

红姜花胚性细胞悬浮体系的建立和原生质体培养

肖 望, 涂红艳, 邓崇会

(广东第二师范学院 生物系, 广东 广州 510303)

摘 要:以红姜花(*Hedychium coccineum*)未成熟花丝和花药为试材,研究了红姜花胚性愈伤组织的诱导、细胞悬浮体系的建立以及原生质体的培养。结果表明:在MS+4 mg/L 2,4-D+4 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂上经过120 d培养诱导出了愈伤组织,愈伤组织在增殖培养基上经过继代筛选获得浅黄色、松散易碎的胚性愈伤组织。胚性愈伤组织通过3个月的悬浮培养,得到均质稳定的胚性细胞悬浮系。以胚性悬浮细胞(ECS)为起始材料分离原生质体,酶解试验表明,在原生质体分离过程中,用于原生质体分离的酶液需要保持一定的渗透压以保护原生质体不被破坏。当甘露醇的浓度为0.14 mol/L时,原生质体产量最高,达到 2.25×10^5 个/mL PCV ECS (packed cell volume, PCV)。在看护培养系统中,原生质体经过7 d的培养,细胞第一次分裂,经过14 d培养,细胞分裂频率达到12.3%,28 d时,细胞团形成频率达到4.2%。所形成的细胞团具有典型的胚性细胞特征。

关键词:红姜花;胚性细胞悬浮体系;原生质体

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0104-05

红姜花(*Hedychium coccineum*)属姜科姜花属(*Hedychium*)多年生草本植物,分布于我国西藏、云南、广西以及沿喜马拉雅诸国及斯里兰卡、缅甸、越南一带,其穗状花序鲜红色,花型美丽,似群蝶飞舞,观赏价值极高,宜做高档鲜切花或园林绿化使用,是姜花属中的珍品,也是极好的花卉育种材料^[1]。自然条件下,红姜花株高1.5~2.0 m,限制了其作为观赏植物的使用,且其鲜切花瓶插期只有3~5 d。培育鲜切花瓶插期长、矮化的红姜花新品种是进行红姜花品种改良和应用的有效措施。利用生物技术方法,如基因工程、体细胞突变和体细胞杂交等,有望克服传统育种的限制因素,达到红姜花品种改良的目的,所有这些技术的应用都有赖于一个高效的植株再生体系。稳定的红姜花胚性细胞悬浮系(Embryogenic cell suspensions, ECS)是实现高效植株再生及经原生质体培养获得高效植株再生体系的良好材料。

涂红艳等^[2]报道了关于通过体细胞胚胎发生途径建立红姜花(*Hedychium coccineum*)植株再生体系的研究,目前尚鲜见关于姜花属(*Hedychium*)植物原生质体分离的研究报道。该研究以红姜花未成熟的花药和花丝为外植体,建立红姜花的ECS,再以ECS为外植体,对原生质体分离条件进行优化,并通过改良原生质体培养方法,达到进一步实现红姜花原生质体培养的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红姜花(*Hedychium coccineum*)未成熟花序取自仲恺农业工程学院番禺实验基地。

所用的纤维素酶R-10(产自Yakult Pharma, Tokyo, Japan)、离析酶R-10(产自Kinki Yakult, Mishino, Japan)和果胶酶Y-23Yakult(产自Seishin Pharma, Japan)购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导和继代培养 愈伤组织诱导和继代培养按照涂红艳等^[2]的方法进行。取红姜花未成熟花序上的花蕾,用自来水冲洗30 min去除表面污物,于超净工作台上用75%酒精进行表面消毒30 s,再用0.1% HgCl₂消毒8 min,无菌水冲洗6次,在超净工作台上剥除花蕾外部苞片,将里面的花丝和花药分离,分别切为0.5 cm长的小段,接种于愈伤组织诱导培养基上。愈伤组织诱导培养基为MS基本培养基^[3]+4 mg/L

第一作者简介:肖望(1970-),女,博士,教授,现主要从事姜科植物生物技术研究 and 植物生理学教学工作。E-mail: exiao7379@sina.com.

基金项目:广东省自然科学基金博士启动资助项目(10451030301004286);广东省高等院校学科与专业建设专项资金资助项目(2013KJJCX0137);广州市科技计划资助项目(2014J4100151)。

收稿日期:2014-11-18

2,4-D+4 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。将获得的愈伤组织在增殖培养基(proliferated medium)中进行增殖培养,通过观察其生长状况筛选胚性愈伤组织。愈伤组织增殖培养基为 MS 基本培养基+1 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L NAA+0.25 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。

1.2.2 胚性细胞悬浮系的建立和培养 胚性细胞悬浮系的建立和培养参考涂红艳等^[2]方法进行。选取浅黄色、松散易碎的胚性愈伤组织约 2 g,加入含 30 mL 悬浮培养基的 100 mL 的锥形瓶中进行悬浮培养。所用的悬浮培养基为 MS 无机盐+B5 维生素^[4]+100 mg/L 谷氨酰胺+230 mg/L 脯氨酸+100 mg/L 麦芽提取物+45 g/L 蔗糖,再加不同浓度的 NAA、TDZ、2,4-D(表 1),筛选最合适的植物生长调节剂组成。培养初期每隔 7 d 继代 1 次,继代 4 次后,每隔 15 d 继代 1 次。继代时将三角瓶置于无菌操作台静置,待所有细胞沉淀到瓶底后,除去上部的旧培养液,补充新鲜培养液。当继代 3~4 次、培养物大量繁殖后,用 420 μ m 孔径筛网过滤除去大的细胞团,保留分散良好的悬浮培养物继续培养,此过程不断重复,以维持悬浮培养物的良好分散性。悬浮培养中细胞生长量用密实细胞体积(Packed Cell Volume, PCV)表示,测定方法参照文献[5]。继代时以 0.5 mL PCV 为起始接种量,15 d 后测定 ECS 的生长量。增殖倍数=ECS 净增殖量/起始接种量。

1.2.3 原生质体的分离和培养 用于原生质体分离的酶组合见表 1,酶溶解液组成为 204 mmol/L KCl+67 mmol/L CaCl₂+不同浓度的甘露醇(0、0.07、0.14、0.28、0.42 mol/L),pH 5.6~5.7。在酶解的不同时间进行原生质体产量的检测,确定原生质体分离的最佳酶解时间和酶混合液的浓度,并研究甘露醇浓度对原生质体产量的影响。将酶解后的混合物依次通过 74、37、25 μ m 的不锈钢筛网过滤,除去细胞碎片和大的细胞团。滤液 50×g 离心 5 min,沉淀用洗涤液重新悬浮,50×g 离心 5 min,如此重复洗涤 2 次。原生质体洗涤液组成为酶溶解液+5 mmol/L MES (2-N-morpholino ethanesulfonic acid),pH 5.7。

表 1 用于红姜花原生质体分离的酶组合

Table 1 Enzyme composition used for protoplast isolation of

<i>Hedychium coccineum</i> g/100mL			
酶组合	纤维素酶	离析酶	果胶酶
Enzyme composition	Cellulase R-10	Macerozyme R-10	Pectolyase Y-23
A	3.0	2.0	0.10
B	3.0	2.0	0.25
C	4.0	1.0	0.15

1.2.4 原生质体的培养 液体浅层培养系统:将原生质体用原生质体培养基悬浮,调整密度到 1×10^5 个/mL,加 2 mL 于直径 6 cm 培养皿,用 Parafilm 密封,刚开始

1~2 d 经常轻轻摇动,避免分布不均匀并帮助通气。看护培养系统:参考 Xiao 等^[6]的方法进行,将红姜花 ECS 用 200 μ m 的金属筛过滤,获得小的细胞团,与 100 mL 双倍浓度看护培养基混合,调整细胞浓度为 20%。将 1.2 g 琼脂糖溶解于 100 mL 蒸馏水,调 pH 5.7,121℃下灭菌 15 min。当琼脂糖溶液温度下降到 30~35℃时,轻轻混入含有 20%看护细胞的 100 mL 双倍看护培养基。将 20 mL 的上述混合液倒入直径为 9.5 cm 的培养皿,在培养基上覆盖一层混合纤维素滤膜。将红姜花原生质体用培养基悬浮,调整密度到 1×10^5 个/mL,取 1 mL 转移到混合纤维素滤膜上,在 27℃黑暗中培养。双倍看护培养基的组成为双倍悬浮培养基+2.8 mmol/L 葡萄糖+116 mmol/L 蔗糖+278 mmol/L 麦芽糖,pH 5.7,过滤灭菌;原生质体培养基的组成为悬浮培养基+0.5 mmol/L MES+0.4 mol/L 葡萄糖,pH 5.7,过滤灭菌。培养 14 d 时计算原生质体分裂频率,培养 28 d 时计算原生质体细胞团形成率。原生质体分裂频率(%)=分裂一次或以上的原生质体数/原生质体接种总数 $\times 100\%$,细胞团形成率(%)=含 6 个以上细胞的细胞团/原生质体接种总数 $\times 100\%$ 。

1.3 数据分析

所有试验均重复 3 次,所得数据采用均数±标准差表示。采用邓肯氏多重分析法进行显著性差异分析,最小显著性差异在 5%水平上显示。

2 结果与分析

2.1 红姜花胚性悬浮细胞系的建立

由表 2 可知,在组合 1 的培养基中,随着 6-BA 浓度增加,细胞增殖量增加,增殖不显著,但镜检时细胞状态良好,处于胚性状态;在组合 2 的培养基中,用不同浓度 TDZ 代替 6-BA,细胞增殖迅速,且随着 TDZ 浓度增加而增加,但非胚性细胞的比例也逐渐增加;在组合 3 的培养基中,选择 TDZ 浓度为 0.02 mg/L,添加不同浓度的 NAA,随着 NAA 浓度增高,细胞增殖量增加,但非胚性状态细胞比例也增加;组合 4 的培养基中,采用低浓度的 TDZ 添加不同浓度的 2,4-D,细胞状态良好,但随着 2,4-D 浓度增加,细胞增殖倍数下降。

从表 2 数据和细胞状态分析,低浓度的 TDZ 和 NAA 对维持细胞的分裂增殖是必需的,2,4-D 对维持细胞胚性状态起着重要的作用。当植物生长调节剂组合为 0.5~1.0 mg/L 2,4-D+0.02 mg/L NAA+0.02 mg/L TDZ 时,有利于红姜花细胞的悬浮培养,并可持续进行稳定增殖。

2.2 红姜花原生质体分离

由表 1 和表 3 可知,酶组合对原生质体产量影响较大,果胶酶和离析酶含量较高时,原生质体产量较高,仅仅是含有高浓度的纤维素酶时,则作用不明显。

在酶组合 B 中,悬浮细胞经过 4 h 酶解,开始有大量原生质体产生。原生质体内含物丰富,胚性状态良好,产量达到 1.32×10^5 个/mL PCV 细胞,但有大量的

非胚性不规则细胞不能被酶解。酶解 7 h 后,原生质体数量最高 2.25×10^5 个/mL PCV 细胞。随着酶解时间的延长,原生质体开始出现破裂现象,产量不再增加。

表 2 植物生长调节剂组合对细胞悬浮培养的影响

Table 2 Compositions of plant growth regulators on culture of cell suspensions					
	2,4-D /(mg · L ⁻¹)	NAA /(mg · L ⁻¹)	6-BA /(mg · L ⁻¹)	TDZ /(mg · L ⁻¹)	增殖倍数 Proliferation times
组合 1 Composition 1	1.0	0.20	0		1.9±0.78 a
	1.0	0.20	0.25		2.1±0.82 a
	1.0	0.20	0.50		2.4±0.55 ab
	1.0	0.20	1.00		2.7±0.73 b
组合 2 Composition 2	1.0	0.20		0.01	5.8±0.42 a
	1.0	0.20		0.02	6.8±0.64 b
	1.0	0.20		0.04	6.4±0.89 ab
	1.0	0.20		0.08	6.3±0.87 ab
组合 3 Composition 3	1.0	0.02		0.02	4.2±0.99 a
	1.0	0.04		0.02	4.8±0.80 ab
	1.0	0.08		0.02	5.7±0.84 bc
	1.0	0.16		0.02	6.9±0.79 c
组合 4 Composition 4	0	0.02		0.02	6.9±0.95 c
	0.5	0.02		0.02	5.5±1.64 bc
	1.0	0.02		0.02	4.1±1.01 ab
	1.5	0.02		0.02	2.6±0.56 a

表 3 酶组合对原生质体产量的影响

Table 3 Effect of enzyme composition on protoplast yield of <i>Hedychium coccineum</i>	
酶组合 Enzyme composition	原生质体产量 Protoplast yield/(10 ⁵ · mL ⁻¹ PCV ECS)
A	1.79 ± 0.47 b
B	2.25 ± 0.61 a
C	1.51 ± 0.55 b

由图 1 可知,添加不同浓度的甘露醇可以起到保护原生质体的作用,当甘露醇浓度为 0.14 mol/L 时,原生质体产量最高,达到 2.25×10^5 个/mL PCV ECS。刚分离的原生质体球形,细胞质浓厚,内含物丰富。细胞直径大小不一,从 10~15 μm 不等(图 2A)。

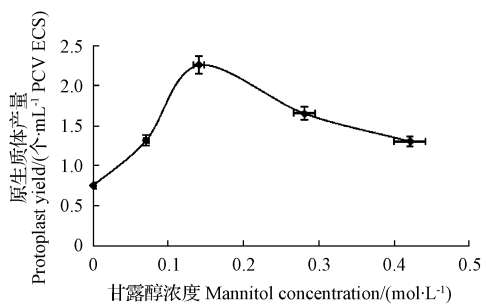


图 1 甘露醇浓度对红姜花原生质体产量的影响
Fig.1 Effect of mannitol concentrations on protoplast yield of *Hedychium coccineum*

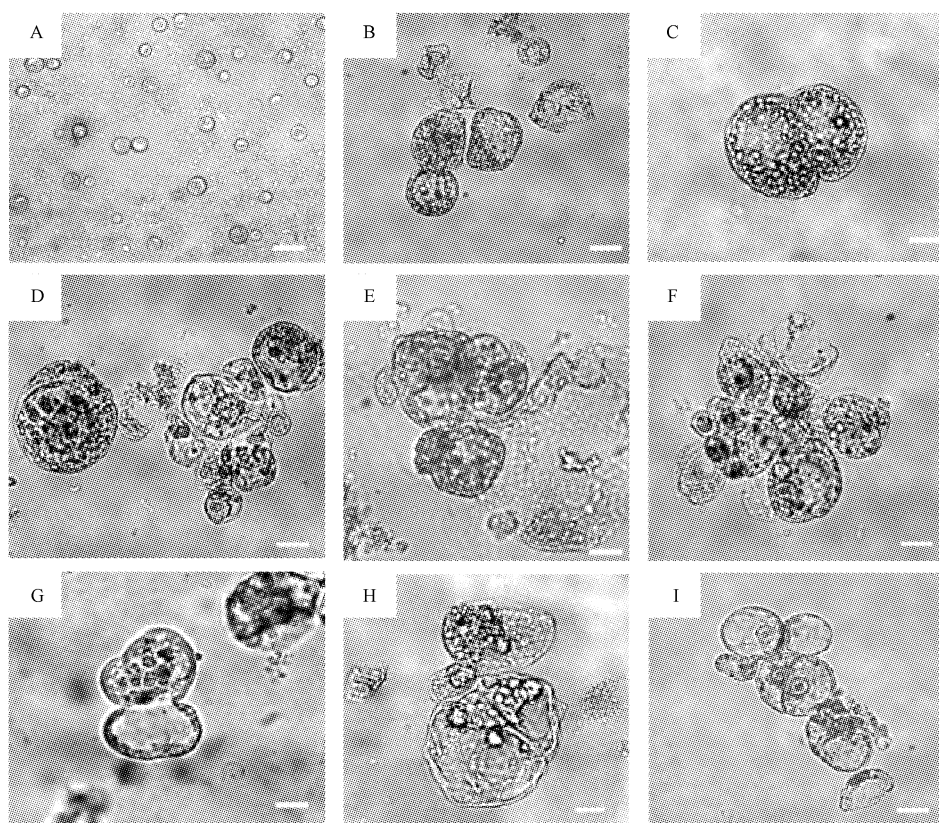
表 4 培养方法对红姜花原生质体分裂频率和细胞团形成频率的影响

Table 4 Effect of culture method on cell division and colony formation of cultured protoplasts of <i>Hedychium coccineum</i>		
培养方法 Culture method	分裂频率(培养 14 d 时) Frequency of cell division (after cultured 14 days)	细胞团形成频率(培养 28 d 时) Frequency of cell cluster formation(after cultured 28 days)
看护培养	12.3 ± 2.26a	4.2 ± 0.77 b
液体浅层培养	10.6 ± 1.64a	0.8 ± 0.17 a

2.3 原生质体的培养

在液体浅层培养系统中,培养 6~7 d 后,一些原生质体开始膨大,由圆形变为椭圆形;培养 10 d 左右,原生质体出现第 1 次分裂(图 2G);继续培养 20~25 d 后,可见到 4~6 个细胞组成的小细胞团(图 2I)。14 d 时细胞分裂频率达到 10.6%;培养 28 d 左右时,细胞团形成率达到 0.8%。但是从液体培养中获得的细胞团中空,内含物少,无明显的胚性特征(图 2H),这些细胞团不能进一步发育。

原生质体在看护培养系统中,经过 4~5 d 的培养,原生质体变形,形成椭圆形的细胞,细胞质浓厚,内含物丰富,具有典型的胚性细胞特征(图 2B)。经过 7 d 左右的培养,变形的原生质体细胞开始第一次分裂(图 2C)。15 d 后,分裂形成 8~10 细胞组成的细胞团(图 2E)。经过 20 d 的培养,成为肉眼可见的细胞团(图 2F)。45 d 时可见大量的肉眼可见的细胞团。由于胚性细胞分裂是不同步的,因此在同一时期既可看到单个的胚性细胞,又可见到二细胞、三细胞和四细胞以致多细胞的细胞团(图 2D)。通过看护培养获得的细胞团,细胞质浓厚,球形,具有典型的胚性细胞特征(图 2B-F)。经过 14 d 的培养,细胞分裂频率达 12.3%;经过 28 d 左右的培养,细胞团形成率达 4.2%(表 4)。但所形成的细胞团转移到体胚诱导培养基中,没有进一步发育。



注: A. 刚分离的原生质体, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; B. 恢复细胞壁生长、变形的原生质体, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; C. 看护培养上的原生质体第一次细胞分裂, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; D. 小细胞团, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; E. 7~8 细胞的细胞团, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; F. 大细胞团, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; G. 液体培养的原生质体细胞第一次分裂, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; H. 液体培养时形成的 3~4 细胞团, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; I. 液体培养时形成的小细胞团, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$ 。

Note: A. Protoplast isolated freshly, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; B. Deformed protoplast with cell wall on feeder layer culture, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; C. The first division of the protoplast on feeder layer culture, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; D. Small cell colonies on feeder layer culture, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; E. Cell colonies consisted of 7-8 cells on feeder layer culture, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; F. Cell colonies on feeder layer culture, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$; G. The first division of the protoplast in liquid culture, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; H. Cell colonies with 3-4 cells in liquid culture, $\text{bar}=20\ \mu\text{m}$; I. Small cell colonies in liquid culture, $\text{bar}=40\ \mu\text{m}$ 。

图 2 原生质体培养形成细胞团的过程

Fig. 2 Procedure of cell colonies formation of protoplast

3 讨论

在将愈伤组织进行悬浮培养的过程中,植物生长调节剂对细胞的增殖及细胞状态有很大的影响。2,4-D 对维持细胞的胚性起着重要的作用,但 2,4-D 浓度过高时,抑制细胞的分裂;低浓度的 NAA 和 TDZ 对维持细胞的分裂起着重要的作用,NAA 和 TDZ 浓度高时,细胞增殖迅速,但细胞容易转变为非胚性状态。

酶组成对原生质体产量的影响较大,高含量的离析酶和果胶酶对原生质体产量有促进作用,而高纤维素酶的作用不明显,可能与细胞壁的组成有关。可能是离体情况下,细胞壁含有更高含量的果胶等物质,对离体细胞起到保护和固定作用。

甘露醇是一种代谢性的可吸收的糖醇,在植物的原生质体分离研究中常被用作渗透调节剂使用^[7-8]。在该试验中,进行红姜花原生质体分离时,酶液中甘露醇的

浓度为 $0.14\ \text{mol/L}$ 可获得最高产量的原生质体,可能与此浓度的甘露醇维持原生质体轻微的质壁分离状态有关。但是进一步提高甘露醇则引起原生质体过度收缩而死亡。

通过液体培养所获得的细胞团细胞大,具有大液泡,不能继续发育,呈现典型的非胚性特征;通过看护培养获得的细胞团表现为明显的胚性状态,这种现象与 Xiao 等^[6]研究的香蕉原生质体培养过程中发现的现象非常相似。故推测可能是看护细胞通过分泌某种物质保持原生质体的胚性状态而起作用。这种设想在一些报道中得到证实,例如从胡萝卜胚性悬浮细胞中分泌的阿拉伯半乳糖蛋白 (AGPs) 可以促进胡萝卜非胚性悬浮细胞向胚性状态转化^[9]; Egertsdotter 等^[10]将从胡萝卜种子中提取的 AGPs 加到挪威云杉的悬浮细胞培养基中,可以促进挪威云杉的体胚发育; Letarte 等^[11]在进行小麦小孢子培养研究中发现,阿拉伯树胶中的 AGPs

具有取代子房共培养的作用。该研究中,红姜花胚性悬浮细胞进行原生质体分离时,可能由于脱壁,导致存在于细胞壁中的维持细胞胚性状态的信号物质丧失,因此在液体状态下,细胞虽然可以分裂形成细胞团,但是所形成的细胞团为非胚性状态,不能继续发育;在看护培养状态下,由胚性看护细胞分泌的这种维持细胞胚性状态所必需的信号物质可以维持原生质体的胚性状态,进一步形成具有胚性的细胞团。但所获得的细胞团没有进一步的发育,可能与原生质体培养基的组成还需要进一步优化有关。

参考文献

- [1] 高江云,盛春玲,杨淑霞.红姜花(姜科)同步大量开花的适应意义[J].生物多样性,2012,20(3):376-385.
- [2] 涂红艳,肖望,邓崇会.红姜花体细胞胚胎发生及植株再生的研究[J].园艺学报,2014,41(10):2139-2146.
- [3] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiology Plantarum, 1962, 5: 473-497.
- [4] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research, 1968, 50: 151-

158.

- [5] 李浚明.植物组织培养教程[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2002:59-102.
- [6] Xiao W, Huang X L, Huang X, et al. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2007, 90: 191-200.
- [7] Patnaik G, Wilson D, Cooking E C. Importance of enzyme purification for increased plating efficiency and plant regeneration from single protoplasts of *Petunia parodii*. Z[J]. Pflanzenphysiol, 1981, 102: 199-205.
- [8] Tegeder M, Gebhardt D, Schieder O, et al. Thidiazuron induced plant regeneration from protoplast of *Vicia faba* cv. Mythos[J]. Plant Cell Reports, 1995, 15: 164-169.
- [9] Kreuger M, Van Holst J G. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L [J]. Planta, 1993, 189: 243-248.
- [10] Egertsdotter U, Von Arnold S. Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) [J]. Physiology Plantarum, 1995, 93: 334-345.
- [11] Letarte J, Simion E, Miner M, et al. Arabinogalactans and arabinogalactan-protein induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture[J]. Plant Cell Reports, 2006, 24: 691-698.

Establishment of Embryogenic Cell Suspension and Protoplast Culture of *Hedychium coccineum*

XIAO Wang, TU Hong-yan, DENG Chong-hui

(Department of Biology, Guangdong University of Education, Guangzhou, Guangdong 510303)

Abstract: Embryogenic cell suspensions were established for the ornamental ginger *Hedychium coccineum* using filaments and anthers. Embryogenic induction, cell suspension culture system establishment and protoplast culture of *Hedychium coccineum* were studied. The results showed that, after culture for 120 days, calli were induced on induced medium (Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 4 mg/L 2,4-D+4 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+30 g/L sucrose+7 g/L agar). The calli were then transferred on proliferated medium (MS basal medium+1 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L NAA+0.25 mg/L 6-BA) and light yellow and friable embryogenic callus were obtained. These embryogenic callus were suspended in liquid medium, and after 3 months culture, a homogeneous and stable embryogenic cell suspension (ECS), composed of small cell aggregates, was established. Viable protoplasts were isolated from ECS in an enzyme mixture of 3.0% (w/v) cellulose R-10, 2% (w/v) macerozyme R-10 and 0.25% (w/v) pectinase Y-23 for 7 hours, enzyme solution with 0.14 mol/L mannitol resulted in the highest yield of 2.25×10^5 protoplasts per mL PCV ECS. Feeder layer culture systems were used for protoplast culture. Frequency of cell division at 14 days and colony formation at 28 days were 12.3% and 4.2% respectively. However, all protoplast-derived cell colonies could not develop further.

Keywords: *Hedychium coccineum*; embryogenic cell suspensions; protoplast