

# 黄竹细胞悬浮培养和原生质体分离\*

阙国宁 诸葛强

**摘要** 以牡竹属黄竹(*Dendrocalamus membranaceus* Munro)的竹节及无菌苗根颈为外植体,培养于含有5 mg/L 2,4-D、0.2 mg/L KT和200 mg/L LH的MS培养基上诱导愈伤组织,然后移至相同成份或不同浓度2,4-D的液体培养基中,进行悬浮培养,以建立分散性良好的悬浮细胞系。利用悬浮细胞和无菌苗叶片经酶解获大量原生质体,其产量分别约为每克鲜重 $2.5 \times 10^5$ 个和 $5 \times 10^5$ 个,活力均可达80%。

**关键词** 黄竹、细胞悬浮培养、原生质体分离

竹类植物以其种类繁多、用途广泛而著称于世。然而由于其开花难以预测和生长周期长,甚至开花结实伴随着竹林的灭亡,为此给遗传改良工作带来了极大困难。近年来,竹类组织培养繁殖研究已取得很大进展<sup>[1~3]</sup>,许多竹种成功地从愈伤组织分化成再生植株。同时某些竹种还进行细胞与原生质体分离培养研究,也取得了显著的进展<sup>[4]</sup>,这些都显示了生物技术在开辟竹类植物遗传改良新途径方面的巨大潜力,具有广阔的应用前景。

1991~1993年,以丛生竹中的优良纸浆竹种为材料,研究其细胞悬浮培养及原生质体分离方法,以期为今后深入研究打下良好基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 外植体的制备

本试验以栽培于我所温室牡竹属黄竹*Dendrocalamus membranaceus* Munro为主要材料,取其长约0.8~1.0 cm含竹节的幼嫩茎段及试管培养的无菌苗的根颈切段为材料进行培养以诱导愈伤组织。用悬浮细胞及无菌苗叶片分离原生质体。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞悬浮培养 外植体经组培常规方法消毒后,培养于附加5 mg/L 2,4-D、0.2 mg/L KT及200 mg/L LH的MS<sup>[5]</sup>固体培养基上以诱导愈伤组织,然后将所诱导的愈伤组织经选择分别培养于2,4-D浓度为0、3、6、9 mg/L,成份与诱导愈伤组织相同的液体培养基中,调节pH至5.8,置于转速为100 rpm的摇床上,暗培养于 $25 \pm 3$  °C条件下。每15 d继代培养1次。

1.2.2 原生质体分离 选取经2~3个月培养、继代后生长10~15 d的悬浮细胞,经离心

1993-08-10收稿。

阙国宁研究员, 诸葛强(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

\*浙江省自然科学基金资助项目。

沉降取沉淀细胞加酶液，或选取无菌苗叶片，用锐刀轻轻刮下表皮，贴浮于酶液上。酶解时将酶解物置于摇床上（30~40 rpm）25℃下暗酶解5 h，经100目滤网过滤除去大细胞团及残渣，再经低速离心（500 rpm，5 min）收集原生质体供观察。

1.2.3 检测 细胞和原生质体数量用血球计数器法<sup>[6]</sup>，原生质体活力用伊文思蓝法(Evans' blue)<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导与生长

本试验采取竹节和无菌苗根颈切段2种材料，接种于含有2,4-D的固体培养基上，经1个月培养后，一般在竹节及竹根颈周围均出现肉眼可见的白色愈伤组织，其中竹节的愈伤组织诱导率达30%~40%，而根颈则可达70%~80%。就累计生长量而言，两者生长趋势基本一致（图1）。在培养初期（约30 d），据观测，竹节愈伤组织生长量小于根颈；中期（约30~90 d），竹节愈伤组织生长速度逐渐快于根颈；到了后期（约90~135 d），后者的累计生长量逐渐超过了前者。经过150 d培养，以竹节为外植体平均愈伤组织鲜重为 $2\ 618 \pm 230$  mg；以无菌苗根颈为外植体平均愈伤组织鲜重为 $2\ 908 \pm 170$  mg。说明无菌苗根颈具有更旺盛的生命力。就愈伤组织结构而言，同样可分为2种类型，第一类为深黄色，质地紧密，具瘤状结构；第二类则为乳白色，质地疏松，继代培养后增殖速度较快，一般2种愈伤组织混合而生。细胞悬浮培养时，需精心挑选才能获得满意的结果。

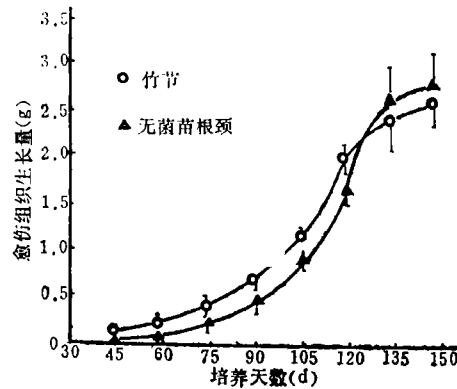


图1 不同原始材料竹愈伤组织累计生长量

### 2.2 悬浮细胞的培养与增长

选取属于第二类的愈伤组织约1 g，分别培养于含有25 mL不同浓度2,4-D的液体培养基中，在摇床上经10 d暗培养后将培养物过100目滤网滤去残渣，将单细胞及细胞团按1:1稀释率，每15 d继代培养1次，直至达到稳定的悬浮细胞系的建立。与一般草本植物相比，悬浮培养中的黄竹细胞增长较慢，就细胞数而言，通常在30~45 d出现对数生长期高峰，其最终增殖率可达8~10倍。黄竹愈伤组织经悬浮培养后，其分散性能良好，多数呈单细胞或5~10个细胞聚集的小细胞团，少数为50~60个细胞以上的细胞团；就细胞形状而言，大致可分为3类（图2-A）：Ⅰ类为近圆形细胞，此类胞体较小，长宽比例相近，细胞核大，细胞质浓，具有很强的分裂能力；Ⅱ类为长形细胞，细胞长宽比例大约3:1，此类细胞仍属正常分裂与生长的细胞；Ⅲ类为异形化细胞，这类细胞多数体积很大、形状极不规则，有的细长弯曲，有的大小极不均衡，在悬浮培养初期游离于培养液中比例较高，随着继代培养次数的增加，其比例逐渐减少。

培养基中的2,4-D浓度对悬浮培养的竹细胞生长与增殖影响很大（图3），其浓度一般在0~9 mg/L范围内，细胞的生长有随着2,4-D浓度的增加而增加的趋势。就总体而言，悬



圆形、高活力的悬浮细胞, 特别是以无菌苗根颈诱导的愈伤组织建立的悬浮细胞系, 经酶解后获得的原生质体产量较高、活力较强。然而对于各类竹种, 如何提高悬浮细胞的原生质体的分离率仍有待进一步深入研究。

**2.3.2 无菌苗叶片** 用锐刀轻刮新鲜、刚展叶的无菌苗叶片表面, 将其切成1 mm左右细条, 按1:10 (W/V) 置于酶混合液中, 经40~50 rpm摇床上28 ℃暗培养16~20 h, 所得酶解液经200目过滤以及离心纯化后, 原生质体产量约为每克鲜重  $5 \times 10^5$  个。黄竹叶片为等面叶, 叶肉中无栅栏与海绵组织之分(图2-B)。经酶解后多数从切口的细胞开始分离成密集的原生质体, 然后逐渐游离于酶解液中(图2-C、D)。一般叶片分离的原生质体产量较悬浮细胞高, 但大小不均, 其活力经检测均达到80%以上。有关原生质体培养等方面的研究工作, 目前正在深入进行中。

### 参 考 文 献

- 1 阙国宁, 诸葛强. 竹子愈伤组织培养与植株再生. 竹子研究汇刊, 1991, 10(4): 79~80.
- 2 Nadgir A L, Phadke C H, Gupta P K, et al. Rapid Multiplication of bamboo by tissue culture. *Silvae Genetica*, 1984, 33(6): 219~223.
- 3 Huang L C, Huang B L, Chen W L. Tissue Culture investigations of bamboo IV. Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices. *Env. Exp. Bot.*, 1989, 29(3): 307~315.
- 4 Huang L C, Huang B L, Chen W L. Tissue culture investigations of bamboo V. Recovery of callus from protoplasts of suspension-cultured bambusa cells. *Bot Bull. Acad. Sin.*, 1990, 31, 29~34.
- 5 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 1962, 15(2): 473~497.
- 6 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 52~54.
- 7 Dixon R A. *Plant cell culture, a practical approach*. Oxford, England, IRL press Limited, 1985. 184~186.

## Study on Cell Suspension Culture and Isolation of Protoplast of *Dendrocalamus membranaceus*

Que Guoning Zhuge Qiang

**Abstract** Root crowns of plantlets and young stems with joint of *Dendrocalamus membranaceus* Munro were cultured on MS agar medium supplemented with 5 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L KT and 200 mg/L LH, calli in rapid growth were formed. Then, the calli were transferred to a liquid medium with the same medium composition or with diverse levels of 2,4-D, the cell suspension culture which consisted mainly of cell or cell aggregates, was established. A great amount of protoplasts were released from mesophyll of sterile seedlings and cell suspension cultures, with protoplast yields  $5 \times 10^5$ /gFW and  $2.5 \times 10^5$ /gFW respectively, and viability above 80%.

**Key words** *Dendrocalamus membranaceus*, cell suspension culture, protoplast isolation

Que Guoning, Professor, Zhuge Qiang (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400).