

DOI: 10.3724/SP.J.1008.2010.00909

· 短篇论著 ·

胀果甘草胚性愈伤组织的诱导研究

Study on embryogenic callus induction of *Glycyrrhiza inflata* Bat.

雷 呈^{1*}, 李 斐²

1. 河南省南阳医学高等专科学校基础医学部, 南阳 473000

2. 河南省南阳医学高等专科学校临床医学系, 南阳 473000

[摘要] 目的 诱导和筛选胀果甘草胚性愈伤组织, 以获得高产细胞株。方法 以胀果甘草为材料, 从外植体、激素等因素研究和分析愈伤组织诱导、胚性愈伤组织的发生过程, 用半薄切片对胚性愈伤组织形态和结构作进一步分析。结果 适宜的外植体是下胚轴; 筛选出胀果甘草细胞生长的适宜培养基。愈伤组织诱导培养基: 植物组织培养的基本培养基(MS) + 6-苄基腺嘌呤(6-BA) 2.0 mg/L + 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 0.5 mg/L; 胚性愈伤诱导培养基: MS + 6-BA 0.5 mg/L + 激动素(KT) 0.5 mg/L + 吲哚丁酸(IBA) 0.1 mg/L; 半薄切片结果, 胚性愈伤组织的细胞为圆形或椭圆形, 核大, 质浓、染色深。结论 在适宜培养基中培养, 胀果甘草胚性愈伤组织生长和发育良好, 为进一步筛选甘草高产细胞株、甘草的大规模生产次生代谢产物、基因工程和人工制种奠定了基础。

[关键词] 胀果甘草; 胚性愈伤组织; 培养技术

[中图分类号] R 282.2

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)08-0909-03

甘草属于豆科(*Leguminosae*) 甘草属(*Glycyrrhiza*) 多年生草本植物, 其中含有很多次级代谢产物, 其主要有效成分为甘草酸、甘草次酸、黄酮类化合物等生物活性物质, 具有补脾益气、清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和诸药之功效^[1], 是药物的天然宝库。

胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.) 是药典记载的正品甘草之一。目前大多数国内学者的研究集中在对胀果甘草的原始材料分离提取、纯化和活性成分药理实验^[2], 但由于自然资源缺乏, 进行大规模生产已不可能。利用甘草细胞培养物代替野生甘草来生产药物, 成为甘草应用的主流之一。在细胞培养中, 筛选或诱发次生代谢产物高的体细胞突变系进而培养成高产细胞株, 是提高细胞培养物的有效途径。胚性愈伤组织的细胞分化能力强, 从其中可以筛选出高产细胞株, 为细胞大规模生产次生代谢物、甘草的基因工程和人工制种具有重要意义。

有关胀果甘草愈伤组织诱导、悬浮细胞培养等研究已有一些文献报道^[3-5], 但对胀果甘草胚性愈伤组织的形成及其胚状体产生的研究还未见报道。本研究以胀果甘草为材料, 对胚性愈伤组织形成和发生的影响因素进行分析, 旨在获得高质量、稳定并具有再生能力的胚性愈伤组织, 为进一步筛选甘草高产细胞株、甘草的大规模生产次生代谢产物、基因工程和人工种子制备奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.) 由新疆昆神公司提供。

1.2 无菌外植体的获得 取胀果甘草种子约200粒, 置于

烧杯中, 先用98%浓硫酸处理30~40 min, 无菌水冲洗至少5次, 然后用1%升汞消毒8~10 min, 无菌水清洗3次, 每次3~5 min, 消毒后接种于植物组织培养的基本培养基(MS)上(琼脂浓度0.8%) 黑暗培养。待苗长到4~5 cm时, 转到光下培养, 3 d后分别取其子叶、下胚轴(切成0.5 cm左右切段) 以及下胚轴再生的试管苗幼嫩茎段、试管苗幼叶进行实验。

1.3 外植体对愈伤诱导率及愈伤组织质量的影响 采用胀果甘草不同的外植体(下胚轴、子叶、试管苗幼叶、幼嫩茎段) 接种在MS1 [MS + 6-苄基腺嘌呤(6-BA) 2.0 mg/L + 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 0.5 mg/L] 和MS2 [MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + 萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L] 培养基上(琼脂浓度0.8%), 每种外植体处理3瓶(250 ml三角瓶), 每瓶80 ml培养基, 每瓶接种15个外植体, 横放, 黑暗培养。约30 d后统计出愈率和观察愈伤组织的质量。出愈率: 在接种一定时间后, 以发生愈伤组织的外植体数和接种数的比值表示。愈伤组织生长量: 对愈伤组织称量, 计算增长倍数。

1.4 不同激素组合对愈伤诱导率及愈伤质量的影响 取下胚轴0.5 cm左右切段, 每种处理3瓶(250 ml三角瓶), 每瓶80 ml培养基, 每瓶接种15个下胚轴, 横放, 黑暗培养。30 d后统计外植体的出愈率和观察愈伤组织的质量。处理1: MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L; 处理2: MS + 6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L; 处理3: MS + 6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L; 处理4: MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L; 处理5: MS + 6-BA 0.5 mg/L + 激动素(KT) 0.5 mg/L + 吲哚丁酸(IBA) 0.1 mg/L。

[收稿日期] 2010-04-14

[接受日期] 2010-05-26

[作者简介] 雷 呈, 硕士, 讲师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0377-63526183, E-mail: leich0504@sina.com

1.5 激素对胚性愈伤组织分化和生长的影响 称取7g诱导的愈伤组织,接种在分化培养基中,共4个处理(不加激素的MS培养基为对照),每种处理接种3瓶(250ml三角瓶),每瓶接种7g,约30d后统计生长量、观察愈伤组织的质量、胚性细胞分化和褐化情况。处理1:MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.5mg/L+2,4-D 0.5mg/L;处理2:MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L+2,4-D 0.2mg/L;处理3:MS+6-BA 0.5mg/L+KT 0.5mg/L+IBA 0.1mg/L;处理4:MS。胚性细胞分化程度:根据郝玉金^[6]转绿指数进行统计。

1.6 胚性愈伤组织发生的解剖学研究 取胚性愈伤组织作半薄切片,参照武昕等^[7]的方法并稍作改动。用FAA固定,梯度乙醇脱水,用Epon812包埋和Technovit 8100包埋,将包埋小块在Leica半薄切片机上切片,甲苯胺蓝-O染色,在IPP 5.0软件和奥林巴斯BX61显微镜下观察及处理图片。

2 结果

2.1 不同外植体对愈伤诱导率及愈伤组织质量的影响 结果表明,外植体类型对出愈率有很大影响(图1),在MS1培养基上接种的外植体,出愈率为45.3%~99.5%,而MS2培养基上为40.2%~92.5%。无论是MS1还是MS2培养基,

都以下胚轴最高,幼嫩茎段最低;MS1诱导愈伤的能力相对较强。

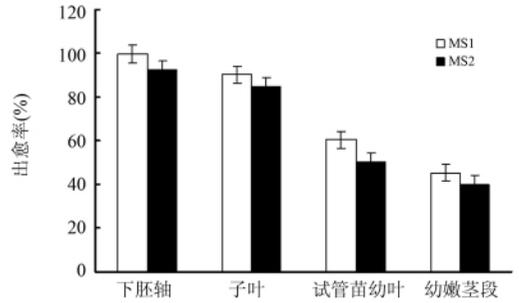


图1 外植体对愈伤组织发生的影响

$n = 45 \bar{x} \pm s$

不同外植体获得的愈伤质量差异极大。下胚轴诱导的愈伤外表淡黄色,抗褐化能力及持续分裂能力强,再分化培养易转绿,质量最好(图2A);其次是子叶愈伤,能获得少量转绿愈伤,褐化较轻;幼叶诱导的愈伤,再分化培养时不易转绿;幼嫩茎段诱导的愈伤质地坚硬,黄色中掺有白点(系较差的愈伤),易褐化。



图2 胀果甘草愈伤组织

A: 下胚轴诱导的愈伤组织; B: 继代培养后的下胚轴胚性愈伤组织; C: 下胚轴胚性愈伤的分化图; D: 胚状体; E: 光学显微镜下观察下胚轴胚性愈伤的分化(Original magnification: $\times 100$)

2.2 激素对诱导下胚轴愈伤组织的作用 实验表明,处理2:6-BA 2.0mg/L+2,4-D 0.5mg/L配合的MS培养基中愈伤组织增殖速度最快,生长旺盛,下胚轴出愈率高达93.3%,愈伤淡黄色,疏松,生长良好,褐化最轻,可以继代培养,是较好的愈伤诱导培养基。处理1、3、4出愈率分别是84.4%、88.8%、75.6%,但愈伤有不同程度的褐化,继代能力差。处理5出愈率为40.0%,最低,愈伤质量也不高,易褐化,不易继代培养。在无2,4-D的处理中,虽然能诱导愈伤,但易褐化,不易产生胚性愈伤。因此适宜的愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 2.0mg/L+2,4-D 0.5mg/L。

2.3 激素对胚性愈伤组织分化和生长的影响 实验表明,处理1愈伤组织生长量最高(12.0 ± 0.4),褐化轻,但胚性细胞少(+),再分化能力差;处理2愈伤组织生长量其次(10.5 ± 0.6),有部分胚性细胞(++),褐化轻;处理3愈伤组织生长量低(8.0 ± 0.3),有大量胚性细胞(+++),浅绿色,褐化轻,在愈伤表面不断出现大量绿色小颗粒;处理4愈伤组织生长量最低(7.0 ± 0.5),未见胚性细胞。因此适宜的胚性愈伤组织分化培养基为处理3(MS+6-BA 0.5mg/L+KT 0.5mg/L+IBA 0.1mg/L)。

胚性愈伤经过几次继代培养,有些保持较高的细胞分裂能力,这些细胞是高产细胞株的筛选对象(图2B);有些细胞发生分化,以后逐渐形成胚状体(图2C、2D),这是进行基因工程和人工种子制种的基础。

将胚状体放入再生培养基培养,胚状体再生能力丧失,逐渐褐化凋亡,未能分化成再生植株。引起胚状体分化成再生植株的因素很复杂,其发生的分子机制还不清楚,有待进一步进行研究。

2.4 胚性愈伤组织发生的解剖学 半薄切片在光学显微镜下观察(图2E):胚性愈伤组织的细胞为圆形或椭圆形,胚性细胞与其周围的薄壁细胞相比,其特点为核大,质浓、染色深,随着分化的进一步进行,便出现了由胚性细胞分裂而来的二细胞至多细胞胚,进而形成了较多的原胚状结构。

进一步观察发现,在早期,胚性化的细胞与周围的细胞界限还不明显,可能存在胞间连丝,周围的细胞输送物质给胚性化的细胞,胚性化的细胞胞质逐渐增厚,细胞壁也增厚,到后期独立性增强,生理上出现相对隔离,这有利于形成成熟的体细胞胚及进一步发育。

3 讨 论

崔凯荣等^[8]指出外植体出愈率与基因型、营养成分、激素、生理状态和物理因子等有关。

本实验结果表明,下胚轴是较好的诱导愈伤组织的材料,诱导的愈伤组织疏松、淡黄色,无论状态还是长势都是最好的。实验还发现,下胚轴愈伤组织总是从生理下端开始发生。

不同植物诱导愈伤组织所需要的激素种类和水平不同。 $2,4-D$ 在愈伤组织的诱导中起着重要作用,并且 $2,4-D$ 与分裂素组合在一起,以适宜的比例,往往比单独作用强。本实验中利用 $6-BA$ 、 KT 、 IBA 联合诱导愈伤组织,但诱导率均不如含有 $2,4-D$ 的高,且诱导的愈伤组织有结块,不易继代。本实验研究表明,有 $2,4-D$ 的处理中,与分裂素组合诱导愈伤组织是较理想的。

适当的继代培养对愈伤组织的分化有促进作用,同一种培养基在继代2~3次后应适当调整激素水平,以避免愈伤组织的褐化和胚性降低。 $2,4-D$ 在胚性愈伤组织的诱导中起着重要作用。本实验发现 $2,4-D$ 有利于甘草愈伤组织诱导、继代。但 $2,4-D$ 存在时,严重影响胚性愈伤组织的稳定。本实验将诱导的愈伤组织继代若干次后,不断出现淡绿色和黄绿色小颗粒细胞,挑出这些细胞再放于同一培养基,胚性消失,非胚性愈伤组织增加。这说明 $2,4-D$ 不利于甘草胚性愈伤组织继代,抑制了胚性细胞的生长。挑选淡绿色或黄绿色愈伤组织细胞,将其转入胚性愈伤组织诱导培养基上,生长10~15 d后,愈伤组织胚性很好,在培养基上(固体和液体)有大量淡绿色和黄绿色细胞,分散性很好,不断有胚性愈伤产生,在愈伤的表面镶嵌有球状的绿色愈伤组织细胞出现并与周围愈伤完全分离,接触不紧密。

胚性愈伤经过几次继代培养,有些保持较高的细胞分裂能力,这些细胞是高产细胞株的筛选对象;有些细胞发生分

化,形成胚状体,这是进行基因工程和人工种子制种的基础。

实验发现,随着培养时间的延长,愈伤组织的分化能力逐渐降低,胚状体再生能力丧失。证据表明导致分化能力降低的主要原因是相关基因的启动子或编码序列发生甲基化而不能表达。在诱导条件下则发生脱甲基化,可能启动了胚状体再生必需基因的表达,使分化能力恢复或增强,重新甲基化则可能关闭了维持愈伤组织生长而抑制胚状体再生的基因的表达^[6,9]。

[参 考 文 献]

- [1] 丛媛媛,热娜·卡斯木,帕丽达·阿不力孜,陈洁,王晓文.新疆胀果甘草多糖的提取及其体外抗氧化活性[J].中药材,2009,32:1435-1438.
- [2] 热娜·卡斯木,丛媛媛,屠鹏飞.胀果甘草多糖的分离纯化及其理化性质[J].华西药学杂志,2008,23:448-450.
- [3] 杨英,郑辉,李赟,季家兴,余龙江.茉莉酸甲酯与二氢茉莉酮酸甲酯对悬浮培养的甘草细胞生长和黄酮积累的影响[J].植物生理学通讯,2008,44:903-906.
- [4] 胡海英,吴晓玲,梁新华.胀果甘草愈伤组织诱导培养[J].药物生物技术,2004,11:170-172.
- [5] 张丽平,梁玉玲,许恒飞.胀果甘草细胞的悬浮培养[J].河北大学学报:自然科学版,2008,28:659-663.
- [6] 郝玉金.柑桔和苹果等果树种质资源的离体保存及其遗传变异[D].华中农业大学图书馆,2000.
- [7] 武昕,周骊楠.一种简单而快捷的半薄切片脱树脂新方法[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13:125-126.
- [8] 崔凯荣,戴若兰.植物体细胞胚发生的分子生物学[M].北京:科学出版社,2000:49-53.
- [9] Kaeppler S M,Phillips R L. DNA methylation and tissue culture - induced variation in plants *in vitro* [J]. Cell Dev Biol,1993,29:125-130.

[本文编辑] 尹 茶