

② 101-103

第28卷 第3期
2000年6月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 28 No. 3
Jun. 2000

[文章编号]1000-2782(2000)03-0101-03

一种简化有效的普通烟草
原生质体培养方法

S572.035.3

黄文川¹, 杨其光²

(1 中国科技大学 经济技术学院, 安徽 合肥 230052)

(2 安徽农业大学 生物工程实验室, 安徽 合肥 230036)

[摘要] 用不同方法进行普通烟草叶肉细胞原生质体培养, 在低温(10℃)预处理原生质体分离材料后, 加厚双层培养基中的固相至固液相体积比为4:1~5:1时, 有利于愈伤组织的快速形成和植株再生。

[关键词] 原生质体培养; 改良双层培养; 普通烟草; 植株再生; 愈伤组织

[中图分类号] S572.035.3 [文献标识码] A

随着一些重要作物(禾本科、豆科等)原生质体培养及植株再生的突破^[1,2], 对建立原生质体植株再生的优化系统研究也越来越多。Firoozabady^[3]以烟草为材料, 建立了烟草原生质体快速植株再生程序, 将培养周期由原来的13周缩短为7周。我国学者徐杏阳^[2]继之对这一系统又作了一些改进。本文在前人研究的基础上^[4], 通过不断实践论证, 探讨出更为简化实用的普通烟草原生质体培养优化系统。

1 材料与方 法

取烤烟良种NC89种子, 表面灭菌, 点播于1/4MSo培养基上。光照(28℃)培养获无菌苗。取1月龄苗叶片, 去中脉, 切成丝状, 置酶液(改良CPW液+10g/L纤维素酶+2g/L离析酶+0.426mol/L蔗糖, pH=5.7)中25℃, 38r/min摇床暗中酶解10h。解离原生质体用0.08mm孔径的尼龙网筛过滤, 离心3min, 漂浮收集。用原生质液体培养基(MS+BA 0.5mg/L+2,4-D 1mg/L+蔗糖 0.426mol/L)调整原生质体至所需密度。

原生质液体培养基悬浮液用3种方式分别培养^[1,5]。①液体浅层培养。将2mL悬浮液接种于直径6cm的培养皿中, 封口培养。②双层培养。培养皿中先用2mL愈伤组织增殖培养基(MS+2,4-D 1mg/L+30g/L蔗糖+7.5g/L琼脂)铺成薄层平板, 再接种2mL悬浮液。③加厚双层培养。将上述双层培养中固相体积加大, 由2mL增至4~10mL。3种方式均在暗中、静止、25℃下进行。

2 结果与分析

2.1 不同培养方式对细胞分裂和愈伤组织的影响

在液体浅层培养中, 原生质体2d后开始膨大, 以后细胞逐渐拉长呈椭圆形。5d后出

[收稿日期] 1999-12-22

[基金项目] 安徽省科委“八五”攻关项目“主要农作物细胞育种及遗传操作研究”

[作者简介] 黄文川(1963-), 男, 讲师, 硕士。

现第一次分裂(以均等分裂为主),10 d 后出现第二、三次分裂,此时分裂频率为 55.3%。20 d 后显微镜下可见小细胞团,30 d 后形成肉眼可见的愈伤组织。与浅层培养方式比较,双层培养在细胞分裂和愈伤组织大小上未出现显著差异。而保持液相体积不变,逐步增加固相体积时,细胞分裂频率无显著提高,但愈伤组织形成有极显著差异,其中固液相体积比为 4:1~5:1 时效果最佳(表 1)。

表 1 3 种培养方式对普通烟草原生质体再生细胞分裂及生长的影响

培养方式	固相体积/ mL	液相体积/ mL	固液相 体积比	培养 10 d 后 细胞分裂 频率/%	培养 20 d 后愈伤组 织直径/mm
液体浅层	0	2	0	55.3 a	≈0.1 c
双层	2	2	1	56.1 a	≈0.1 c
加厚双层	4	2	2	56.6 a	0.55 b
	6	2	3	56.8 a	0.57 b
	8	2	4	57.0 a	1.83 a
	10	2	5	57.1 a	1.85 a

注:表中数字后字母示差异显著性,不同字母代表 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著,相同字母表示差异不显著;q 测验,4 次重复;原生质体密度为 $1.91 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,下表同。

2.2 不同培养方式对植株再生的影响

采用加厚双层培养,20 d 后即能形成 2 mm 的愈伤组织,转至分化培养基 14 d 后,分化出芽。切下芽点置 1/2 MSo 培养基中生根培养,7 d 后形成完整小植株。这比前人的烟草原生质体再生系统^[4]更加简化快速。

2.3 低温预处理和原生质体密度对培养效应的影响

采用常温(28℃)和低温(10℃)控制,对离体叶片进行温度处理。通过不同原生质体密度进行培养。结果表明,低温预处理原生质体分离材料显著提高细胞分裂频率,与 Zapata 等^[6]的结果一致,而较低培养密度则能提高分裂频率和降低蛔虫形细胞团的产生(表 2)。

表 2 不同预处理温度和培养密度对原生质体分裂频率及细胞状态的影响

预处理温度/ ℃	培养密度/ mL^{-1}	1~3 次 分裂频率/%	蛔虫形细胞团 发生率/%	预处理温度/ ℃	培养密度/ mL^{-1}	1~3 次 分裂频率/%	蛔虫形细胞团 发生率/%
28	5.8×10^5	8.13 f	6.26 a	10	5.8×10^5	38.51 d	3.05 c
	2.9×10^5	21.07 e	4.37 b		2.9×10^5	57.34 c	1.11 e
	2.9×10^4	63.05 b	1.88 d		2.9×10^4	79.16 a	0 e
	2.9×10^3	0 g	0 e		2.9×10^3	0 g	0 e

注:q 测验,3 次重复。

3 讨 论

本试验对常规双层培养法进行改良,改常规双层培养法的薄层固相为厚层固相,改原高糖质量浓度的固相为低糖质量浓度的固相,而固相培养基中的激素成分也有所变化。分析改良双层培养法的优点,可能有 3 个方面。① 具有较强的通气培养功能。加厚的固相能逐渐吸收上层液相,随着细胞的不断分裂,上层液相不断变薄,这样原生质体及分裂后的细胞团可始终处于良好的通气状态,较好的促进了原生质体再生细胞的分裂和愈伤组织的快速形成。② 加厚的固相使之吸收液相中某些毒物的能力提高。③ 改良的双层培养基

中低糖质量浓度的固相能使液相中的再生细胞团逐渐适应低糖环境而使细胞处于紧张状态,有利于细胞的生长和分裂;另外,固相中含有的较高质量浓度的生长素,也促进了再生细胞的快速分裂。综上所述,经改良的双层培养方法培养的普通烟草原生质体,培养 20 d 后即可分裂再生成直径为 1~2 mm 的愈伤组织,而对照(液体浅层和常规双层培养)的原生质体再生细胞仅形成肉眼难以看见的微小细胞团(直径在 0.1 mm 以下)。用此改良双层培养法进行普通烟草原生质体培养最终使其培养周期(从原生质体培养到完整植株再生)缩短为 40 d 左右。

[参考文献]

- [1] 颜昌敬. 农作物组织培养[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991.
- [2] 卫志明,许智宏. 大豆原生质体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯,1988,2:53-54.
- [3] Friozabady E. Rapid plant regeneration from *Nicotiana mesophyll* L.L. protoplasts[J]. Plant Sci, 1986, 46: 127-131.
- [4] 徐杏阳. 烟草叶肉细胞原生质体快速再生植株的简易方法[J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(4): 359.
- [5] 杨其光,唐贵良,林国平,等. 烟草体细胞无性系变异及体细胞杂交研究[J]. 安徽农业大学学报, 1993, (增刊): 15-18.
- [6] Zapata F J, Evans P K, Power J B. et al. The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of *lycopersicon esculentum* and *lycopersicon peruvianum*[J]. Plant Sci Lett, 1977, 8: 119-124.

A simplified and effectual system of protoplast culture of *N. Tabacum*

HUANG Wen-chuan¹, YANG Qi-guang²

(1 University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230052, China;

2 Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: Different methods are used to cultivate leaf protoplast of *Nicotiana tabacum*. After pre-treatment of protoplast material at low temperature (10℃), two-layer culture medium is thickened to the extent that the volume ratio of solid and liquid reached 4 : 1—5 : 1, which is quite helpful for rapid emergence of callus and plant regeneration.

Key words: protoplast culture; modified two-layer culture; *Nicotiana tabacum*