

# 绞股蓝悬浮细胞的原生质体再生植株

张航宁 吴琴生 刘大钧

(南京农业大学细胞遗传所 南京 210095)

绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak.) 是葫芦科多年生草本药用植物, 现已得到广泛的开发利用, 本文首次报道了绞股蓝悬浮细胞的原生质体再生植株。

## 1 材料和方法

### 1.1 绞股蓝悬浮培养系统的建立

绞股蓝幼茎切段经表面消毒后在含 1mg/L 2, 4-D 和 0.2mg/L KT 的 MS 固体培养基上诱导愈伤组织, 愈伤组织转移到含 0.5mg/L 2, 4-D, 1mg/L NAA 和 0.1mg/L KT 的 MS 液体培养基中, 经振荡培养形成了增殖快速, 分散均匀, 含有大量胚性细胞团的悬浮细胞系。

### 1.2 原生质体的游离和培养

将继代培养 4d 的绞股蓝悬浮细胞 2ml 放入含 20ml 酶液的三角烧瓶中 (酶液组成为 2% Cellulase RS+0.1% Pectolyase Y-23+0.55mol/L 甘露醇+CPW 盐, pH=5.8), 27℃ 下缓慢振荡 (30r/min) 5h 后, 用 300 目尼龙网过滤, 滤液在 400r/min 下离心 5min, 收集其中的原生质体, 用含 1mmol/L 氯化钙和 0.55mol/L 甘露醇溶液洗两次, 用原生质体培养基洗一次, 将原生质体密度调至  $1 \times 10^6$ /ml, 悬浮于原生质体培养基中。在直径为 3cm 的小培养皿中滴入 1ml 悬浮有绞股蓝原生质体的培养基, 并使其在培养皿底部均匀地铺成一薄层, 27℃ 散射光下培养。

### 1.3 绞股蓝原生质体培养再生愈伤组织和植株分化

将绞股蓝原生质体培养 4 周后肉眼可见的小细胞团转到 MS+0.5mg/L 2, 4-D, 0.1 mg/L KT 的固体培养基上, 使其长到 0.5cm 后, 转移到 MS+1mg/L KT+0.5mg/L IAA 的固体培养基上, 出现绿色胚状体后, 再转移到 MS+1mg/L 6-BA+0.5mg/L IAA 的培养基上分化出茎叶, 最后在不含激素的 MS 固体培养基上发育成完整植株。

## 2 结果

### 2.1 绞股蓝悬浮培养系统的建立

由绞股蓝幼茎诱导形成的淡黄色、颗粒状胚性愈伤组织很适于建立起增殖快速、分散均匀的悬浮系 (图版 1-1), 镜检可以看到, 其细胞呈球形, 内含物丰富, 细胞分裂旺盛, 因而也特别适于原生质体游离, 并获得较高的原生质体分裂频率。

### 2.2 绞股蓝原生质体的游离和培养

每毫升绞股蓝悬浮细胞经酶解能得到  $7.5 \times 10^6$  个原生质体, 刚游离得到的原生质体呈球形, 大小基本一致, 细胞质浓厚, 内含物丰富 (图版 1-2), 在合适的培养基中, 第 2 天开始复壁, 第 4 天出现第一次分裂 (图版 1-3), 2 周后形成含数十个细胞的细胞团 (图版 1-4), 4 周后即能形成肉眼可见的小愈伤组织 (图版 1-5)。

本研究试验了几种常用的培养基对绞股蓝原生质体培养的影响, 结果见表 1。IM 和 KM 培养基含有丰富的氨基酸、维生素等有机成分, 原生质体在其中的分裂频率和植板率都很高, MS 培养基也能使

纹股蓝原生质体正常地持续分裂,但频率要低于 IM 和 KM 培养基。

表 1 不同培养基对纹股蓝原生质体培养的影响

培养基	NT <sup>(1)</sup>	MS <sup>(2)</sup>	IM <sup>(3)</sup>	KM <sup>(4)</sup>
分裂频率 (%) <sup>*</sup>	2.20	15.2	32.5	47.3
植板率 (%)	0.75	8.30	26.5	25.2

\*: 10 天后的分裂频率

### 2.3 纹股蓝原生质体再生愈伤组织和植株分化

纹股蓝原生质体形成的小愈伤团在 MS+0.5mg/L 2, 4-D+0.1mg/L KT 的固体培养基上增殖到 5mm 后,转移到不同的分化培养基上,3 周后即能分化出绿色胚状体(图版 1-6),再将胚状体继续接种到相同的分化培养基上,3 周后发育成带茎叶的绿色小植株,不同激素配比对胚状体发生及绿苗再生频率的影响见表 2。

从表 2 可以看出, D<sub>1</sub> 培养基上胚状体发生频率最低而绿苗分化率最高, D<sub>2</sub> 培养基上胚状体发生频率最高,绿苗分化率却最低,可见 KT 有利于胚状体的发生,而 6-BA 有利于茎叶的形成。培养基中添加玉米素也有利于胚状体发生和绿苗的形成。当幼苗长到约 3cm 高时,转移到不含任何激素的 MS 固体培养基上,4 周后发育成完整的植株。

### 3 讨论

胚性悬浮细胞系由于增殖快,分散性好而非常适于原生质体的游离和培养,同时也是植物细胞大规模培养和优良细胞系筛选的基础材料,跟大多数植物一样,纹股蓝细胞悬浮培养物经长期继代培养,也会发生细胞胚性下降甚至丧失,细胞内含物减少,并变成弯曲形。我们在继代培养 10 个月,分化能力下降到 5% 左右时,在培养基中添加 500ml/L 水解酪蛋白和 0.1mol/L 脯氨酸,同时把 2, 4-D 水平降至 0.1mg/L,并不断选择较致密的细胞团继代,这样 1 个月,悬浮细胞分化能力又恢复到 52%。

培养基组成对原生质体培养的影响也很大, KM 和 IM 培养基较适合纹股蓝原生质体,特别是低密度下原生质体的培养,但由于这些培养基成分复杂,药品价格较贵,配制困难,实验重复性也较差。MS 是普遍采用的一种培养基,我们采用结合看护培养的方法,使植板率由浅层培养的 13.4% 上升到 20.5%。我们也曾试图用 MS 培养基中提高原生质体培养密度的方法来提高原生质体分裂频率,但由于高密度下极易发生原生质体的粘集,反而使分裂频率降低,所以我们认为 MS 培养基结合看护培养是纹股蓝原生质体培养的理想方法。

### 参 考 文 献

- [1] Nagata T *et al.* *Planta*, 1971, **99**: 12~20.
- [2] Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant*, 1962, **15**: 473~477.
- [3] Hame B *et al.* *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1989, **86**: 6157~6160.
- [4] Kao K N, Michayluk M R. *Planta*, 1975, **126**: 105~110.

表 2 植物激素对胚状体发生和绿苗再生频率的影响

培养基	激素组合 (mg/L)	胚状体发生 频率 (%) <sup>*</sup>	绿苗分化频率 (%) <sup>**</sup>
D <sub>1</sub>	6-BA 1 IAA 0.5	15.5	78.5
D <sub>2</sub>	KT 1 IAA 0.5	32.0	46.4
D <sub>3</sub>	6-BA 0.5 KT 0.5 IAA 0.5	16.1	51.6
D <sub>4</sub>	6-BA 0.25 KT 0.25 Zeatin 0.1 IAA 0.5	28.8	53.5

注:基本培养基均为 MS。

\* 原生质体再生愈伤组织在分化培养基上球形胚形成频率。

\*\* 胚状体在分化培养基上绿苗形成的频率。

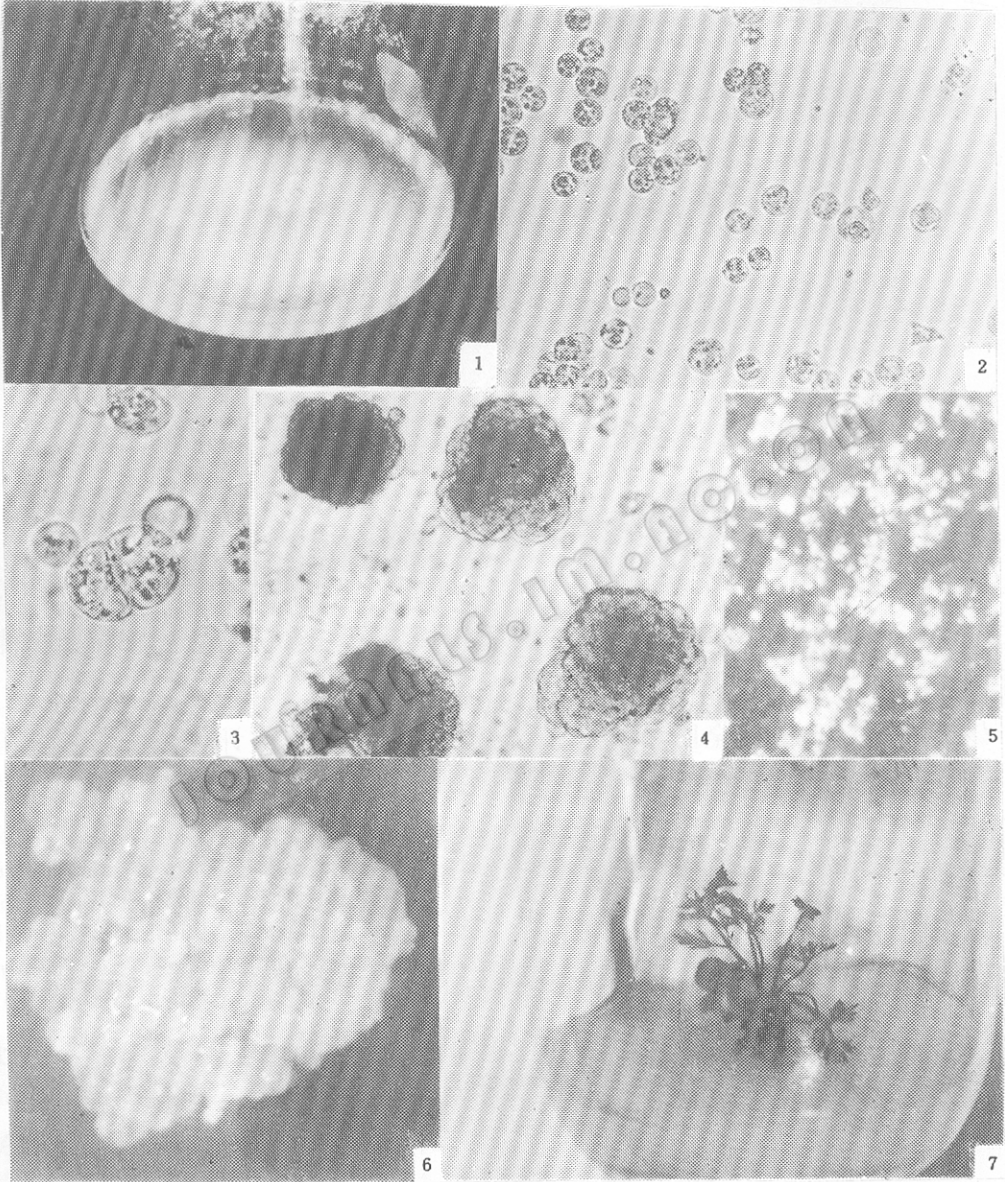
## Protoplast Culture and Plant Regeneration from the Suspension Cells of *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak.

Zhang Hangning Wu Qinsheng Liu Dajun

(Cytogenetics Institute, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

**Abstract** While the embryogenic callus induced from young stems of *G. pentaphyllum* on MS medium with 1mg/L 2,4-D and 0.2mg/L KT were cultured in MS liquid medium on a rotary shaker, stable embryogenic suspensions were established. A high yield of protoplasts could be released from the suspension cells incubated in a enzyme solution containing 2% cellulase RS, 0.1% pectolyase Y-23, 0.55mol/L mannitol and CPW salt for 5 hours. These protoplasts were cultured in different medium with liquid and nurse culture method. Cell division was observed within 4 days and microcalli were formed within 4 weeks. After proliferating, protoplast-derived callus differentiated into embryoid on MS solid medium with 1mg/L KT and 0.5mg/L IAA. Stems and leaves were formed on MS medium with 1mg/L 6-BA and 0.5mg/L IAA. Finally, complete plantlets were obtained on hormone free MS solid medium.

**Key words** *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak., suspension cells, protoplast, plant, regeneration



1. Suspension cell culture of *Gynostemma pentaphyllum*
2. Fresh protoplasts isolated from suspension cells of *G. pentaphyllum*
3. First cell division of the protoplast
4. Protoplast derived cell cluster
5. Protoplast-regenerated microcalli
6. Embryogenesis of the regenerated callus
7. Protoplast regenerated plantlet