

油菜薹茎段髓部原生质体培养再生植株*

赵 云 王茂林 王海燕 张义正

(四川大学生物工程系, 四川成都, 610064)

提 要 以油菜品种“蜀杂6号”的薹茎段髓部为材料分离原生质体, 产量一般在每g鲜重 2×10^6 个左右。在每L附加1.5 mgBA、0.4 mgNAA、1.5 mg2, 4-D、200 mg水解酪蛋白、250 mg木糖、0.3 M蔗糖和0.1 M葡萄糖的Nitsch培养基中, 对原生质体进行液体浅层静置培养。2~7天内原生质体出现第一次分裂, 分裂频率最高可达49.2%。培养15天后逐渐形成肉眼可见的小愈伤组织。21天时将培养基改换成每L附加2 mgBA、0.2 mg 2, 4-D和3%蔗糖的MS扩增培养基, 45天后可形成5 mm左右的愈伤组织。大于2 mm的愈伤组织可在每L含有1.0 mgBA、3.0 mgZT和0.1 mgNAA的MS琼脂培养基上分化出芽, 分化频率可达36.7%。在1/2 MS无激素培养基中, 1 cm左右的分化芽有85.9%生根, 形成完整的植株。

关键词 甘蓝型油菜; 薹茎; 髓; 原生质体; 植株再生

植物原生质体能直接摄取外源DNA、细胞器等, 是遗传转化的一个理想受体。原生质体分离培养及再生的成功, 为转移外源基因、改良作物的品质与产量, 提供了一种重要手段。

自从Kartha(1974)^[7]首次从油菜(*Brassica napus*)叶肉原生质体获得再生植株以来, 油菜原生质体的分离培养已取得不少进展。用于分离原生质体的材料主要集中在两部分: 一部分是叶片^[6, 7, 11], 另一部分是下胚轴^[1, 3, 4, 5, 8, 13], 同时也涉及到一些其它的组织, 如子叶^[12]、幼根^[14]、茎胚^[10]、茎皮层^[9]以及叶柄^[2]等。分离原生质体的植株一般为无菌苗或温室栽培的材料, 很少以大田栽种的油菜为材料。以油菜薹茎段髓部为材料, 分离培养原生质体, 则国内外未见报道。我们以大田栽种的油菜薹茎段髓部为材料, 成功地游离出大量有活力的原生质体, 进而获得再生植株。

1 材料和方法

1.1 实验材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)双低杂交一代种“蜀杂6号”, 由本课题组选育, 种植于四川联合大学生物工程系试验地。田间管理按常规方法进行。

1.2 实验方法

1.2.1 原生质体制备 1) 薹茎段表面消毒: 在油菜抽薹后至开花初期, 取其薹茎段, 去掉薹叶及花蕾, 将其切成5 cm长的小段, 放入70%乙醇中消毒2分钟后, 无菌水冲洗一次, 加入0.2% HgCl₂消毒10分钟, 无菌水冲洗4次待用。

2) 酶溶液制备: 酶溶液由1%纤维素酶(Onozuka, R-10)、0.2%果胶酶(Macerozyme,

* 四川省科委应用基础资助项目。

收稿日期: 1996-09-12, 收到修改稿日期: 1997-05-13

R-10)和 3 mmol MES(2-morpholino ethanesulfonic acid)组成,溶于原生质体洗涤液中,经 0.45 μm 孔径的滤膜抽滤灭菌。洗涤液成分为每 L 含: 12.31 mg KH_2PO_4 、100 mg KNO_3 、300 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.16 mg KI、0.025 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 附加 0.4 M 甘露醇, pH5.6~5.8。

3) 原生质体游离: 用解剖刀和镊子去掉灭菌后茎段的表皮及皮层, 将中间髓部切成 0.5 mm 左右的薄片, 放入 50 ml 的三角瓶中, 按每 g 材料加 5 ml 的比例加入酶液, 静置过夜, 酶解温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。次日早上, 将酶解物在水平旋转式摇床上摇一个小时(30 rpm), 最终酶解时间 12~14 小时, 待原生质体游离较完全时, 将酶解液分别经 100 目和 200 目尼龙网过滤。滤液经 500 rpm 离心 5 分钟, 去掉上清液, 用洗涤液将原生质体洗涤 2 次, 沉下的原生质体悬浮于 1.5 ml 的洗涤液中, 然后在 10 ml 的刻度离心管中加入 8.5 ml 含 15% 蔗糖的洗涤液(去掉了甘露醇), 在此液面上缓缓加入上述 1.5 ml 的原生质体悬浮液, 700 rpm 离心 3 分钟, 小心吸出界面的原生质体, 再以培养基洗涤 1~2 次, 即可获得纯的原生质体。

1.2.2 原生质体培养 采用 Nitsch 培养基, 每 L 附加 1.5 mg BA、0.4 mg NAA、1.5 mg 2, 4-D、200 mg 水解酪蛋白和 250 mg 木糖, 分别以 0.4 M 的蔗糖、葡萄糖、甘露醇或它们的不同组合作渗透压稳定剂。当单独以甘露醇为渗透压稳定剂时, 另附加 1% 蔗糖和 1% 的葡萄糖作为碳源。培养基的 pH 值为 5.8。采用液体浅层培养, 在 6 cm 直径的培养皿中, 加入 3 ml 的培养液, 原生质体密度为 $10^4 \sim 10^6$ 个/ml, 于暗处静置培养, 培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。培养至 10 天及 15 天时, 分别用含 0.1 M 蔗糖的培养基稀释, 每次加入 0.5 ml。10 天后转入室内散射光下培养。21 天时, 用细吸管小心吸出培养基, 另外加入 2 ml 的扩增培养基。扩增培养基采用 MS 基本培养基, 并每 L 附加 2 mg BA、0.2 mg 2, 4-D 和 3% 的蔗糖, pH5.8。所有培养基均过滤灭菌。

1.2.3 植株再生 将 2 mm 以上的小愈伤组织转入分化培养基中诱导分化, 分化培养基以 MS 为基本培养基附加一定量的 BA、ZT 和 NAA, 3% 蔗糖和 0.8% 琼脂。待芽长至 1 cm 左右, 将芽切下, 转入 1/2 MS 无激素的生根培养基中诱导生根。在分化及生根过程中, 培养温度为 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$, 每天光照 14 小时, 光强 2500Lux。

2 实验结果

2.1 原生质体分离

油菜茎段髓部在酶解液中能释放大量的原生质体, 纯化后的产量一般在每 g 鲜重 2×10^6 个左右, 原生质体大小在 30~80 μm 之间(图 1-1)。油菜所处的生育阶段对原生质体的产量及活力均有很大的影响。在抽茎至开花前这段时间, 原生质体的产量均较高; 一旦植株开花, 原生质体产量急剧下降, 且很少发生分裂。

2.2 原生质体的分裂

在适宜密度和培养基中, 几小时后, 原生质体细胞质即变浓, 第二天即可观察到部分原生质体分裂, 方式以均等分裂为主(图 1-2)。3~5 天部分细胞发生第二次分裂(图 1-3), 形成 4 细胞团(图 1-4), 紧接着发生第 3 次细胞分裂, 形成 8 细胞团(图 1-5)。原生质体发生第一次分裂的时间不等, 在第 2~7 天均观察到原生质体再生细胞的第一次分裂, 第 9 天统计分裂频率, 高的可达 49.2%。培养 15 天后具几十个细胞的细胞团(图 1-6)可逐渐形成肉眼可见的小愈伤组织, 一月时愈伤组织达 1~2 mm 左右(图 2-7)。在细胞团形成后, 培养基的

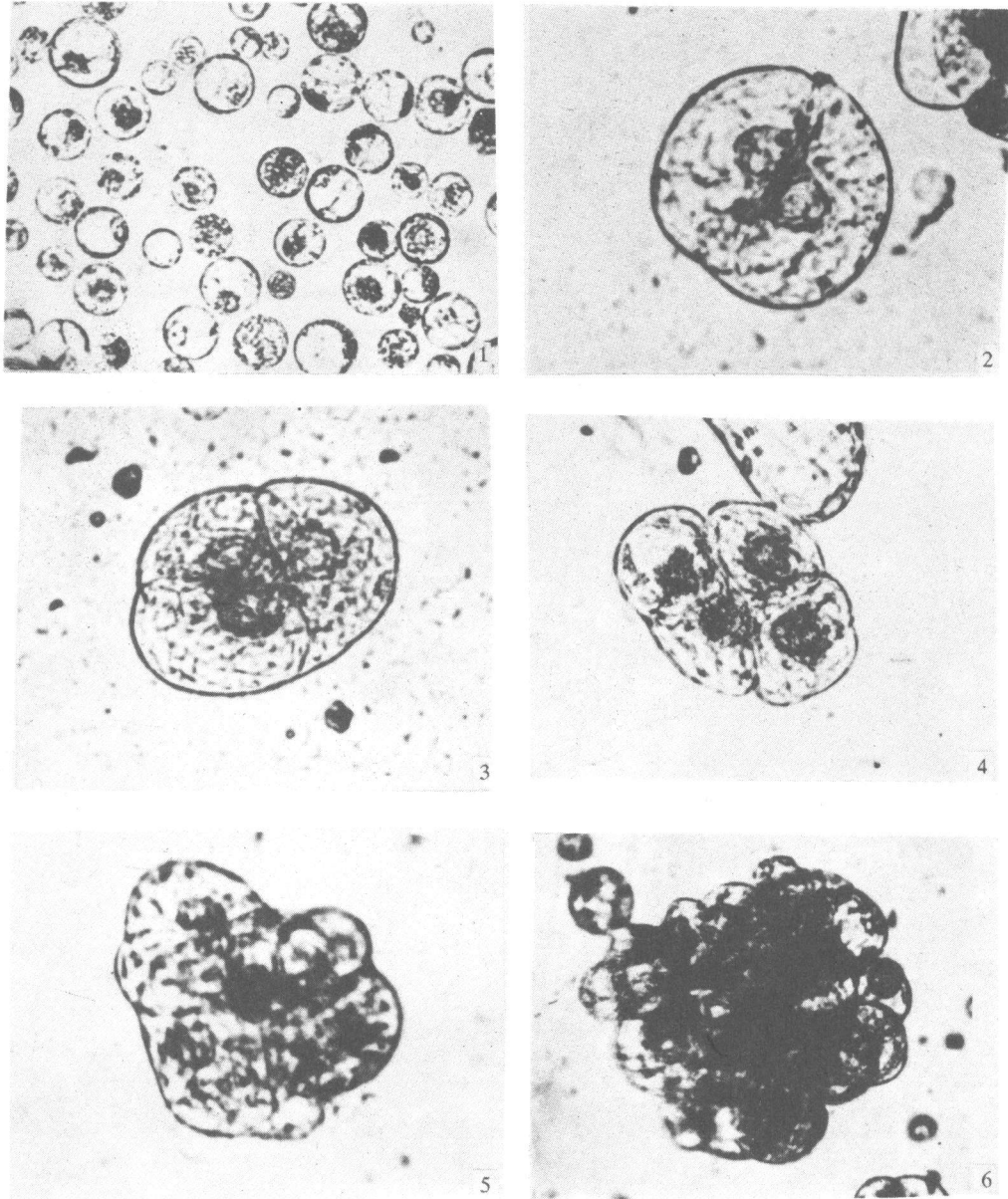


图 1 1. 刚刚分离的原生质体, 2. 第 2 天细胞发生的第一次分裂, 3. 培养 3 天细胞发生第 2 次分裂,
4. 培养 4 天时的 4 细胞团, 5. 培养 8 天时的细胞团, 6. 培养 15 天时的细胞团,
Fig. 1 1. Freshly isolated protoplasts, 2. First division of protoplast-derived cell after 2 cultured days,
3. Second division after 3 days, 4. Tetracellular regenerant after 4 days, 5. Cell colony
growing after 8 days, 6. Cell colony growing after 15 days,

稀释有利于小愈伤组织的快速生长。在培养 3 周后, 如果不换培养基, 愈伤组织一般停留在 1 mm 左右, 很少有愈伤组织继续生长, 如果将培养基换成扩增培养基, 愈伤组织可继续生

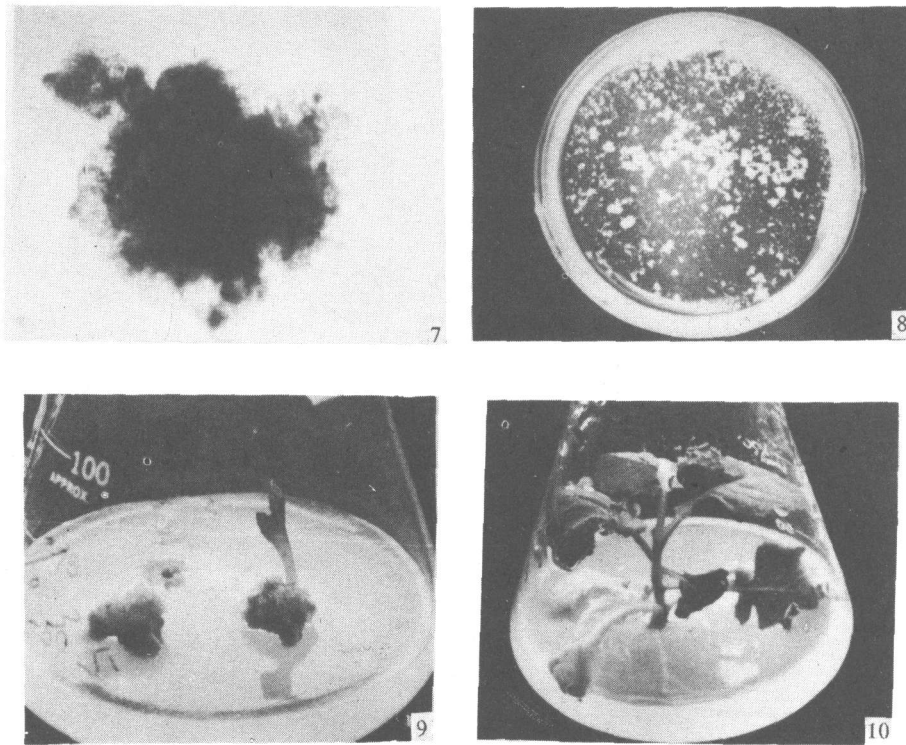


图2 7. 培养4周时的小愈伤组织, 8. 培养45天时的小愈伤组织, 9. 愈伤组织再生芽, 10. 根、芽完整的植株

Fig. 2 7. Microcalli growing after 4 cultured weeks, 8. Microcalli growing after 45 days, 9. Shoot formation from protoplast-derived calli, 10. Complete plantlet with roots and shoots

长, 45天后, 愈伤组织大的可达5 mm(图2-8)。在植板率较高的培养皿中, 换成扩增培养基后, 最好视克隆数的多少进行不同程度的稀释, 否则细胞将相互粘连成片状, 容易褐化死亡, 也难于获得单细胞克隆。

表1 渗透压稳定剂对原生质体分裂的影响*

Table 1 Effect of osmotic stabilizer on cell division and colonies formation in protoplast culture

蔗糖(M) Sucrose	葡萄糖(M) Glucose	甘露醇(M) Mannitol	培养密度(10^4 /ml) Density of protoplast	分裂频率(%) Division frequency	植板率(%) Plating efficiency
0.4	0	0	4	2.4	0
0.4	0	0	5	2.1	0
0.4	0	0	10	4.5	0
0.4	0	0	50	16.0	0
0.4	0	0	100	22.0	0
0	0.4	0	4	2.8	0.1
0	0.4	0	5	10.0	1.0
0	0	0.4	4	3.7	0
0	0	0.4	5	7.9	0.8
0.3	0.1	0	4	25.7	3.1
0.1	0.1	0.2	4	15.5	2.1

* 表中激素组合为每L含1.0 mgBA、0.2 mgNAA和0.8 mg2, 4-D。

* Plant hormones in medium were 1.0 mg BA, 0.2 mg NAA and 0.8 mg 2, 4-D per L.

2.3 渗透压稳定剂对原生质体分裂的影响

单独使用蔗糖作渗透压稳定剂,原生质体均漂浮在培养基表面。在较低密度下,细胞均长大拉长变形,内含物减少,很少发生均等分裂,绝大部分细胞发生出芽,产生仅含细胞质的胞质体(Cytoplasm)。在高密度下,细胞体积变化不大,细胞质变浓,发生均等分裂并沉降在培养皿底部。但高密度培养,褐化现象十分严重,最终未获得细胞克隆。单独使用葡萄糖或甘露醇作渗透压稳定剂的细胞分裂频率虽然不如单独使用蔗糖的高,但一般能获得细胞克隆。从试验的组合看,0.3 M 蔗糖加上 0.1 M 的葡萄糖作渗透压稳定剂效果好(表 1)。

2.4 原生质体培养密度对再生细胞分裂的影响

由表 2 可知,培养密度对原生质体分裂频率有很大的影响。在 5×10^4 个/ml 以上的密度,原生质体的分裂频率都相当高,但是原生质体密度越大,越易导致细胞聚集、粘连,最终褐化死亡。

表 2 培养密度对原生质体分裂的影响*

培养密度(10^4 个/ml) Density of protoplasts	出现一次分裂时间(day) 1st division time	分裂频率(%) Division frequency	褐化情况 Browning	植板率(%) Plating efficiency
1	4	0.1	无 No	0
2	3	12.7	无 No	1.9
3	2~3	24.3	无 No	3.1
5	2	43.9	较少 Little	4.8
10	2	49.2	较明显 Appearance	0
50	2	48.3	明显 Noticeable	0
100	2	无法统计 Unable observation	明显 Noticeable	0

* 渗透压稳定剂为 0.3 M 蔗糖+0.1 M 的葡萄糖。

* Osmotic stabilizer is 0.3M sucrose and 0.1 M glucose.

2.5 植株再生

2 mm 以上的愈伤组织在适宜的分化培养基上,10 天左右即可见绿色芽点,随后芽点进一步分化形成芽(图 9)。ZT 对植株再生影响较大。在无 ZT,仅含 4.0 mgBA/L 和 0.1 mg NAA/L 的培养基中,再生分化率仅 3.3%,其余愈伤组织大部分均褐化死亡;将 BA 换成 ZT 时,再生分化频率提高到 20%,同时,ZT 能有效地抑制褐化,培养基中加入 ZT 后仅有个别愈伤组织褐化。本实验的最佳激素配比是每 L 1 mgBA、3 mgZT 和 0.1 mg NAA,再生分化频率可达 36.7%(表 3)。实验中,未分化的愈伤组织,即使未褐化,在进一步的实验中均未分化出芽,可能失去了再生能力。将 1 cm 左右的芽转入无激素的 1/2 MS 培养基中,78 个芽有 67 个芽最终长出了根,从而形成完整的植株(图 10),生根率 85.9%。

表 3 激素对植株再生的影响

Table 3 Effect of plant hormone on shoot regeneration

激素浓度 Concentrate of hormone (mg/L.)			再生频率(%)
BA	ZT	NAA	Frequency of shoot regeneration
4.0	0.0	0.1	3.3
2.0	2.0	0.1	26.7
1.0	3.0	0.1	36.7
0.0	4.0	0.1	20.0

3 讨论

以叶片为材料分离获得的原生质体产量高,遗传同质性高,但分裂频率及植株再生频率较低^[5, 6, 10];以下胚轴为材料分离的原生质体,分裂频率及再生能力相对较高,但取材需大量的小苗,而且原生质体群体的遗传异质性较高,不适于在对遗传同质性要求很高的情况下使用^[9]。Klimaszewska^[9]利用油菜茎的皮层薄壁细胞分离原生质体,获得54%的细胞分裂频率和20%的再生频率,说明油菜茎是分离原生质体的良好材料。但是采用皮层组织,取材麻烦,在需要量较大的情况下,则需要较多的植株,例如要获取1g新鲜材料,需要4~6株油菜,而每个植株又要取14~16个节间才能满足要求。采用髓部组织,一个植株顶部的3~4个节间,即可取出2~3g材料,同时该植株的分枝仍可收获种子,这特别适合于材料有限尤其是对原生质体遗传同质性要求较高的情况下使用。由于髓部被茎表皮及皮层所包裹,在进行表面消毒时不易受到伤害,因而以髓部为材料分离原生质体优于油菜其它部位的组织,与采用无菌苗为材料的方法相比,则更为方便实用。从取材的时间看,只要适当调整播期或人工进行春化,一年中大部分时间均可获取油菜茎段材料。

在油菜的整个生活史中,抽薹期是生长最为迅速的时期之一,这可能是此时分离的原生质体较易发生分裂的原因。实验结果表明采用薹茎段髓部为材料分离原生质体,其产量和质量均较稳定,且受植株生长环境影响较小。因此,薹茎段髓部薄壁组织可作为油菜原生质体分离的可靠材料来源。

原生质体的大量分离纯化及高频率的植株再生是原生质体高效遗传转化的前提和关键。实验结果表明油菜薹茎段髓部原生质体已满足了这一要求。目前,我们正以油菜髓部原生质体为材料进行遗传转化研究。

参 考 文 献

- 1 程振东、卫智明、许智宏, 1994, 生物工程学报, 10, 30~33
- 2 罗科、罗鹏, 1992, 植物学报, 34, 237~239
- 3 Barsby, T. L., S. A. Yarrow and J. F. Shepard, 1986, Plant Cell Reports, 5, 101~103
- 4 Choung, P. V., K. P. Pauls and W. D. Beversdorf, 1985, Plant Cell Reports, 4, 4~6
- 5 Glimelius, K., 1984, Physiol. Plant., 61, 38~44
- 6 Kao, H. M. and G. Seguin-Swartz, 1987, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 10, 79~90
- 7 Kartha, K. K., M. R. Michayluk, K. N. Kao, et al. 1974, Plant Sci. Lett., 3, 265~271
- 8 Kirti, P. B., 1988, Plant Breeding, 100, 222~224
- 9 Klimaszewska, K. and W. A. Keller, 1987, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8, 225~233
- 10 Kohloebach, H. W., G. Wenzel and F. Hoffmann, 1982, Z. Pflanzenphysiol. Bd. 105, 131~142
- 11 Li, L. C. and H. W. Kohlenbach, 1982, Plant Cell Reports, 1, 209~211
- 12 Lu, D. Y., D. Pental and E. C. Cocking, 1982, Z. Pflanzenphysiol. Bd., 107, 59~63
- 13 Poulsen, G. B. and S. V. S. Nielson, 1989, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 17, 153~158
- 14 Xu, Z. H., M. R. Davey and E. C. Cocking, 1982, Plant Sci, Lett., 24, 117~121

Plant Regeneration from Bolting Stem Pith Protoplasts of *Brassica napus*

Zhao Yun Wang Maolin Wang Haiyan Zhang Yizheng

(Department of Biotechnology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract The yield of purified protoplasts isolated from bolting stem pith of *Brassica napus* cv. Shuza 6 was normally about 2×10^6 per gram of fresh tissue. The protoplasts were cultured in Nitsch liquid medium supplemented with 1.5 mg BA, 0.4 mg NAA, 1.5 mg 2, 4-D, 200 mg caseinhydrolysat and 250 mg xylose per L as well as 0.3 M sucrose and 0.1 M glucose. The first cell division occurred after 2~7 days and the highest division frequency estimated after 9 days of culture was 49.2%. After 15 days, cell colonies were formed and microcalli could be observed. The microcalli were transferred into the proliferation liquid medium (MS with 2 mg BA and 0.2 mg 2, 4-D per L and 3% sucrose) after 21 cultured days and calli, 5 mm in diameter were obtained after 45 days. Protoplast-derived calli, over 2 mm in diameter, were subcultured on the MS agar medium with 1.0 mg BA, 3.0 mg ZT and 0.1 mg NAA per L in order to induce shoots and the frequency of shoot formation was 36.7%. After reaching 1 cm in height of shoots they were transferred onto 1/2 MS medium without any plant growth regulators. 85.9% of shoots were rooted and complete plants were obtained.

Key words *Brassica napus*; Bolting stem; Pith; Protoplast; Plant regeneration