

# 黄瓜子叶原生质体培养获得体细胞胚胎发生和再生植株

贾士荣 傅幼英 林 云

(中国农业科学院蔬菜研究所, 北京)

从6个黄瓜栽培品种、3个雌性系和2个F<sub>1</sub>杂种的子叶游离原生质体, 培养后均获得持续的细胞分裂和愈伤组织。其中37-1G×78-50F<sub>1</sub>代杂种的原生质体来源的愈伤组织, 在IAA 0.2、KT 5mg/l或不加生长素、仅加BA 2mg/l的培养基上, 产生出大量的体细胞胚, 胚状体在转至MS大量元素减半、不加任何外源激素的培养基上后, 形成了有根、芽的小植株。

**关键词** 黄瓜; 原生质体培养; 体细胞胚胎发生; 植株再生

近年来植物原生质体培养技术进展很快, 它在细胞融合、体细胞变异的选择利用、遗传转化以及病毒研究等方面的应用已显示出巨大潜力, 由原生质体培养成植株的植物种已达七十多种。但原生质体培养迄今在葫芦科重要作物上未见有成株的报道, 原因之一可能是葫芦科作物的组织培养基础较差。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是葫芦科植物中一种重要的蔬菜作物, 目前只有少数几篇有关黄瓜原生质体培养的报道<sup>[1-4]</sup>。1977年Coutts和Wood从两个黄瓜品种的子叶和第一真叶分离原生质体, 真叶原生质体培养后获得持续细胞分裂、愈伤组织和根的分化, 子叶原生质体培养未获得细胞分裂。吕德扬和Cocking (1984)由黄瓜子叶原生质体培养获得芽分化。我们于1983、1984年建立起一个黄瓜子叶原生质体培养系统, 可由黄瓜的大田和大棚主栽品种、雌性系以及F<sub>1</sub>代杂种等11个不同遗传背景材料的原生质体培养成愈伤组织<sup>[5,6]</sup>, 这里进一步报道从子

叶原生质体来源的愈伤组织获得体细胞胚胎发生和植株再生。

## 材料和方法

供试材料包括六个黄瓜栽培品种即津研2号、长春密刺、麦黄瓜、津研系统选系512、朱庄秋瓜选系及丝瓜青选系; 三个雌性系即7925G、MSU713-5、37-19G; 以及两个F<sub>1</sub>代杂种37-1G×78-50和长日落合2号。

黄瓜种子用70%酒精消毒数秒, 含活性氯0.7%的次氯酸钠浸泡10min, 无菌水淋洗4次, 接种于MS大量元素减半、

本文于1985年2月9日收到。

杨美珠同志参加了部分工作, 特此致谢。

缩写: 2,4-D; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid  
2,4-二氯苯氧乙酸;

KT; Kinetin 激动素, 6-糠基氨基嘌呤;

BA; Benzylaminopurine 6-苄氨基嘌呤;

IAA; Indoleacetic acid 吲哚乙酸;

MS; Murashige and Skoog (1962)

B<sub>6</sub> 维生素、N.Z. amine 500mg/l、无激素的固体培养基上暗培养, 发芽后转至荧光灯下, 光强 1,500 lux。

配制 4% 纤维素酶 Onozuka R10、1% 离析酶 Macerozyme R10 液, 将其溶于 0.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、7mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.5M 甘露醇、3mM MES(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) 中, pH 5.8, 渗透压 796 ± 3.2mmol/kg (用 5100C 型蒸发渗透压计测定)。将酶液与修改的 DPD<sup>[8]</sup> 原生质体培养基 (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 增至 800mg/l, 补加 2,4-D 0.5、KT 1mg/l, pH 5.8, 渗透压 466 ± 2.6mmol/kg), 按 1:1 比例混合。酶液和 DPD 培养基均用孔径为 0.45 与 0.2μm 的滤膜过滤灭菌。取子叶切成细条, 放入以上混合液中, 25—26℃ 下静止酶解 2h, 100rpm 旋转培养 3h, 酶解液用 62μm 不锈钢网过滤, 500—1000 rpm 离心 5min, 去上清液, 沉淀用修改的 DPD 培养基再悬浮, 离心, 反复洗涤原生质体 4 次后浅层暗培养在 10ml 细胞培养皿中, 每皿加原生质体悬液约 2ml。

培养 10 天左右, 用降低渗透压 (≈ 290 mmol/kg) 和激素浓度 (2,4-D 0.25, KT 0.5mg/l) 的培养基稀释。25 天后当形成直径约 1mm 的细胞团时, 将其转入 2,4-D 0.01 + BA 1mg/l (愈伤组织诱导培养基 CI<sub>1</sub>) 或 IAA 0.2 + BA 0.5mg/l (愈伤组织诱导培养基 CI<sub>2</sub>) 的修改的 MS 固体培养基上, 以诱导愈伤组织。愈伤组织随后转至 IAA 0.2、KT 5mg/l (胚状体诱导培养基 EI<sub>1</sub>) 或不加生长素仅加 2mg/l BA (EI<sub>2</sub>) 的培养基上, 使愈伤组织增殖并诱导体细胞胚胎发生。最后将胚状体转至 MS 大量元素减半、不加任何外源激素的培养基 (1/2MSO) 上, 以诱导植株再生。液体转入固体培养基后, 培养物置于 1,500 lux 荧光灯光照下, 10/14h 光/暗交替, 温度相

应为 25 ± 1℃ 及 20 ± 1℃。

## 结 果

游离后原生质体成活率一般达到 80—95% (图 1-1), 培养过程中成活率无变化。第 4 天开始一次分裂, 呈均等分裂或不均等分裂, 8 天时细胞分裂频率可达 46% (图 1-2, 3)。培养 10 天左右用降低渗透压和激素浓度的培养基稀释, 可促进细胞的进一步旺盛分裂, 形成多细胞团。这与我们在豌豆叶肉原生质体培养中观察到的稀释能促进细胞分裂的结果相同<sup>[8]</sup>。

培养约 25 天, 当形成直径约 1mm 的小愈伤组织 (图 1-4) 时, 将其转入固体培养基 CI<sub>1</sub> 或 CI<sub>2</sub> 上培养, 这时 11 个供试材料均形成了愈伤组织, 愈伤组织呈黄绿色并具绿点, 结构致密 (图 1-5)。

愈伤组织形成后, 以 MS 无机盐、B<sub>6</sub> 维生素作为基本培养基, 配制了约 200 种不同的激素组合和配比、不同蔗糖浓度、不同氮源比例、不同有机添加物 (如椰乳、酪蛋白氨基酸、N.Z. amine、水解乳蛋白、酵母提取物、根皮苷) 的培养基, 以诱导器官分化。愈伤组织在以上培养基上除偶发性地形成根或叶状芽外, 绝大多数无明显的器官分化。只有 F<sub>1</sub> 代杂种 37-1G × 78-50 在 CI<sub>2</sub> 上诱导的愈伤组织, 在转至 EI<sub>1</sub> 或 EI<sub>2</sub> 上后, 形成了白色或乳黄色疏松的愈伤组织和大量胚状体 (图 1-6, 图版 I-1)。胚状体在及时转至 1/2MSO 上后, 可进一步发育, 形成较为正常的胚根和芽 (图版 I-4—6), 在初生胚状体上还可形成次生的球形或鱼雷形胚 (图版 I-2, 3, 5)。经在 1/2MSO 上再继代一次, 形成具根和叶片的小植株 (图版 I-7)。

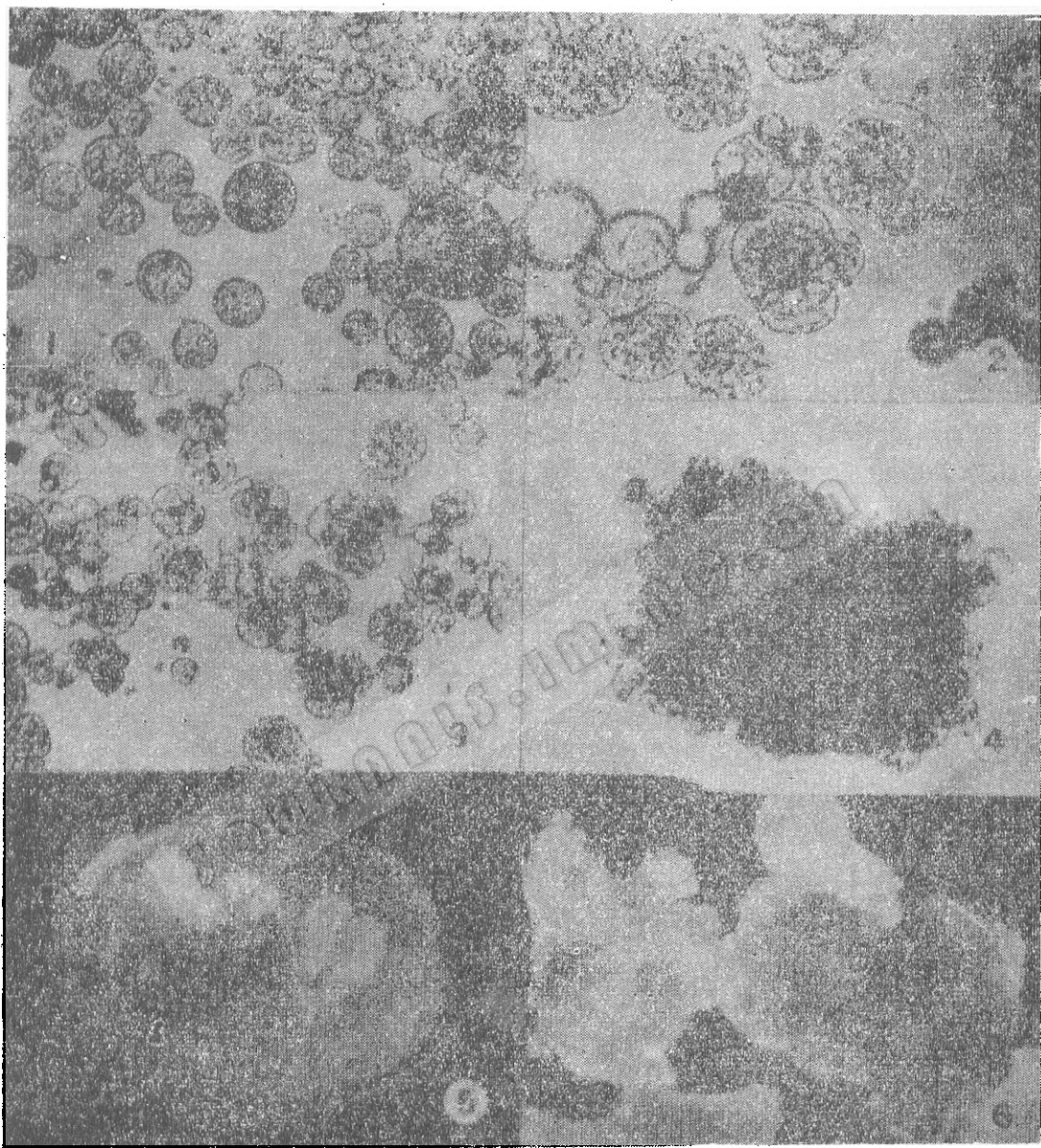


图1 黄瓜子叶原生质体培养中的体细胞胚胎发生

Fig.1 Embryogenesis from cotyledon protoplast culture of cucumber

1. 刚分离的子叶原生质体; 2. 一次、二次细胞分裂, 箭头示周围的老壁; 3. 细胞旺盛分裂 (培养8天); 4. 小愈伤组织; 5. 愈伤组织; 6. 愈伤组织上分化胚状体.

1. Freshly isolated protoplasts from cotyledon; 2. First and second division. Note the original regenerated cell wall; 3. Actively dividing cells after 8 days in culture; 4. Small callus in liquid culture; 5. Callus proliferated on agar medium; 6. Embryoids formed on callus.

## 讨 论

用无菌苗子叶作为分离原生质体的材料,比用温室或田间生长植株的叶片作材料,具有污染少,生理状态较为一致,因而游离和培养成功率高,易于重复等优点。在我们实验室条件下,游离和培养成愈伤组织的成功率可达90%以上,重复性高。实验所建立的原生质体分离培养系统,细胞分裂频率高,培养8天约可达50%,且可不改变培养基成份及培养条件,从十一种不同遗传背景的黄瓜材料获得愈伤组织,这显然对原生质体技术应用于黄瓜育种实践是十分有利的。

以往许多作者多用叶片作为分离原生

质体的材料,但在有些植物种上不易培养成功,或者供体植物需在严格控制光、温、湿度的植物生长箱中栽培。近年用无菌苗子叶或根作原生质体分离培养的报告逐渐增多<sup>[10-14]</sup>,而且使苜蓿、甘兰、花椰菜等作物的原生质体培养成株。用子叶等作分离原生质体的材料的另一个好处是,可以增加材料的种类,以使原来不能培养成功的植物种有可能培养成株。

据我们所知,从黄瓜原生质体来源的愈伤组织获得体细胞胚胎发生和植株再生,迄今在文献中还未见报道。这里报告的诱导体细胞胚胎发生和植株再生技术,有可能用于黄瓜育种,或在农作物的细胞和基因工程中用作细胞融合或遗传转化体系。

## 参 考 文 献

- (1) Binding, H. et al.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 101:119—130, 1981.
- (2) Coutts, R. H. A. and K. R. Wood: *Plant Sci. Lett.*, 4:189—193, 1975.
- (3) Coutts, R. H. A.: *Plant Sci. Lett.*, 9:45—51, 1977.
- (4) 吕德扬, E. C. Cocking: *科学通报*, 7:434—436, 1984.
- (5) 贾士荣等, 中国农业科学院蔬菜研究所1983年科学研究年报, 44—46页.
- (6) Jia, S. R. et al.: In: *Proceedings of International Symposium on Genetic Manipulation in Crops*, Oct. 22—26, 1984, Beijing, China (in press).
- (7) Murashige, T. and F. Skoog: *Physiol. Plant.*, 15:473—497, 1962.
- (8) Durand, J. et al.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 69:26—34, 1973.
- (9) Jia, S. R.: *Can. J. Bot.*, 60:2192—2196, 1982.
- (10) Lu, D. Y. et al.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 107:59—63, 1982.
- (11) Lu, D. Y. et al.: *Plant Sci. Lett.*, 31:87—89, 1983.
- (12) Schwenk, F.W.: *Plant Sci. Lett.*, 17(4):437—442, 1980.
- (13) Vatsya, B. and S. Bhaskaran: *Protoplasma*, 113:161—163, 1982.
- (14) Xu, Z. H. et al.: *Plant Sci. Lett.*, 24:117—121, 1982.

# SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM COTYLEDON PROTOPLAST CULTURE OF CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

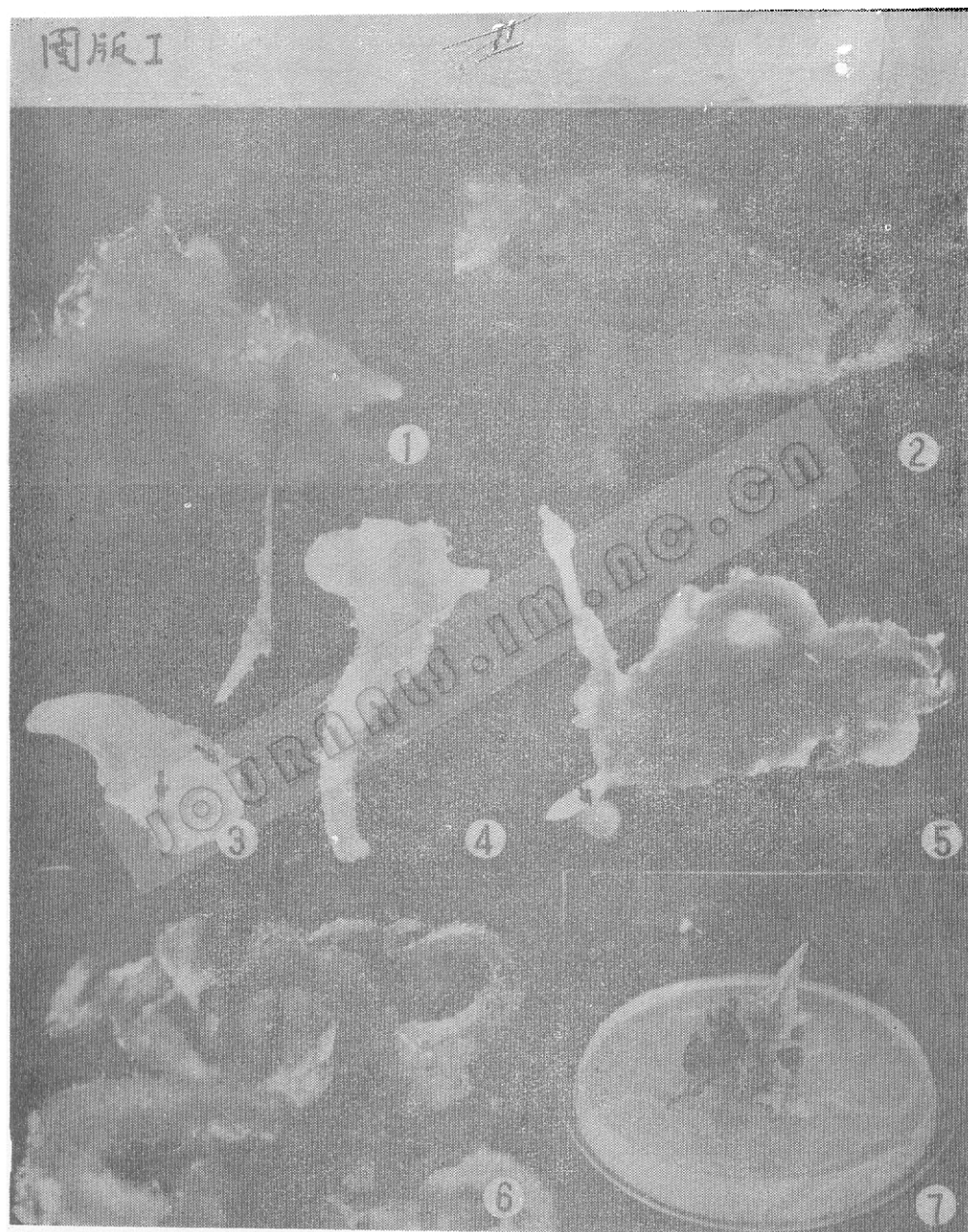
Jia Shirong Fu Youying Lin Yun

(Vegetable Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Protoplasts were isolated from cotyledons of six cultivars, three gynocious lines, and two F1 hybrids of cucumber. Sustained division was obtained when protoplasts were cultured in modified DPD liquid medium supplemented with 0.5mg/l of 2,4-D and 1 mg/l of kinetin. The division frequency reached 46% after 8 days in culture. After transfer of cell colonies onto modified MS agar medium supplemented with 2,4-D 0.01 and benzylaminopurine (BA) 1 mg/l, or indoleacetic acid (IAA) 0.2 and BA 0.5 mg/l, all eleven lines formed calluses. Among them the calluses of F1 hybrid 37-1G × 78-50 produced a large number of somatic embryoids on medium with the hormone combinations of IAA 0.2 and kinetin 5 mg/l, or 2 mg/l of BA without auxin. When embryoids were transferred onto a medium with half strength of MS macroelements devoid of exogenous hormones, plantlets with shoots and roots developed.

## Key words

Cucumber (*Cucumis sativus* L.); protoplast culture; somatic embryogenesis; plant regeneration



1. 愈伤组织上分化胚状体； 2,3. 胚状体，箭头示初生胚状体上长出的次生胚状体； 4,5. 胚状体萌发，胚根及芽伸长，箭头示胚根上长出的次生球形胚； 6. 胚状体萌发形成的芽； 7. 具叶和根的再生小植株。

1. Embryoids formed on callus; 2,3. Somatic embryoids:secondary embryoids produced on primary embryoids; 4,5. Embryoid germination with elongated roots and shoots; 6. Shoot formation following embryoid germination; 7. Regenerated plantlet with leaves and roots.