

文章编号: 1001-1498(2002)02-0247-05

晚松悬浮细胞系的建立和原生质体的分离

张守英, 阙国宁

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: 晚松; 悬浮细胞系; 原生质体分离

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

植物悬浮细胞系的建立和原生质体的分离已被广泛地应用于生理学、生物化学、细胞学、遗传学及分子生物学的研究,它是生物技术中进行原生质体培养、杂交、基因转移、突变系筛选等项研究的较理想手段^[1]。针叶树在这方面的研究起步虽晚,但至今已取得令人瞩目的进展^[2]。

晚松(*Pinus serotina* Michx.)原产于美国东南部沿海地区,是重要的经济用材树种,我国已于60年代进行了引种。从晚松的组培看^[3],它是再生能力较强的一个树种,是一个进行基础性探索研究很理想的材料,晚松细胞培养和原生质体分离及培养方面的研究国内外未见报道。本文采用晚松成熟种子胚诱导愈伤组织,筛选并继代培养,从而建立分散性好、活力高的悬浮细胞系,经过酶解,分离出高活力的原生质体。为进行晚松的原生质体培养、基因导入及细胞融合等研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的诱导

本试验以优良的晚松成熟种子(由本所国外松课题组提供)为外植体,经过水清洗后用 $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4$ 消毒1 min,冲洗干净后,浸于清水中3~4 d,使其种胚萌动。剥去外皮,先后用体积分数为75%的酒精溶液表面消毒30 s,无菌水清洗3次后,置于 1.5 g L^{-1} 的 HgCl_2 溶液约3~4 min,无菌水再清洗5次,在无菌条件下取出种胚,接种于愈伤组织诱导培养基中。基本培养基选择MS, pH 5.7,置于 25 ± 2 的培养室中,分为光培养和暗培养两种,每种培养有3种诱导培养基(见表1),每种培养基接种30个外植体。1个月后愈伤组织出现,通过比较筛选出最适条件的培养基,选取淡绿色松散的愈伤组织,每4周继代培养1次。

1.2 悬浮细胞系的建立

将培养了6个月龄的生长旺盛、质地松散的愈伤组织约1 g移到25 mL液体培养基中:基本培养基为MS,附加水解乳蛋白 200 mg L^{-1} ,KT 0.2 mg L^{-1} ,2,4-D的质量浓度为0、2.5、5.0 mg L^{-1} ,蔗糖 30 g L^{-1} 。而后置于约 100 r min^{-1} 的摇床上,在 25 ± 2 黑暗条件下进行振荡培

收稿日期: 2001-09-18

基金项目: 国家林业局“亚热带林木培育重点实验室”基金项目(1998~1999年)

作者简介: 张守英(1968-),女,黑龙江加格达奇人,助理研究员。

养。8~10 d 继代1次,定期观测细胞的生长量^[4]。

1.3 原生质体的分离

选取培养3个月继代培养各个生长时期的悬浮细胞,经离心沉降取沉淀细胞加等体积酶液,酶液组成为:(1) 10 g L⁻¹纤维素酶(Onozuka R-10) + 2.5 g L⁻¹果胶酶(Pectinase Serva), (2) 20 g L⁻¹纤维素酶(Onozuka R-10) + 2.5 g L⁻¹果胶酶(Pectinase Serva), (3) 20 g L⁻¹纤维素酶(Onozuka R-10) + 2.5 g L⁻¹果胶酶(Pectinase Serva) + 10 g L⁻¹半纤维素酶,分别加入 7 mmol · L⁻¹CaCl₂ · 2H₂O、100 g L⁻¹甘露醇、5 mmol L⁻¹MES 制成酶混合液,pH5.6。酶混合液经过离心取上清液,用0.45 μm的滤膜过滤灭菌,酶解物置于摇床(30~40 r min⁻¹)上,25 ± 2 黑暗条件下酶解4~5 h。酶解混合液经100 μm的尼龙网过滤,除去大细胞团。酶解液低速离心500 r min⁻¹,收集的原生质体用洗液洗涤3次,经纯化的原生质体用血球计数器法计数,算出晚松悬浮细胞每克鲜样的原生质体产量,原生质体活力用伊文思蓝法(Evans blue)检测^[5]。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导与筛选

晚松种胚接种2周后开始膨大,4周后出现愈伤组织。从试验可以看出晚松成熟胚在光培养与暗培养下愈伤组织诱导的类型不同,暗培养下诱导的愈伤组织为白色,粘质或水浸状,继代培养不增殖,逐渐褐化死亡,所以晚松愈伤组织的诱导不适于暗培养。而光培养下诱导的愈伤组织为淡绿色,略为疏松或紧密,继代培养后呈疏松状态,增殖较快(见图版 - 1)。基本培养基选用MS,添加不同浓度的2,4-D和KT(见表1),试验结果表明MS + KT 0.2 mg L⁻¹ + 2,4-D 2.5 mg L⁻¹培养基为最适,诱导的愈伤组织呈淡绿色较疏松,生长正常,愈伤组织诱导率达80.0%,此培养基为继代培养基,筛选出的愈伤组织每月继代1次,继续增殖。

表1 晚松光培养下愈伤组织诱导情况

序号	基本培养基	2,4-D 质量浓度/ (mg L ⁻¹)	KT 质量浓度/ (mg L ⁻¹)	原植数/ 个	愈伤组织诱导数/ 个	诱导率/ %
1		1.0	0.1	30	16	53.3
2	MS	2.5	0.2	30	24	80.0
3		5.0	0.3	30	22	73.3

2.2 悬浮细胞系的建立及生长状况

选取淡绿色、疏松易碎的愈伤组织约1 g,分别培养于25 mL KT为0.2 mg L⁻¹,2,4-D的质量浓度分别为0、2.5、5.0 mg L⁻¹的MS₁、MS₂、MS₃液体培养基中,在100 r min⁻¹摇床上悬浮培养。8~10 d 继代1次,用吸管吸取底部的单细胞或小细胞团按1:1的稀释率,直至达到稳定的悬浮细胞系建立(见图版 - 2~5)。

图1是不同2,4-D质量浓度对晚松悬浮细胞生长的影响情况,当在MS₁培养中,细胞增殖慢,增殖率很低,细胞呈大的团块状,在MS₃培养中,细胞增殖的速度快,生长周期短,细胞进入对数生长期后,很快进入静止期和衰亡期。而在MS₂培养中,细胞增殖率高,生长较正常,4~6 d之间为对数生长期,6~10 d之间为直线生长期,10~14 d之间为细胞缓慢增长期,14 d以后悬浮细胞数减少,细胞逐渐衰老自溶变成灰褐色,因此认为2,4-D的最适浓度为2.5 mg L⁻¹,

继代周期为 8~10 d。

图 2 是细胞在 MS₂ 中培养 16 d 的悬浮培养周期中 pH 值的变化动态。培养初期培养液的细胞处于缓慢增殖的延迟期,pH 值开始迅速下降,到第 4 d 随着细胞的生长,pH 值由低逐渐升高,细胞的增殖速度也显著加快,到第 10 d pH 值升高到 4.9 后,又开始逐渐下降,细胞进入缓慢增殖期和静止期。

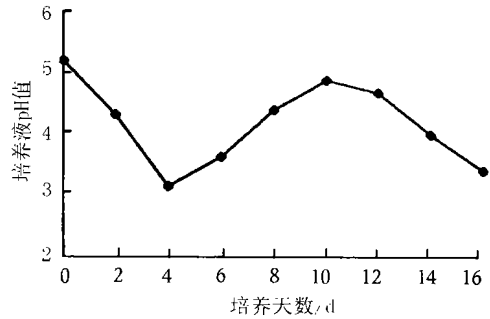
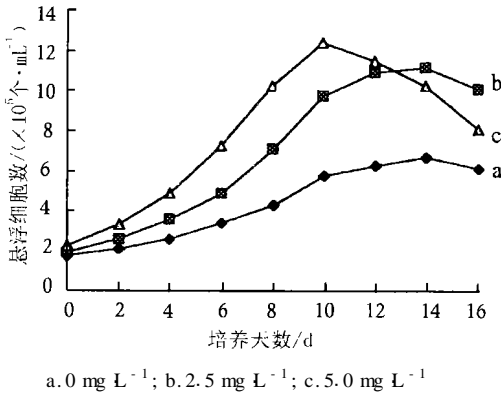


图 1 不同质量浓度的 2,4-D 对悬浮细胞生长的影响

图 2 晚松悬浮细胞培养液在培养周期内 pH 值的变化

2.3 原生质体的分离

2.3.1 酶液组成对原生质体分离的影响(见图版 - 6,7) 采用 3 种不同的酶液分离晚松悬浮细胞的原生质体,结果(表 2)表明 2 号酶液分离的悬浮细胞的原生质体产量和原生质体活力均最高,分别为 5.9×10^5 个 g^{-1} (FW)和 71.0%。

表 2 酶液组成对原生质体产量和活力的影响

酶液编号	酶液组成	原生质体产量/($\times 10^5$ 个 g^{-1})	原生质体活力/ %
1	10 g L ⁻¹ 纤维素酶、2.5 g L ⁻¹ 果胶酶	3.1	61.3
2	20 g L ⁻¹ 纤维素酶、2.5 g L ⁻¹ 果胶酶	5.9	71.0
3	20 g L ⁻¹ 纤维素酶、2.5 g L ⁻¹ 果胶酶、10 g L ⁻¹ 半纤维素酶	2.7	52.0

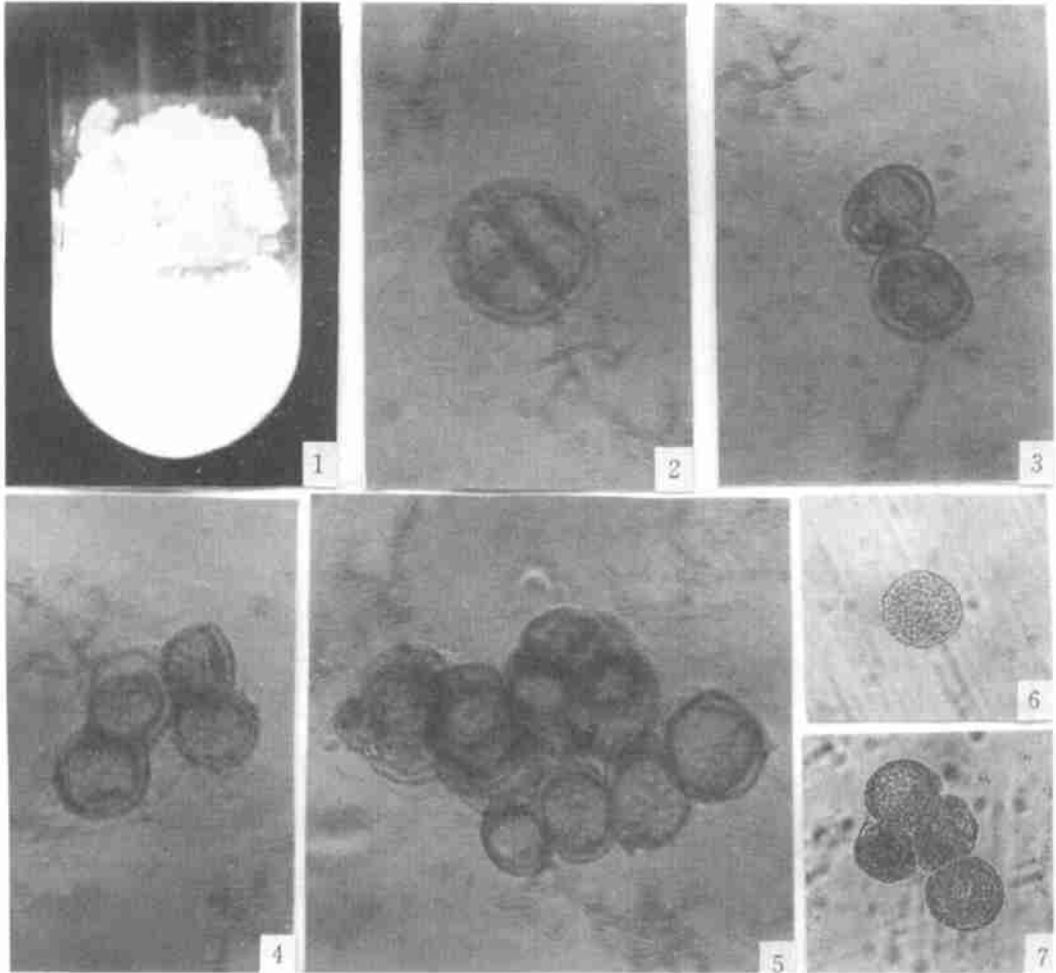
2.3.2 悬浮细胞生长期对原生质体分离的影响 取晚松悬浮系中不同生长时期的悬浮细胞,用 2 号酶液分离原生质体。结果(表 3)表明对数生长期的悬浮细胞的原生质体产量和原生质体活力均最高,分别为 5.7×10^5 个 g^{-1} (FW)和 70.4%。

表 3 悬浮细胞生长期对原生质体产量和活力的影响

悬浮细胞生长期	原生质体产量/($\times 10^5$ 个 g^{-1})	原生质体活力/ %
延迟期	3.1	59.0
对数生长期	5.7	70.4
线性生长期	4.3	63.0
减慢期	3.2	52.0
静止期	2.6	47.8

通过本试验研究,建立了分散性良好的晚松悬浮细胞系,并确定了分离悬浮细胞原生质体的最佳酶液组成和悬浮细胞生长期。但由于技术与设备等原因,所分离的原生质体的数量与

质量尚有待进一步改进。鉴于晚松组培的再生能力很强,所以晚松原生质体培养及植株再生的研究值得进一步深入的探索。



图版

1. 晚松愈伤组织; 2~5. 悬浮培养中圆形细胞分裂为二细胞、四细胞、细胞团(×200);
6,7. 悬浮细胞分离的原生质体(×200)

参考文献:

- [1] 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 1~19, 36~48
 [2] 诸葛强, 阙国宁. 杉木悬浮细胞系的建立和原生质体的分离[J]. 林业科学研究, 1992, 5(6): 628~632
 [3] 阙国宁, 房建军, 葛万川, 等. 火炬松、湿地松、晚松组培繁殖的研究[J]. 林业科学研究, 1997, 10(3): 227~232
 [4] 汪德耀. 细胞生物学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1981. 172~200
 [5] Dixon R A. Plant Cell Culture: a Practical Approach[M]. England: IRL Press Limited, 1985. 184~186

Establishment of Cell Suspension Culture and Isolation of Protoplast of *Pinus serotina*

ZHANG Shouying, QUE Guoning

(The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract : Callus was induced by embryos from mature seeds of *Pinus serotina* with MS medium contained 0.2 mg L⁻¹ of KT and 2.5 mg L⁻¹ of 2,4-D. After successive subculture and selection, six-month-old callus were transferred to a liquid medium with 0.2 mg L⁻¹ of KT and 0~5.0 mg L⁻¹ of 2,4-D and 200 mg L⁻¹ of LH for vibration culture, the suspension-cultured cell lines were established with favorable dispersivity. A great amount of protoplasts were released from three-month-old cell suspension cultures, and protoplast yield and protoplast viability of suspension cells on linear phase are the highest under the enzyme combination cellulase R-10 2% + pectinase 0.25%.

Key words : *Pinus serotina*; cell suspension culture; protoplast isolation

《菌物词典》第九版简介

Dictionary of Fungi, 9th Edition, by P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David and J. A. Stalpers, CAB International, 2001, 655 pp. ISBN 085199377 X. Price \$ 90.00

《菌物词典》第九版最近由英国著名的 CAB International 出版,该词典提供了菌物界中门、纲、目、科和属的名称及每个分类单元所包括种类的数量,每个分类单元所属的上一级分类单位,凡是与菌物的形态、生理、生态、病理、培养、栽培、杀菌剂、共生、真菌毒素等有关的名词、名称进行了解释,对有些重要结构进行了绘图,对一些著名菌物学家进行了简介,可以说该词典是有关菌物学的百科全书。

新版《菌物词典》与 6 年前的第八版相比,有如下几个主要特点:

1. 编辑者由过去的 D. L. Hawksworth, P. M. Kirk, B. C. Sutton 和 D. N. Pegler 变为 P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David 和 J. A. Stalpers. 因此只有 P. M. Kirk 是上一版的作者。

2. 结合近 10 年分子生物学的研究结果,特别是对核糖体 DNA 序列的分析结果,对子囊菌门分类系统进行了修正,该新系统承认 6 个纲,55 个目,291 个科。

3. 担子菌纲分类系统的修正,该系统由第八版的 32 个目减少到 16 个目,一些重要的变化如:将马勃科由过去的马勃目放到伞菌目中,将硬皮马勃科由过去的硬皮马勃目放到牛肝菌目中,将韧革菌科由过去的韧革菌目放到红菇菌目中,将牛排菌科由过去的牛排菌目放到伞菌目中等。有些由过去的属提升为科,有些由过去的目降为科等。因此熟悉过去系统的学者很快会发现这个新系统在很多地方打破了过去的体系。

4. 将半知菌重新加到词典中,但只是将所有属名罗列在词典中,并未建立分类系统。

5. 与第八版相比,缺少纲目科的检索表。

6. 该词典还建议了 7 个新目,9 个新科,提升了 1 个亚目为目,1 个亚科为科。

由于此版对原有的分类系统作了较大的变动,很多形态相近,过去在同一目中的科被放到了不同的目中,这个新的体系是否能够被菌物学者广泛接受还有待于时间的考证。该版的不足之处是很多属、科或目的新信息及进展没有反映到词典中,有些甚至是 10 年以前的资料,因此该词典提供的关于一些属、科及目中种类的数量并不准确,一些参考文献也已过时。

《中国科学院沈阳应用生态研究所,戴玉成》