

甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究

程振东 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 从甘蓝型油菜下胚轴分离纯化原生质体。种子萌发时进行光照处理对原生质体产率影响不大,但可提高其活力。对液体浅层、固体平板和“琼脂岛”3种培养方法进行比较,结果“琼脂岛”法效果最好,不但细胞分裂速度快,而且克隆形成频率高。再生的愈伤组织转到分化培养基上后迅速分化出芽。诱导生根后进行移栽,生长状况良好。

关键词 甘蓝型油菜,原生质体培养,植株再生

从理论上讲,应用植物基因工程技术应该能够突破物种间的界限,转移有用基因,为农作物的进一步改良提供新的手段。其中用外源 DNA 直接转化原生质体不一定需要克隆的基因和特定的载体,具有更大的潜在应用价值^[1,2]。为此,建立可靠、高效的原生质体再生系统十分必要。

甘蓝型油菜原生质体的培养,自 1974 年首次成功后陆续有不少报道。早期主要是从叶肉细胞分离原生质体,再生的愈伤组织分化频率较低^[3-6]。后来改用根和花粉单倍体植株茎上的次生胚,分化频率虽有所提高^[7,8],但仍不令人满意。自从 Glinelius^[9]的工作报道以后,下胚轴被公认具有较强的再生能力,广泛用于原生质体的分离和培养^[9-13]。本文对影响甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养效率的一些因素进行了研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试的甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)为栽培品种“云北 2 号”和“宁油 7 号”,分别由上海市青浦县农科所和上海农科院作物所提供种子。种子经流水冲洗 7—8 小时后依次在 70%乙醇和含 3%有效氯的漂粉精片水溶液中分别浸泡 30 秒和 20 分钟,以进行表面灭菌。然后用无菌水洗涤 4—5 次,并接种到无激素 MS 培养基^[14]上发芽生长。除非特别说明,本文所涉及的植物材料均在 25℃,每天 12 小时 3.5kErg·cm⁻²s⁻¹光照条件下培养。

1.2 原生质体的分离

种子萌发 4 天后取长约 1cm 的下胚轴,横切成 0.5—1mm 厚的薄片,置于附加 13%甘露醇的改良 CPW 盐溶液^[15]中质壁分离 1 小时左右,换入酶液后在摇床上酶解过夜(25℃,50r/min,黑暗)。酶液成分如下:1%纤维素酶(Onozuka R-10),0.2%离析酶(Macerozyme R-10),0.5%半纤维素酶(Sigma)和 3mmol/L MES (2-Nmorpholino ethanesulfonic acid),溶于附加 9%甘露醇的改良 CPW 盐溶液(CPW-9M)中。酶解后经 100 目尼龙网过滤,滤出液在 500r/min 离心 5 分钟。用 CPW-9M 洗原生质体两次,再用含 17%蔗糖的改良 CPW 盐溶液漂浮一次。漂浮的原生质体转入另一个离心管中,加

本文于 1992 年 6 月 9 日收到。

CPW-9M 至 10ml,混匀后离心收集原生质体。培养前再用原生质体培养基(PCM)洗原生质体一次。PCM 的配方基本按照 KM8p(不加核苷酸和氨基酸)^[16]只是维生素按照 B₅^[17],以 0.4mol/L 葡萄糖作渗透压稳定剂,激素为萘乙酸(NAA)0.1mg/L(激素浓度单位下同)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1.0 和 6-苄基氨基嘌呤(BA)0.5。

1.3 原生质体培养

1.3.1 液体浅层法:用 PCM 把原生质体稀释至密度为 2×10^5 /ml。取 2.5ml,注入直径 60mm 的培养皿(下同)中培养。得到细胞团后铺到含有 0.2%gelrite 的扩增培养基(PM)表面,使其进一步生长。PM 成分如下:K₃^[18]+3%蔗糖+2,4-D 0.1+BA 0.5-1.0。

1.3.2 固体平板法:将细胞密度为 4×10^5 /ml 的原生质体 PCM 悬浮液与含 1.2%低熔点琼脂糖的 PCM(融化后保持在 40℃水浴中)等量混匀后,倒入培养皿中(体积为 2.5ml)。待培养基凝固后用 Parafilm 封口培养。得到小细胞团后把培养基切成小块,转入盛有少量 PM 液体培养基的培养皿中。两星期后更新 PM,并把琼脂糖块完全切碎,用滴管转移到含 0.2% gelrite 的 PM 上进行培养。

1.3.3 “琼脂岛”法:按固体平板法把密度为 4×10^5 ml 的原生质体 PCM 悬浮液与含 1.2%低熔点琼脂糖的 PCM 等量混匀,用滴管滴到培养皿中。每皿一般滴 5 滴,每滴大约 50 μ l。待其凝固后加入 PCM,液面不超过“琼脂岛”高度的三分之二。得到小细胞团后,用 PM 代替 PCM。一星期后更新 PM,并把“琼脂岛”切碎,转移到含 0.2% gelrite 的 PM 上进行培养。

在上述三种方法中,原生质体前 10 天均在黑暗条件下,以后转至每天 12 小时弱散射光(1.5kErg cm⁻².s⁻¹)条件下培养。愈伤组织生长至 1mm 时,转移到含 0.7%琼脂的 PM 上,促使其长大,并统计存活愈伤组织数,计算克隆形成频率(10^5 个原生质体通过培养形成的愈伤组织数)。

1.4 植株的再生和移栽

把 3—5mm 大小的愈伤组织转移到分化培养基(DM)上,诱导芽的形成。DM 成分如下:K₃+1%蔗糖+玉米素(ZT)5.0+吲哚乙酸(IAA)0.1+0.7%琼脂。当分化的绿芽长至 1—2cm 时,将其切下,插入含有吲哚丁酸(IBA)0.5 的 MS 生根培养基(RM)中,诱导生根。再生植株根系发达后,炼苗 3 天,并移栽到花盆中,置于人工气候室中培养。

2 结果与讨论

2.1 种子萌发时的光照条件对原生质体产率和活力的影响

如果种子在光照条件下培养,从 1g 下胚轴(鲜重)可分离纯化到 2.9×10^6 个原生质体;如果在黑暗条件下培养则仅能分离到 1.6×10^6 个原生质体。这主要是因为种子在黑暗条件下萌发,下胚轴含水量较高(数据未列出)。如果按 100 根下胚轴计算,则不论在光照还是黑暗条件下萌发,均能分离到 $3.5—4.0 \times 10^6$ 个原生质体。由此看来,光照条件与下胚轴原生质体的产率关系不大。但光照对原生质体活力的影响是明显的。对“云北 2 号”下胚轴原生质体进行液体浅层培养,第 8 天统计分裂频率。前者为 25.7%,后者为 12.7%。光照使原生质体分裂频率提高一倍左右。Lu 等^[9]以籽苗子叶作材料也观察到类

似的现象。但是白菜型油菜(*B. campestris*)有所不同,如果种子在光照条件下培养,子叶原生质体易于破碎,根本不进行分裂;而光照与否对甘蓝(*B. oleracea*)子叶原生质体的分裂频率影响不大。由此可见,随着物种的不同,光照的作用结果差异较大。

2.2 不同方法对原生质体培养效率的影响

2.2.1 液体浅层法:原生质体培养 2 天就开始拉长变形,有的已在进行第一次分裂。分裂方式以均等分裂为主(图版 I-2)。第 7 天统计分裂频率,“云北 2 号”为 23.7%，“宁油 7 号”为 18.3%。培养 3 周,肉眼可以看到小愈伤组织的形成(图版 I-4A)。这时需用滴管把它们吸出,铺到含有 0.2% gelrite 的 PM 表面,否则细胞将相互粘连成片状,随后大量褐化死亡。卫志明等在花椰菜上也观察到类似的现象^[20]。

2.2.2 固体平板法:原生质体培养 4 天开始第一次分裂,16 天形成肉眼可见的小愈伤组织。这时需把琼脂糖薄层切成小块,放入盛有少量 PM 的培养皿中(图版 I-4B)。否则,如果继续培养下去或直接转移到含 0.2% gelrite 的 PM 表面,细胞将大量褐化死亡。

2.2.3 “琼脂岛”法:原生质体培养 4 天开始第一次分裂,与固体平板法相似,而略迟于液体浅层法。不过第 7 天即可见到 15 个细胞左右的细胞团,第 10 天肉眼就能看到多细胞团和小愈伤组织(图版-4C)。这说明原生质体一经分裂,其持续分裂的速度要比用固体平板法和液体浅层法都高(表 1)。更为重要的是,培养同样数量的原生质体能够得到的愈伤组织数,用“琼脂岛”法要比用固体平板法和液体浅层法高出 10 倍以上(表 2)。原因可能有两个;第一,培养基的通气状况较好;第二,能够为原生质体提供更充分的营养。

表 1 不同培养方法对“云北 2 号”下胚轴原生质体分裂速度的影响

Table 1 Effects of culture methods on the division speed of hypocotyl protoplasts*(cv. "Yunbei 2")

Culture methods	Time of the first cell division (days after plating)	Time of the formation of visible calli (days after plating)
Thin liquid later	2	21
Agarose solid layer	4	16
"Agarese island"	4	10

2.3 植株的再生和移栽

愈伤组织在 PM 上生长到 3—5mm 大小时(图版 I-5),转移到 DM 上诱导芽的分化。如果转移太早,愈伤组织小于 2mm,3—5 天内就会褐化死亡。如果在 PM 上继代时间过长(大于 1 个月),愈伤组织将失去分化能力。而 3—5mm 的愈伤组织转到 DM 上以后,2 周内就在其表面

出现很多绿色的芽点,其中一部分继续分化出芽(图版 I-6),其余则转化成致密的绿色愈伤组织。“云北 2 号”的分化频率为 14.9%，“宁油 7 号”为 23.4%。分化出的茎芽要尽早切下,插入 RM 中诱导生根(图版 I-7)。如果在 DM 上时间太长,虽然能提高芽数,但多数将“玻璃化”,不利于获得完整植株。把根系发达的植株移栽到土壤中,大多数生长状况良好(图版 I-8)。用液体浅层法、固体平板法和“琼脂岛”法均可从甘蓝型油菜下胚轴原生

表 2 不同培养方法对克隆形成频率的影响*

Table 2 Effects of culture methods on the efficiency of colony formation *

Culture methods	"Yunbei 2"	"Ningyou 7"
Thin liquid later	6.6	7.0
Agarose solid layer	75	30
"Agarese island"	830	440

* Efficiency of colony formation; number of calli from 10^5 protoplast plated

质体再生获得完整植株,其中以“琼脂岛”法效果最好。用这种方法进行原生质体培养具有细胞分裂速度快、克隆形成频率高等特点,这在甘蓝型油菜是首次报道。此法可能比较适合于进行以原生质体为受体的遗传转化,因为在筛选转化细胞时,更换“琼脂岛”周围的液体培养基比较方便,同时又不明显扰乱原生质体周围的微环境。

参 考 文 献

- [1]刘春明,许智宏. 遗传,1989,11: 39—42.
- [2]程振东等. 植物生理学通讯,1992,218: 161—164.
- [3]Kantha K K *et al.* Plant Science Letter,1974,3: 265—271.
- [4]Thomas E *et al.* Mol. Gen,Genet,1976,145: 245—247.
- [5]Li L C and Kohlenbach H W. Plant Cell Reports,1982,1: 209—211.
- [6]Kao H M and Seguin-Swartz G. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1987,10: 79—90.
- [7]Kohlenbach H W *et al.*, Z. pflanzenphysiol,1982,105: 131—142.
- [8]Xu Z H *et al.*, Plant Science letter,1982,24: 117—121.
- [9]Glimelius K, Physiol Plant, 1984,61: 38—44.
- [10]Chuong P V *et al.* Plant Cell Reports,1985,4: 4—6.
- [11]Barsby T L *et al.* Plant Cell Reports, 1986,5: 101—103.
- [12]Kirti P B. Plant Breeding, 1988,100: 222—224.
- [13]Poulsen G B and Nielsen S V S. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989,17: 153—158.
- [14]Murashige T and Skoog F. Physiol Plant, 1962,15: 473—497.
- [15]Wei Z M and Xu Z H. Plant Science, 1990,70: 101—104.
- [16]Kao K N and Michayluk M R. Planta, 1975,126: 105—110.
- [17]Gamborg O L *et al.* Exp Cell Res, 1968,50: 151—158.
- [18]Nagy J I and Maliga P. Z. Pflanzenphysiol, 1976,78: 453—455.
- [19]Lu D Y *et al.* Z. Pflanzenphysiol, 1982,107: 59—63.
- [20]卫志明,许智宏. 植物生理学报, 1990,16(4): 394—400.

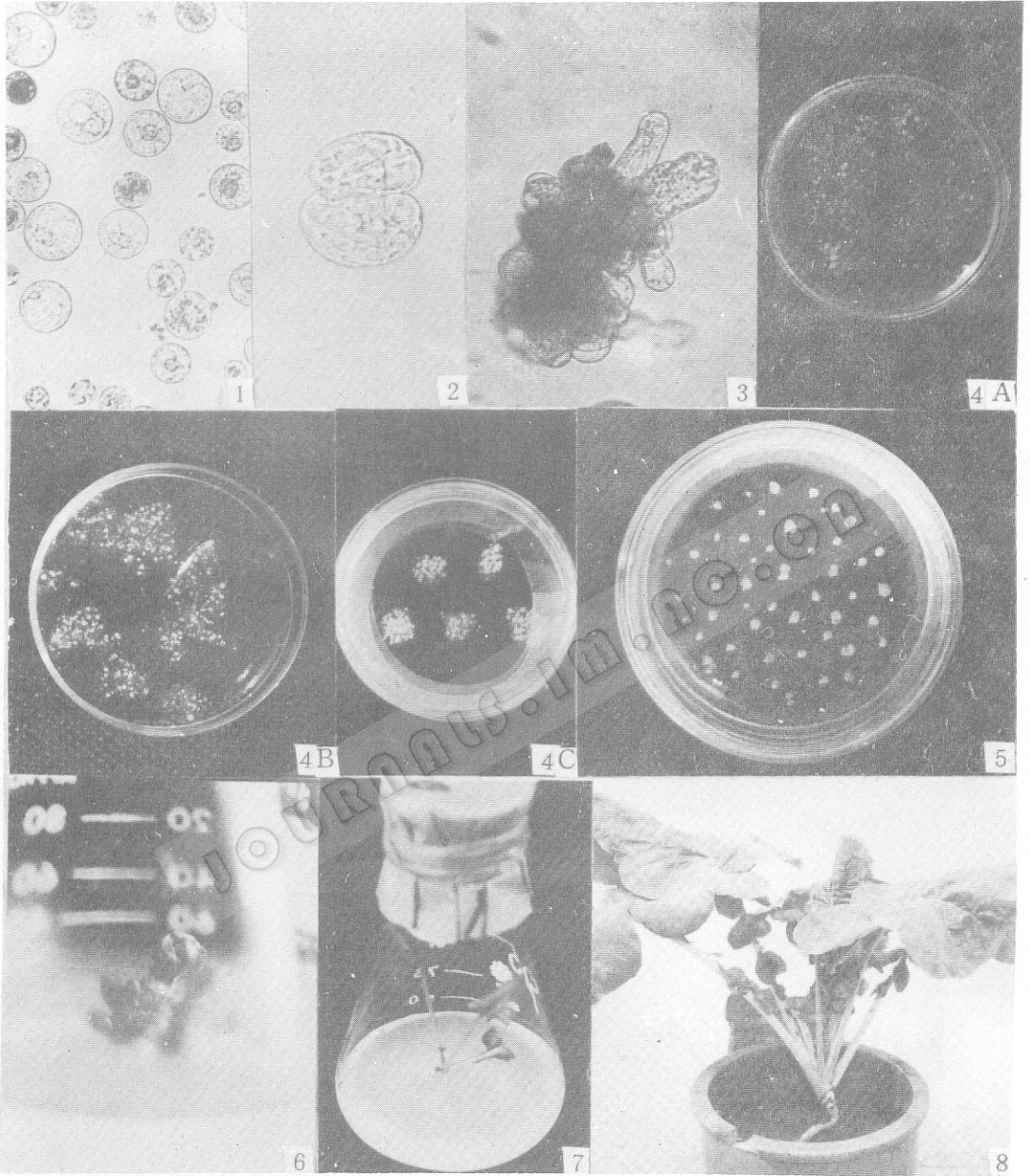
Study on Hypocotyl Protoplast Culture of Rapeseed

Cheng Zhenlong Wei Zhiming Xu Zhihong

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

Abstract Protoplasts were isolated from hypocotyl of two rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars “Yunbei 2” and “Ningyou 7”. Light treatment during seed germination could apparently increase the division frequency. The purified protoplasts were cultured with three different methods. The method called “agarose island” was found superior to the two others (“thin liquid layer” and “agarose solid layer”). Protoplasts cultured in the “agarose island” divided more rapidly, and developed into calli more frequently. Shoot regeneration occurred when the protoplasts-derived calli were transferred onto differentiation medium. Individual shoot was rooted on the rooting medium. Whole plants have been transplanted into pots, and grow well in the phytotron. The “agarose island” method might be suited to the genetic transformation of protoplasts because the liquid medium surrounding the “island” could be conveniently replaced without disturbing the microenvironment of protoplasts plated.

Key words *Brassica napus* L., protoplasts culture, plant regeneration



1. Freshly isolated protoplasts from hypocotyl of *Brassica napus*

2. First cell division

3. Cell cluster regenerated from the hypocotyl protoplasts

4. Small calli regenerated in "thin liquid layer" (A), "agarose solid layer" (B) of "agarose island" (C) culture

5. Calli transferred onto differentiation medium

6. Shoot formation on the protoplast-derived callus

7. Whole plant regenerated on rooting medium

8. Regeneuated plants growing in pots