

四川‘竹根姜’胚性细胞悬浮系的建立与植株再生

郭英华 关秋竹 张振贤*

(中国农业大学农学与生物技术学院蔬菜系, 北京 100094)

摘要: 选用四川省地方品种‘竹根姜’的茎尖组织建立了体细胞胚性细胞悬浮系, 并通过悬浮培养获得了姜再生植株。结果表明悬浮细胞干质量受 pH 影响。接种量和 AgNO_3 对悬浮细胞的生长都有影响: 最佳接种量为 1.0%, 最适 AgNO_3 浓度为 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。胚性细胞悬浮系增殖后, 接种到前期筛选的成熟分化培养基上获得了再生植株。

关键词: 姜; 悬浮系; 体细胞胚; 植株再生

中图分类号: S 632.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 05-0905-03

Establishment and Plant Regeneration of Somatic Embryogenic Cell Suspension Cultures in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)

Guo Yinghua, Guan Qiuzhu, and Zhang Zhenxian*

(Agronomy and Biotechnology College, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Somatic embryogenic suspension cultures of ‘Zhugenjiang’ ginger cultivars of Sichuan province were established. From which, regenerated plantlets were obtained. The relationship between the dry mass of suspension cultures and pH changes in medium was also discussed. The effects of inoculation and AgNO_3 on the growth of embryogenic suspensions were also discussed. The optimum concentrations of inoculation and AgNO_3 were 1.0% and $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

Key words: Ginger; Suspension culture; Somatic embryogenesis; Plant regeneration

1 目的、材料与方法

姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 由于开花和结籽障碍, 无法采用有性杂交手段进行种质创新和品种改良, 且长期无性繁殖, 极易造成种性退化。迄今已在姜的组培脱毒快繁^[1]、花器官培养、体细胞胚胎发生^[2]、器官发生^[3]、原生质体培养和种质保存等方面取得一定进展。但有关姜胚性细胞悬浮系的建立和植株再生方面的工作尚未见报道。作者选择我国特产之一四川省地方品种‘竹根姜’, 利用其茎尖组织建立了胚性细胞悬浮系并获得了再生植株。

选取色泽好、无病菌的种姜, 洗净后 (28 ± 2) 催芽。约 30 d 后出芽。取长 1.5~2.0 cm 初生芽, 无菌处理后剥取 1.0 mm 大小生长点接种于胚性愈伤组织诱导培养基 MSN (硝酸铵含量减半的 MS 培养基) + 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%, (26 ± 1) 下暗培养。形成的胚性愈伤组织每 4 周继代 1 次。继代时挑选外观疏松、色泽鲜黄、细胞结构致密的愈伤组织。

以继代培养后的胚性愈伤组织作为悬浮培养的起始材料, 置于 100 mL 三角瓶内, 加入 40 mL 液体培养基 (MSN + 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 3%)。三角瓶置于恒温旋转摇床上 [$100 \sim 120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, (26 ± 0.5)] 黑暗条件下振荡培养。每 2 周继代 1 次, 隔代用孔径为 0.5 mm 的尼龙网过滤处理, 使其大小均一。定期在倒置显微镜下观察悬浮细胞生长发育情况。

收稿日期: 2005-01-03; 修回日期: 2005-08-13

基金项目: 国家科技攻关项目 (2001BA511B-08-12); 农业部农业结构调整项目 (04-06-02B)

*通讯作者 Author for correspondence

悬浮细胞系的干质量及 pH 测定: 每隔 2 d 取其充分摇匀的悬浮培养物 10 mL, 离心 (100 \times g, 10 min), 沉淀烘干 (60 $^{\circ}$ C, 24 h) 后称其质量, 同时测其上清液 pH 值。液体培养基中, 加入不同浓度的 AgNO_3 (0, 2, 4, 6, 8 和 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养 20 d 后测定悬浮细胞的鲜质量增加值。

将直径约 1~2 mm 的胚性细胞团转移到前期筛选得到的固体胚性愈伤组织诱导增殖培养基上 (MSN + 2,4-D 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%)。待愈伤组织长到直径 0.5 cm 左右时接种到成熟分化培养基上 (MS + 2,4-D 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA 5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%)。第 1 片真叶展开后转到再生培养基上 (MS + BA 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%) 获得再生植株。

2 结果与讨论

2.1 胚性细胞悬浮系的建立及生长特性

‘竹根姜’外植体接种到胚性愈伤组织诱导培养基上 1 周后, 基部开始膨大, 形成花环状结构 (图版, 1)。约 30 d 左右开始出现细小颗粒状、结构松脆的淡黄色胚性愈伤组织 (图版, 2)。选择此类愈伤组织进行液体振荡培养, 建立了胚性细胞悬浮系 (图版, 3)。悬浮系中大多数细胞呈圆球形, 细胞质浓厚, 细胞核明显, 细胞分裂旺盛, 多为均等的有丝分裂, 细胞分散度良好, 主要由单细胞和小型细胞团组成 (图版, 4)。

胚性悬浮细胞系的干质量增加值变化呈“S”形曲线, pH 的变化近似“V”形曲线, 在接种后 1~9 d 的范围内 pH 不断下降, 从 5.8 下降到最低点 4.05, 此阶段干质量增长缓慢; 9~13 d pH 迅速回升, 从 4.05 增加到 5.19, 此阶段干质量增长迅速, 悬浮细胞处于对数生长期; 13~17 d, pH 缓慢回升, 干质量缓慢增加; 第 17 天以后 pH 和干质量的增加都几乎停滞 (图 1), 如不及时添加新鲜培养基, 悬浮细胞将老化死亡。pH 与干质量之间的这种关系, 可能是外源生长素 2,4-D 引起 pH 下降, 促进内源生长素在细胞内的不断积累, 诱导与细胞生长有关基因的表达, 从而促进细胞生长。

2.2 接种量和 AgNO_3 对悬浮细胞生长的影响

2.2.1 接种量对悬浮细胞生长的影响 接种量的大小影响悬浮细胞的生活力, 接种量小于 0.5%, 悬浮细胞增殖缓慢, 容易衰老、逐渐失去分化能力, 最终死亡, 10 d 时干质量增加 61 mg; 接种量大于 2.0%, 细胞繁殖迅速, 分散度差, 养料及氧气供应不足, 悬浮细胞团容易褐化, 10 d 时干质量增加 86 mg; 最适宜的接种量为 1.0%, 10 d 时干质量增加 154 mg (图 2)。

2.2.2 AgNO_3 对悬浮细胞生长的影响 添加低浓度 AgNO_3 (2.0~6.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 悬浮细胞的鲜质量增加值高于对照, 褐化速度减慢 (表 1), 可见低浓度 AgNO_3 对悬浮细胞的生长有一定促进作

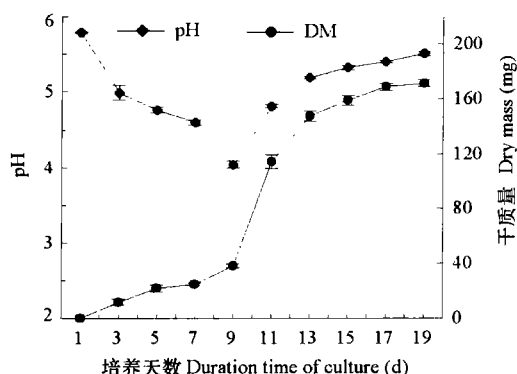


图 1 四川‘竹根姜’胚性细胞悬浮系干质量和 pH 关系
初始接种量为 0.5%。

Fig 1 Variation of dry mass and pH of embryogenic suspensions of ‘Zhugenjiang’ ginger
Inoculum at 0.5%.

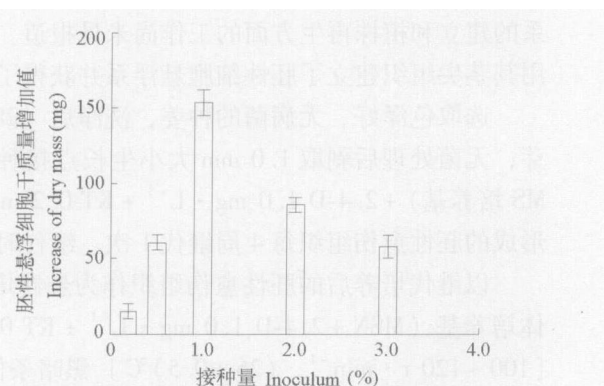


图 2 接种量对四川‘竹根姜’悬浮系干质量增加值的影响
Fig 2 Effect of inoculums on the dry mass increase of ‘Zhugenjiang’ ginger suspension cultures

用。而附加高浓度的 AgNO_3 ($> 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 鲜质量增加值与对照差别不明显, 但是有加速褐化的现象 (表 1), 可见高浓度 AgNO_3 对悬浮细胞生长有毒害作用。可能低浓度的 AgNO_3 抑制了乙烯的合成, 从而抑制乙烯对细胞的毒害作用, 促进了细胞增殖, 减缓了细胞的老化; 另一方面高浓度的 Ag^+ 对细胞造成毒害作用, 因此导致细胞过早老化死亡。

2.3 胚性细胞悬浮系的分化及植株再生

悬浮细胞团接种到固体培养基后, 其直径扩增到 0.5 cm 需要 20 d 左右。胚性愈伤培养在扩增培养基上将一直保持其体细胞胚胎发生能力, 很难再分化, 只有接种到附加低浓度 $2,4\text{-D}$ 的分化培养基 ($\text{MS} + 2,4\text{-D } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 3\% + \text{琼脂 } 0.7\%$) 上后, 才开始器官分化 (图版, 5)。小苗第 1 片真叶展开后, 转到不含 $2,4\text{-D}$ 的培养基上 ($\text{MS} + \text{BA } 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 0.7\%$) 更利于茎叶的伸展和根的生长, 附加低浓度 NAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 有利于茎的伸长, 叶片的伸展和根的生长, 一个月左右形成根、茎、叶具全约 2 cm 高的小苗, 获得了完整的再生植株 (图版, 6)。

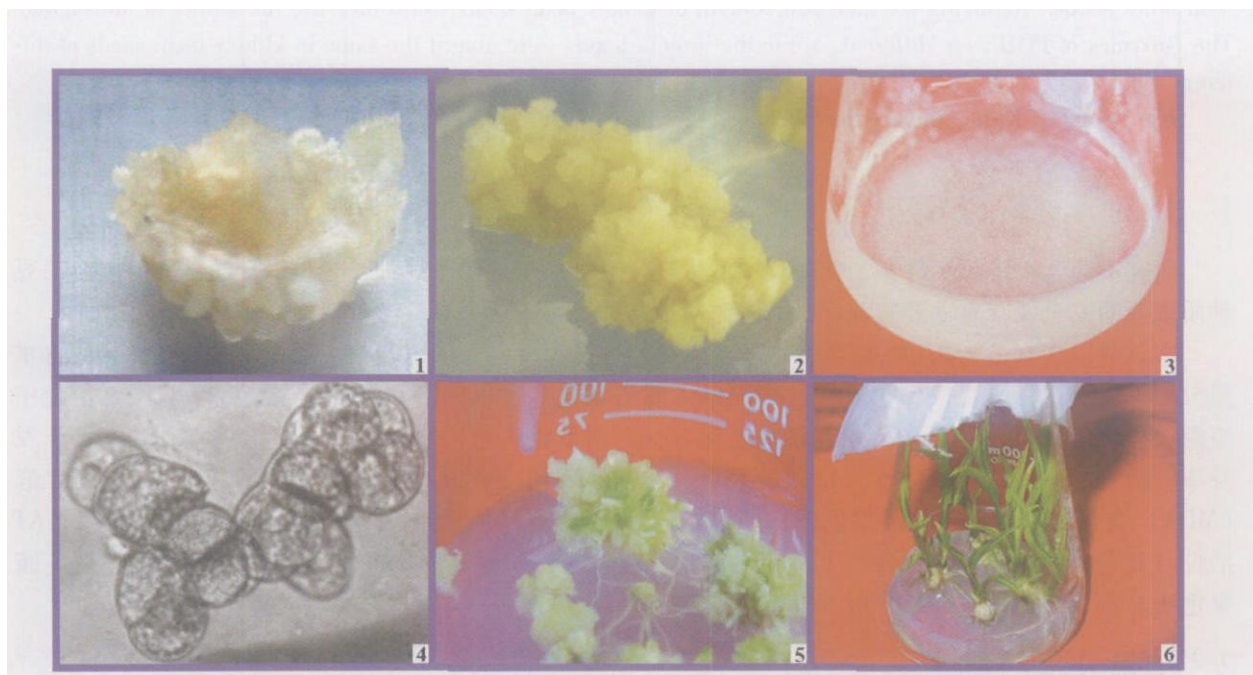
表 1 AgNO_3 对四川‘竹根姜’胚性悬浮细胞生长的影响

Table 1 The effect of AgNO_3 on the growth of embryogenic suspensions of ‘Zhugenjiang’ ginger

AgNO_3 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	鲜质量增加值 Increase of fresh mass(g)	褐化时间 Time of browning (d)
0	1.6 ± 0.04	10 ± 0
2.0	1.9 ± 0.05	12 ± 0.6
4.0	2.3 ± 0.04	14 ± 0.6
6.0	2.4 ± 0.04	15 ± 1.0
8.0	1.6 ± 0.10	8 ± 0
10.0	1.5 ± 0.03	7 ± 0

参考文献:

- 1 Shama TR, Singh BM. High-frequency in vitro multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Roscae. Plant Cell Reports, 1997, 17: 68 ~ 72
- 2 Babu KN, Samsudeen K, Ratnamal M J. Embryogenesis and plant regeneration from ovary derived callus cultures of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Journal of Spices and Aromatic Crops, 1996, 5 (2): 134 ~ 138
- 3 Babu KN, Samsudeen K, Ravindran PN. Direct regeneration of plantlets from immature inflorescence of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) by tissue culture. Journal of Spices and Aromatic Crops, 1992, 1 (1): 43 ~ 48



图版说明: 1. 花环状结构; 2. 胚性愈伤组织; 3. 胚性细胞悬浮系; 4. 胚性悬浮细胞团; 5. 分化芽和根; 6. 再生植株。

Explanation of plates: 1. Flower like callus; 2. Embryogenic callus; 3. Embryogenic suspension cultures; 4. Embryogenic cell cluster; 5. Redifferentiated shoots and roots; 6. Regenerated plantlets