

甘蔗胚性细胞团和愈伤组织某些性质的比较

罗紫娟 唐典禧 梁倩华 石贵玉

(广西师范大学生物系)

摘要 在培养24天的生长周期中, 胚性细胞团的分裂细胞数共出现三次高峰。第一次出现在继代后的第8天, 第二次出现在第12天, 第三次出现在第18天, 其中以第二次高峰期的细胞分裂数量最多。愈伤组织中仅观察到两次高峰, 第一次出现在第12天, 第二次出现在第18天。细胞分裂数比胚性细胞团少。细胞分裂高峰出现得迟可能愈伤组织比胚性细胞团生长缓慢的一个重要因素。

不同细胞分裂高峰时期胚性细胞团的DNA和蛋白质均比相同时期的愈伤组织含量高, 高峰期在第12和第18天, 这与内部的DNA和蛋白质含量变化是一致的。这说明胚性细胞团具有较快分裂能力的原因之一。

胚性细胞团的过氧化物酶同工酶带也多于愈伤组织, 酶带染色较深, 表示酶活性高。

广西甘蔗组织培养育苗是以胚性细胞团^[1]进行继代繁殖和分化得到绿苗的。一般来讲, 胚性细胞团生长较快, 易于形成胚状体, 因此成苗率高; 而愈伤组织生长较慢, 通过器官发生的小植株较少, 因此繁殖率较低, 所以选择合适的胚性细胞团有利于试管苗的扩大生产和工厂化。本文从分裂细胞数, DNA和蛋白质的含量以及过氧化物酶同工酶电泳谱带来说明胚性细胞团和愈伤组织间存在的某些差异, 为说明胚性细胞团生长速度较快和成苗率高提供某些依据。

材料和方法

1. 材料: 桂糖11号的愈伤组织和胚性细胞团。

愈伤组织培养在 $N_6 + 2,4-D 3 \text{ mg/L} + KT 1 \text{ mg/L} + LH 500 \text{ mg/L} + NAA 0.5 \text{ mg/L} +$ 白糖4%+琼脂0.5%的培养基上, 而胚性细胞团则培养在去除LH的相同培养基上。培养室温度为25—28℃, 白天用40瓦的日光灯照射10小时。

2. 细胞分裂数的测定: 把培养不同天数的胚性细胞团和愈伤组织制成切片, 进行孚尔根和温纳染色^[2], 对各个时期的切片进行仔细的检查, 然后在显微镜下统计细胞分裂数。切片制成后, 从每个材料中选取比较典型的切片, 再选取三个细胞分裂数最多的视野(放大200倍, 染色质开始集缩的前期、中、后期都属细胞分裂期)进行计数, 用平均数表示每个视野的细胞分裂数。

3. 核酸含量的测定: 用二苯胺法测定组织中DNA的含量。

根据分裂细胞数的测定, 我们把测定时间选择在继代培养后的第八、十二、十八、二十四天。

DNA的提取方法:

(1) 取鲜材料0.5克加0.5ml研磨缓冲液(称取26.298克氯化钠, 13.235克柠檬酸三钠盐, 37.23克EDTA分别溶解, 一起定容至1000ml, 并用20% N_4OH 调节pH至7.0)和1%样品量的十二烷基硫酸钠, 研磨成浆状物为止。加等体积的氯仿-异戊醇(24:1)剧烈摇动30秒钟, 离心5分钟(4000转/分)。(3)取上清液于72℃水浴保温3—4分钟, 冰箱冷却至室温。(4)加入4:1倍5M高氯酸L提取液为4ml, 高氯酸为1ml)。(5)加等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 剧烈摇动30秒钟, 离心5分钟(4000转/分)。(6)取上清液, 慢慢

加入 2 倍体积 95% 乙醇, 然后用玻璃棒轻搅至核酸沉淀〔如玻璃棒挑不起核酸的沉淀物, 则离心 15 分钟 (4000 转/分)〕。(7) 将沉淀物溶于适量 $0.1 \times \text{SCC}$, 溶解后, 加入等于溶液的 $1/10$ 体积量的 $10 \times \text{SCC}$, (8) 重复上述步骤 (6) (7), 即得 DNA 粗制品。(9) 市售酵母 RNA 酶 0.2 克溶于 50 毫升 0.15M 氯化钠溶液 (用 HCl 调 pH 5), 并在 80°C 水浴中保温 10 分钟, 进行预处理。加预处理的 RNA 酶, 使溶液含酶约 $70 \mu\text{g}/\text{毫升}$, 在 37°C 水浴中保温 30 分钟。(10) 加等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 离心 5 分钟 (4000 转/分)。(11) 重复 (6) (7) 步骤, 即得纯 DNA 提取液。(注 SCC 为氯化钠-柠檬酸三钠缓冲液)。

分别取 2 ml 胚性细胞团和愈伤组织的纯 DNA 提取液于试管中, 加入 4 ml 二苯胺溶液, 充分混合后在室温 (约 20°C) 下放置 24 小时, 然后在 721 型分光光度计 600nm 处测光密度 OD_{600} 值。另取一试管加入 2 ml 0.5N HClO_4 和 4 ml 二苯胺溶液作对照。

4. 蛋白质含量的测定: 用 Folin 酚试剂法^[4] 测定组织中的蛋白质。

称取样品 1 克, 放冰箱 1 小时后, 加入提取缓冲液 (0.1 M Fris-HCl 缓冲液, pH 8, 内含 0.5M 蔗糖, 0.6mM 抗坏血酸和 0.6mM 半胱氨酸) 10 ml, 在水浴中研成匀浆, 离心 10 分钟 (3500 转/分), 取上清液再离心 15 分钟 (4000 转/分), 将上清液用水稀释 100 倍。取 0.6 ml 样品, 加 3 ml 0.2M 三羟基氨基甲烷溶液, 10 分钟, 再加 0.3 ml 0.2M HCl, 30 分钟后用 721 型分光光度计比色。以等量蒸馏水加试剂为对照。

5. 过氧化物酶同工酶: 用聚丙烯凝胶电泳进行分析。称 300mg 材料中加入 1 ml 提取缓冲

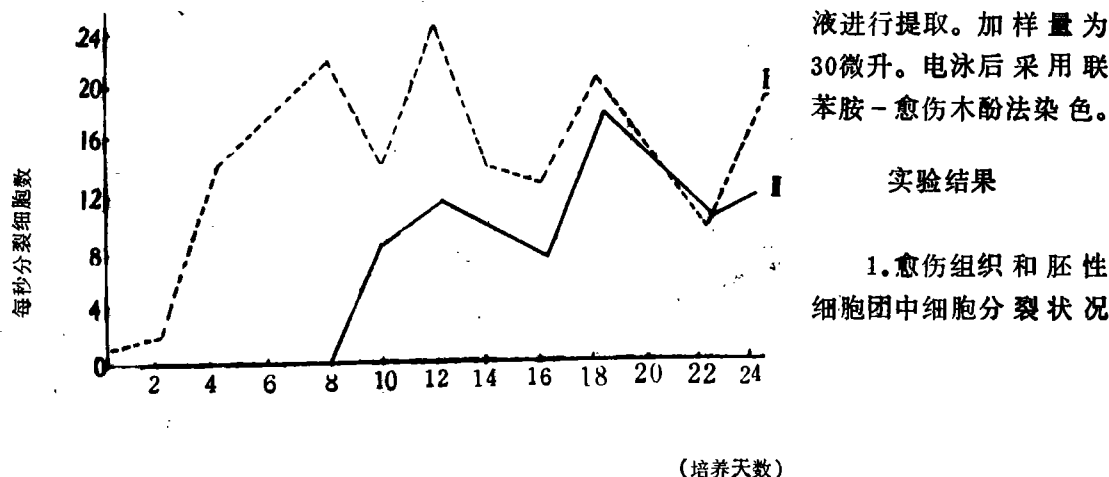


图 1 胚性细胞团和愈伤组织不同时期分裂细胞数

I、胚性细胞团; II、愈伤组织

从图 1 可以着到, 细胞分裂数基本上呈周期性变化, 并且无论是胚性细胞团还是愈伤组织, 每个周期所经历的时间基本上都是 6 天。培养 24 天为一生长周期里, 发现培养一个月左右而尚未继代的胚性细胞团和愈伤组织, 细胞分裂已趋于停止。这种胚性细胞团和愈伤组织转管继代培养的那天为 0 天, 以后逐渐恢复分裂。胚性细胞团继代后的第六天开始出现通过平周分裂而形成的胚性细胞团, 在这些新的细胞团中, 细胞排列很有规律, 这与曾吉恕所观察到的胚性细胞团中的排列是一致的^[6]。由于刚从一个细胞分裂形成的两个细胞, 所以形状相似, 排列整齐而紧密, 体积比周围细胞小。胚性细胞团到了继代的第 8 天, 细胞分裂数达到第一个高峰, 第二次出现在继代后的第 12 天, 第三次在继代后的第 18 天, 胚性细胞团共出

现三次高峰期,其中以第二次高期的细胞分裂数量最多。愈伤组织在最初有一段停滞期,到第9天有些细胞才恢复分裂,第一个高峰期在第12天,第二次在第18天,共观察到两个高峰期。细胞分裂高峰的差异可能是愈伤组织比胚性细胞团生长慢的一个重要原因,而且同一时期的细胞分裂数也比胚性细胞团少(见表)。

2. 蛋白质和核酸含量的比较

不同细胞分裂高峰时期的愈伤组织和胚性细胞团中蛋白质和核酸含量比较结果见表。

表 不同细胞分裂高峰时期愈伤组织和胚性细胞团中蛋白质和核酸含量的比较

培养天数	0		8		12		18		24	
	愈伤组织	胚性细胞团	愈伤组织	胚性细胞团	愈伤组织	胚性细胞团	愈伤组织	胚性细胞团	愈伤组织	胚性细胞团
分裂细胞数 (三个视野平均数)	0	1.1	0	22	12	24.8	19	21	13.5	19.7
DNA含量 (Ug/每克鲜重)			4.95	6.50	17.33	21.45	18.15	22	11	16.5
蛋白质含量 (Ug/每克鲜重)			63.2	71.7	68.1	109.8	69.8	96.1	51.6	61.0

从表中可以看出在继代培养后第8天、12天、18天和24天的胚性细胞团中的蛋白质和核酸含量均高于相同时期内具有较高的分裂活动。此外,从几个细胞分裂高峰活动最旺盛,此时蛋白质和核酸含量亦最高,无论胚性细胞团还是愈伤组织均是如此。

3. 过氧化物酶同工酶谱带比较

甘蔗胚性细胞团中过氧化物酶同工酶谱带多于愈伤组织,且染色较深(图2)。

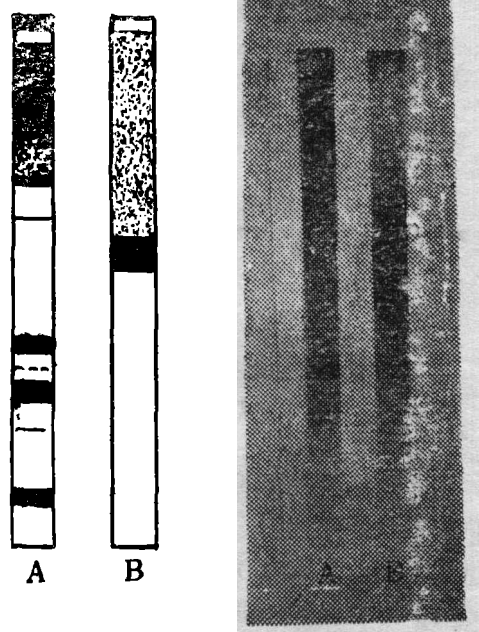


图2 胚性细胞团和愈伤组织过氧化物酶同工酶谱带的比较

A. 胚性细胞团; B. 愈伤组织。

讨 论

广西各地甘蔗培养苗的生产单位都一致认为胚性细胞团增殖快,分化频率高,成苗率高。经我们实验分析,胚性细胞团中DNA和蛋白质含量都比愈伤组织高。DNA蛋白质都是细胞有丝分裂的基础,其含量较高可能与胚性细胞团分裂和增殖多有关^[6]。此外,DNA和蛋白质含量高,表明细胞代谢旺盛,所以过氧化物同工酶谱带多,活性高。

在培养的24天的生长期中,愈伤组织继代培养后有一段时间的停滞才开始细胞分裂。而胚性细胞团几乎没有停滞阶段,所以胚性细胞团启动快。从测定DNA的含量来看,胚性细胞团要比愈伤组织高,可以推测胚性细胞团的细胞可能有较多的复制单位^[7],因此DNA在一定时间内复制快,合成量也较多。所以细胞分裂也快,细胞增殖快,分化后成苗率也高。

无论是胚性细胞团和愈伤组织分裂细胞数基本上呈周期性变化,每个周期所经历的时间基本都是6天。在24天培养时间内,高峰期在第12、第18天,这与内部的DNA和蛋白质含量是一致的。这为生产上提供了一定的理论依据,细胞团最好在生长旺盛尚未衰老的25天左右转管较为合适。

参 考 文 献

- [1] 梁倩华、罗紫娟等,1982:体细胞培养中胚性细胞团的发生和苗形成的细胞学观察,广西师院学院院刊(1):2—8。
- [2] 芮菊生、杜懋琴等,1980:组织切片技术,人民教育出版社,220页。
- [3] 北京大学生物化学实验指导,1980:73—74。
- [4] 上海师范大学生物系,1979:生物化学实验,上海科学出版社,117—120。
- [5] 曾吉恕,1979:甘蔗体细胞培养中的胚状体发生。植物生理学报,5〔4〕:411—416。
- [6] C·W·普列斯谷脱〔美〕著,张伟成等译,1980:真核细胞的繁殖,科学出版社,10—107。
- [7] 朱熹主篇,1982:植物染色体技术,(4):科学出版社。

COMPARISON OF CERTAIN CHARACTERISTICS OF EMBRYOIDS AND CALLUS OF SUGAR-CANE

Luo Zi-juan, Tang Dian-xi, Liang Qian-hua and Shi Gui-yu
(Department of Biology, Guangxi Normal University)

ABSTRACT

In the culture growth period for twenty-four days, the cell numbers of division of embryoids appeared three peaks, the first on eighth days after subculture, the second on twelfth day, the third on eighteenth day. Among them the cell numbers of division of the second peak is the most. The cell numbers of division of callus only two peaks were observed, the first on twelfth day, the second on eighteenth day. The cell numbers of division of callus are less than embryoids. The cell division and division peak of callus appeared later than the embryoids, slow growth of the callus is likely an important cause.

During different stages of cell division peaks the contents of DNA and protein of embryoids all along higher than same stage of callus, the peaks appeared at twelfth and eighteen day, this is in accordance with the change in contents of DNA and protein and a cause of faster division.

peroxidase isozyme bands of embryoids are more than callus. The deeper colour of the peroxidase bands showed the high activity of the peroxidase.