

土人参原生质体培养再生植株

张相岐 王献平

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

安利佳 范松华 向卫

(辽宁师范大学生物系, 大连 116022)

摘 要

分别由土人参(*Talinum paniculatum* (Jaeq.) Gaertn.)组织培养再生苗的叶片和幼茎诱导的愈伤组织游离出原生质体。叶肉原生质体在培养中未能进行正常分裂,存活不过1周。愈伤组织原生质体在P₄培养基中(K8p+2,4-D 0.2 mg/L+NAA 1.0 mg/L+ZT 0.5 mg/L+椰乳 50 mL/L+葡萄糖 0.5 mol/L)培养3 d开始第一次分裂,培养7 d时分裂频率为36.7%。愈伤组织再生率在液体培养中为0.31%,在双层培养中为0.34%。愈伤组织在含有较低浓度的6-BA的分化培养基上分化出不定芽。幼苗生根后移栽到花盆中继续生长,2~3个月后开花结实,长出粗壮的肉质根。再生小植株在试管中继代培养2~3个月开花结实。研究结果还表明:(1)愈伤组织在液体培养基或增殖培养基中培养时间过长,或继代次数过多均不利于分化。(2)较低浓度的6-BA(0.5~0.7 mg/L)对愈伤组织的分化是合适的。(3)GA₃对幼苗的发育有促进作用。(4)多效唑(MET)对土人参试管苗有明显的壮苗和壮根作用。

关键词 土人参;原生质体;再生植株;试管苗开花结实;多效唑

PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF *TALINUM PANICULATUM*

Zhang Xiang-qi and Wang Xian-ping

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

An Li-jia, Fan Song-hua and Xiang Wei

(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116022)

Abstract

The protoplasts of *Talinum paniculatum* (Jaeq.) Gaertn. were isolated from leaves and

calli. The mesophyll protoplasts did not undergo normal division and lived one week at the longest in culture. However, the callus protoplasts, cultured in P₄ medium (K8p+2, 4-D 0.2 mg/L, NAA 1.0 mg/L, ZT 0.5 mg/L, coconut milk 50 mL/L, glucose 0.5 mol/L), underwent first division after 3 d of culture. The division frequency was 36.7% after 7 d of culture. The regeneration frequencies of callus were 0.31% in liquid culture and 0.34% in double-layer culture. Shoots differentiated on regeneration media and rooted on R₃ and R₇ media. Mature plants were obtained 2~3 months after transplanting the protoplast-derived plantlets into flower pot or successive subculturing in test tubes. The results also indicated that: (1) Too long a period of callus culture in liquid medium or in solid proliferation medium was unfavorable to differentiation. (2) Low concentration of 6-BA in medium was suitable for callus differentiation. (3) GA₃ promoted development of young adventitious bud. (4) Multi-effect triazole significantly strengthened sprout and root development in test tube cultures.

Key words *Talinum paniculatum*; Protoplast; Plant regeneration; *In vitro* flowering and fruiting; Multi-effect triazole

土人参与(*Talinum paniculatum* (Jaeq.) Gaertn.)是一种马齿苋科植物,其肉质根入药,为滋补强壮剂。土人参与原产于热带美洲,我国已引种多年,中南各地广有栽培^[1]。关于土人参与的离体培养研究少有报道^[2]。原生质体培养尚未见报道。我们对土人参与的叶肉和愈伤组织原生质体进行了分离和培养,并由愈伤组织原生质体再生了完整可育的植株。

1 材料和方 法

1.1 组织培养与试管苗的分化

切取盆栽土人参与的幼茎和花梗为外植体,依次经70%乙醇和0.1%的升汞表面灭菌后切段,接种于G₁(MS+2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+6-BA 0.7 mg/L)和G₂(2,4-D 2.0 mg/L,其它与G₁相同)培养基上诱导愈伤组织。诱导培养在室内散射光下进行,培养温度为23~27℃。当愈伤组织长到5 mm以上时,转入分化培养基M-3和T-10(表3)中分化出苗。分化培养在2000~3000 lx光照条件下进行,每天光照12 h。当幼苗长到4~6片全展叶时取叶片游离原生质体,切取幼茎诱导愈伤组织。

1.2 原生质体的分离与培养

1.2.1 叶肉原生质体的分离与培养 以组织培养再生苗最上部的一对全展叶片为材料,用镊子撕去下表皮,切成约1 mm的小条,以每克叶片10 mL混合酶的比例在J₂和J₆混合酶液(表1)中进行酶解。混合酶液抽滤灭菌,滤膜孔径为0.45 μm。酶解在50 r/min的摇床上进行,温度为25~27℃。在J₂中酶解8 h,在J₆中酶解5.5 h。酶解结束后用400目镍丝网过滤酶解液,离心(500 r/min,4 min)收集原生质体。原生质体用P₆培养基(表2)漂洗3次,再用P₆培养基调节密度至4.0×10⁴~5.0×10⁴个/mL,于玻璃培养皿中进行液体浅层培养。每个40 mm直径的培养皿中加2.5 mL培养物。培养在(26±1)℃的

暗培养箱中进行。

表 1 游离土人参原生质体的酶液成分

Table 1 Composition of enzyme solutions for isolating protoplast of *Talinum paniculatum*

成分 Components	酶 液 Enzyme solutions ¹⁾		
	J ₂	J ₅	J ₆
Cellulase R-10 (%)	2.00	2.00	2.00
Hemicellulase (%)	0.50	0.50	0.50
Pectinase (%)	0.50	0.50	0.50
Pectolyase Y-23 (%)	—	0.12	0.12
Macerase (%)	0.12	—	—
Driselase (%)	—	—	0.20
CaCl ₂ · 2H ₂ O (mg/L)	1320	1320	1320
KH ₂ PO ₄ · H ₂ O (mg/L)	100	100	100
MES ²⁾ (%)	0.10	0.10	0.10
Mannitol (mol/L)	0.20	0.25	0.20
Sorbitol (mol/L)	0.20	0.25	0.20

pH=5.8。1)酶液经 0.45 μm 网过滤消毒。Enzyme solution were sterilized through 0.45 μm mesh filtration.

2)Multi-effect triazole.

1.2.2 愈伤组织原生质体的分离、培养与再生 切取组织培养苗的幼茎为外植体在 G₁ 和 G₂ 培养基上诱导愈伤组织。当愈伤组织长到 5 mm 左右时选取生长旺盛、结构疏松的作为游离原生质体的材料。将愈伤组织用镊子夹碎或用刀片切碎,以每克愈伤组织 10 mL J₅ 酶液(表 1)的比例酶解 8 h。酶解条件及原生质体的收集和漂洗方法与叶片相同。愈伤组织原生质体培养在 P₄ 培养基(表 2)中,培养密度和条件与叶肉原生质体相同。每 7 d 加 1 次培养基,每次加入 0.3~0.5 mL 新鲜培养基,并逐步降低培养基中葡萄糖的浓度。第一次加 P₁₀ 培养基,第二次加含 0.25 mol/L 葡萄糖的 P₇ 培养基,以后加 0.2 mol/L 葡萄糖的 P₇ 培养基(表 2)。

表 2 土人参原生质体培养基成分

Table 2 Culture media for protoplast of *Talinum paniculatum*

成分 Components	培养基 Media			
	P ₄	P ₆	P ₇	P ₁₀
基本培养基 Base medium	K8p ^[3]	K8p	K8p	K8p
2,4-D (mg/L)	0.20	0.20	0.50	1.00
NAA (mg/L)	1.00	1.00	0.20	0.20
6-BA (mg/L)	—	0.70	0.50	0.50
ZT (mg/L)	0.50	—	0.20	0.10
椰乳 Coconut milk (mL/L)	50	50	50	50
水解乳蛋白 Lactalbumin hydrolysate (mg/L)	—	—	—	250
葡萄糖 Glucose (mol/L)	0.50	0.40	0.25, 0.20	0.35

pH=5.8

当原生质体再生的微小愈伤组织肉眼可见时,一部分转入双层培养。方法是在固体培养基(50 mL 三角瓶中加 25 mL K8 培养基^[3],激素成分与 G₁ 相同)表面加 0.5 mL 培养物,再加 1.5 mL P₇ 培养基。其余的仍进行液体浅层培养。当小愈伤组织长到 1~2 mm 时转入 G₁ 和 G₂ 培养基中增殖,待愈伤组织长到 5~10 mm 时转入分化培养基中分化出芽。

当幼苗长到 2~3 cm 高时,从茎基部剪下转入生根培养基 R_3 (1/2 MS+IBA 2.0 mg/L+IAA 2.0 mg/L)和 R_7 (R_3 +多效唑(MET) 1.25 mg/L)中生根。当不定根长到 1~2 cm 长时,移栽到花盆中生长至开花结实和肉质根充分发育。

1.2.3 试管植株的开花结实 将原生质体再生苗连续切取茎端部(有 4 片全展叶)继代培养 2~3 次(每次 1 个月),再转入生根培养基中生根并一直生长发育至开花结实。

2 结果和讨论

2.1 组织培养和试管苗的分化

茎和花梗外植体在 G_1 和 G_2 培养基上培养 3~4 d 切口处明显膨胀,1 周后长出愈伤组织,诱导率为 75%~90%。愈伤组织一般为白色,结构疏松,生长速度较快,一般 3 周左右直径达 5~10 mm。愈伤组织转入分化培养基 M-3 和 T-10(表 3)中两周左右分化出不定芽。在 M-3 和 T-10 上的分化率分别为 9.0%和 26.0%。芽分化两周左右便可长到 2~3 cm 高,有 4~6 片全展叶。这时便可取叶片游离原生质体,同时切取茎重新诱导愈伤组织。

2.2 原生质体的分离与培养

2.2.1 叶肉原生质体的分离与培养 叶片在 J_2 中酶解 8 h,始终没能得到足够量的原生质体,产量仅有 10^3 个/g。在 J_6 中酶解 5.5 h,原生质体密度达到最大,产量为 3×10^5 个/g,碎片较多。完整的原生质体占 70.9%。原生质体培养在 P_6 培养基中,48 h 后有部分存活的原生质体变为椭圆形,证明细胞壁已经再生。随后有少数细胞出芽,但未见正常的对称分裂。培养至 7 d 时几乎全部死亡。

2.2.2 愈伤组织原生质体的分离、培养及植株再生 组织培养再生苗的茎段接种在 G_1 和 G_2 培养基上 1 周左右诱导出愈伤组织,诱导率为 100%。3 周时愈伤组织可长到 5 mm 以上。切碎的愈伤组织在 J_5 混合酶液中酶解 8 h,原生质体产量为 $7 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ 个/g。经离心纯化后,原生质体完整率为 89.3%,细胞质浓稠,淀粉粒明显(图版 I, 1)。原生质体培养在 P_4 培养基中 48 h 有 64.5%变为椭圆形,体积稍增大,细胞质更加稠密,原生质带明显。培养 3 d 陆续开始第一次分裂(图版 I, 2)。培养 5 d 见到第二次分裂(图版 I, 3)。培养 7 d 时原生质体再生细胞的分裂频率为 36.7%,另有 0.2%的细胞出芽。不分裂的原生质体可存活 2~4 周。能够分裂的原生质体中约 25%能够持续分裂,2 周左右形成细胞团。其中部分细胞团结构紧密(图版 I, 4),能够继续发育为愈伤组织。培养至 5~6 周,小愈伤组织可长到 1~2 mm(图版 I, 5),愈伤组织再生率为 0.31%。小愈伤组织转入 G_1 和 G_2 培养基中增殖 2 周左右可长到 5~10 mm,这时便可转入分化培养基诱导分化。另外,用另一种方法培养,即双层培养 10 d 左右,表面液体培养基已干燥,小愈伤组织长到 1~3 mm(图版 I, 6),小愈伤组织再生率为 0.34%。由于小愈伤组织在固体培养基表面密度较大,所以需要转入 G_1 和 G_2 培养基中继代培养 1 次,以降低密度,促进生长,防止老化。继代培养 2 周左右,当愈伤组织长到 5~10 mm 时转入分化培养基诱导分化。

比较两种培养方式,再生细胞团转入双层培养优于一直进行液体浅层培养。主要表现在 3 点:(1)小愈伤组织生长较快,比液体浅层培养快 7 d 左右。(2)愈伤组织再生率稍高。(3)小愈伤组织质量较好,转入增殖培养基后均能正常生长。液体浅层培养再生的小愈伤

组织有一部分半透明或边缘呈绒毛状,转入增殖培养基后不能继续生长或呈稀软的糊状,这种愈伤组织不能分化。

增殖后的原生质体再生愈伤组织多数和幼茎诱导的愈伤组织形态相似,一般为白色,有的带有极淡的绿色或紫色,结构疏松,表面粗糙、干燥。转入分化培养基以后,愈伤组织逐渐转变为4种形态:(1)形态和质地与在增殖培养基中相似(图版 I, 7)。(2)暗绿色,结构致密、质地坚硬,表面有瘤状突起,生长缓慢(图版 I, 8)。(3)鲜绿色,结构疏松似第(1)类,生长较快。(4)暗绿色,质地坚硬似第(2)类,但表面无瘤状突起,而常有一层白色粉末状结构,生长缓慢。愈伤组织转入分化培养基2~3周,部分愈伤组织分化出芽和根(表3)。分化培养过程中观察到愈伤组织形态与分化能力有密切关系。能够分化的主要是第(1)类愈伤组织,占分化愈伤组织的83.46%,并且分化出不定芽和不定根。在第(2)类愈伤组织上只分化出不定芽,占分化愈伤组织的16.54%。而第(3)和第(4)类愈伤组织未能分化。在第(1)和第(2)类愈伤组织上分化出的不定芽差别也很大。在第(1)类愈伤组织上分化出的不定芽形态正常,生长快。一旦分化出芽便马上抽茎成苗(图版 II, 9)。而在第(2)类愈伤组织上分化出的不定芽叶片小而厚,生长缓慢。许多幼芽需要转入加有GA₃的M-5培养基上才能逐渐转为正常生长发育。另外,未分化出芽的瘤状愈伤组织转入M-5培养基上继续进行分化培养,5.2%的愈伤组织由瘤状部位抽出不定芽。看来GA₃对幼芽

表3 土人參原生质体再生愈伤组织的分化

Table 3 Differentiation of callus derived from protoplast of *Talinum paniculatum*

培养基 ¹⁾ Medium	激素组成 Combination of hormones (mg/L)	分化类型 Type of differentiation	分化率 Percentage of differentiation (%)
M-3	6-BA 0.7, NAA 0.2	芽,根 Bud, root	11.66
M-5	6-BA 1.0, GA ₃ 1.0	—	0
M-15	6-BA 1.5, NAA 0.2	—	0
M-16	6-BA 3.0, NAA 0.2	—	0
M-17	ZT 0.7, NAA 0.2	—	0
M-18	ZT 1.5, NAA 0.2	—	0
M-19	ZT 3.0, NAA 0.2	—	0
M-20	ZT 0.7, 6-BA 0.7, NAA 0.2	—	0
M-21	ZT 1.5, 6-BA 1.5, NAA 0.2	—	0
M-22	ZT 3.0, 6-BA 3.0, NAA 0.2	—	0
MB-16	6-BA 0.7, NAA 0.2, 2,4-D 0.2	芽 Bud	23.75
T-1	6-BA 0.5, KT 0.5, ZT 0.5, NAA 0.2	芽 Bud	13.33
T-10	6-BA 0.5, ZT 0.5, IBA 0.5	芽,根 Bud, root	26.56
T-12	6-BA 0.7, NAA 0.2, 2,4-D 0.2	芽 Bud	21.58

pH=5.8

1)所有培养基均加水解乳蛋白250 mg/L,蔗糖3.0%,琼脂0.8%。M. MS培养基; MB. 大量元素同MS,微量元素和有机物同B₅; T. 铁盐,微量元素和有机物同B₅,大量元素和其它附加物如下: NH₄NO₃ 1500 mg/L, KNO₃ 2000 mg/L, MgSO₄ 400 mg/L, KH₂PO₄ 200 mg/L, CaCl₂ 450 mg/L, 甘氨酸2.0 mg/L, 生物素0.2 mg/L, D-泛酸钙1.0 mg/L。

1) All media with 250 mg/L of lactalbumin hydrolysate, 3.0% of sucrose and 0.8% of agar. M. MS medium; MB. Macroelements as in MS, microelements and organic compounds as in B₅; T. Iron compound, microelements and organic compounds as in B₅, macroelements and other compounds as follows: NH₄NO₃ 1500 mg/L, KNO₃ 2000 mg/L, MgSO₄ 400 mg/L, KH₂PO₄ 200 mg/L, CaCl₂ 450 mg/L, glycine 2.0 mg/L, biotin 0.2 mg/L, D-calcium pantothenate 1.0 mg/L.

的进一步生长发育有明显的促进作用。

由表 3 可见, 在 14 种分化培养基中, 有 5 种分化出芽。这 5 种培养基的激素组成特点是都含有较低浓度的 6-BA (0.5~0.7 mg/L)。而含有较高浓度 6-BA 或加有细胞分裂素 ZT 的培养基均未分化出芽。由此推测低浓度的 6-BA 对于土人参与愈伤组织的分化是有利的。

研究结果还表明: 液体浅层培养再生的小愈伤组织不及时转入固体培养, 以及愈伤组织在增殖培养基中培养时间过长或继代次数过多均不利于分化。当小愈伤组织长到 1~2 mm 大小后, 继续在液体培养基中培养 3~4 周, 再转入分化培养, 或者小愈伤组织增殖培养 5~6 周后再转入分化培养, 结果均未分化出芽。正常转入增殖培养的小愈伤组织继代培养 3 次(每次 1 个月)后再转入分化培养基, 分化率也大大降低, 甚至不能分化(表 4)。

当幼苗长到 2~3 cm 高时, 从茎基部剪下, 转入 R₃ 和 R₇ 培养基中生根。1~2 周长出不定根, 生根率几乎达 100%。但在两种培养基上生长的不定根数量和形态都有明显差别: 在 R₃ 培养基中, 不定根的数量一般有 3~10 条, 最多为 20 条左右。根较细, 根毛较少。根及植株生长较快(图版 I, 10); 而在 R₇ 培养基中, 生根要比 R₃ 迟 5 d 左右, 不定根的数量明显增多, 一般有 30~50 条, 最多可达上百条。并且根较粗壮, 根毛多, 生长整齐。植株在生根培养基中生长缓慢, 节间缩短, 植株变得较粗壮(图版 I, 11)。当不定根长到 1~2 cm 长时便可移栽到花盆中继续生长。不定根的数量和质量直接影响移栽存活率。在 R₃ 中生根的再生植株移栽存活率为 64.0%, 而在 R₇ 中生根的再生植株移栽存活率为 92.5%。比较两种生根培养基的成分可见, 两者的唯一差别是 R₇ 中添加了 1.25 mg/L MET。由此看来, MET 对于土人参与原生质体再生植株有明显的壮苗和壮根作用, 并且使不定根数量增加, 根毛增多, 从而大大提高试管植株的移栽存活率。有关 MET 的类似作用在水稻等植物上已有不少报道^[4,5]。

表 4 继代培养 3 次的愈伤组织分化
Table 4 Differentiation of callus following three successive subcultures

培养基 Media	M-3	MB-16	T-1	T-10	T-12
分化率(%) Percentage of differentiation	5.0	5.0	0	0	7.5

移栽存活的原生质体再生植株生长 2~3 个月便开花结实(图版 I, 12)。盆栽的再生植株全部长出粗壮的肉质根(图版 I, 13)。膨大的肉质根多为 2~3 条, 4 个月龄的盆栽植株肉质根直径一般为 8~15 mm。

2.3 试管植株的开花结实

连续切取原生质体再生苗的茎端部继代培养 2~3 次, 每次 1 个月, 有部分试管苗分化出花芽。转入生根培养基中继续培养得到了开花的再生植株, 并且部分结实(图版 I, 14), 从而在试管中完成了生活史。试管植株所结种子也较饱满, 能够萌发出苗, 但结实数较少, 一般每个蒴果中只有 5 粒左右种子。另外, 试管植株在 R₃ 和 R₇ 培养基中只长不定根, 从未长出膨大的肉质主根。

关于试管苗开花已有许多报道^[6~11]。但马齿苋科植物试管苗开花的报道尚未见到。

研究试管苗开花结实对于探讨植物的成花机理、各类激素在生殖器官分化中的作用,以及建立微型观赏花卉工业和种质保存方面都有意义。

参 考 文 献

- 1 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第一册. 北京: 科学出版社. 1972. 618
- 2 孙敏, 汤绍虎. 土人参加根的诱导与培养. 植物生理学通讯, 1991. 27: 236
- 3 Kao K N, Michayluk M R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*. 1975. 126: 105~110
- 4 汤日圣, 吴鹤鸣, 张金喻等. 多效唑防止水稻倒伏的原因剖析. 植物生理学通讯, 1989. (4): 23~26
- 5 郑康乐, 周宗敏, 王熹. 多效唑对水稻试管苗移栽后存活率的影响. 植物生理学通讯, 1988. (6): 36~37
- 6 王熊, 张菊野, 连宏坤等. 素心建兰无性繁殖系的建立及其开花. 园艺学报, 1988. 15: 205~208
- 7 Dickens C W S, van Staden J. *In vitro* flowering and fruiting of soybean explants. *J Plant Physiol*. 1985. 120: 83~86
- 8 Narasimhulu S B, Reddy G M. *In vitro* flowering and pod formation from cotyledons of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor Appl Genet*. 1984. 69: 87~91
- 9 Tejavathi G, Anwar S Y. *In vitro* induction of capitula from cotyledons of *Carthamus tinctorius* (safflower). *Plant Sci Lett*. 1984. 36: 165~168
- 10 Tisserat B, Galletta P D. *In vitro* flowering in *Amaranthus*. *Host Sci*. 1988. 23: 210~212
- 11 Chang Wei-chin, Hsing Yue-ie. *In vitro* flowering and embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature*. 1980. 284: 341~342

图 版 说 明

图 版 I

1. 新游离的愈伤组织原生质体。2. 培养 3 d 原生质体第一次分裂。3. 培养 5 d 原生质体第二次分裂。4. 培养 2 周原生质体再生的细胞团。5. 液体浅层培养再生的小愈伤组织。6. 双层培养再生的小愈伤组织。7. 白色疏松的愈伤组织。8. 绿色的瘤状愈伤组织。

图 版 II

9. 在 T-10 培养基上分化出的幼苗。10. 在 R₃ 培养基上生根的原生质体再生小植株, 不定根少而纤细。11. 在 R₇ 培养基上生根的原生质体再生小植株, 不定根多而粗壮。12. 在花盆中开花结实的原生质体再生植株。13. 原生质体再生植株的肉质根。14. 在试管中结实的老生质体再生小植株。

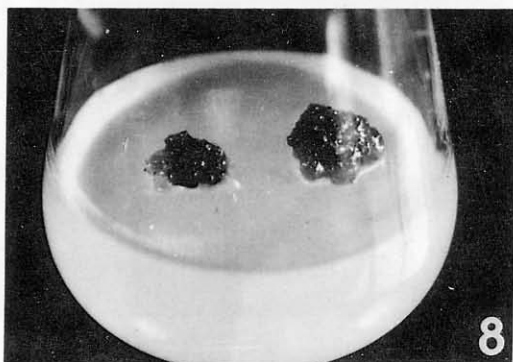
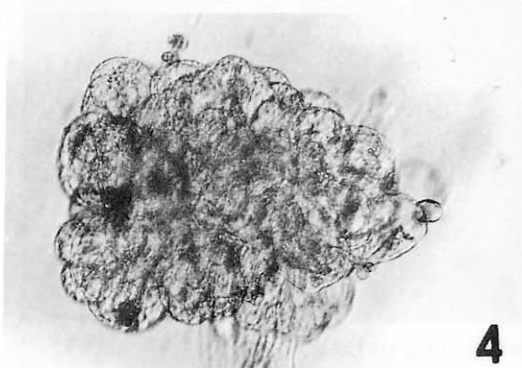
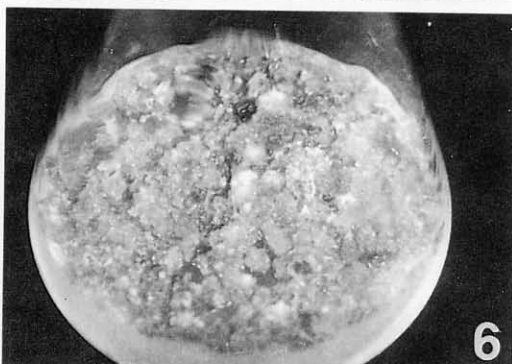
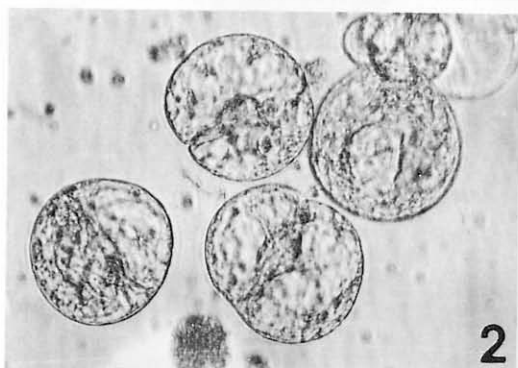
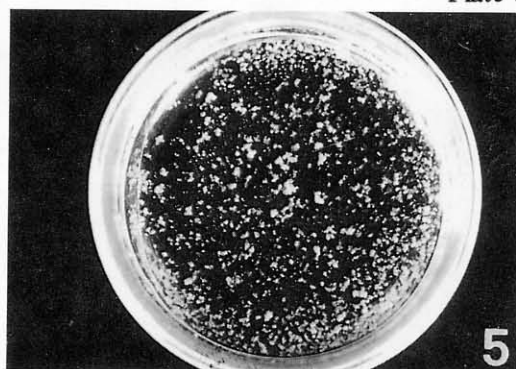
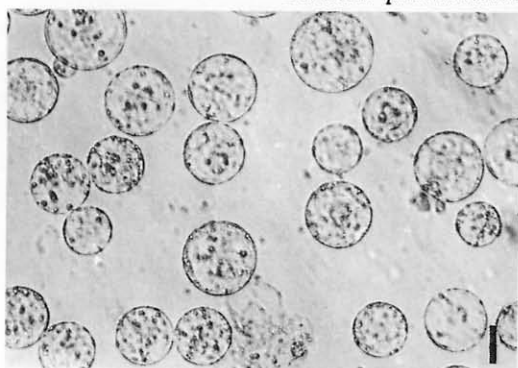
Explanation of Plates

Plate I

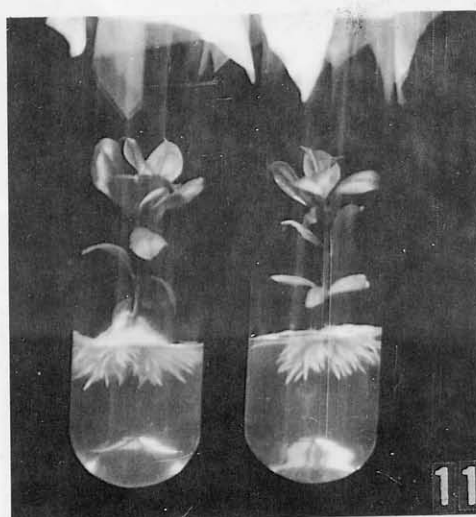
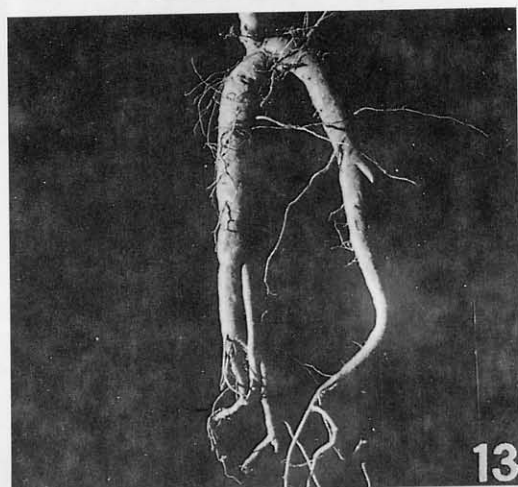
Fig. 1. Freshly isolated callus protoplasts. Fig. 2. First division of protoplasts after 3 d of culture. Fig. 3. Second division of protoplast after 5 d of culture. Fig. 4. Microcolony derived from protoplast after 2 weeks of culture. Fig. 5. Microcalli derived from protoplasts in liquid culture. Fig. 6. Microcalli derived from protoplasts in double-layer culture. Fig. 7. White, loose calli derived from protoplast. Fig. 8. Green, tumour-like calli derived from protoplasts.

Plate II

Fig. 9. Shoots differentiated on T-10 medium. Fig. 10. Regenerated plantlets on R₃ medium, with few and thin adventitious roots. Fig. 11. Regenerated plantlets on R₇ medium, with many strong adventitious roots. Fig. 12. Regenerated plant in pot with flower and fruits. Fig. 13. A chyloradix of protoplast-derived plant. Fig. 14. Protoplast-derived plantlet fruiting in a test tube. Arrows indicated mature capsules.



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text