

火炬松胚性细胞悬浮培养物的生长参数变化

唐巍 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

郭仲琛

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 以火炬松 (*Pinus taeda* L.) 成熟合子胚来源的胚性愈伤组织为材料建立了胚性细胞悬浮系, 测定了其培养物的鲜重、干重、细胞体积和胚数及培养液中的 pH 值、电导率和蔗糖浓度等生长参数在培养过程中的变化动态。结果表明, 在培养周期内, 培养液中的 pH 值、电导率和蔗糖浓度的逐步降低与培养物的鲜重、干重、细胞体积和胚胎数的逐步增加保持一致性。在培养至 18-21 d, pH 值、电导率和蔗糖浓度均接近或降到最低点, 而胚数及细胞体积的增长都达到最高点。

关键词 火炬松; 胚性细胞悬浮系; 生长参数

分类号 Q944.6

CHANGES IN GROWTH PARAMETERS OF EMBRYOGENIC CELL SUSPENSION CULTURES OF LOBLOLLY PINE (*PINUS TAEDA*)

Tang Wei Ouyang Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Academia Sinica, Beijing 100080)

Guo Zhongchen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093)

Abstract Embryogenic calli derived from mature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) of three genotypes from Hunan Province, viz. Shaoyanghigh-2, Yongshunmiddle-1 and Yongshunmiddle-3 were used in embryogenic cell suspension culture. Parameters in the growth of cultures, including fresh weight, dry weight, packed cell volume, somatic embryo number, as well as pH, conductivity, and sucrose concentration of the culture medium were measured during culture period. The results showed that, during culture circle, the decrease in pH, conductivity, and sucrose concentration in the medium was shown to be related to the increase of fresh and dry masses, packed cell volume, and somatic embryo number of cultures. pH, conductivity, and sucrose concentration at the 18th to 21st days of culture were at lowest level, while embryo number and packed cell volume were at highest.

Key words *Pinus taeda*; Embryogenic cell suspension culture; Growth parameter

测定已建立的胚性细胞悬浮系的生长动态,掌握其生长和分化的基本规律,可以为体细胞胚的大规模生物反应器生产、体细胞胚的分化和发育、遗传转化、基因克隆和表达、环境胁迫和植物激素生理学等研究提供依据^[1-3]。火炬松(*Pinus taeda* L.)是世界南方松中最重要的绿化和造林用速生针叶树种,其体细胞胚胎发生的研究已有报道^[1-4],但胚性细胞悬浮系的建立及其生长特性的研究在国内外尚未见报道。本文在建立火炬松的胚性细胞悬浮系的基础上^[5],测定了其HB, MA和MC 3个基因型胚性细胞悬浮培养物在培养周期内的几个重要生长参数的变化动态,优化了胚性细胞悬浮培养物的培养条件,为研究悬浮条件下火炬松体细胞胚胎发生的变化规律及体细胞胚的大规模生物反应器生产奠定了基础。

1 材料和方法

火炬松材料为邵阳2号(HB)、永顺1号(MA)和永顺3号(MC),前者来源于湖南邵阳市林业科学研究所,后者由张家界市永顺县青田坪农场提供。

胚性愈伤组织的诱导、保持和增殖 以HB、MA和MC三个基因型火炬松的成熟合子胚为外植体,在附加 8 mg L^{-1} 2,4-D, 4 mg L^{-1} BA, 400 mg L^{-1} CH和 400 mg L^{-1} 谷氨酰胺的DCR培养基^[6]上诱导愈伤组织。待愈伤组织形成后,挑选其中的白色、半透明、有光泽的粘性胚性愈伤组织转移到附加 2 mg L^{-1} 2,4-D, 1 mg L^{-1} BA, 400 mg L^{-1} CH和 400 mg L^{-1} 谷氨酰胺的DCR培养基上进行愈伤组织的保持和增殖。

胚性细胞悬浮系的建立 胚性细胞悬浮系的建立参照Hakman等^[6]的方法,将增殖产生的胚性愈伤组织接种于附加 1 mg L^{-1} 2,4-D, 0.1 mg L^{-1} IBA, 0.5 mg L^{-1} BA, 500 mg L^{-1} CH, 500 mg L^{-1} 谷氨酰胺和 500 mg L^{-1} 火炬松种子胚乳粉的DCR液体培养基中,培养早期每天用100目不锈钢筛过滤1次,以获得均一的细胞悬浮培养物。培养物在往复式摇床上培养,转速为120 rpm。所有培养均在黑暗条件下进行,培养基中的蔗糖浓度为 30 g L^{-1} , pH5.8。固体培养基中的琼脂浓度为 6.5 g L^{-1} , 培养温度 $23\pm 1^\circ\text{C}$, 悬浮培养物中胚性愈伤组织接种量为 25 g L^{-1} 。

生长参数的测定 悬浮培养物的鲜重、干重及胚数等测定参照Dong等^[7]的方法。细胞密度和细胞体积的测定参照Davis等^[8]的方法。pH值和蔗糖浓度的测定参照Lulsdorf等^[9]的方法。电导率的测定参照Hahlbrock等^[10]的方法,用DDS-11A型电导率仪测定,配套电极为DJS-10型铂黑电极。pH值、电导率和蔗糖浓度试验中的培养液用 $45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。所有实验均重复3次,最后对实验结果进行统计分析。

2 结果

2.1 鲜重、干重、细胞体积和胚数的变化动态

在建立火炬松基因型HB、MA和MC的胚性细胞悬浮系后,测定了其鲜重、干重、细胞体积和胚数等生长参数在培养过程中的变化动态。结果表明,在27 d的培养周期内,三种基因型胚性悬浮培养物的鲜重增长高峰在12-15 d(MA是12 d, HB和MC是15 d)(图1)。干重增长高峰在15-18 d(MA是15 d, HB是18 d, MC是15 d)(图2)。MA和HB的干重增长高峰和鲜重增长高峰不同,MC的干重增长高峰和鲜重增长高峰相同。细胞体

积(每 10 ml 细胞悬浮液中悬浮细胞所占的体积) 增长高峰在 18-21 d (MA 和 HB 是 18 d, MC 是 21 d) (图 3)。MA 的细胞体积增长高峰落后于其干重增长高峰 3 d, HB 的细胞体积增长高峰和干重增长高峰相同, MC 的细胞体积增长高峰落后于干重增长高峰 6 d。MA 和 MC 的细胞体积增长高峰均落后于其鲜重增长高峰 6 d, HB 的细胞体积增长高峰落后于其鲜重增长高峰 3 d。胚数(每毫升培养物中的早期体细胞胚数) 增长高峰在第 18-21 天 (MA 是 18 d, HB 是 21 d, MC 是 18 d) (图 4)。MA 的胚数增长高峰与其细胞体积增长高峰相同。MC 的胚数增长高峰介于其干重增长高峰和细胞体积增长高峰之间。

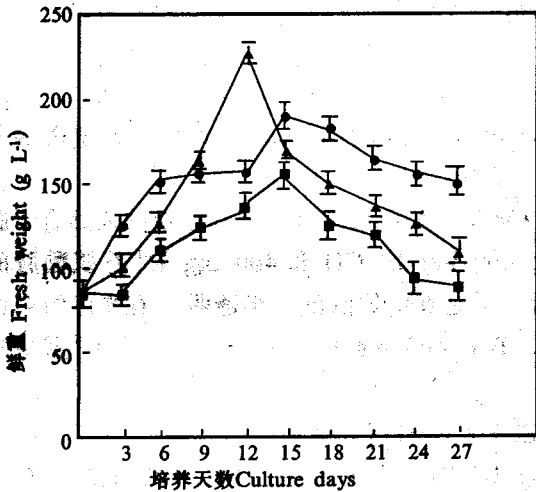


图 1 火炬松胚性悬浮培养物在培养周期内的鲜重变化
Fig. 1 Changes in fresh weight of embryogenic suspension cultures of loblolly pine during culture period

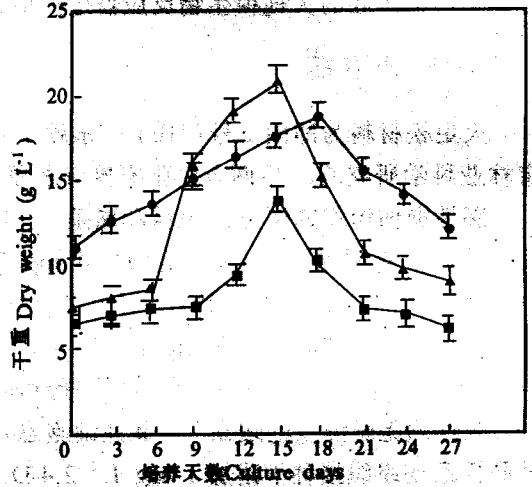


图 2 火炬松胚性悬浮培养物在培养周期内的干重变化
Fig. 2 Changes in dry weight of embryogenic suspension cultures of loblolly pine during culture period

● HB=Shaoyanghigh-2; ■ MC=Yongshunmiddle-3; ▲ MA=Yongshunmiddle-1

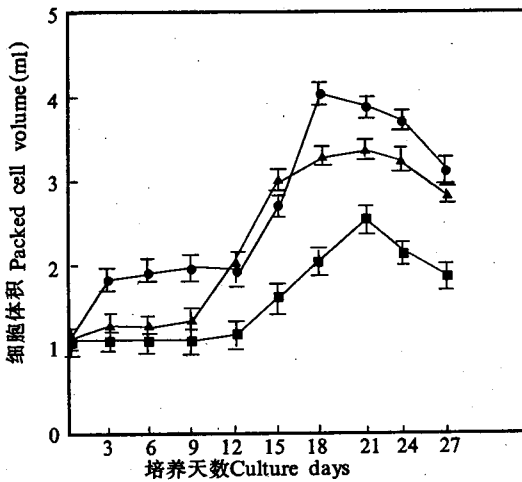


图 3 火炬松胚性悬浮培养物在培养周期内的细胞体积变化
Fig. 3 Changes in packed cell volumes of embryogenic suspension cultures of loblolly pine during culture period

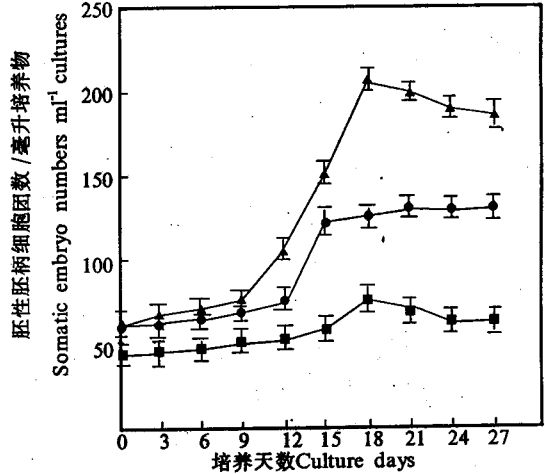


图 4 火炬松胚性悬浮培养物在培养周期内的胚性胚柄细胞团数变化
Fig. 4 Changes in somatic embryo number from embryogenic suspension cultures of loblolly pine during culture period

● HB= Shaoyanghigh-2; ■ MC=Yongshunmiddle-3; ▲ MA=Yongshunmiddle-1

2.2 pH值、电导率和蔗糖浓度的变化

在测定HB、MA和MC三个基因型胚性悬浮培养物的鲜重、干重、细胞体积和胚数的同时,分别测定了其培养液中的pH值、电导率和蔗糖浓度。结果表明,在27d的培养周期内,3种基因型胚性培养物的pH值在3d内出现第1次较大幅度的下降,在21-27d,3种基因型胚性培养物的pH值均呈直线下降,27d时降到3.8-4.4之间(MA是4.1,HB是4.4,MC是3.8)。电导率在18d内有较大幅度的下降,但在6d内的下降幅度最大。在21-27d,3种基因型胚性悬浮培养物的电导率变化趋于平稳,27d时,HB、MA和MC培养物的电导率介于 $0.45-0.75 \times 10^4$ 之间(MA是 0.55×10^4 ,HB是 0.75×10^4 ,MC是 0.45×10^4)。蔗糖浓度在18d内下降幅度较大,MA和HB几乎呈直线下降,MC在3-9d有一个平缓期。在21-27d,3种基因型胚性培养物的蔗糖浓度变化趋于平稳,27d时,HB、MA和MC的蔗糖浓度介于 $9-13.5 \text{ g L}^{-1}$ 之间(MA是 12.5 g L^{-1} ,HB是 13.5 g L^{-1} ,MC是 9 g L^{-1})。从生长参数的测定结果看,在培养周期内,HB、MA和MC三种基因型胚性培养物的培养液中pH值、电导率和蔗糖浓度逐步下降的变化动态与培养物本身的鲜重、干重、细胞体积和胚数逐步增加的变化趋势表现出一定的相关性。胚性培养物对培养液中矿质离子和碳源的利用高峰与培养物本身的生长高峰相吻合。

3 讨论

鲜重、干重、细胞体积、胚数、pH值、电导率、蔗糖利用率等是监测胚性细胞悬浮系的生长状况、分化程度和代谢活动的重要生长参数^[10-12]。尽管不同基因型间同一生长参数的变化动态有一定差异,但所测定的火炬松胚性细胞悬浮系中,直接反映培养物本身的生长和分化状况的鲜重、干重、细胞体积和胚数等生长参数的总的变化有其规律:鲜重增长高峰在培养的12-15d,干重增长高峰在15-18d,细胞体积增长高峰与胚数增长高峰相同,在18-21d。这一规律性变化,反映了培养周期内胚性培养物对培养基中养分的吸收和利用情况。水分、矿质离子、糖和含氮养分的吸收和积累,尤其是细胞内含水的增加,导致鲜重增长高峰的出现;小分子物质的同化,构成细胞结构成分的大分子物质的大量合成及细胞内淀粉等贮存养分的积累导致干重增长高峰的出现;细胞内干物质的大量积累为胚性细胞的增殖分化及体细胞胚的形成提供了物质基础,导致胚数增长高峰的出现,随着培养时间的延长及培养物生长量的增加,培养液中有毒代谢产物增多,有效养分减少,细胞得不到充足养分,部分细胞老化或液泡化,导致细胞体积增长高峰的出现。早期体细胞胚的胚柄细胞的伸长和高度液泡化可能是细胞体积增长高峰与胚数增大高峰相同的一个原因^[13]。pH值、电导率和蔗糖浓度的变化与细胞体积和胚数的变化呈负相关,它说明培养物的增长是建立在培养基中养分消耗基础之上的。培养后培养液中养分的大量消耗导致细胞生长的停滞,部分细胞的老化、损伤、破碎和细胞内含物的释放导致了后期电导率的微小回升。

参考文献

- 1 Attree S M, Fowke L C. Embryogeny of gymnosperms. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 35:1-35
- 2 唐巍, 杨映根, 桂耀林等. 松柏类植物体细胞胚胎发生的研究与应用. *植物学通报*, 1996, 3(1):25-31

- 3 Becwar M R, Nagmani R, Wann S R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine. *Can J Bot*, 1990, 20:810-817
- 4 Gupta P K, Durzan D. Somatic embryogenesis from callus of mature sugar embryos. *J Bio Technology*, 1986, 4: 643-653
- 5 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛. 火炬松细胞悬浮培养体细胞胚胎发生的研究. *西北植物学报*, 1996, 16(4):399-402
- 6 Hakman I, Fowke L C. Somatic embryogenesis in black spruce and white spruce. *Can J Bot*, 1987, 65:656-659
- 7 Dong D Z, Dunstan D I. Growth parameters, protein and DNA synthesis of a embryogenic suspension culture of white spruce. *J Plant Physiol*, 1994, 144:201-208
- 8 Davis D G, Stolzenberg J A, Dusky J. A comparison of various growth parameters of cell suspension cultures to determine phytotoxicity of xenobiotic. *Weed Sci*, 1984, 32:235-242
- 9 Lulsdorf M M, Tautorus T E, Kikcio S I. Germination of encapsulated embryos of interior spruce and black spruce. *Plant Cell Rep*, 1992, 12:385-389
- 10 Hahlbrock K, Kuhlen E. Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium. *Planta*, 1972, 108:271-278
- 11 Laine E, David A. Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplast of *Pinus caribaea*. *Plant Sci*, 1990, 69:215-224
- 12 Webb D T, Webster F, Flinn B S. Factors influencing the induction of embryogenic and caulogenic callus from embryos of *Picea glauca* and *Picea engelmannii*. *Can J For Res*, 1989, 19:1303-1308
- 13 Tautorus T E, Fowke L C, Dunstan D I. Somatic embryogenesis in conifer. *Can J Bot*, 1991, 69:1873-1899