

文章编号: 1000-3112(2000)02-0168-04

## 枸杞髓组织培养中体细胞胚胎发生 与过氧化物酶同工酶分析

S567.190.3

Q913.1

魏琴<sup>1</sup>, 曹有龙<sup>2</sup>, 陈放<sup>2</sup>, 周黎军<sup>3</sup>, 陈东林<sup>1</sup>

(1. 宜宾师范高等专科学校生物系, 四川宜宾 644007; 2. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610064; 3. 宜宾农业学校, 四川宜宾 644003)

**摘要:** 枸杞髓组织在 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上诱导愈伤组织发生。在 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+CH 500 mg/L 培养基上继代培养, 再转入 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的分化培养基上进行分化培养。显微观察表明, 在培养过程中愈伤组织细胞由非胚性细胞转变为胚性细胞, 直至发育成体细胞胚胎和完整植株; 电泳结果显示, 体细胞胚胎发生的各阶段, 其过氧化物酶同工酶发生相应的变化。

**关键词:** 枸杞; 髓组织培养; 体细胞胚胎; 过氧化物酶同工酶

中图分类号: Q949.71+8.43 文献标识码: A

体细胞胚胎发生

## Observation of somatic embryogenesis and analyses of peroxidase isozymes in culture of the pith of *Lycium barbarum* L.

WEI Qin<sup>1</sup>, CAO You-long<sup>2</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>,  
ZHOU Li-jun<sup>3</sup>, CHEN Dong-lin<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Yibin Teachers' College, Yibin 644007, China; 2. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 3. Yibin Agriculture School, Yibin 644003, China)

**Abstract:** Callus was induced on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA, from pith of *Lycium barbarum* L. and subcultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L NAA and 500 mg/L CH. Swell pieces of calli were observed under the microscope and it was revealed that the nonembryonic cells of the callus had changed to embryonic cells from which plant was developed through somatic embryogenesis on the MS culture medium supplemented with 2 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA. Electrophoretic study of peroxidase isozymes had demonstrated corresponding changes during the stages of somatic embryogenesis.

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; pith cultured; somatic embryogenesis; peroxidase isozyme

收稿日期: 1999-06-03

作者简介: 魏琴 (1967-), 女, 讲师, 植物学专业。

枸杞作为重要的药物资源,得到了普遍关注。在组织和细胞培养及应用方面,近年来已取得不少有意义的进展<sup>[1~3]</sup>,利用枸杞叶片作为外植体已成功地诱导出体细胞胚胎及完整植株<sup>[4]</sup>,但利用髓组织诱导体细胞胚胎发生并对其过程中过氧化物酶同工酶进行研究未见报道。通过本文的实验,填补了该领域的空白,为枸杞的进一步研究提供了实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为我国宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.)。为宁夏农林科学院枸杞所培养的高产优质品种——宁杞1号。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 胚性愈伤组织的诱导与分化

取当年生长的具有明显分化成髓组织的枝条,摘除并丢弃叶子。侧芽和带有分生组织的顶端100 mm。把外植体的切端蘸熔蜡封着伤口,然后浸入70%酒精中20 s,再转入0.1%升汞溶液中8~10 min,用无菌水冲洗3次。最后用吸水纸吸干用解剖刀从茎的两端各切取10 mm,余下部分切成20 mm的小段,用无菌镊子夹住茎的切段,用瓶塞打孔器从髓组织中取出组织的圆柱体。将圆柱体转移到90 mm的无菌培养皿中,用解剖刀切成2~3 mm厚的小圆片,接种到MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L的固体培养基上,在该培养基中加入500 mg/L的水解酪蛋白(CH)作为继代培养基。挑选在诱导培养基上色泽鲜艳、生长迅速的愈伤组织进行继代培养,2~3次继代后,出现的疏松颗粒状愈伤组织<sup>[3]</sup>,接种至MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L的分化培养基上。

#### 1.2.2 体细胞胚胎发生的显微观察

分别取接种到分化培养基上0、3、6、9、12、15、18、21、24、27 d的材料以FAA固定,爱氏苏木精整染4 d,曙红复染,石蜡包埋,切片厚度8 μm脱蜡封片后,Olympus光镜下观察照相。

#### 1.2.3 过氧化物酶同工酶分析

分别取分化培养基上培养0~27 d的材料以及植株叶片1 g于冰浴研钵中,加0.1 M Tris-HCl缓冲液2.5 mL,研磨成浆转入离心管,4 000 r/min离心20 min,取上清液加等量的40%的蔗糖溶液,摇匀,放入冰箱冻室备用。采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳方法进行过氧化物酶同工酶分析。分离胶浓度为7.5%,浓缩胶浓度为2.5%,胶厚1 mm,每槽加样50 μL,稳压220 V,电泳5 h,整个过程在0~4 °C进行<sup>[4]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 胚性愈伤组织的诱导、继代和分化

枸杞髓组织在诱导培养基上约10 d产生愈伤组织,诱导率为80%。愈伤组织为淡黄色松散型,2~3次继代后更加松散,颗粒小,分散好,很难用镊子夹起来。接种到分化培养基上,松散的愈伤组织逐渐变紧密,两周后表面出现若干绿色小点,进一步培养,能分化出大量绿色小芽。

### 2.2 体细胞胚胎的发生

继代培养7 d后的愈伤组织转移到分化培养基上后,0 d观察表明,愈伤组织大多为非胚

性细胞, 细胞体积大, 排列疏松, 细胞质薄, 核小, 染色浅 (图版 I: 1); 培养 3 d 后, 胚性细胞逐渐增多, 形态上以其体积小、细胞质浓厚、核大、染色深为特征 (图版 I: 2), 同时还发现 2-细胞胚 (图版 I: 3)、4-细胞胚 (图版 I: 4)、8-细胞胚 (图版 I: 5) 的存在; 第 6~15 d 中出现大小不等的球形胚 (图版 I: 6); 第 18~24 d 中出现心形胚 (图版 I: 7), 鱼雷胚 (图版 I: 8); 第 27 d 中出现子叶胚 (图版 I: 9), 其维管组织未与愈伤组织联系, 子叶胚掉在培养基上, 经继续培养 (图版 I: 10) 长成小植株 (图版 I: 11)。

胚性细胞的启动发生于愈伤组织的表面或内部。

### 2.3 过氧化物酶同工酶分析

过氧化物酶同工酶分析情况见图 1、2。

从图 2 可以看出, 愈伤组织在转入分化培养基后, 随着培养时间的延长, 过氧化物酶酶带也增加, 从第 6~21 d 在 Rf 0.12 处出现新的酶带, 在第 24~27 d 时, 不但在 Rf 0.12 处有酶带, 还有 Rf 0.15、0.18 处有新酶带, 这些新增加的酶带逐渐与植株同工酶酶带相一致。

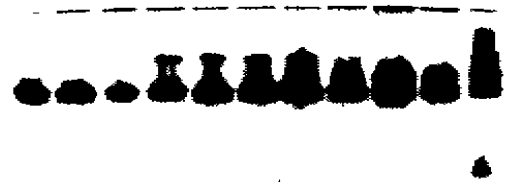


图 1 过氧化物酶同工酶照片

Fig. 1 The photograph of peroxidase isozymes

## 3 讨论

胚性细胞在分化培养基上经过 2-细胞胚、4-细胞胚、8-细胞胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚等过程而发育成小植株, 这与合子胚的发育途径相似。

同工酶是来源于生物体结构不同而能催化同一反应的酶。根据酶与基因的关系, 生物体酶的结构是由基因所决定。对同工酶的分析是探查基因存在和表达的有效工具。植物的发育过程是遗传信息在时间和空间顺序表达的过程。同工酶分析为有机体顺序发育提供了

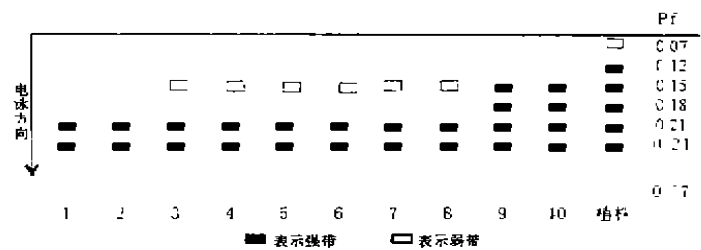


图 2 过氧化物酶同工酶谱

Fig. 2 Peroxidase isozymatic spectra

手段<sup>[21]</sup>。枸杞髓组织培养中过氧化物酶同工酶发生的变化说明细胞的生长、分化过程中基因的表达在时间、空间上是不同的。据文献<sup>[5]</sup>报道, 酶活力的提高或基因同工酶酶谱的变化, 可能是组织块进入分化期的前奏。该实验中, 从培养的第 6 d 开始, 同工酶开始变化, 第 6~21 d 同工酶酶谱较一致, 从第 24~27 d 又发生变化, 且与植株更一致。这与显微观察的从第 3~21 d 以胚性细胞的分裂为主, 第 18~24 d 出现了维管组织的分化相一致, 所以反过来也证明培养过程中细胞分裂、分化的存在, 为过氧化物酶同工酶作为枸杞体细胞胚胎发生的分子标记的可能性提供实验依据。

### 参考文献:

- [1] 张尔荣, 刘成安. 枸杞叶柄的组织培养 [J]. 植物学通报, 1991, 8 (4): 50~52

- [2] 杨汉民, 高清祥. 枸杞体细胞胚的诱导与形态发生 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 8 (增刊): 59~60
- [3] 曹有龙, 罗 青, 陈晓斌等. 具高分化潜能的枸杞胚性悬浮细胞系的建立及保存 [J]. 宁夏大学学报 (自然科学版), 1996, 17 (4): 59~63
- [4] 张自立, 俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990
- [5] 徐竹筠. 2, 4-D 浓度对胡萝卜体细胞胚胎发生及其同工酶的影响 [J]. 植物生理学报, 1984, 10 (4): 373~379
- [6] 杨和平, 程井辰. 植物体细胞胚胎发生的生理生化研究进展 [J]. 植物学通报, 1991, 8 (2): 1~8
- [7] 郝建平, 周小梅, 李宝平等. 蛇床幼茎离体培养中体细胞胚胎形成的观察 [J]. 武汉植物学研究, 1994, 12 (3): 247~250
- [8] 张玉方, 倪德祥, 王凯基. 非洲紫罗兰叶片培养中胚状体发生的形态学研究 [J]. 植物学报, 1981, 24 (3): 282~285
- [9] 赵双宜, 栗翼玫, 张燕君等. 萝卜雄性不育个体发育中的同工酶研究 [J]. 中国农业科学, 1994, 27 (6): 18~24
- [10] 杨 文, 何知洲, 程剑平等. 甘蔗过氧化物酶同工酶分析 [J]. 植物学通报, 1998, 15 (6): 65~69
- [11] Zee S Y, Wu S C. Embryogenesis in the petiole explants of Chinese celery [J]. *Z. Pflanzphysiol.*, 1979, 38: 325~335

#### 图版说明:

1. 非胚性细胞 400×; 2. 胚性细胞 200×; 3. 2-细胞胚 400×; 4. 4-细胞胚 400×; 5. 8-细胞胚 200×; 6. 球形胚 200×; 7. 心形胚 200×; 8. 鱼雷胚 200×; 9. 子叶胚 200×; 10. 从愈伤组织上脱落的体细胞胚胎; 11. 小植株的幼苗。

#### Explanation

1. Nonembryonic cell 400×; 2. Embryonic cell 200×; 3. Two-cell somatic embryo 400×; 4. Four-cell somatic embryo 400×; 5. Eight-cell somatic embryo 200×; 6. Globular somatic embryo 200×; 7. Heart-shaped somatic embryo 200×; 8. Torpedo-shaped somatic embryo 200×; 9. Cotyledon-shaped somatic embryo 200×; 10. Somatic embryogenesis from callus; 11. A plantlet seedling.