

文章编号: 1003-8701(2000)03-0018-03

马铃薯叶肉细胞原生质体培养

赵颖君¹, 祁新¹, 李鹏志², 赵劲松², 邬信康²

(1. 吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省农科院, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 马铃薯叶肉细胞原生质体培养后, 再生细胞形成细胞团和愈伤组织。愈伤组织经 MS + 2, 4-D 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + ZT 0.5 mg/L + 蔗糖 2% 继代后, 移至分化培养基 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + ZT 1.0 mg/L + AC 2 g/L + 蔗糖 2% + 甘露醇 1% 上分化效果较好。小植株在培养基 MS + NAA 1.0 mg/L 上形成完整植株。

关键词: 马铃薯; 叶肉细胞; 原生质体; 植株再生

中图分类号: S 532.035.3

文献标识码: A

植物原生质体是一种优越的单细胞系统, 能在单个细胞水平上进行精密的遗传修饰和遗传重组。因此, 原生质体是植物基因工程较好的转化系统, 原生质体也是获得细胞无性系和选育突变体的优良起始材料。马铃薯是四倍体无性繁殖作物, 常规育种有许多困难。要通过生物技术对马铃薯进行遗传改良, 原生质体再生植株是重要基础。本研究对马铃薯叶肉细胞原生质体进行培养, 并再生出完整植株。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯春薯 1 号无菌脱毒苗叶片。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗培养

脱毒试管苗采用茎切段扩大繁殖, 每个茎段带有 1~2 个腋芽, 培养基是 MS 附加 NAA 1.0 mg/L、蔗糖 3%, pH 5.8, 用 8 g/L 琼脂固化。培养条件: 光照强度 2 000 lx, 光周期 16 h 光照/8 h 黑暗, 温度 (26±2)°C。

1.2.2 原生质体分离和培养

将顶部、中部、下部等部位的无菌苗叶片剪碎后, 分别放入酶混合液中进行处理, 条件为黑暗、28°C, 酶解时间分别为 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h。酶液组成为: Cellulase (Onzuka R-10) 1.0% + Pectinase (Sigma) 0.5% + CaCl₂·2H₂O 1 470 mg/L + KH₂PO₄ 95 mg/L + MES 600 mg/L + 甘露醇 0.55 mol/L, pH 5.6。酶解后将混合液用 400 目镍网过滤, 除去较大的组织。然后离心 (500 r/min, 3~5 min), 并用 CPW 洗液悬浮清洗, 再离心洗涤, 反复 3 次, 最后用原生质体培养基洗一次, 用液体培养法培养在 V-KM^[1] 和 D_{2a}^[2] 二种培养基上, 培养密度为 5×10⁵。这二种培养基的生长调节物质见表 1, 培养基 pH 值以 1N KOH 调至 5.6, 用孔径 0.4 μm 的微

收稿日期: 1999-07-13. 修回日期: 1999-12-10

作者简介: 赵颖君 (1968-), 女 (满族), 长春市双阳区人, 学士, 助理实验师, 主要从事作物栽培实验工作。

孔滤膜抽滤灭菌。

表1 原生质体培养基附加生长调节物质

生长调节物质 (mg/L)	培养基	
	V-KM	D _{2a}
2,4-D	0.2	—
6-BA	0.5	0.6
NAA	1.0	1.5
CH	250	—
CM	20	50

+6-BA 0.4 mg/L+蔗糖 2%;C 为 MS+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+ZT 0.5 mg/L+蔗糖 2%;D 为 MS+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L+ZT 0.5 mg/L+蔗糖 2%。pH 5.8,以 8 g/L 琼脂固化。愈伤组织长到 5 mm 时,诱导芽分化。培养基为 MS+ZT 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+AC 2 g/L+蔗糖 2%+甘露醇 1%+琼脂 8 g/L,pH 5.8,培养条件为光强 2 000 lx,光照 16 h,温度(26±1) °C。待芽长到 1 cm 时,将芽切下接在 MS+NAA 1.0 mg/L+蔗糖 3%的固体培养基上,生根后形成完整植株。

2 结果与分析

2.1 不同部位叶片的原生质体存在明显差异

由顶部叶片分离下来的原生质体产量、活力比中部、下部的高。其中以顶部刚刚展开健壮的嫩叶最好。下部叶片由于生理状况较差,几乎没有完整的原生质体游离下来。

2.2 酶解时间对原生质体产量的影响

酶解时间分别为 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h。随着酶解时间延长,原生质体产量呈直线上升,其中处理 4 h 的原生质体产量较高,完整性也好(图 1-1),酶解时间再增加,原生质体大多破裂。

2.3 培养基对原生质体培养的影响

叶肉细胞原生质体培养第 5 d 发生第一次分裂(图 1-2)。原生质体培养和其它组织细胞培养一样,需要大量元素以及微量元素。因此,原生质体培养基一般是加以修饰和改良的细胞培养基,但原生质体无论在结构和代谢生理上与组织细胞差异毕竟较大。本试验以 D_{2a}和 V-KM 为原生质体培养基,在 D_{2a}、V-KM 培养基上植板率分别为 15%和 12%,D_{2a}上培养的原生质体形成细胞团较快,4 周左右形成由 10 余个细胞组成的小细胞团(图 1-3),6 周后能观察到愈伤组织(图 1-4)。而 V-KM 上形成细胞团的速度较慢,要 6 周左右。

2.4 继代培养基对愈伤组织生长及分化的影响

原生质体培养 50 d 后,将小愈伤组织转移到 4 种培养基上继续增殖。培养基 A、B 上的愈伤组织随着增殖逐渐褐化;培养基 C 的愈伤组织生长较慢,结构紧密,呈淡黄色;培养基 D 上的愈伤组织生长迅速,结构松软;进行分化培养时,A、B、D 没有分化出芽,大部分褐化、死亡,只有 C 培养基上的愈伤组织能分化出芽(图 1-5),并形成再生植株(图 1-6)。表明马铃薯叶肉细胞原生质体的愈伤组织生长需要适量的 2,4-D,较高浓度的 2,4-D 虽然促进了愈伤组织生长,但对植株再生产生了不利影响。李世君(1989 年)也有相似结果^[3]。Saxena(1987 年)在牛豆树原生质体培养时也得出这样的结论^[4]。因此,在进行原生质体培养时,各个发育阶段要不断调整激素的种类和浓度,并且考虑对下一步培养的影响。

1.2.3 愈伤组织培养及植株再生

原生质体培养 3 周左右,也就是有细胞团出现时,每隔 10 d 补加不含渗透剂的新鲜培养基,以便为细胞发育提供充足的营养并保证细胞团持续分裂形成愈伤组织。当愈伤组织长至 1~2 mm 时,转移到固体培养基,每天散射光照 16 h,(24±2) °C 下培养。培养基有四种:A 为 D_{2a};B 为 MS+NAA 1.0 mg/L

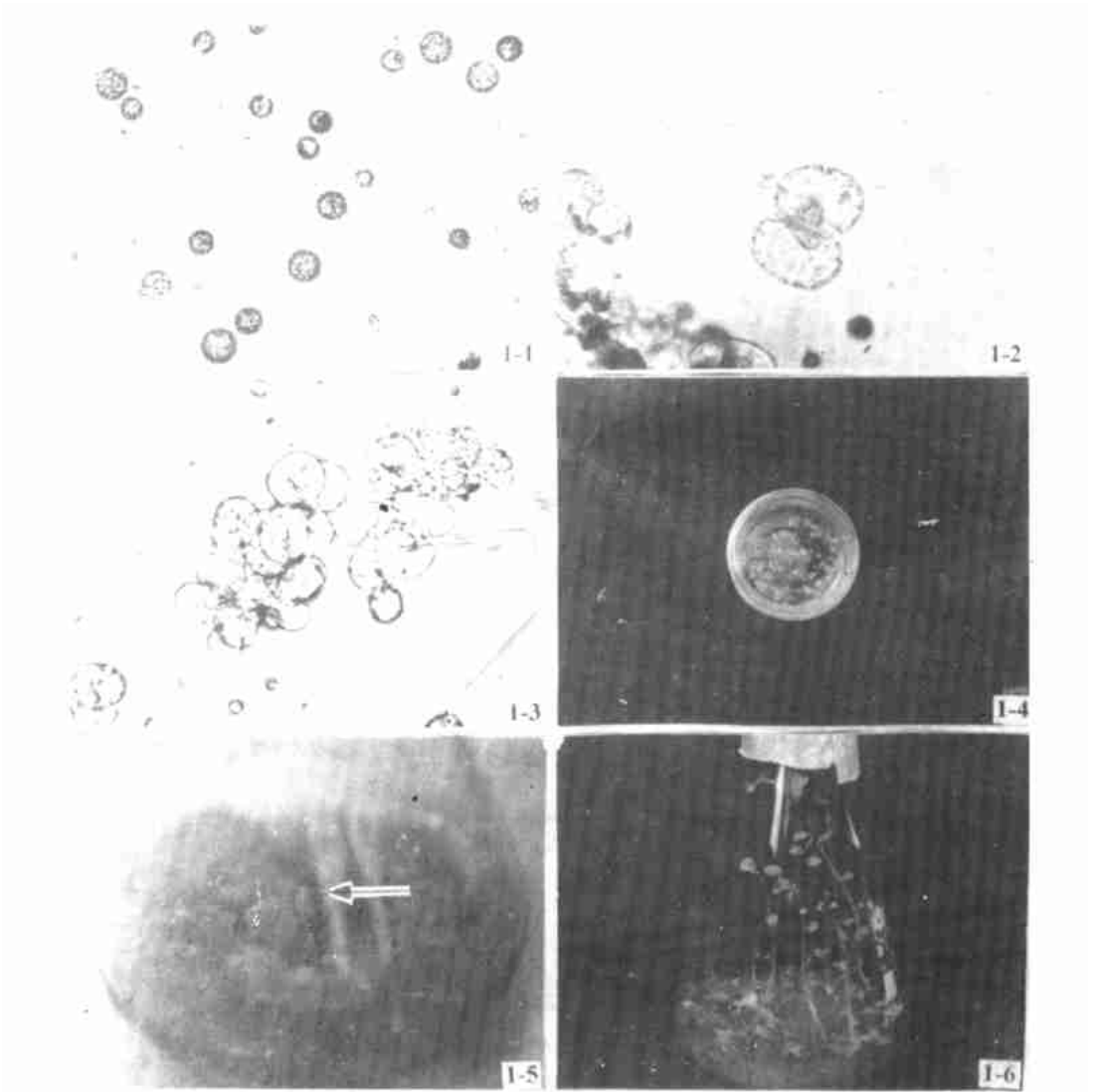


图1 马铃薯叶肉细胞原生质体培养

1-1. 叶肉细胞原生质体 1-2. 再生细胞第一次分裂 1-3. 原生质体再生的细胞团
1-4. 原生质体再生的愈伤组织 1-5. 愈伤组织分化出芽 1-6. 再生完整植株

2.5 原生质体培养基对分化的影响

从表2可以看出,原生质体在V-KM培养基上分裂速度较慢,但在分化培养基上分化频率却高于D_{2a}培养基。

表2 原生质体培养基对愈伤组织分化频率的影响

原生质体培养基	接种愈伤组织总数	分化出芽的愈伤组织总数	百分率(%)
D _{2a}	60	19	31.7
V-KM	60	26	43.3

3 讨论

在马铃薯叶肉细胞原生质体培养中,2,4-D对愈伤组织生长速度和植株再生有显著影响。较高浓度的2,4-D明显促进愈伤组织生长,但抑制芽的分化;较低浓度的2,4-D有利于形态器官的建成和阻止愈伤组织褐化。

(下转第31页)

参考文献:

- [1] 孙宏德·黑土肥力和肥料效益定位监测研究Ⅲ·施肥及种植方式对土壤物理性状的影响[J].吉林农业科学,1993(4):41-44.
- [2] 张 宽,等·淡黑钙土化肥定量和增产效益的研究[J].吉林农业科学,1987(3):42-45.
- [3] 赵景云,等·吉林主要土壤氮磷化肥用量与配比试验研究[J].吉林农业科学,1987(4):48-51.
- [4] 姜 岩·论土壤有机培肥[C].土壤培肥研究论文集,1988,7.
- [5] 张道夫·有机无机肥料配合是现代施用技术的发展方向[J].土壤肥料,1984(1).
- [6] 金维续·有机无机肥料配合施用研究进展[J].土壤肥料,1984(3).
- [7] 阎晓艳,有机无机肥料相结合是培肥地力增产增收的最佳途径[J],吉林农业科学,1993(2):55-59.

(上接第 20 页)

参考文献:

- [1] Bokelmann, et al·Z·Planzen Physiol[J]., 1983, 109, 259-265.
- [2] LI X-H·Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *digitalis lanta*[J].Theor·App¹·Genet·, 1981, 60, 345-347.
- [3] 李世君,等·马铃薯无菌苗肉原生质体再生植株[J].生物工程学报,1989,5(1):57-63.
- [4] Saxena P K. et al·Plant regeneration from mesophyll¹¹ protoplasts of the tree legume *pithecellobium dulce* benth[J].Plant Science, 1987, 53, 257-262.

Protoplast Culture of Potato's Mesophyll Cell

ZHAO Ying-jun, et al.

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118 China)

Abstract: The mesophyll cell protoplasts of potato could divide from cell colonies and callus after cultured. The callosity was subcultured on the stock culture of MS+2, 4-D 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+ZT 0.5 mg/L+sucrose 2%, differentiated on the medium of MS+ZT 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+AC 2 g/L+sucrose 2%+mannitol 1%. The plantlet formed whole plant on the medium of MS+NAA 1.0 mg/L.

Key words: Potato (*Solanum tuberosum* L.); Mesophyll cell; Protoplast; Plant regeneration