

102-102

第21卷 第1期
1993年1月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol.21 No.1
Jan. 1993

甘蓝子叶原生质体培养与植株再生的研究*

孙 振 久

(陕西省蔬菜研究所, 陕西杨陵·712100)

摘 要 将 0.5% 纤维素酶 Rs+0.1% 果胶酶 Y-23 酶溶液振荡处理 3 h, 可得到最高的细胞分裂率, 但原生质体分离数量较低, 0.5% 纤维素酶 R-10+0.05% 离析酶 R-10+0.005% 果胶酶 Y-23 酶溶液, 25℃ 下处理 14 h, 原生质体分离数量及细胞分裂率均较高, 1/2MS 培养基添加 NAA 3 mg/L+BA 0.5 mg/L+2, 4-D 0.1 mg/L 的液体培养基有利于细胞团形成及愈伤组织生长。本试验获得了完整的再生植株, 芽分化率达 20% 左右。

关键词 甘蓝; 子叶; 原生质体培养; 液体培养基; 植物激素 / 植株再生

中图分类号 Q944.6; S635.103.5

甘蓝(*Brassica oleracea*)原生质体培养的报道较多⁽¹⁻⁶⁾。制取原生质体的取材器官、部位、试材的营养状态和生长发育阶段的不同, 都影响原生质体的分离数量及活力⁽⁴⁾。不同品种间原生质体培养效果及植株再生能力均有很大差异⁽³⁾, 不同研究中分离原生质体所用酶溶液的成分、浓度不同, 培养基组成差异也较大^(2,3,6,7), 因此, 有必要进一步探讨较好的原生质体制取及培养条件。

1 材料与方法

以甘蓝的杂交一代品种“秦菜 3 号”为试材。将种子在 70% 乙醇中浸泡 20 s, 再用 1% 次氯酸钠消毒 10 min, 播入含有 MS 基本培养基的试管中, 在 25℃, 12 h 光照下培养 7~10 d, 切取展开的子叶, 在含有 CPW 盐的 0.5 mol/L 甘露醇溶液中切成 1 mm 宽的细条, 放入不同酶成分和浓度的酶溶液中处理。再用孔径 50 μm 的尼龙筛过滤, 以 900 r/min 离心 3 min, 用含有 0.5 mol/L 甘露醇的 CPW 盐溶液洗涤 3 次, 即得到原生质体。将原生质体放入不同组成、不同激素浓度的培养基中, 密度调整为 1×10^5 个/mL, 培养 1 周后观察细胞分裂情况, 3 周后调查细胞团形成情况。试验重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 酶液成分和浓度对原生质体分离效果的影响 将不同成分和浓度酶溶液处理得到的原生质体, 培养在(1/2)MS+NAA 1 mg/L+BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+0.5 mg/L 甘露醇的液体培养基中, 1 周后观察其细胞分裂情况。酶的组成及浓度见表 1。结果表明, 以 0.5% 纤维素酶 Rs+0.1% 果胶酶 Y-23 酶溶液振荡处理 3 h(处理 3), 细胞分裂率最高, 但原生质体分离数量则不如处理 1 和处理 2 高, 同时碎片也较多。以 0.5% 纤维素酶 R-10+0.05% 离析酶 R-10+0.005% 果胶酶 Y-23 酶溶液处理 14 h(处理 2), 原生质体分离数量及细胞分裂率均较高, 说明处理 2 较适于供试材料的原生质体制取。可以看

收稿日期: 1991-12-04

出, 酶的成分和浓度对原生质体的产量与质量影响很大。前人的研究认为, 酶的浓度低时甘蓝叶肉原生质体分离数量下降, 而且由于原生质体缓慢分离, 常常导致自身融合。而过分增加酶的浓度, 同样会降低原生质体的活力^[3,5,8]。在本试验中也看到酶的浓度高于1%时, 原生质体活性显著下降。

表1 不同酶成分和浓度的处理效果

处理	酶成分及浓度	处理条件		细胞分裂率 (%)	原生质体 分离数量 ¹⁾
		温度(℃)	时间(h)		
1	1%纤维素酶 R-10 0.1%离析酶 R-10 0.5%纤维素酶 R-10	25	14	13	+++
2	0.05%离析酶 R-10 0.005%果胶酶 Y-23 0.5%纤维素酶 R ₁	25	14	35	++++
3	0.1%果胶酶 Y-23	29	3 ²⁾	43	+

1) 酶液中原生质体数量; +: $<1 \times 10^2$ 个/mL; ++: $<1 \times 10^3$ 个/mL; +++: $<1 \times 10^4$ 个/mL; ++++: $>1 \times 10^5$ 个/mL; 2) 50 次/min 振荡处理。

2.2 不同培养基、激素和浓度对细胞团、愈伤组织形成的影响 将处理2酶溶液制备的原生质体以 1×10^5 个/mL 的密度培养在液体培养基中(表2)。在25℃黑暗条件下培养3周后观察细胞团形成情况。每隔1周添加一次新鲜培养液, 5周时调查愈伤组织形成情况。结果表明, 不同培养基对细胞团及愈伤组织形成的影响较一致, 较高浓度的生长素类物质有利于细胞团的形成和生长, 同时细胞分裂素与生长素的比例也有较大影响。在3种基本培养基中, 以(1/2)MS效果最好。在此培养基中产生的愈伤组织生长较快, 形成的数量多, 多为淡白色, 较疏松。培养基中碳源的种类及浓度对细胞壁的再生产生一定影响。高浓度的 NH_4NO_3 对原生质体有毒害作用, NH_4^+ 会大大降低原生质的活力^[1]。本试验中 NH_4^+ 浓度较低的(1/2)MS培养基效果较好也说明了这一问题。

表2 不同培养基及激素组成的培养效果

培养基	mg/L					
	NAA 1+BA 0.5+2,4-D 0.1		NAA 3+BA 0.5+2,4-D 0.1		NAA 0.5+BA 1	
	细胞团	愈伤组织	细胞团	愈伤组织	细胞团	愈伤组织
KM	++	+	++	+	+	+
MS	+	±	±	-	+	-
(1/2)MS	++	+	+++	++	+	+

注: 细胞团及愈伤组织形成百分率。-, 0%; ±, $<1\%$; +, $1\% \sim 5\%$; ++, $5\% \sim 20\%$; +++, $20\% \sim 50\%$ 。

2.3 植株再生 将上述试验中得到的小愈伤组织转移到再分化培养基(1/2)MS+BA 1 mg/L+GA₃ 0.03 mg/L+3%蔗糖+0.6%琼脂)中, 于25℃, 2000 lx, 16 h光照条件下培养3周后分化出芽, 待芽长到1~2 cm时将其切取, 转移到(1/2)MS+NAA 1 mg/L+3%蔗糖+0.6%琼脂的生根培养基中, 2~3周后生根, 形成完整植株。根尖染色体观察多数为 $2n=18$, 也看到 $2n=36$ 和非整倍体, 但比例很小。本试验未进行再分化培养基的筛选, 利用文献[3]的经验得到了较高的芽分化率(20%左

右)。试验中看到, 继代培养的时间、愈伤组织的状态都对植株再生产生较大影响。

不少研究表明, 植物的生长环境、年龄都会对原生质体的分离产生影响, 是原生质体分离的重要因素^[1,4,6]。本试验以试管苗为试材, 较好地排除了生长环境等外界因素的影响, 2 次试验重复所得结果一致。

本文是在日本京都府农业综合研究所的稻叶幸司先生指导下完成的, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 王纪方, 金波. 蔬菜组织培养. 上海: 上海科学技术出版社, 1983
- 2 西貞夫. 野菜の組織、細胞培養と育種. 東京: 農業図書株式会社, 1990: 185~187
- 3 松原幸子. アブラナ科植物の子葉プロトプラストからのカルス形成及び植物体再分化. 園学雑 59 別 2, 1990, 290~291
- 4 西尾剛. アブラナ科野菜葉肉プロトプラストの初期培養条件に関する研究. 野菜試験場報告 A, 1986, 14: 11~19
- 5 Swanson E B, Dunwell J M. The characterization of herbicide to lerant plants in *Brassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. *Plant Cell Reports*, 1988; 7: 83~87
- 6 Fu Y Y, Jia S R, Lin Y. Plant regeneration from mesophyll protoplast culture of Cabbage (*Brassica oleracea*). *Theor Appl Genet*, 1985; 71: 495~499
- 7 Lu D Y, Pental D, Cocking E C. Plant regeneration from seedling cotyledon protoplast. *Z Pflazen Physiol Bd*, 1982; 107: 59~63
- 8 岸本直樹. ダイコン子葉プロトプラストからの不定芽形成. 植物組織培養, 1990; 7(2): 114~115

The Culture of Cotyledon Protoplasts and Regeneration of Plantlets of *Brassica oleracea*

Sun Zhenjiu

(Shaanxi Vegetable Research Institute, Yangling, Shaanxi, China, 712100)

Abstract Through the treatment of application of 0.5% cellulase Rs+0.1% pectolyase Y-23 by shaking for 3h, the highest cell division efficiency was obtained, but the number of protoplast isolation was relatively low. Also, through the treatments using enzyme mixture of 0.5% cellulase R-10+0.05% macerozyme R-10+0.005% pectolyase Y-23 incubated at 25℃ for 14h, more protoplasts were isolated and a high efficiency of cell division was gained. The liquid medium of 1/2 MS containing 3 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA and 0.1 mg/L 2,4-D was favourable to the formation of cellular aggregate and the callus growth. Complete plantlets regenerated were obtained, and the bud differentiation rate can reach 20% or so in this experiment.

Key words *Brassica oleracea*; Cotyledons; Protoplast culture; liquid media; phytohormones / plantlet regeneration