伤组织呈白色,质地比较坚硬,生长不旺盛。而采用试管苗顶端嫩叶或再生不定芽嫩叶,均可 100%诱导愈伤组织。不同外植体来源诱导的愈伤组织其植株再生能力的差异则更为显著。采用成熟叶片诱导获得的愈伤组织,其植株再生率较低只有 7%;而采用再生不定芽嫩叶诱导获得的愈伤组织则可 100%再生植株,且植株再生所需时间也最短。从愈伤组织的生理状态上看,采用不定芽嫩叶诱导获得的愈伤组织多为结构疏松、易于分散的淡黄色愈伤组织,该愈伤组织不仅生长速度快,再生能力强,且非常适用于悬浮细胞培养系的建立。

表 1 外植体来源对愈伤组织诱导及植株再生的影响

外植体 Explant	愈伤组织诱导率 Induction rate of callus/%	诱导时间 Induction time/d	愈伤组织状态 Callus status	不定芽再生率 Adventitious bud regeneration rate/%
再生不定芽嫩叶	100	6	淡黄、疏松	100
顶部嫩叶	100	15	黄色、疏松	100
成熟叶片	26	25	白色、致密	7

2.2 悬浮培养的细胞增殖特性

悬浮培养的细胞增殖速率及活力与培养时间存在

着相关性(图 1)。继代培养后第 0~6 天为延迟期,细胞生长缓慢,第 6 天在显微镜下观察只发现极少数悬浮细胞,细胞密度为 0.8×10^3 个/mL;继代培养后 7~12 d 为悬浮细胞的对数生长期,此时期细胞增殖迅速,活力旺盛,第 12 天观察细胞密度达到了 8.2×10^3 个/mL;在继代培养第 15 天后观察,细胞活力开始降低,细胞开始呈现老化特征,且悬浮液中细胞碎片增多,说明有部分细胞开始破裂。所以在以后的试验中均选用继代培养 7~12 d 的悬浮细胞为试材。

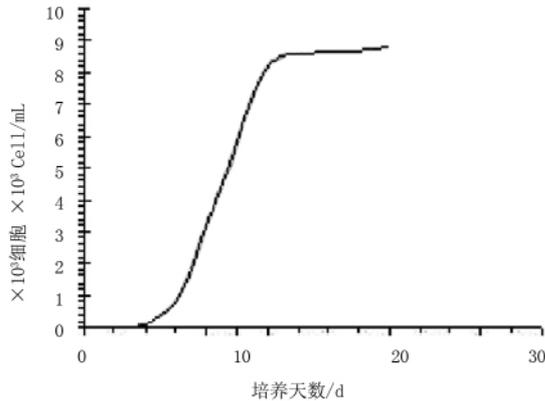


图 1 悬浮细胞培养过程中的增殖特性

Fig. 1 Proliferation properties of suspension cultivated cells

2.3 悬浮细胞继代培养次数对细胞再生能力的影响
对每次继代培养的悬浮细胞用 FDA 进行活力检测并固定化培养,观察其再生能力。结果表明,悬浮细

胞的继代次数与细胞的活力及再生愈伤组织能力直接相关(图 2)。悬浮继代培养 3 次以上的悬浮细胞,其再生愈伤组织的能力明显下降,在培养 60 d 后只能形成少量微型愈伤组织。而继代培养 1~2 次的悬浮细胞,在培养约 30 d 后即可再生出微型愈伤组织(图 3-d),再生率分别为 80%和 69%。

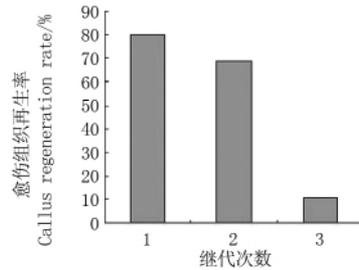


图 2 悬浮细胞继代培养次数对愈伤组织再生的影响

Fig. 2 Effect of suspension cell subculture times on callus regeneration

2.4 悬浮细胞的铺板密度对愈伤组织增殖的影响

在固体增殖培养基上,愈伤组织的增殖能力与悬浮细胞的铺板密度相关。研究表明,当悬浮细胞的密度小于 5 个/mm² 时,培养 40 d 后未观察到愈伤组织形成;而当悬浮细胞的密度过高时,则常常形成聚集的愈伤组织,不利于分离获得单独增殖的愈伤组织。若将悬浮细胞的铺板密度控制在 5~8 个/mm² 时,在培养 30 d 后即可再生大量肉眼可辨的独立的微型愈伤组织(图 3-d)。

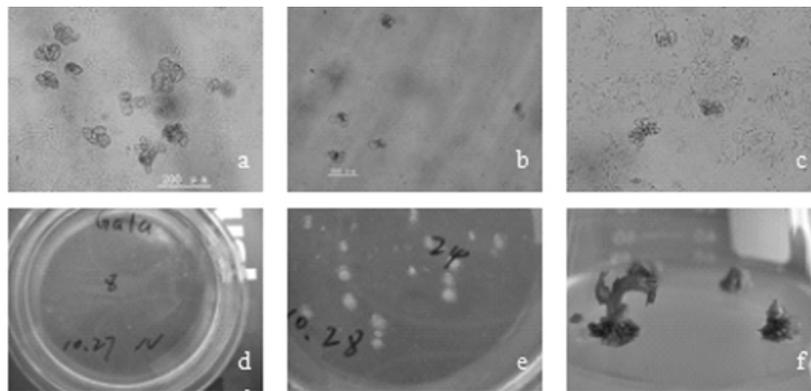


图 3 悬浮细胞的铺板密度对愈伤组织增殖的影响

Fig. 3 Effects of suspension cell density on the callus regeneration

注:a. 较高密度的悬浮细胞培养;b. 低密度的悬浮细胞培养;c. 较佳密度的悬浮细胞培养;d. 固体增殖培养 30 d 后再生微型愈伤组织;e. 固体增殖培养 40 d 后再生愈伤组织;f. 再生植株。

Note; a. High density of suspension cells culture; b. Low density of suspension cells culture; c. Appropriate density of suspension cells culture; d. The regenerated mini-calli cultured on the solid medium for 30 days; e. The regenerated calli cultured on the solid medium for 40 days; f. Plants regeneration.

2.5 生长调节类物质对愈伤组织器官发生的影响

由表 2 可知,单独采用 BA 或采用 BA 与 NAA 结合,均未能诱导愈伤组织器官发生。而采用 BA 和 IBA 结合,在暗培养条件下可诱导愈伤组织形成根,且较低浓度的 BA 有利于根的发生(发生率 45%),当 BA 浓度达到 5.0

mg/L 时,根的发生被抑制。若将培养基中的 IBA 换成 IAA,则有利于芽的诱导。虽然较高浓度的 BA 有利于芽的形成,但当 BA 浓度达到 5.0 mg/L 时,愈伤组织上发生的芽开始出现玻璃化现象。将诱导获得的芽转到光下培养 20 d 后即可形成再生植株(图 3-f)。

表2 生长调节剂种类及浓度
对愈伤组织植株再生能力的影响

Table 2 Effects of the type and concentration of
plant growth regulators on the plant regeneration of callus

培养基种类 Medium type	根诱导率 Induction rate of root/%	芽诱导率 Induction rate of bud/%
① BA 0.5 mg/L	0	0
② BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L	0	0
③ BA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L	45	0
④ BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L	11	0
⑤ BA 2.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L	10	0
⑥ BA 5.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L	0	0
⑦ BA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L	0	17
⑧ BA 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L	0	26
⑨ BA 2.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L	0	35
⑩ BA 5.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L	0	53

3 讨论

细胞的悬浮培养一般都采用胚性细胞。胚性细胞是指在一定条件下具有体胚发生能力的细胞^[6-7]。例如,近年来禾谷类作物悬浮细胞培养取得重大进展,主要是因为采用了从幼胚诱导愈伤组织来建立悬浮细胞培养系。然而在木本植物如苹果上,由于胚性组织的愈伤组织诱导率非常低(5.0%),且植株再生能力也很差^[8],因而造成苹果细胞培养的研究进展缓慢。若能从苹果叶片诱导生长旺盛的愈伤组织建立悬浮培养细胞系,则不仅材料容易得到,而且重复性好。在以往的研究基础上提出以叶片再生不定芽的嫩叶作为外植体,可诱导获得具有高增殖活力的愈伤组织。采用其建立的悬浮细胞系,可在较短的时间内较高频率地诱导获得再生植株,克服了前人研究中悬浮细胞植株再生能力差的问题。分析其原因可能是再生不定芽的叶片比较幼嫩,其生理生化代谢较旺盛,可塑性大,因而易于分化诱导出生长旺盛、再生能力强的愈伤组织。

该研究发现悬浮细胞的继代培养次数影响细胞的

活力和植株再生能力,采用继代培养 1~2 次的悬浮细胞,有利于获得较好的植株再生频率。悬浮细胞在固体培养基上的增殖与铺板密度也有一定的相关性。悬浮细胞只有达到一定的密度时,才能增殖获得愈伤组织团。这可能与植物细胞分泌到细胞外的内源生长物质有关。此外该试验通过采用不锈钢筛网过滤的方式去除了悬浮培养液中大的细胞团,经固体培养基培养后,可以获得大量来源均一的类似单细胞克隆的愈伤组织。若辅以荧光标记分析,则可有效地分离细胞融合或苹果转化过程中产生的嵌合体杂种细胞或转化细胞,从而改进苹果育种方法,提高苹果的育种效率。

参考文献

- [1] 肖建会,孙建设. 苹果原生质体研究[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(S): 98-100.
- [2] James D J, Passey A J, Barbara D J, et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed Ti-binary vector [J]. Plant Cell Rep, 1989(7): 658-661.
- [3] Zhu L H, Holefors A, Ahlman A, et al. Transformation of the apple rootstock M. 9/29 with the rol B gene and its influence on rooting and growth [J]. Plant Sci., 2001, 160(3): 433-439.
- [4] Wu Y J, Li Y H, Wu Y Q, et al. Transgenic plants from fragmented shoot tips of apple (*Malus baccata* (L.) Borkhausen) via agrobacterium-mediated transformation [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 128: 450-456.
- [5] Dominguez A, Cervera M, Perez R M, et al. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after Agrobacterium-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimaeric plants at unexpected high frequencies [J]. Molecular Breeding, 2004, 14: 171-183.
- [6] 王大元. 禾谷类植物的细胞培养和体细胞胚胎发生 [J]. 细胞生物学杂志, 1984, 6(1): 16-20.
- [7] Vasil I K. Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and tissue culture System for the improvement of cereal and grass crops [J]. Plant Physiology, 1987, 128: 193-218.
- [8] 李玉生, 吴永杰, 赵艳华, 等. 苹果胚性细胞的诱导及植株再生研究 [J]. 河北农业科学, 2009, 13(10): 64-66.

Study on the Somatic Cell Suspension Culture and Plant Regeneration of Apple

LI Yu-sheng, WU Yong-jie, ZHAO Yan-hua, WU Ya-qin, CHENG He-he, CHEN Long

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600)

Abstract: The young leaves of plantlets regenerated from the leaves of apple seedling *in vitro* were used test material, effect factors of the establishment of suspension cultures from apple somatic cell and plant regeneration were studied. The results indicated that callus with strong growth vitality could be induced that cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA, and 2.0 mg/L BA. The callus were transferred to liquid MS medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BA and the suspension cell lines were established when the single cells and cell clusters that contains about 8~10 single cells were separated by using stainless steel sieve for subculture. Micro-callus could be obtained when the suspension cells were transferred onto MS solid medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BA and cultured for 25 days in the dark. When these micro-calli were cultured on the MS medium supplemented with 5.0 mg/L BA, 0.5 mg/L IAA for 1 month in the dark, fifty-three percent of which regenerated apple plants when transferred to the light for thirty days. The somatic cell suspension culture and plant regeneration protocols established here was not only useful for the separation of hybrid or transgenic cells and plant regeneration during cell fusion or genetic transformation research, but also very important on the selection of mutation plants by using tissue culture methods.

Key words: apple; callus; suspension culture; plant regeneration