

‘霞多丽’胚性细胞悬浮系的建立及植株再生

侯丽霞¹, 刘伟¹, 张雅丽², 刘新¹, 卢江²

(1. 青岛农业大学 生命科学学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东 青岛 266109; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:以‘霞多丽’前胚物质为试材,初步建立了‘霞多丽’胚性细胞悬浮系,并研究了不同激素及其浓度配比,不同种类及浓度的碳源以及谷氨酰胺对悬浮细胞生长的影响。结果表明:2,4-D和 NOA 均可以抑制胚性细胞的分化,但 2,4-D 更有利于细胞的增殖,最佳的 2,4-D 附加浓度为 1 mg/L。同等浓度(0~60 g/L)的麦芽糖比蔗糖更利于细胞的生长,15 g/L 为‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的最佳麦芽糖浓度。附加谷氨酰胺可以显著提高悬浮细胞的生长,其中以 500 mg/L 为最佳。

关键词:‘霞多丽’;胚性细胞;悬浮系;激素;碳源;谷氨酰胺

中图分类号:S 663.104.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)23-0093-04

葡萄(*Vitis vinifera* L.)属于多年生果树,由于遗传背景复杂,生命周期长,使得常规育种手段在葡萄品种改良上受到很大限制,基因工程技术的应用为葡萄品种改良提供了新的途径^[1]。虽然目前多个葡萄品种已经建立了再生体系,但存在再生率较低、重复性差等问题^[2]。体细胞胚胎发生是一种常用的葡萄再生途径,

由于再生率高,易于基因遗传转化而受到人们的高度关注。研究者利用不同葡萄品种的幼叶、花药等材料成功诱导产生了体细胞胚,并获得了转化植株^[3]。

‘霞多丽’别名‘莎当妮’,原产法国,是我国及南美国家最重要的葡萄栽培品种,主要用其酿造高档干白葡萄酒,酒色淡金黄色,澄清、优雅,是一种极为重要的酿酒葡萄品种。该试验旨在建立一种有效的胚性细胞悬浮系,进而进行胚胎发生及植株再生途径,为研究优良功能基因的遗传转化提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 ‘霞多丽’前胚物质 由美国佛罗里达州农工大学葡萄与小果研究中心卢江教授惠赠(图版 1 A)。

第一作者简介:侯丽霞(1978-),女,博士,讲师,研究方向为葡萄分子细胞生物学。E-mail:houliaxia78@163.com。

责任作者:刘新(1966-),女,博士,教授,研究方向为植物逆境生理与分子生物学。E-mail:liuxin6080@yahoo.com.cn。

基金项目:农业部 948 计划资助项目(2006-G26)。

收稿日期:2011-09-09

3 结语

城市公园地域文化表达要真实、正确,不但要保护前人已创造的文明文化,完整地表现并传给后代,也要创造属于这个时代的有价值的文化。在当今的时代背景下,提出植根于地域文化的公园规划设计概念是十分必要的,“只有民族的,才是世界的”。公园才能成为

地域文化的载体,不断发扬光大。

参考文献

- [1] 中华人民共和国行业标准. 公园设计规范(CJJ/T48-1992)[S]. 北京:中国建筑工业出版社,1992.
- [2] 刘少宗. 园林设计[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2008.

Respect Local Features and Express Local Cultures

XU Da-wei, LIU Zhong-hua

(College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: With the development of economic globalization, Harbin is in the rapid economic development, urbanization is accelerating the occasion, the city park construction is in full swing. City park on the expression of regional culture, regional characteristics of the city to establish a crucial role. This paper for Harbin zhaolin park was regional culture expression for research and hopefully we can express Harbin city parks play a role in local culture.

Key words: city park; regional culture; expression; zhaolin park

1.1.2 主要试剂 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、Phytigel 均购于 Sigma 公司;萘氧乙酸(naphthoxyacetic acid, NOA)、L-谷氨酰胺(L-glutamine, Glu)购于上海生工生物工程技术有限公司;其它药品为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 ‘霞多丽’胚性细胞悬浮系的建立 取未分化、质地细腻均匀的淡黄色前胚物质约 2~3 g, 无菌条件下转移至含 MS 液体培养基的三角瓶中。(25±1)℃, 暗条件下振荡培养(110 r/min)。每隔 10 d 用新鲜液体培养基更换掉大约 3/4 的旧液, 同时去除漂浮在原培养基上层的细胞碎片和长弯形衰败细胞。

1.2.2 ‘霞多丽’体细胞胚的成熟、分化及植株再生 取‘霞多丽’胚性细胞团, 置于分化培养基(MS+0.5 g/L 谷氨酰胺+30 g/L 蔗糖+2.5 g/L Phytigel)上, (25±1)℃, 前期暗处理, 2 周后, 置于光下培养(8 h/16 h 暗/光, 2 000 lx)。3~4 周后, 体式显微镜下观察‘霞多丽’体细胞胚的成熟、分化情况。待体细胞胚分化至子叶期后, 将分化的体细胞胚挑出(生长至 3 cm 左右), 置于生芽培养基(MS+30 g/L 蔗糖+2.5 g/L Phytigel)上, (25±1)℃, 光下培养(8 h/16 h 暗/光, 2 000 lx)3~5 周。

1.2.3 激素对‘霞多丽’胚性悬浮细胞快繁的影响 取未分化、质地细腻均匀的淡黄色前胚物质约 2~3 g, 以 MS+15 g/L 麦芽糖+0.5 mg/L 谷氨酰胺为基本培养基, 附加不同浓度的 2,4-D 和 NOA, 其浓度均设 0、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 5 个处理, 置于(25±1)℃ 110 r/min 振荡培养箱中振荡培养, 15 d 后分别称量其鲜重和干重。

1.2.4 碳源对‘霞多丽’胚性悬浮细胞快繁的影响 以 MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 谷氨酰胺为基

本培养基, 附加不同浓度的蔗糖和麦芽糖, 其浓度均设 0、15、30、45、60 g/L 5 个处理, 置于振荡培养箱中振荡培养, 15 d 后分别称量其鲜重、干重。

1.2.5 谷氨酰胺对‘霞多丽’胚性悬浮细胞快繁的影响 以 MS+1.0 mg/L 2,4-D+15 g/L 麦芽糖为基本培养基, 附加不同浓度的谷氨酰胺, 其浓度设 0、250、500、750、1000 mg/L 5 个处理, 置于振荡培养箱中振荡培养, 15 d 后分别称量其鲜重和干重。

1.2.6 细胞鲜重及干重的测量方法 取 1 mL 离心管(管底刺孔, 直径小于 1 mm)称重, 将 0.5 mL 悬浮细胞液(事先摇匀), 置于称重的 1 mL 离心管中。将 1 mL 离心管置于 1.5 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 2 min, 取出称重 1 mL 离心管。称重后, 将其置于 60℃ 高温下 48 h, 烘干并称重。细胞鲜重(g/L)=(离心后离心管的重量-离心前离心管的重量)/0.5; 细胞干重(g/L)=(烘干后离心管的重量-离心前离心管的重量)/0.5。

1.2.7 数据统计分析 测定结果用 Duncan's 新复极差方法分析。

2 结果与分析

2.1 ‘霞多丽’胚性细胞悬浮系的建立

2.1.1 激素对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响

由图 1 可看出, 在一定范围内, 随着 NOA 和 2,4-D 浓度的不断增加, ‘霞多丽’悬浮细胞的细胞鲜重和干重呈现先升高后降低的增殖趋势。其中当附加 1 mg/L 的 2,4-D 时, 胚性悬浮细胞的生长量达到最大, 且与对照相比, 细胞的鲜重和干重分别增长了 153.3% 和 119.6%($P<0.05$); 而添加激素 NOA 时, 胚性悬浮细胞的鲜重和干重略有下降(图 1)。这表明与 NOA 相比, 2,4-D 更有利于胚性细胞的增殖, 且 1 mg/L 为其最佳的附加浓度。

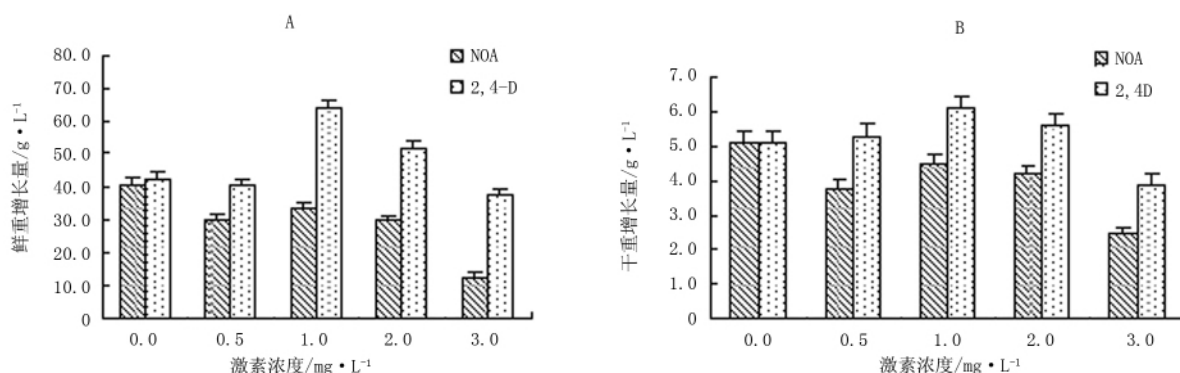


图 1 NOA 和 2,4-D 对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响

2.1.2 碳源对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响

由图 2 可看出, 在一定浓度范围内, 蔗糖和麦芽糖均有利于‘霞多丽’胚性悬浮细胞的增殖。当附加 15 g/L 的蔗糖时, 胚性悬浮细胞的鲜重和干重分别比对照增加了 282%(图 2A)和 179%(图 2B)。而附加麦芽糖其促进胚性悬浮细胞的生长的作用更为明显, 15 g/L 为最佳浓度, 在此浓度下胚性悬浮细胞鲜重和干重分别比对照增加了 400%和 246%(图 2)。

2.1.3 谷氨酰胺对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响

由图 3 可看出, 附加一定浓度的谷氨酰胺可以显著地促进‘霞多丽’胚性悬浮细胞的生长($P<0.05$), 并具有较为明显的浓度效应。当附加谷氨酰胺的浓度为 500 mg/L 时, 悬浮细胞的生长量达到最大。其细胞鲜重和干重与对照相比, 分别增加了 229%(图 3A)和 175%(图 3B)。

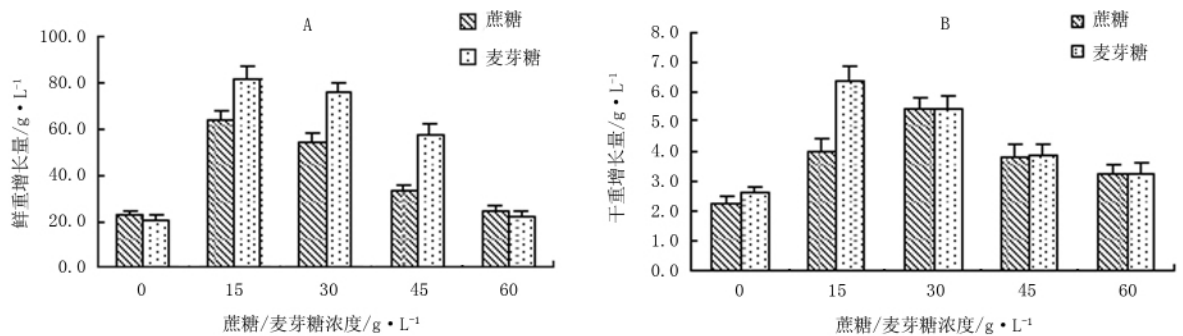


图2 蔗糖和麦芽糖对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响

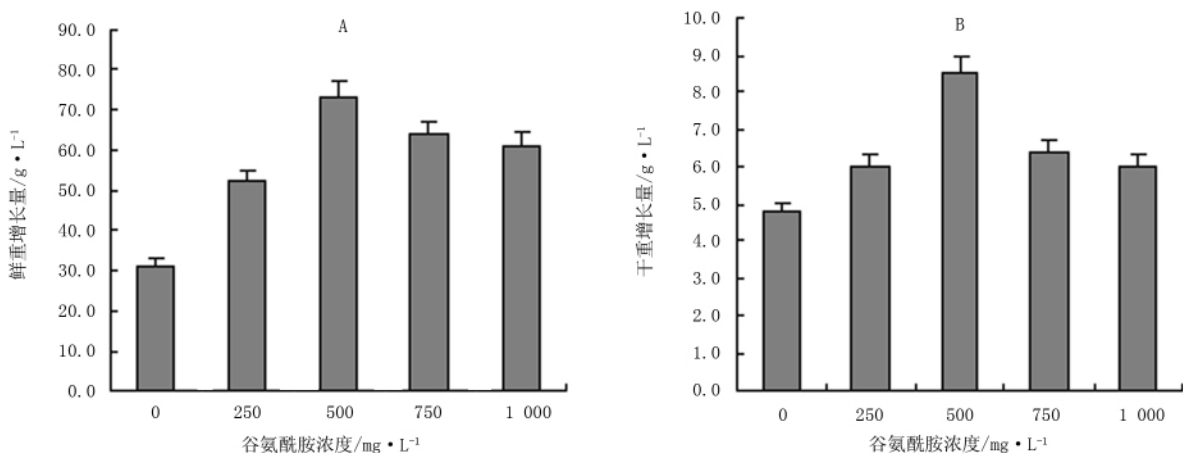


图3 谷氨酰胺对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响

2.1.4 ‘霞多丽’胚性细胞悬浮系的建立及形态观察

取未分化、质地细腻均匀的淡黄色前胚物质约 2~3 g,置于含 MS+1.0 mg/L 2,4-D+15 g/L 麦芽糖+0.5 mg/L 谷氨酰胺的基本培养基中,(26±1)℃,暗条件下振荡培养(110 r/min)。几周后,培养液由浊变清,开始出现胞质浓密的单细胞和小细胞团,反复继代,即可获得质地均一、生长迅速的胚性细胞悬浮系(图版 1 B)。

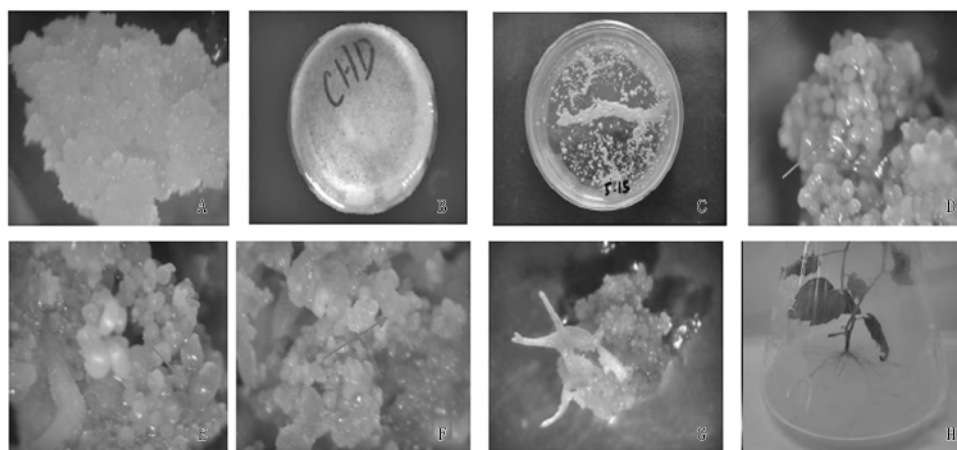
2.2 ‘霞多丽’胚性细胞的分化及植株再生

2.2.1 ‘霞多丽’胚性细胞团的保持 将获得的胚性细胞团进行继代培养,(25±1)℃,暗条件培养 30 d后,观察到的胚性细胞团大多呈现白色或浅黄色,质地细腻均一,有光泽,遇到液体即分散成细沙状,是适宜的供试材料。与此同时,也有少数细胞团呈现淡黄色,质地粗糙,松散易碎,不适宜作进一步研究。

2.2.2 ‘霞多丽’体细胞胚的分化、成熟及植株再生 将筛选出的胚性细胞团接种至不含 2,4-D 的分化培养基上培养,3 周后开始陆续出现胚状体。起初呈现白色或淡黄色,质地细腻,分化一段时间后变成颗粒状,并逐渐发育成乳白色,半透明状的球形胚(图版 1 D)。球形胚继续分化,经历鱼雷形胚(图版 1 E)、心形胚(图版 1 F)和子叶形胚(图版 1 G)后,最终生长发育为有功能性叶片的植株(图版 1 H)。

3 结论与讨论

目前虽然葡萄基因组测序已经完成,但大量的基因功能尚未确定,需要进一步利用转基因手段研究其功能,为此葡萄转化体系的建立至关重要,而体细胞胚是较好的研究材料。在胚性细胞悬浮细胞系的建立过程中,植物激素是影响细胞状态的重要调控因素^[4]。该试验研究了 2,4-D 和 NOA 对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长快繁的影响。结果表明,2 种激素均可以有效抑制胚性细胞的分化,同等浓度的 2,4-D 比 NOA 更有利于‘霞多丽’胚性悬浮细胞的生长。1 mg/L 为其最佳的 2,4-D 附加浓度。这与 Pinto-Sintra^[5] 和 Jayasankar^[6] 分别对葡萄品种‘Touriga Nacional’、‘Chardonnay’和‘Thompson Seedless’的研究结果类似。碳源是细胞的生长必不可少的营养物质^[7],支玉玺等^[8]以中国野生华东葡萄(*V. pseudoreticulata*)感白粉病株系‘广西-2’的花药为试材,证明 15.0 g/L 蔗糖有利于体细胞胚的形成。但该试验研究表明,在‘霞多丽’胚性细胞悬浮细胞系的建立过程中,同等浓度的麦芽糖比蔗糖更有利于促进胚性悬浮细胞的生长。这与 Amar 等通过对葡萄砧木品种‘110 Richter,Kober5BB,Kober125AA’和酿酒葡萄品种‘Tempranillo’,‘Cabernet-Sauvignon’的研究结果一致^[9]。该试验中谷氨酰胺对‘霞多丽’胚性悬浮细胞生长的影响结果与



图版 1

注:图版 1 中 A 代表‘霞多丽’的前胚物质;B 代表‘霞多丽’胚性悬浮细胞系;C 代表体细胞胚的保持;D 代表球形胚阶段;E 代表心形胚阶段;F 代表鱼雷形胚阶段;G 代表子叶后期;H 代表成熟植株。

Jayasankar 对葡萄品种‘Chardonnay’和‘Thompson Seedless’的研究结果类似^[6],进一步证明谷氨酰胺对细胞的生长具有明显的促进作用。该试验,通过对不同激素、不同碳源及谷氨酰胺最佳浓度的筛选,初步建立了胚性悬浮细胞‘霞多丽’的胚性悬浮系,为进一步研究抗性基因的遗传转化提供了理论依据和技术支持。

参考文献

- [1] 张文娥,王飞,潘学军. 葡萄属植物(*Vitis* L.)再生系统的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31:190-196.
- [2] 陶建敏,庄智敏,章镇,等. 葡萄基因转导研究进展[J]. 果树学报,2003(5):384-387.
- [3] Dhekney S A, Li Z T, Dutt M, et al. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cultures and plant regeneration in *Vitis rotundifolia* Michx(muscadine grape)[J]. Plant Cell Rep, 2008, 27:

865-872.

- [4] 李明,王树香,冯大领. 植物体细胞胚发生及发育研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(3):237-241.
- [5] Pinto-Sintra A L. Establishment of embryogenic cultures and plant regeneration in the Portuguese cultivar ‘Touriga Nacional’ of *Vitis vinifera* L. [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2007,88:253-265.
- [6] Jayasankar S, Gray D J, Litz R E. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine [J]. Plant Cell Rep,1999,18:533-537.
- [7] 王兴军,毕玉平. 利用细胞培养进行药物生产的研究[J]. 生物技术,1997(1):1-3.
- [8] 支玉玺,张剑侠,王跃进. 华东葡萄广西-2 花药胚状体诱导与再生植株的研究[J]. 果树学报,2010(1):18-23.
- [9] Ben Amar A, Cobanov P, Boonrod K, et al. Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation [J]. Plant Cell Rep,2007, 26:1439-1447.

Establishment of the Embryogenic Cell Suspensions Cultures and Plant Regeneration of Wine Grape ‘Chardonnay’

HOU Li-xia¹, LIU Wei¹, ZHANG Ya-li², LIU Xin¹, LU Jiang²

(1. Life Science College of Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109; 2. College of Food Sciences and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100093)

Abstract: An efficient system for the establishment and multiplication of highly prolific embryogenic cell cultures of wine grape ‘Chardonnay’ was developed. Using pro-embryonic masses(PEMs)as starting material, cell suspensions was initiated in liquid medium containing NOA(1.0 mg/L as growth regulator. The effects of different hormones, carbon sources with their concentrations and glutamine on multiplication of ‘Chardonnay’ embryogenic suspension cell were tested. The results indicated that the influences of each factor on multiplication were significantly different. Both 2,4-D and NOA could inhibit differentiation of ‘Chardonnay’ embryogenic suspension cell. But 2,4-D was more beneficial to proliferative and 1 mg/L was the optimum concentration. Maltose was better than sucrose with the same level(0~60 g/L), 15 g/L was the best additional concentration. Glutamine was helpful to the multiplication of embryogenic suspension cell and 500 mg/L was the optimum.

Key words: ‘Chardonnay’; embryogenic cell; suspension lines; hormones; carbon sources; glutamine