

# 埃塞俄比亚芥的原生质体培养 及植株再生

杨美珠 贾士荣

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100081)

## 摘 要

以埃塞俄比亚芥“84A165”为材料,从3—5日龄无菌苗的子叶、下胚轴或温室生长的三叶期苗的第一真叶游离原生质体,悬浮于P-B液体培养基中,用0.15—0.3%低融点琼脂糖固化,薄层漂浮,暗培养。原生质体密度为 $5 \times 10^3$ — $1 \times 10^4$ /ml。下胚轴原生质体在培养后48小时出现一次分裂,3天后分裂频率达21%,6天后达34%。子叶和真叶原生质体起始分裂稍晚(第5天),分裂频率也较低。培养1周后,加入稀释培养基DPDK<sub>3</sub>,并转至光下,以后每隔一周加液一次。一个月后获得肉眼可见的小愈伤组织。植板率为2—3%。小愈伤组织在固体增殖培养基上继代长大。子叶和真叶原生质体来源的愈伤组织在转至补加NAA 0.1、BA 3mg/l的分化培养基上后获得芽分化,把这些芽切离,转至IAA 0.2mg/l的生根培养基上,再生出完整植株。

**关键词** 埃塞俄比亚芥;原生质体;植株再生

埃塞俄比亚芥是芸苔属(*Brassica*)中的三个复合种之一,具BBCC基因组,具有很大的应用潜力<sup>[3]</sup>。芸苔属原生质体培养在80年代发展很快,现已从甘兰型油菜(*B. napus*)<sup>[2,5,8-11,18]</sup>、甘兰(*B. oleracea*)<sup>[3,8,12,13,16-18,20]</sup>、芥菜型油菜(*B. juncea*)<sup>[4,19]</sup>、白菜型油菜(*B. campestris*)<sup>[8]</sup>、以及埃塞俄比亚芥(*B. carinata*)<sup>[6]</sup>获得植株再生。其中甘兰型油菜和甘兰研究最多,白菜型油菜的植株再生仍难以突破,仅Glimelius(1984)<sup>[10]</sup>获得1%的再生频率。埃塞俄比亚芥原生质体的植株再生迄今只有一篇报道,植板率较低,只有0.2—0.6%<sup>[6]</sup>。

本文报告埃塞俄比亚芥的下胚轴、子叶、真叶原生质体培养,并由子叶和真叶原生质体再生成完整植株。

## 材 料 和 方 法

### (一) 供试材料

埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata* Braun.)“84A165”由江苏省农业科学院经济作物研究所陈玉卿同志惠赠,并经蕾期自交或开放授粉繁殖一代。挑选表面光滑的饱满种子,经70%乙醇消毒数秒后,立即投入0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液中,消毒2—3分钟,不时摇动,然

后用无菌蒸馏水冲洗 5 次以上,滤纸上凉干,接种在 Nitsch 无激素培养基上。25℃ 散射光下培养,3—5 天后待用。

## (二) 原生质体的游离

取 3—5 日龄苗的下胚轴,撕去表皮,切成 5mm 长的小段,子叶切成 1mm 左右的细条。第一真叶取自温室生长的三叶期苗,撕去下表皮,投入已配制好的酶解液中。酶液最终浓度为纤维素酶 Onozuka R<sub>10</sub> 1%、离析酶 Macerozyme R<sub>10</sub> 0.4%,配制方法同前报道<sup>[2]</sup>。75rpm 旋转式摇床上振荡,下胚轴酶解 9—16 小时,子叶 16—24 小时,真叶 4—6 小时。原生质体呈球形,质膜较薄时中止酶解。

## (三) 原生质体的培养

原生质体酶混合液经 62 $\mu$ m 不锈钢网过滤,500rpm 离心 5—7 分钟,除去上清液,沉淀物用 P-B 培养基重悬,于离心管底部注入 17% 蔗糖漂浮,500rpm 离心 5—7 分钟,吸出两液层界面的原生质体,再经沉淀收集法用 P-B 培养基洗涤 3 次,重悬使原生质体密度为  $2 \times 10^4$  左右。将此悬液与 30℃ 左右、含 0.3—0.6% 低熔点琼脂糖的 P-B 培养基等量混合 (V/V = 1:1),滴入 60mm 直径塑料培养皿中,使之成一薄层,待冷却到半固体状态时加入 P-B 液体培养基,这时包埋了原生质体的琼脂糖薄层即漂浮在液体表面。培养皿用 Parafilm 封口,25℃ 下暗培养。

培养 1 周后,加入渗透压降低的稀释培养基 DPDK<sub>3</sub><sup>[7]</sup> 0.5ml,转至 1000lx 荧光灯光照下培养,并每隔一周加入新鲜的 DPDK<sub>3</sub>。待形成肉眼可见的小愈伤 (300—500 $\mu$ m) 后,转至改良的 MS 固体培养基上 (MS 无机盐, B<sub>5</sub> 维生素,甘氨酸 2mg/l,蔗糖 3%, N. Z. amine 500mg/l, 琼脂 0.7%, pH5.8),添加不同的激素配比,诱导愈伤组织增殖。

## (四) 愈伤组织的继代分化

小愈伤从液体转至固体后,开始生长缓慢,4 周后小愈伤长大,这时或转至愈伤组织增殖培养基上(改良的 MS, 补加 2,4-D 0.01—0.5、KT1—3mg/l) 继代,或转到低生长素 (NAA)、高细胞分裂素 (BA) 的培养基上诱导器官分化。

# 结 果

## (一) 原生质体的分离和培养

下胚轴酶解 9 小时后,即可见到许多大小不一、液胞化程度不等的原生质体。高度液胞化的原生质体由于离心时难以沉淀,在洗涤中部分汰除。经 17% 蔗糖漂浮,可获得较纯净的原生质体,成活细胞达 90% 左右(图版 I, 1)。

下胚轴原生质体培养 1 天后,有些细胞变成椭圆,两天后即可见一次分裂(图版 I, 2),培养第 3 天分裂频率为 21%,第 6 天达 34.4%。子叶和真叶原生质体起始分裂比下胚轴晚 2—3 天,一般培养 5 天后出现一次分裂,分裂频率也远比下胚轴低(10 天时约 20%)。

观察中发现,苗龄对下胚轴、子叶原生质体的产率和分裂频率有很大影响。酶解 3—7 日龄苗的下胚轴均可获得有活力的原生质体,但以 3—5 日龄苗的下胚轴游离效果最好,并可获得高频率的细胞分裂。子叶只在 3 日龄苗时游离原生质体才能见到细胞分裂。以上结果与以往大多数研究者采用 3—5 日龄苗作为起始材料的结果一致<sup>[4,10]</sup>。这个时期

的幼苗子叶刚刚从淡黄转成完全绿色, 可以作为一种形态标志。

真叶原生质体培养中叶位非常重要, 采用不同大小的第2、3片真叶, 均未获得细胞分裂。

### (二) 细胞团的持续分裂与生长

原生质体在培养中有轻微褐化出现, 但只要定期加入稀释培养基 DPDK<sub>3</sub>, 并转至光下培养, 则许多细胞团可继续发育至小愈伤组织。下胚轴原生质体的植板率达2—3% (小愈伤组织数/培养细胞数)。

由于包埋时琼脂糖浓度较低, 琼脂糖内的细胞团很易扩散到液体中去。观察发现, 包埋时植板密度过大, 常易导致褐化加重。为防止琼脂糖内部相邻细胞团之间的相互抑制, 我们在加 DPDK<sub>3</sub> 稀释时常将琼脂糖分割成小片, 让更多的细胞团扩散到液体中去, 同时使培养皿中的液体尽量呈一薄层, 以改善通气状况, 这样可使细胞团很容易地长成小愈伤组织。

在子叶原生质体培养中, 曾观察到球形胚的形成。当细胞团长至肉眼可见的小愈伤组织时, 其表面常常突起一些光滑致密的球形结构(图版 1, 5、6)。

### (三) 愈伤组织的增殖与器官分化

小愈伤组织由液体转至固体时, 其体积越大, 转移后成活率越高, 以直径大于0.5mm为宜。

小愈伤组织在低2,4-D (0.1mg/l) 下, 比在高2,4-D (0.5mg/l) 下生长相对较快。它们在2,4-D 0.01—0.05mg/l BA 或 KT 1—5mg/l 的培养基上均未分化出芽, 但常有根毛(覆盖在愈伤组织表面)或根形成。在无生长素仅含激动素的培养基上, 根的分化也很普遍。小愈伤在 NAA 0.5—2mg/l、BA1—3 mg/l 的培养基上比在2,4-D 的培养基上生长更快(表1)。

表1 小愈伤组织从液体转至固体\*后45天的生长状况

Table 1 Growth of microcalli 45 days after transferring onto agar medium\* from liquid culture

2,4-D (mg/l)	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0	2.0
NAA					0.5	0.5	0.5	2.0	2.0
KT	1.0	3.0	1.0	3.0					
BA					1.0	3.0	5.0	1.0	3.0
愈伤组织状态 <sup>1)</sup>	II	II	I	I	IV	IV	III	III	III
Callus structure									
愈伤组织生长量 <sup>2)</sup>	++	++	+	+	++	+++	+	++	+++
Callus growth									
根毛 <sup>3)</sup>	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Root hairs									

\* 基本培养基均为改良的 MS。1) 愈伤组织状态分为四级: 1. 致密 2. 较致密 3. 较松散 4. 松散。2) 愈伤组织生长量分为三级: +, 生长较慢 ++, 生长较快 +++, 生长迅速 3) 根毛: +, 少许 - 无根毛

\* Modified MS as a basic medium. 1) Callus structure was divided into four categories: 1. Dense 2. Relatively dense 3. Relatively loose 4. Loose 2) Callus growth is divided into three classes: +. Slow ++. Medium +++. Fast 3) Root hairs: +. Few -. No root hair formed

子叶和真叶原生质体来源的愈伤组织,在 2,4-D 0.4 和 0.2mg/l、KT 3mg/l 的改良 MS 上继代,愈伤组织变得致密,生长减慢,一个半月后将其转至 NAA 0.1mg/l、BA 3 mg/l 的分化培养基上,2 周后有绿点产生,同时出现少量根毛,3 周后从绿点处出现芽分化(图版 I, 9)。其中有一块愈伤上长出带两片子叶的小植株,随后有二、三片真叶长出(图版 I, 8)。在供试的147块愈伤组织中,有 11 块分化出 25 个芽,分化率 7.5%。

将再生芽转至仅含 BA 1mg/l 的培养基上继代,可形成许多丛生芽(图版 I, 10)。丛生芽切开逐个地转至补加 IAA 0.2mg/l 的生根培养基上,即可形成根和完整小植株。

## 讨 论

下胚轴、子叶具有取材方便,不需表面消毒、污染较少,生理状态易于控制,结果稳定,重复性较高等优点,故近年来被广泛地采用。

芸苔属原生质体在液体培养中容易聚集,不仅导致早期观察的困难,还会因聚集引起细胞褐化,甚至破碎解体,降低分裂频率,尤其是子叶和真叶原生质体聚集现象更为严重<sup>[17,20]</sup>。芸苔属原生质体培养的另一特点是,成活原生质体均漂浮在液体表面,能进行持续分裂;沉淀于培养皿底部的原生质体均大多死亡,或为细胞碎片,或者只停留在一、二次分裂上,很难继续发育。推测这与通气状况不良有关。为此 Chuong 等(1985)<sup>[7]</sup>在芸苔属下胚轴原生质体培养中,采用 13% 蔗糖加 5g/l Ficoll 漂浮的方法,使原生质体及其后形成的小愈伤漂浮在液体表面,获得很好的结果。我们采用琼脂糖半固体包埋并漂浮在液体表层的方法,使原生质体既避免聚集,容易观察,又利于通气,加液时易于更换新鲜培养基,从而提高了分裂频率。我们在下胚轴原生质体培养中发现,浅层液体培养 5—7 天后,聚集的细胞团逐渐解体,若在解体之前把这些分裂的细胞团包埋在琼脂糖内,则细胞团继续发育,解体现象大大减轻。这可能是由于细胞聚集时,释放出一些有害物质,使相邻的细胞受到影响。由于采用琼脂糖薄层包埋漂浮法,埃塞俄比亚芥下胚轴原生质体的植板率可达 2—3%。

据文献报道和我们观察,芸苔属原生质体来源的愈伤组织,在分化培养基上很易形成根和根毛,有些愈伤上密密地覆盖根毛,然后出现芽分化。所有在 2,4-D 0.1—0.5mg/l 配合以各种 KT 浓度的固体培养基上生长的小愈伤组织,或继代后较大的愈伤组织,在转移到 2,4-D 降至 0.05mg/l 以下、BA 或 KT 1—5mg/l 的培养基上,根和根毛的分化率在 50% 以上。这表明,降低 2,4-D 对根的发生十分有利。

子叶和真叶原生质体来源的愈伤组织,在 2,4-D 0.4 和 0.2mg/l、KT 3mg/l 的固体上继代一个半月后,转移到 NAA 0.1mg/l、BA 3mg/l 的分化培养基上,两周后分化出芽,四周后又观察到有的分化物带有两片正常的子叶,随后从子叶中间长出 2—3 片真叶。

Murashige 等(1984)指出<sup>[4]</sup>,器官发生只有在类分生组织或能转变成类分生组织的细胞中实现,近期研究认为,高 2,4-D 在诱导这种类分生组织、促进体细胞胚的形成中有重要作用,但体细胞胚在高 2,4-D 下继续生长则会受到抑制,胚状体的发育或器官发生必须在转至低生长素的条件下进行。我们在埃塞俄比亚芥子叶原生质体再生中观察到由前期高生长素转入后期低生长素诱导出植株再生,与上述解释相吻合。

## 参 考 文 献

- [1] 李文彬、陈正华、宋玉华、张大卫, 1986: 芥菜型油菜原生质体再生的研究。遗传学报, 13: 184—187。
- [2] 傅幼英、贾士荣、林云, 1985: 结球甘蓝叶肉原生质体培养再生植株。园艺学报, 12(3): 171—175。
- [3] Anand, I. J., J. P., Singh, and R. S. Malik, 1985: *Brassica carinata*, a potential oilseed crop for rainfed agriculture. *Cruciferae Newsletter*, No. 10, pp 76—79.
- [4] Barsby, T. L., S. A. Yarrow, and J. F. Shepard, 1986. A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports* 5: 101—103.
- [5] Bidney, D. L., J. F. Shepard, and E. Kaleikau. 1983: Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Brassica oleracea*. *Protoplasma*, 117: 89—92.
- [6] Chatterjee, G., and S. R. Sikdar, 1985: Regeneration of plantlets from mesophyll protoplast of *Brassica juncea* L. Cjern. *Plant Cell Reports*, 4(5). 245—247.
- [7] Chuong, P. V., K. P. Pauls, and W. D. Beversdorp, 1985: A simple culture method for *Brassica* hypocotyl protoplasts. *Plant Cell Reports*, 4: 4—6.
- [8] Chuong, P. V., K. P. Pauls, and W. D. Beversdorp, 1987: Protoplast culture and plant regeneration from *Brassica carinata* Braun. *Plant Cell Reports*, 6: 67—69.
- [9] Durand, J., I. Potrykus, and G. M. Donn, 1973: Plantes issues de *Petunia*. *Z. Pflanzphysiol.*, 69: 26.
- [10] Glimelius, K., 1984: High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. *Physiol. Plant.*, 61: 38—44.
- [11] Kartha, K. K., M. R. Michayluk, K. N. Rao, O. L. Gamborg, and F. Constabel, 1974: Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* cultivar Zephyr). *Plant Sci. Lett.* 3(4): 265—271.
- [12] Kohlenbach, H. W., G. Wenzel, and F. Hoffmann, 1982: Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. *Z. Pflanzphysiol.*, 105: 131—142.
- [13] Li, L-C. and H. W. Kohlenbach, 1982: Somatic embryogenesis in quite a direct way in cultures of mesophyll protoplasts of *Brassica napus* L. *Plant Cell Reports* 1: 209—211.
- [14] Lillo, C., and E. A. Shahin. 1986: Rapid regeneration of plants from hypocotyl protoplasts and root segments of cabbage. *Hortscience*, 21(2): 315—317.
- [15] Lu, D-Y., D. Pental, and E. C. Cocking, 1982: Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. *Z. Pflanzphysiol.*, 107: 59—63.
- [16] Murashige, T. and L-C. Huang. 1984: Organogenesis *in vitro*, structural, physiological, and biochemical aspects. In: "Biotechnology in International Agricultural Research". Manila, Philippines, pp. 227—239.
- [17] Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Roussene, and M. Renard, 1983: Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, 191: 244—250.
- [18] Robertson, D. and E. D. Earle, 1986: Plant regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *italica* CV Green Comet broccoli. *Plant Cell Reports*. 5: 61—64.
- [19] Vatsya, B., and S. Bhaskaran, 1982: Plant regeneration from cotyledonary protoplasts of cauliflower *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Protoplasma*, 113: 161—163.
- [20] Xu, Z-H, M. R. Davey, and E. C. Cocking, 1982: Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Sci. Lett.*, 24: 117—121.

## PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF *BRASSICA CARINATA* BRAUN.

Yang Mei-zhu and Jia Shi-rong

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

### Abstract

Protoplasts of *Brassica carinata* Braun. (accession No. 84A165) were enzymatically isolated

from hypocotyls and cotyledons of 3—5 day-old test-tube seedlings or first true leaves taken from greenhouse grown plants at a three-leaf stage. The protoplasts were suspended in a P-B liquid medium solidified with 0.15—0.3% low melting agarose which formed a thin layer floating on the surface of the liquid medium. The optimum protoplast density was ranging from  $5 \times 10^3$  to  $1 \times 10^4$ /ml. As for the hypocotyl protoplasts, the first division was observed after 48 h in the culture. The division frequency reached 21% and 34% at day 3 and 6 respectively. The initiation of cell division in the case of cotyledon and mesophyll protoplast culture was late, usually at day 5, and the division frequency was also somewhat lower. One week after culture, the cultures were transferred to fluorescent light condition with an intensity of about 1,000 lx. A dilution medium DPDK<sub>3</sub> was then added and the dilution procedure was repeated at one week interval thereafter. One month after culture, microcalli with 300—500  $\mu$ m in size were formed. It was also found that in some cases globular embryoid structure protruded on the callus surface. Totally, a 2—3% plating efficiency was achieved. Shoot regeneration occurred when cotyledon and mesophyll protoplast-derived calli were transferred onto a modified MS medium supplemented with NAA 0.1, BA 3 mg/l. Individual shoots were rooted on a rooting medium supplemented with 0.2 mg/l of IAA. Intact plants with normal morphology were eventually produced.

**Key words** Ethiopia mustard (*Brassica carinata*); Protoplast; Plant regeneration

### 图 版 说 明

1. 子叶原生质体。 2. 一次分裂。 3. 二次分裂。 4. 细胞团。 5. 原生质体来源愈伤组织上突起的球形胚结构。 6. 分离出的球形胚。 7. 下胚轴原生质体培养形成的愈伤组织。 8. 具两片子叶的芽分化。 9. 子叶原生质体来源愈伤组织上的芽和根分化。 10. 子叶原生质体培养形成的丛生芽。

### Explanation of plate

Fig. 1. Freshly isolated cotyledon protoplasts. Fig. 2. First division. Fig. 3. Second division. Fig. 4. Cell cluster. Fig. 5. Protruded globular structure on the surface of the protoplast-derived callus. Fig. 6. Isolated globular embryoid. Fig. 7. Callus formation from hypocotyl protoplast culture. Fig. 8. Shoot regeneration with a pair of cotyledons. Fig. 9. Shoot and root differentiation on the cotyledon protoplast-derived callus. Fig. 10. Multiple shoots obtained from cotyledon protoplast culture.

