

诸葛菜叶柄原生质体培养再生植株

罗科* 罗鹏

(四川大学生物系, 成都)

本文首次报道用诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*) 试管苗叶柄为材料分离原生质体, 经培养再生了植株。用于原生质体培养的基本培养基为Nitsch培养基, 附加 100mg/L 丝氨酸, 800mg/L 谷氨酰胺和13%的蔗糖, 激素成分为0.5mg/L BA, 0.5mg/L NAA和 1mg/L 2,4-D(或0.5mg/L BA和2mg/L 2,4-D)。原生质体的培养密度为 2×10^5 /ml。培养7天的原生质体分裂频率约为40%。在附加0.05mg/L NAA和3mg/L BA的MS分化培养基上, 愈伤组织可分化出大量的芽和苗, 分化频率为100%。

关键词 诸葛菜, 叶柄原生质体; 原生质体培养; 植株再生

诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus*), 又名二月兰, 翠紫花, 是一种十字花科观赏植物, 在我国许多城市都有栽培^[1]。最近又发现诸葛菜是一种珍贵的油料植物种质资源^[2,3]。诸葛菜种子的油脂成分具有芥酸、亚麻酸含量低、亚油酸含量高等优点^[3]。如果能将这些优良性状转移到油菜中去, 无疑会使油菜的品质得到很大的改良。徐晓昕等(1988)曾培养诸葛菜叶肉原生质体获得了再生植株, 并证明诸葛菜叶肉原生质体具有极强的再生能力^[4]。我们对诸葛菜试管苗的叶柄原生质体培养进行了研究, 获得了再生植株, 发现叶柄也是原生质体的优良供体材料。

材料与 方法

(一) 材料

诸葛菜的种子经0.1% HgCl_2 表面灭菌后, 接种到0.5%琼脂培养基上, 在光照下发芽, 当幼苗长到5cm时, 取茎尖在附加3mg/L BA和0.05mg/L NAA的MS培养基上进行茎尖繁殖。无菌苗长到合适

大小时, 取叶柄作为分离原生质体的材料, 同时将茎尖或腋芽在同样的培养基上作继代繁殖。

(二) 原生质体的分离

将100个叶柄(约7—10g)切成0.5—1mm长的小段, 立即投入酶溶液中。酶溶液的组成为1%纤维素酶Onozuka R10和0.2%离析酶 Macerozyme R10, 用含有3%蔗糖, 0.4mol/L甘露醇和1480mg/L CaCl_2 的洗涤液配制。材料在26℃下静置保温酶解。酶解约16h后, 适当摇动酶液, 以利于原生质体从组织中释放出来。随后将酶和原生质体的混合物通过200目孔径的铜丝网过滤。滤过的原生质体-酶溶液在400r/min下离心3min, 收集漂浮在溶液表面的原生质体。先用洗涤液在同样的离心条件下将原生质体洗涤2次, 再用培养基洗涤1次。

(三) 原生质体的培养

将原生质体悬浮于培养基中并将原生质体的密度调节至 1×10^4 — 2×10^5 /ml。原生质体在6cm直径的培养皿中于黑暗中

本文于1990年12月7日收到。

* 现在中国科学院成都生物研究所工作。

做浅层静置培养, 每个培养皿含2—4ml培养液。培养温度为26℃。

用于原生质体培养的基本培养基为Nitsch培养基, 内含13%的蔗糖, 并附加100mg/L 丝氨酸和800mg/L 谷氨酰胺。激素成分为0.5mg/L BA, 0.5mg/L NAA和1mg/L 2,4-D(或0.5mg/L BA和2mg/L 2,4-D)。

原生质体培养10天以后, 在每个培养皿中加入新鲜培养基0.5—1ml, 以促进原生质体的生长。以后每隔1周加液1次, 并逐步降低培养基的渗透压。

(四) 植株再生

原生质体经过4—6周的培养后, 将适当大小的愈伤组织转移到分化培养基上, 在光照下诱导植株分化。分化培养基为MS, 附加3mg/L BA, 并配合一定量的2,4-D或NAA。

结果与讨论

(一) 原生质体的分离

材料经保温酶解16h后, 适当摇动酶液, 便有大量的原生质体从叶柄组织中释放出来($3-4 \times 10^5$ /g)。试验中发现, 这些原生质体具有很高的漂浮性, 即便在低浓度蔗糖溶液(3%蔗糖+0.4mol/L甘露醇)中也是这样。这可能是因为试管苗叶柄组织的细胞液泡化程度较高的缘故。这种漂浮性非常有利于原生质体的纯化和收集。在原生质体的洗涤过程中, 离心后原生质体和碎片被分开, 完整的原生质体都集中在离心管中液体的表面, 而碎片等杂质则沉降在离心管的底部(图版I-1)。集中在液面的原生质体纯度很高, 并且很容易收集。经过这样几次洗涤和离心漂浮后, 最终得到的原生质体十分纯净。原生质体的漂浮不仅有利于原生质体的纯化,

对原生质体的培养可能也有意义^[7,8]。

(二) 原生质体的培养

刚分离出的原生质体具有很高的透明度, 直径在30—80μm之间(图版I-2)。原生质体在分裂前透明度显著降低, 折光性加强。在所试的2种不同激素配比的培养基上, 原生质体的初期表现较为相似。培养约2天后, 出现原生质体的第1次分裂(图版I-3)。随后细胞持续分裂形成细胞团, 并进一步形成小愈伤组织(图版I-4,5)。

随着细胞团的进一步生长, 不同培养基上细胞团的结构出现了一些差别。在不含NAA的培养基上, 细胞团较为致密; 在含有NAA的培养基上则显得相对松散。这种现象在诸葛菜叶肉原生质体的培养中也有类似的报道。徐晓昕等(1988)曾观察到当BA和NAA配合使用时, 由叶肉原生质体形成的细胞团通常呈分散的小颗粒状, 而BA和2,4-D配合使用时则没有这种现象出现^[4]。在我们的试验中, 培养基加入NAA时细胞团虽然显得松散, 但并不呈小颗粒状, 这可能是培养基中同时含有2,4-D的原因。但在两种培养基上原生质体的分裂频率却相似。

原生质体密度对原生质体的分裂有较大的影响。我们发现较高的原生质体密度有利于诸葛菜叶柄原生质体的分裂。当原生质体密度较高时(2×10^5 /ml), 原生质体的分裂快, 分裂频率较高, 培养7天后进行观察, 分裂频率大约在40%左右。降低原生质体的密度(1×10^4 /ml), 原生质体的分裂频率显著降低, 大约只有10—20%。Chuong等(1985)在油菜原生质体培养中曾报道过类似的现象, 他们还发现在高密度下原生质体形成的愈伤组织比低密度下原生质体形成的愈伤组织小^[7], 而我们则观察到虽然高密度原生质体的分

裂频率较高,但及时补加培养液时,愈伤组织的大小并无多大的差异。据试验,补加培养液最好是在培养后的10—15天进行。这时加液,不仅可有效地防止褐化现象,还可促进细胞团的生长。但如果培养中的原生质体密度较低($<10^5/\text{ml}$),即便不补加培养液,也很少出现褐化。

在十字花科油料植物的原生质体培养中,原生质体生长缓慢已被认为是导致褐化的重要因素之一^[8,9],这也可以解释出现上述现象的原因。原生质体会分泌出一些有害的代谢物并在培养基中积累。当原生质体密度高时,有害代谢物在培养基中的积累快、浓度高,如不及时稀释,便会抑制原生质体的生长并导致褐化发生。相反,原生质体密度低,有害代谢物在培养基中的积累速度慢,因而对原生质体的影响较小。此外,原生质体密度较高,培养时培养基中的营养成分消耗也较快,如不及时补加培养液,便会减慢原生质体的生长,从而加剧褐化的发生。

当愈伤组织长到一定大小时(约0.5 mm),生长往往变得十分缓慢,甚至停止,这时即便再补加培养液,也无多大的改变。这可能是由于愈伤组织的生长需要更好的透气性。因此,愈伤组织应及早转移到分化培养基上,否则,在液体培养基中培养的时间过长,会导致愈伤组织

的死亡。

(三)植株的再生

愈伤组织转移到分化培养基上后,一般经过约3周的时间出现分化。试验证明,诸葛菜叶柄原生质体愈伤组织也具有极强的分化能力,但在不同激素配比的培养基上愈伤组织的分化方式不同。我们的实验结果表明,在附加3mg/L BA和0.05 mg/L NAA的培养基上,愈伤组织先变得深绿,形成大量的芽点,随后长出许多芽和苗(图版I-6),分化频率为100%,而在附加3mg/L BA和0.5mg/L 2,4-D的培养基上,愈伤组织并不变绿,也不出现芽点,而是产生许多类似胚状体的结构。当转移到上述附加BA和NAA的培养基上后,这些胚状体结构很快便形成小苗,分化频率仍为100%。但如果让愈伤组织长期停留在含2,4-D的培养基上,这些结构则逐步转变的愈伤组织。可见,2,4-D对胚状体的进一步发育是不利的。

以上结果进一步证明了诸葛菜是一个再生能力极强的物种。同时也表明试管苗的叶柄在诸葛菜中也是原生质体的优良供体组织。从叶柄容易分离原生质体,原生质体易纯化,易分裂,再生频率高。诸葛菜叶柄原生质体的这些特性使它完全可以用于细胞融合及各种遗传操作的基础研究。

参 考 文 献

- [1] 俞德浚:作物品种资源, 4:1—8, 1985.
- [2] 张兆清等:西南农业学报, 3(3):19—22, 1990.
- [3] 曹熙德、李子先:天然产物研究与开发, 1:(2)71—74, 1989.
- [4] 徐晓昕, 许智宏:植物生理学报, 14(2):170—174, 1988.
- [5] 徐晓昕, 许智宏:实验生物学报, 20:503—508, 1987.
- [6] Barsby, T.L. et al.:Plant Cell Reports, 5:101—103, 1986.
- [7] Chuong, P.V. et al.:Plant Cell Reports, 4:4—6, 1985.
- [8] Chuong, P.V. et al.:Plant Cell Reports, 6:67—69, 1987.
- [9] Glimelius, L.:Physiol. Plant., 61:38—44, 1984.

Plant Regeneration from Petiole Protoplast Culture of *Orychophragmus violaceus*

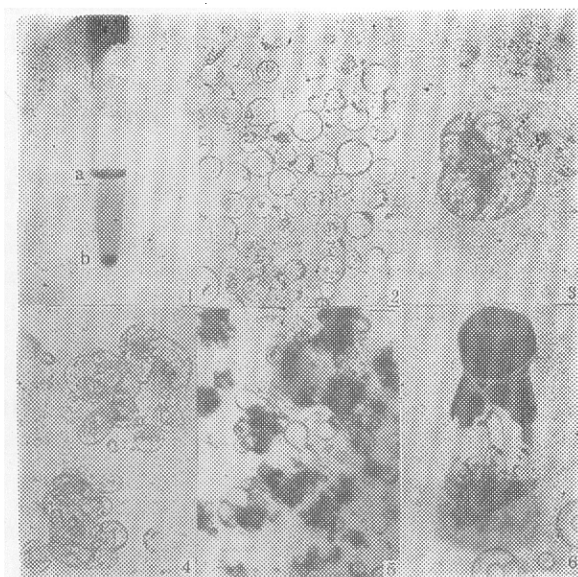
Luo Ke Luo Peng

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu)

Protoplasts were isolated from petioles of sterile seedlings of *Orychophragmus violaceus*. The medium for protoplast culture was Nitsch containing 100mg/L serine, 800mg/L glutamine, 13% sucrose and complemented with 0.5mg/L BA, 0.5mg/L NAA and 1mg/L 2,4-D (or with 0.5mg/L BA and 2mg/L 2,4-D). Protoplasts were cultured at a density of 2×10^5 /ml. The frequency of protoplast division was about 40% after 7 days of culture. On MS medium containing 3mg/L BA and 0.05mg/L NAA, the protoplast-derived calli could regenerate many shoots and the regeneration frequency was up to 100%.

Key words

Orychophragmus violaceus; petiole protoplasts; protoplast culture; plant regeneration



1. 离心后原生质体漂浮在离心管中液体的表面(a), 破碎物质集中在离心管的底部(b)

After centrifugation, protoplasts floated on the surface of the solution in the centrifugal tube (a), and debris concentrated at the bottom (b)

2. 从叶柄组织分离的原生质体

Protoplasts isolated from petiole tissue

3. 原生质体第1次分裂

First protoplast division

4. 培养10天后形成的小细胞团

Small cell colonies after 10 days of culture

5. 培养1月后形成的小愈伤组织

Microcalli after a month of culture

6. 再生小植株

Regenerated plantlets