

甘蓝下胚轴原生质体再生植株

周 微 卫志明 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 经纯化后,甘蓝下胚轴原生质体的产量为 $1.5 \times 10^6 \text{g}^{-1}$ (FW),采用液体浅层培养的方法进行培养。2~3d 后,发生第一次分裂,第 10 天,统计分裂频率为 61%,5 周内形成大量的细胞团和小愈伤组织,统计植板率为 1.1%,把小愈伤组织转到与原生质体培养基相同激素的 MS 固体培养基上增殖。当愈伤组织长到 3~5mm 大小时,接到分化培养基上,芽分化率为 46.7%,分化出来的芽长到 3~4cm 长时,从基部切下,插入生根培养基,两星期左右即可长成完整植株。

关键词 甘蓝,下胚轴,原生质体,再生植株

植物原生质体培养和植株再生是进行植物遗传操作的基础技术。在十字花科的植物中,迄今为止,已有甘蓝型油菜^[1~3]、甘蓝^[4,5]、花叶菜^[6,7]、青花菜^[8]等相继由原生质体再生植株。十字花科蔬菜作物的试管无菌实生苗下胚轴的原生质体,具有生长快、褐化少、分裂频率高,植株再生能力强等特点。但是,在国内很少有关于甘蓝下胚轴原生质体再生完整植株的报道;国外的有关文献中普遍存在着再生频率不高的问题。本研究旨在探讨影响甘蓝下胚轴原生质体培养和植株再生的因素,从而为其进一步的遗传操作奠定基础。

1 甘蓝的培养

1.1 材料来源

本实验所采用的甘蓝 (*Brassica oleracea*) 品种为“牛心”,种子由上海农学院蔬菜组提供。甘蓝种子经低温 (4℃) 处理后,流水冲洗过夜,在 70% 乙醇中浸泡 30s,然后用含有效氯成份 3% 的漂白精片溶液浸泡 12min,无菌水洗一遍。再用 0.1% 的升汞溶液处理 2~3min,无菌水反复冲洗,滤纸吸干后,播种在不含激素的 MS 基本培养基上,置暗中发芽 ($26 \pm 1^\circ\text{C}$)。

1.2 原生质体的制备

取 5~7d 龄的甘蓝试管无菌实生苗的下胚轴,用解剖刀纵切成条状薄片 (0.1~0.2mm),置于含 13% 甘露醇的 CPW 液 (CPW13M, CPW 盐液成分为:氯化钙 100mg/L,磷酸二氢钾 170mg/L,硫酸镁 250mg/L,硝酸钙 43mg/L) 中质壁分离 1h 左右后,移去 CPW13M 液,放入酶液中酶解,酶液的组成为:4% 的纤维素酶 (Cellulase R-10),0.3% 的果胶酶 (Macerozyme R-10),0.5% 的半纤维素酶 (Hemicellulase),溶于含 9% 甘露醇的 CPW 液 (CPW9M) 中,酶解材料置于暗中,在往复式摇床 (35~40r/min) 上酶解 12~14h。

甘蓝下胚轴的酶解溶液用 $45\mu\text{m}$ 的尼龙网过滤, 以便去掉未曾酶解完全的植物组织以及细胞碎片。离心 ($500\text{r}/\text{min}$, 4min) 并收集原生质体, 用 CPW9M 液清洗两遍, 原生质体悬浮于 2ml CPW9M 中, 取另一 10ml 的离心管加含 18% 蔗糖的 CPW 溶液 (CPW18S) 至 8ml 处, 小心地把 2ml 原生质体悬浮液滴加于 8ml 的 CPW18S 上, 离心收集原生质体, 最后用原生质体培养基清洗一遍 (原生质体培养基的成分为: K8p 基本培养基附加 $0.4\text{mol}/\text{L}$ 的葡萄糖, $1\text{mg}/\text{L}$ 的萘乙酸 (NAA), $0.5\text{mg}/\text{L}$ 的 6-苄基腺嘌呤 (6-BA), $0.2\text{mg}/\text{L}$ 的 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D)。所得到的纯净原生质体通过血球计数板计数后统计甘蓝下胚轴原生质体的产量 (每 ml 的细胞数 = 血球计数板上大格的细胞数 $\times 10^4$), 用原生质体培养基调整为不同密度的原生质体进行培养。

1.3 原生质体的培养及植株再生

将甘蓝下胚轴不同密度的原生质体分别培养 (图版 I-1), $2\sim 3\text{d}$ 后, 观察发生第一次分裂 (图版 I-2) 及第二次分裂 (图版 I-3) 的时间, 培养到第 10 天统计分裂频率 (在显微镜下观察到的分裂细胞的数目与观察到的细胞总数的比率), 统计长成肉眼可见的小愈伤组织 (图版 I-5) 所需的时间及植板频率 (每个培养皿中形成的小愈伤组织的数目与每个培养皿中培养的细胞数目的比率)。把小愈伤组织转到与原生质体培养基相同激素的 MS 增殖培养基上进行增殖培养 (图版 I-6)。当愈伤组织长至 $3\sim 5\text{mm}$ 大小时, 移到不同种类和浓度的激素相配比的分化培养基上进行分化培养 (图版 I-7)。观察发生绿色芽的频率, 切下小芽转入不含激素的 MS 培养基上, 促进芽的伸长, 当芽长至 $3\sim 4\text{cm}$ 时, 插入含 $0.5\text{mg}/\text{L}$ 吲哚丁酸 (IBA) 的 $1/2\text{MS}$ 生根培养基上, 促进生根, 长成完整植株 (图版 I-8)。

2 结果与讨论

2.1 培养密度对甘蓝下胚轴原生质体分裂的影响

在甘蓝下胚轴原生质体的培养中, 探索合适的培养密度是很关键的。我们试验了 $0.25\sim 5.0\times 10^5/\text{ml}$ 5 个原生质体密度 (见表 1), 发现 $1.0\times 10^5/\text{ml}$ 的效果最好, 分裂率达 61.0% , 当密度少于 $1.0\times 10^5/\text{ml}$ 时, 原生质体开始分裂需时较长, 且分裂频率明显低于 $1.0\times 10^5/\text{ml}$ 。当把密度提高到 $2.5\times 10^5/\text{ml}$ 时, 原生质体进行第一次分裂后就开始聚集, 严重影响继续分裂, 10d 后统计分裂频率仅为 13.0% , 由于 $5.0\times 10^5/\text{ml}$ 的培养密度过高, 培养后的第二天就发生聚集, 原生质体逐渐解体死亡。

表 1 培养密度对甘蓝下胚轴原生质体分裂的影响

Table 1 The effect of different culture density on the cell division of hypocotyl protoplasts from *Brassica oleracea*

Density of culture ($/\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	0.25	0.5	1	2.5	5
Time of first division/d	5	3	2	2	2
Time of second division/d	7	5	5	6	—
Frequency of division after 10 days/%	3.5	20.0	61.0	13.0	—

2.2 渗透压稳定剂对甘蓝下胚轴原生质体稳定性的影响

Lillo 等^[9]报道在甘蓝 (*Brassica oleracea capitata*) 下胚轴原生质体培养时, 利用

0.2mol/L 葡萄糖作为渗透压稳定剂, Kao 等^[10]选用 0.1mol/L 葡萄糖与 0.2mol/L 蔗糖作为青花菜 (*Brassica oleracea* L. ssp.) 下胚轴原生质体的渗透压稳定剂。我们试验了不同的渗透压稳定剂对甘蓝下胚轴原生质体分裂的影响(见表 2)。发现 0.4mol/L 的葡萄糖比 0.05mol/L 的蔗糖加上 0.35mol/L 的葡萄糖更加有利于甘蓝原生质体的分裂和保持细胞的稳定性。另外, 若利用 0.4mol/L 的甘露醇或 0.4mol/L 的蔗糖作为渗透压稳定剂时, 培养的第二天原生质体就开始解体。可见, 甘蓝下胚轴原生质体不能利用甘露醇和蔗糖作为碳源来促进原生质体的细胞壁再生及再生细胞的分裂和克隆形成。

表 2 不同的渗透压稳定剂对甘蓝下胚轴原生质体的影响

Table 2 The effect of different osmoticum on the cell division of hypocotyl protoplasts from *Brassica oleracea*

Osmoticum	0.05mol/L sucrose+0.35mol/L glucose	0.4mol/L glucose
Time of first division/d	3	3
Time of second division/d	6	5
Frequency of division, after 10days/%	28.9	43.7

2.3 激素对愈伤组织分化的影响

在愈伤组织分化芽的过程中, 培养基中除含 0.2mg/L 的吲哚乙酸 (IAA) 再附加低浓度的玉米素 (ZT) 时, 仅能获得少量的芽(见表 3), ZT 的浓度由 1mg/L 增加到 5mg/L 时, 每块愈伤组织上的芽数就由 4.7 个增加到 22 个, 愈伤组织的芽分化频率可达 47.3%。但 ZT 不同浓度间其芽的分化率相差不大。当用 BA 替代 IAA 时, 有些愈伤组织一般较难分化出芽。可见, 对甘蓝下胚轴原生质体愈伤组织的器官分化来说, IAA 与 ZT 适当配合使用比较有利。

表 3 激素对愈伤组织分化的影响

Table 3 The effect of different hormone on the shoot formation of *Brassica oleracea*

Hormone/mg · L ⁻¹	Rate of shoot differentiation/%	Shoots developed of per callus
ZT 1+IAA 0.2	40.0	4.7
ZT 3+IAA 0.2	43.8	8.0
ZT 5+IAA 0.2	47.3	22.2
ZT 5+BA 0.2	11.2	5.7
ZT 5+BA 0.5	13.4	6.5
ZT 5+BA 1	13.6	4.8

* The number of the cultivated calli is 50 per treatment

2.4 预处理对原生质体再生的影响

比较了在黑暗中萌发的黄化苗与光下萌发的绿苗的下胚轴游离的原生质体在产量及再生能力上的差异, 发现黄化苗与绿苗下胚轴原生质体在产量上相差不大, 但是, 由黄化苗下胚轴游离得到的原生质体, 无论在开始分裂的时间上还是在细胞的再生能力上均优于由绿苗下胚轴游离获得的原生质体(见表 4)。这种现象与有的学者的实验结果^[11]不符。甘蓝下胚轴原生质体的植株再生, 除上述培养密度、渗透压稳定剂、激素调节、暗处理外, 及时转移愈伤组织对提高芽苗的分化频率也十分重要。同时, 新形成的芽要转移到不含激素的 MS 培养基上, 促进其生长。

表 4 暗处理对甘蓝下胚轴原生质体的产量及生长的影响

Table 4 The effect of dark-treatment on the yield of protoplasts and the growth of hypocotyl protoplasts of *Brassica oleracea*

Treatment	Light	Dark
Yield of protoplasts/ $\times 10^6 \text{g}^{-1}$ (FW)	1.5	1.6
Time of first division/d	5	3
Division frequency/%	28.9	54.3
Plating frequency/%	0.5	1.1
Shoot differentiation frequency/%	25.0	46.7

实验结果表明, 选取暗中萌发的甘蓝实生苗的下胚轴作为制备原生质体的材料, 所得到的原生质体具有大小均匀, 产量高, 易于启动分裂, 再生能力强等特点。因而, 利用甘蓝下胚轴原生质体的再生作为受体系统, 进行细胞的遗传操作, 从而改良品种, 将具重大意义。

参 考 文 献

- [1] Brasby T L, Yarrow S A, Shepard J F. *Plant Cell Rep*, 1968, **5**: 101~108.
- [2] Chuong P V, Dauls K P, Beverdorf W D. *Plant Cell Rep*, 1985, **4**: 4~6.
- [3] Kao H M, Seguin-Swartz G, *Plant Cell and Organ Culture*, 1987, **10**: 79~90.
- [4] 傅幼英, 贾士荣. *园艺学报*, 1985, **12**: 171~175.
- [5] Bidney D L, Shepard J F, Kaleikau E. *Protoplasma*, 1983, **117**: 89~92.
- [6] Glimelius K. *Physiol Plant*, 1984, **61**: 38~44.
- [7] Vatsya B, Bhaskarran S. *Plant Sci Lett*, 1981, **23**: 277~282.
- [8] Robertson D, Earle E D. *Plant Cell Rep*, 1986, **5**: 61~64.
- [9] Lillo C, Shanlin F A. *Hor Sci*, 1986, **2**: 315~317.
- [10] Kao H M, Keller W A, Gleddie S *et al.* *Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 311~315.
- [11] Lu D Y, Pental D, Cocking E C. *Plant Cell Rep*, 1982, **1**: 59~63.

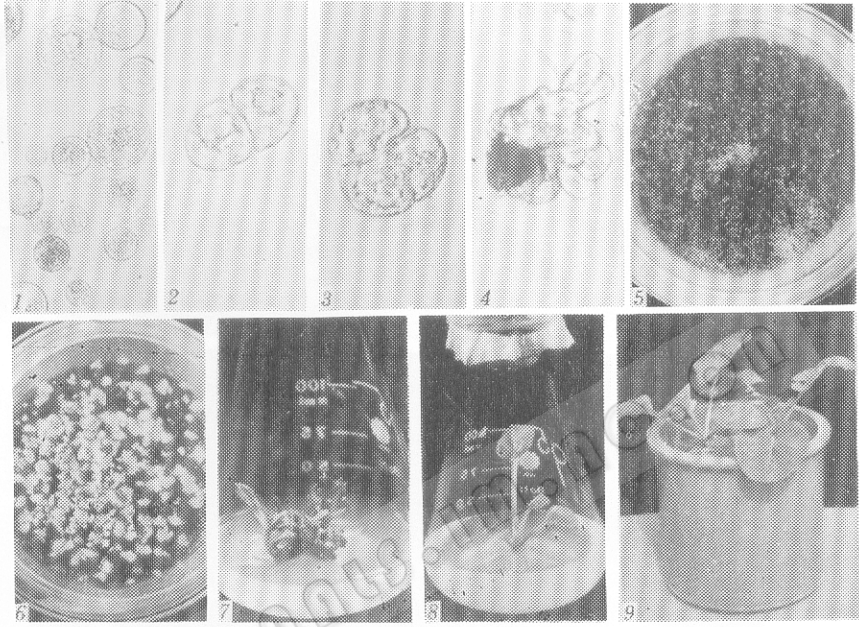
Plant Regeneration from Hypocotyl Protoplasts of *Brassica oleracea*

Zhou Wei Wei Zhiming Xu Zhihong

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract The yield of purified protoplasts isolated from hypocotyl of *Brassica oleracea* was $1.5 \times 10^6 \text{g}^{-1}$ (FW) and they were cultured in a K8p liquid medium supplemented with 0.2 mg/L 2,4-D, 1mg/L NAA and 0.5mg/L BA. The protoplasts started to divide after 2~3 days of culture, and the division frequency was 61% after 10 days. The cell clones and microcalli could be obtained in 5 weeks, then transferred to the proliferation MS medium supplemented with the same hormones as the K8p liquid medium. The plating frequency was about 1.1%. Calli of 3~5mm in diameter were transferred on MS differentiation medium, the frequency of shoot but formation was about 46.7%. Whole plants were obtained upon transferring 3~4cm shoots to 1/2 MS medium with 0.5mg/L IBA.

Key words *Brassica oleracea*, hypocotyl, protoplast, plant regeneration



1. Fresh hypocotyl protoplasts isolated from *Brassica oleracea*
2. The first division of regenerated cells after 3 days
3. The second division of regenerated cells after 6 days
4. The regenerated cell clones after 10 days
5. The regenerated cell clones and microcalli after 6 weeks
6. Proliferic callus
7. Differentiated shoots from protoplast callus
8. The whole plant on the root induced medium
9. Regenerated plant grows normally in the pot