

大白菜无菌苗叶肉原生质体植株再生

李世君 孟 征 盛方镜 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所, 杭州)

商用大白菜叶肉原生质体, 经液体培养基浅层培养, 再生细胞分裂, 并获得愈伤组织。愈伤组织转到分化培养基上诱导分化, 已从城青2号大白菜叶肉原生质体得到再生的完整植株。再生细胞的分裂频率与培养基中的激素种类和浓度有关, 受原生质体培养浓度的影响。多胺类物质(亚精胺(SPD))的加入, 可促进细胞分裂, 并有益于以后植株的再生。通过提高新鲜培养液的pH值(6.5)可使细胞团的褐化得到明显的控制。在植株分化过程中, 培养基中低浓度(1.1%)的蔗糖与植株分化有关。

关键词 大白菜、原生质体、植株再生

芸苔属(*Brassica*)有大约100种植物其中包括许多重要油料、饲料和蔬菜作物, 是一个丰富的基因库, 是进行植物遗传操作的好材料。

七十年代以来, 随着生物技术的不断完善, 芸苔属作物原生质体培养也得到了较快的发展。现在已分别从油菜^[1-6]、甘蓝^[3, 6-11]、芥菜^[12-16]等获得了再生植株。但大白菜原生质体培养仍存在很大问题, 迄今为止只有Glimelius^[3](1984)一例成功的报道, 再生频率仅有1.0%。该研究在我国尚未见成功的报道。

我们以市售栽培品种城青2号和高脚白大白菜(*Brassica pekinensis* Rupr Cheng Qing No.2, *Brassica pekinensis* Rupr Gao Jiaobai)的无菌苗叶肉原生质体为材料, 对其进行培养并获得了再生植株。现将研究结果报道如下:

材料与方 法

(一) 无菌苗的建立

选取籽粒饱满的种子, 经70%乙醇浸泡1 min, 无菌水冲洗三遍, 再在0.1%

升汞溶液中浸泡10—12 min, 无菌水冲洗五次, 用无菌滤纸将种子表面的水吸干。最后将种子接种到无菌苗培养基上^[17], 在25°C, 4000Lx、16/8h的条件下, 使其萌发。待真叶刚刚长出, 将无菌苗剪下, 接种到相同的培养基上, 使其进一步发育(培养条件同上)。

(二) 原生质体游离

取无菌苗上完全展开的真叶(叶龄6—10天), 撕去下表皮, 放到混合酶液(1%纤维素酶(*cellulase* Onozuka R-10), 0.5%离析酶(*Macerozyme* Onozuka R-10), 27.2mg/L KH_2PO_4 , 101.0 mg/L KNO_3 , 246.0 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16 mg/L KI, 0.025 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1480 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.52 mol/L甘露醇, pH5.8, 0.45 μ 微孔滤膜过滤(*Sigma*))中酶解(25°C、黑暗、静置18h)。酶处理后的悬浮液用400目金属筛网过滤。滤液经500 rpm离心5 min, 去上清液, 沉淀部分重新悬浮于原生质体洗液(0.52 mol/L甘露醇, 27.2

本文于1991年1月27日收到,

mg/L KH_2PO_4 , 101.0 mg/L KNO_3 , 246.0 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1480 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.16 mg/L KI, 0.025 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH 5.8. 0.1 Mpa 灭菌 20 min) 中, 500 rpm 离心 3 min, 去上清液。沉淀再依此法洗两次。纯化后的叶肉原生质体用 Bp 培养液重新悬浮。用血球计数板计算其产量。

(三) 原生质体的培养

将两种大白菜叶肉原生质体用 Bp 培养液 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ [18] 大量元素、有机酸、糖及糖醇, B_6 [19] 微量元素、维生素, 0.43 mol/L 葡萄糖, 其它附加成分见表 1,

表 1 原生质体培养基附加成分

Table 1 The additional components of protoplast culture media

Bp	Hormone (mg/L)	2,4-D	NAA	6-BA	Zea	SPD*
	1	0.25	0.5	0.1	0	0
2	0.5	0.5	0.25	0	0	
3	1.0	0.5	0.5	0	0	
4	1.0	0.1	0.5	0	0	
5	0.2	1.0	0	0.5	0	
6	0.5	0.5	0.25	0	2	

* SPD (Spermidine)

pH 5.8, 用 0.45 μ 微孔滤膜过滤) 培养, 原生质体的浓度为 1—60 $\times 10^4$ /ml。分别取 1 ml 接种到直径为 2 cm 的小培养中, 用 Parafilm 封口, 在 25°C 下, 暗中静置培养。培养 5 天后统计细胞分裂频率 (分裂的细胞总数占观察细胞总数的百分比。每次统计 150 个细胞左右, 重复 3 次取均值)。培养 10 天后按 1:1 的比例加入同种新鲜的小细胞团形成时起, 定期 (15 天) 向培养物中加入降渗的 Bp 培养液, 直至小愈伤组织长到直径约 1 mm 大小。

(四) 植株再生

将直径约 1 mm 大小的愈伤组织转到 MS [20] (0.2 mg/L 2,4-D, 3.0 mg/L KT, 3% 蔗糖, 0.7% 琼脂, pH 5.8, 0.1 Mpa 灭菌 20 min) 培养基上培养约 20 天, 然后转到 MSD (基本成分同 MS, 其它附加成分见表 2, 0.7% 琼脂, pH 5.8, 0.1 Mpa 灭菌 20 min)。

系列分化培养基上诱导植株分化。将分化出的苗 (2 cm 大小) 从愈伤组织上剪下, 接种到 MSR (0.5 mg/L NAA, 3% 蔗

表 2 MD 分化培养基附加成分

Table 2 The additional components of MSD differentiation media

MSD	AC*	6-BA	KT	IAA	GA ₃	Sucrose	Manitol	Agar
		mg/l					g %	
1	3	0	0.1	0	3	0	0.7	
2	3	0	0.1	0	1.1	0	0.7	
3	3	0	0.1	0	1.1	1.9	0.7	
4	3	0	0.1	0.5	1.1	0	0.7	
5	5	0	0.1	0	1.1	0	0.7	
6		3	0.1	0	1.1	0	0.7	
7		5	0.1	0	1.1	0	0.7	

* AC: 附加成分 (Additional Components)

糖, 0.7% 琼脂, pH 5.8) 培养基上诱导生根 (培养条件同无菌苗)。

结果与讨论

(一) 原生质体游离

无菌苗叶片的生理状态对于能否获得大量状态良好的原生质体至关重要。应选用叶片较薄, 下表面叶脉较少, 呈鲜绿色的叶片, 这种叶片是分离原生质体的理想材料。从这样的叶片分离下来的原生质体

(见图版 I-1)量可达 $6 \times 10^5 - 10^6$ /ml 酶液·g叶片。

(二) 原生质体培养

1. 激素种类及浓度对细胞分裂频率的影响: 城青 2 号叶肉原生质体以 4×10^4 /ml 分别用含有不同激素配比的 Bp1—5 培养基(表 1)进行液体浅层培养。在不同的培养基中细胞分裂频率迥然不同(表 3)。表 3 结果表明各激素之间的相互平衡是刺激细胞分裂的重要因素。通过光学显微镜观察表明不同种类的激素与生长素的相互作用对分裂细胞的进一步发育影响甚大, 在 Bp5 培养液中细胞虽能分裂, 但只能发育到十多个细胞组成的小细胞团, 由于细胞团褐化严重而最终死亡。

表 3 激素对细胞分裂频率的影响

Table 3 The influence of hormone on the division frequency of cells

Bp	1	2	3	4	5
Division frequency (%)	6	27	15	9	15

2. 原生质体培养浓度对细胞分裂频率的影响: 城青 2 号叶肉原生质体用 Bp 2 培养液制成不同的浓度(表 4), 在 25°C 下、暗中进行浅层液体培养。48h 后出现第一次细胞分裂(图版 I—2); 72h 后可观察到细胞经二次分裂形成的细胞团(图版 I-3)。第五天时统计细胞频率(见表 4)。结果表明选择合适的原生质体浓度有利于细胞分裂频率的提高。

表 4 原生质体培养浓度对细胞分裂频率的影响

Table 4 The influence of the density of protoplast on the division of frequency

Density ($\times 10^4$ /ml)	1	2	4	8	20	60
Division frequency (%)	8	15	27	37	31	19.3

3. 植株基因型对细胞分裂频率的影响: 城青 2 号和高脚白叶肉原生质体以 8×10^4 /ml 的浓度用 Bp2 培养液进行浅层培养, 其细胞分裂频率有较大差异(见表 5)。这一结果表明在进行大白菜叶肉原生质体培养时, 要建立高分裂频率的培养体系, 除了筛选合适的培养基外, 植物体的基因型也是不可忽视的因素。

表 5 基因型对细胞分裂频率的影响

Table 5 The influence of genotype on the division frequency of cells

Lines	Division frequency (%)
Cheng Qing No.2	37
Gao Jiaobai	12.5

4. 多胺类物质[亚精胺(SPD)]对细胞分裂频率的影响: 城青 2 号叶肉原生质体以 8×10^4 /ml 的浓度进行液体浅层培养结果见表 6。所得结果表明: SPD 是一种能刺激大白菜叶肉原生质体分裂的生物活性物质。它与细胞发育过程中的许多参数有关。如增加原生质体活力, 刺激细胞分裂。在苹果原生质体研究中还发现外源多胺类物质的加入, 可抑制原生质体的乙烯合成, 降低 RNase 活性, 刺激核酸的合成^[21, 22]。

表 6 亚精胺(SPD)对细胞分裂频率的影响

Table 6 The influence of spermidine on the division frequency of cells

Media	Bp2	Bp6
Division frequency (%)	37	41

5. 细胞团褐化的控制: 大白菜叶肉原生质体经 Bp 系列培养液培养培养后, 在细胞分裂、细胞团形成过程中, 均有不同程度的褐化。这也是十字花科作物原生质体培养普遍存在的问题。为了解决这一问题, 人们往往采用选取良好的起始材料, 配合适宜的培养基, 促进原生质体快

速分裂或不断更换新鲜培养液来减轻或避免褐化^[1,3]。另外,还有人采用漂浮培养法来减轻褐化^[12,23]。在本实验中发现,原生质体培养10天后,褐化严重的培养液中的pH值下降至5.0,这可能是使细胞团褐化,发育缓慢的主要原因之一。针对这一结果,提高补加新鲜培养基的pH值至6.5。这样可使细胞团的褐化程度在很大程度上得以减轻,从而加速细胞团的生长发育。这种控制褐化的方法简便易行。另外,还发现在Bp培养液中加入SPD也能使褐化得以控制。这可能是由于SPD能刺激原生质体在早期快速分裂和其本身的碱性使引起细胞褐化的多酚类物质丧失作用。

城青2号叶肉原生质体用Bp6培养,10天后按1:1的比例加入Bp6培养液(pH6.5)对培养物进行稀释。以后每隔两周在培养物中加入降渗的Bp6培养液(pH6.5)(3:1)。15天可见(见图版I-4)细胞团。20天后可见图版I-5所示的小愈伤组织。五周后小愈伤组织可达直径约1mm大小。

(三) 植株分化

直径约1mm的愈伤组织从液体培养基中转到MS培养上扩增。经扩增培养基筛选试验表明:只有在含2,4-D 0.2mg/L, 3mg/L KT的培养基上才能使愈伤组织得到良好的增殖。其它任何激素配比的培养基均导致愈伤组织大量生根或死亡。小愈伤组织经扩增后可得到白色松散和淡黄色或白色瘤状愈伤组织。愈伤组织经上述MS培养基培养15—20天后,转到MSD培养基(表2)上诱导植株分化。结果只有从Bp6,再经MS扩增得到的瘤状愈伤组织能在MSD₂培养基上培养40天左右,有3.3%的苗被诱导形成(见图版I-7)。苗的分化可能与Bp6培养液中的SPD和

MSD₂中的低浓度蔗糖(1.1%)有关。甘露醇(1.9%),KT,高浓度的6-BA(5mg/L)、GA₃均不利于植株分化。这也说明原生质体以后是否具有分化苗的能力,不仅取决于分化培养基的成分,而且在原生质体培养阶段也很重要。待苗长到2cm大小时,转到MSR培养基上诱导生根,使之发育成完整植株(图版I-8)。在诱导分化过程中,根的分化是一种普遍现象。在表2所示的几种分化培养基上均能诱导根的形成。另外,苗的分化是继愈伤组织有少量绒毛状根分化出现后才发生的。在埃塞俄比亚芥的原生质体植株再生研究中也有类似现象^[15]。

及时地进行诱导愈伤组织的植株分化,也是成功的关键。这一点与Glimelius^[3]的研究结果相一致。但不能过早,如果将从Bp6培养液中获得的直径约1mm大小的愈伤组织直接转到MSD培养基上诱导分化,则小愈伤组织很快变褐而死亡。这一点与马铃薯原生质体植株分化时的现象相似^[25]。

大白菜原生质体植株再生困难与其基因型有密切关系。Murata等^[24]在组织水平植株再生的研究证明了这一点。在本实验中,城青2号叶肉原生质体能高频分裂并再生植株,而高脚白叶肉原生质体只能发育到小细胞团。

另外,根据愈伤组织能分化出大量绒毛状根和不定根的现象推测这可能是由于大白菜愈伤组织的乙烯合成较旺盛。在利用整体植株做实验时,许多植物如马铃薯、蕃茄,乙烯的施用可在茎部位形成根的分生组织,从而分化出大量的不定根^[26]。在苹果的原生质体研究中,外源多胺的加入有效地抑制了乙烯合成,刺激了细胞分裂^[22]。在本实验中,SPD的加入提高了细胞分裂频率,最终导致植株再

生。这也可能与乙烯合成能力的降低有关。

参 考 文 献

- [1] Barsby, T.L. et al., *Plant Cell Rep.*, 5:101,1986.
 [2] Chuong, P.V. et al., *Plant Cell Rep.*, 4:4,1985.
 [3] Glimelius, K., *Physiol. Plant.*, 61:38,1984.
 [4] Kartha, K.K., et al., *Plant Sci. Lett.*, 3 (4):265,1974.
 [5] Li, L.C. et al., *Plant Cell Rep.*, 1:209,1982.
 [6] Xu, Z.H. et al., *Plant Sci. Lett.*, 24:117, 1982.
 [7] Bidey, D.Z. et al., *Protoplasma*, 117:89,1983.
 [8] Lillo, C. et al., *Hort Sci.*, 21 (2):315,1986.
 [9] Lu, D.Y. et al., *Zpflanzenphysiol*, 107:59:,1982.
 [10] Robertson, D. et al., *Plant Cell Rep.*, 5:61,1986.
 [11] Vatsya, B. et al., *Protoplasma*, 113:161,1982
 [12] Chuong, P.V. et al., *Plant Cell Rep.*, 6:67,1987.
 [13] Chattjee, G. et al., *Plant Cell Rep.*, 4:245,1985.
 [14] 李文彬等: 遗传学报, 13 (3):184,1986.
 [15] 杨美珠等: 植物学报, 31 (2):89,1989.
 [16] Kirt, P.B. et al., *Plant Cell Tissus and Organ Culture*, 20:65,1990.
 [17] 李世君等: 浙江农业大学学报, 16 (3):303,1990.
 [18] Kao, et al., *Planta*, 126:105,1975.
 [19] Gamborg, O.L. et al., *Exp. Cell Res.*, 50:151,1968.
 [20] Murashige, T. et al., *Physiol. Plant.*, 15:473,1962.
 [21] Basu, A.S.A. et al., *Plant Sci.*, 56:167,1983.
 [22] Eilers, R.J. et al., *Plant Cell Rep.*, 7:216,1988.
 [23] Millam, S.R. et al., *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 12:285,1988.
 [24] Murata, M. and Orton, T.J., *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 11:111,1987.
 [25] 李世君等: 生物工程学报, 5 (1):57,1989.
 [26] 戴光仁等译: 新编植物生理学——绿色植物的生活, 北京大学出版社, 第一版, 292页, 1989.

Plant Regeneration of Mesophyll Protoplasts From Axenic of Chinese Cabbage (*Brassica pekinensis* Rup.)

Li Shijun Meng Zeng Sheng Fangjing Li Debao
(*Biotechnological Institute of Zhejiang Agricultural University, Hangzhou*)

Mesophyll protoplasts of commercial Chinese cabbage were cultured with liquid medium as shallow layer. Regenerated cells divided and calli were obtained. Regeneration plants of Chinese cabbage (Cheng Qing No.2) had been obtained from the regenerated calli after being transferred onto differentiation medium. The division frequency of the regenerated cells related to the kinds of the hormones and their concentrations, and was also

influenced by the culture density of protoplasts. Addition of spermidine (SPD) into the protoplast culture medium enhanced cell division frequency and plant regeneration from the P-calli. By increasing the pH value (6.5) of fresh supplement protoplast culture medium, the "cell browning" phenomenon was obviously controlled. In addition, the plant regeneration was favored by the presented low concentration of sucrose in the differentiation medium.

Key words

Chinese cabbage; protoplast; plant regeneration.

图版 I 说明(城青 2 号)

Explanation of plate (Cheng Qing No.2)

1. 从城青 2 号分离下的叶肉原生质体
The mesophyll protoplasts isolated from Cheng Qing No.2(10×40)
2. 第一次细胞分裂
The first division of regenerated cell(10×40)
3. 第二次细胞分裂
The secondary division of regenerated cell(10×40)
4. 培养15天后的原生质体来源的细胞团
Protoplast-derived colony after 15 days (10×40)
5. 20天后的小愈伤组织
P-calli after 20 days (10×10)
6. 从愈伤组织分化出的绿点(箭头所示)
Differentiated green point from P-calli (showing in arrow)
7. 由绿点形成的芽
Developed shoots from green point in the calli
8. 分化的完整植株
Differentiated whole plant

