

毛白杨的叶肉原生质体培养再生植株*

王善平** 许智宏 卫志明

(中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032)

摘 要

毛白杨 (*Populus tomentosa*) 是我国华北地区特有的一种林木。从毛白杨无菌苗分离得到的叶肉原生质体在改良的 KM8p 液体培养基中进行浅层培养, 7 天后开始第一次细胞分裂, 10 天时分裂频率可达 20% 左右, 随后形成大量的细胞团和愈伤组织。通过调整培养基中的激素浓度, 愈伤组织呈黄绿色并逐渐变得紧密, 当这种愈伤组织转到附加玉米素和吲哚乙酸或者萘乙酸的 MS 培养基上时, 培养 4—5 周后开始有芽的分化。待芽伸长后从基部切下转到无激素的 1/2 MS 培养基上, 即长根形成完整植株。

关键词: 毛白杨, 原生质体培养, 植株再生

随着生物工程的发展, 植物原生质体技术已越来越多地应用于植物细胞的遗传操作以及有关的植物分子生物学、植物生理学和细胞生物学的研究之中。虽然至今已有 100 多种植物的原生质体经培养可以再生植株, 但其中大多数是草本植物。木本植物原生质体培养仍有不少困难, 成功的种类不多^[1]。在林木树种中, 由原生质体再生植株成功的只有檀香^[2]、榆树^[3]、杨树^[4,5]和白云杉^[6]。我们用我国特有的杨树树种毛白杨为材料已进行过叶外植体遗传转化的研究^[7], 同时我们也开展了原生质体培养工作, 本文首次报道我们由毛白杨原生质体培养成功地得到了再生植株的结果。

一、材料和方法

1. 毛白杨无菌苗的培养

将毛白杨 (*Populus tomentosa*) 试管苗的叶片切成 0.5cm × 0.5cm 大小, 置于附加 0.25 mg/l BA, 0.25mg/l ZT 和 0.25mg/l IAA, 0.65% 琼脂的 MS 培养基^[8]上 (pH5.6), 培养条件为 25℃, 每日光照 16h, 4000lx。约 3—4 个星期后, 从叶切片周围分化出大量的芽, 将这些芽转到改良的 MS 琼脂培养基(无激素但附加 2% 蔗糖和 10mg/l 维生素 B₁ 上, 即可得到大量具有良好根系的试管苗。

本文 1990 年 5 月 28 日收到。

* 国家七·五生物工程资助项目。

** 中国科学院上海生物工程中心。

2. 叶肉原生质体的游离

从6—8周苗龄的无菌苗上取1.5—2cm长的叶片游离原生质体。用解剖刀将叶片切成宽1mm左右的细条,置于附加0.7mol/L甘露醇的CPW^[9]盐溶液(pH5.6)中质壁分离1—1.5h。随后换入过滤灭菌的酶液,放在24℃培养箱中,黑暗静置酶解12—14h。酶液组成为:2%纤维素酶(Onozuka R-10),0.5%离析酶(Onozuka R-10),0.5mol/L甘露醇溶于CPW盐溶液中(pH5.6)。酶解后将酶解液用200目的尾龙网过滤,去除未酶解的组织残渣。将原生质体悬浮液离心(500r/min,2.5min),吸去酶液,在离心管中加入新鲜的洗液,其组成为附加0.5mol/L甘露醇的CPW溶液(pH5.6)。使原生质体重新悬浮后再次离心(500r/min,2.5min)。去掉洗液后,再加入2ml新鲜的洗液悬浮原生质体后,将此原生质体悬浮液缓缓地加到8ml含0.5mol/L蔗糖CPW溶液的液面之上,以1000r/min的速度离心5min,后,吸取界面上纯化的原生质体,如上法再用洗液离心洗涤一次后,加入少量培养基,在血球计数板上计数,估算原生质体的产量。

3. 原生质体培养

将纯化的原生质体悬浮于改良的KM8p^[10]培养基中,稀释成各种不同的原生质体密度,在6cm培养皿中进行液体浅层培养,每皿加2ml培养液,在24℃培养箱内黑暗培养直到长成细胞团。试验了培养基中不同的渗透剂(甘露醇、葡萄糖及蔗糖)对原生质体培养的影响。改良的KM8p培养基配方为:激素用0.5mg/l 2,4-D,0.5mg/l BA和0.5mg/l NAA,其它成分同KM8p。培养后7天和10天统计细胞分裂的频率。培养10周以后每隔1周或2周添加新鲜的降低渗透压的培养基,每皿0.5ml,此降低渗透压的培养基组成中去除了培养液中的葡萄糖和2,4-D。

4. 再生愈伤组织的培养及分化

将肉眼可见的小愈伤组织转到附加0.2—0.5 mg/l BA,0.2—0.5 mg/l NAA和0.2% Gelrite的MS生长培养基中,4—6周后长成大小为直径5mm左右的愈伤组织。将此愈伤组织转到含有IAA和不同细胞分裂素的MS分化培养基上诱导芽的形成。分化培养基均以0.7%琼脂固化。

培养条件均为25℃,每日光照16h,光强为4000lx。

二、结果与讨论

1. 原生质体的游离

由毛白杨无菌苗伸展的、幼嫩的叶片能够游离出大量健康的、有活力的原生质体(图版1-1),产量为 5.0×10^6 /g鲜重。酶解前用质壁分离液处理有利于缩短酶解时间,我们一般在酶解2h后轻轻摇动培养皿,也有利于酶解。在前述酶解条件下游离出来的原生质体,大小较均匀,细胞膜光滑完整,液泡化程度不高。如果选用的叶片较老(叶片边缘已有卷曲现象),则经过几次洗涤后,得到的原生质体产量较低,且细胞膜大多不完整。

2. 原生质体培养

培养基中所用的渗透剂对原生质体培养的影响较大,以蔗糖为渗透剂培养3—4天后,原生质体大量粘结,并逐渐褐化死去;用甘露醇也因少数细胞的坏死逐渐引起周围细胞的解体,我们的试验表明,只有用葡萄糖作为渗透剂,才能成功地克服细胞大量粘连及细胞解体的现

象,所以在以后的试验中,我们都选用葡萄糖作为渗透剂.在原生质体培养密度为 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 时,培养 4—5 天后部分原生质体即开始长壁,细胞呈椭圆形,培养后 1 星期可见细胞第一次分裂(图版 I-2),分裂频率为 6.1%,培养至 10 天,细胞分裂频率上升到 20.3%. 培养至 3 个星期,可见十几个细胞的小细胞团(图版 I-3). 如果原生质体培养密度为 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$,则培养至第 5 天就能见到第一次分裂,但如在以后的培养过程中不及时降低细胞密度,则不能进行持续的细胞分裂. 当原生质体培养密度为 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 时,在培养 10 周内无需添加新鲜的培养基,因为作为渗透调节物质的葡萄糖可以作为碳源被细胞在代谢过程中逐渐利用,培养液中渗透压随之逐渐下降,从而促使细胞持续分裂. 培养 10 星期后,每隔 1—2 个星期,需往培养皿中加入新鲜的降低渗透压的培养基,培养后 12 星期,即有大量肉眼可见的黄色小愈伤组织出现. 以后随加入新鲜培养基并适当地稀释细胞团或小愈伤组织的密度,促进小愈伤组织的生长.

在降低渗透压的培养基中,我们去掉了 2,4-D,经过几次加液,即形成结构紧密的愈伤组织.

3. 再生愈伤组织的增殖及分化

将肉眼可见的小愈伤组织连同培养基一起吸到附加 0.5mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 0.2% Gelrite 固化的 MS 固体培养基上(图版 I-4),3—4 个星期后,长成直径约 2mm 的小愈伤组织,将这种愈伤组织转到新鲜的附加不同浓度的 BA 和 NAA 的 MS 增殖培养基上(表 1),2—3 个星期后,愈伤组织长到直径约 5mm 大小,将此愈伤组织转到不同的分化培养基上,培养 4 周后开始形成芽(图版 I-5). 培养 6 周后统计分化频率(表 1).

表 1 愈伤组织在不同增殖培养基及分化培养基上培养对分化的影响*

分化培养基激素组成 (mg/l)	增殖培养基激素组成 (mg/l)		
	BA0.2 + NAA0.2	BA0.5 + NAA0.2	BA0.5 + NAA
ZT0.5 + IAA0.1	8%	5%	10%
ZT1.0 + IAA0.5	0	23%	10%
ZT1.0 + IAA0.1	—	—	12%
ZT0.5 + BA0.5 + IAA0.5	—	—	8%
BA1.0 + IAA0.1	0	3%	0
2-ip 0.5 + IAA0.1	0	0	3%

* 每种分化培养基上接种 20—60 块愈伤组织.

由表 1 可见,分化培养基激素种类对愈伤组织的分化有很大影响,细胞分裂素以 ZT 为最佳,生长素以 IAA 为最佳(数据未列出). 另一方面,使原生质体形成愈伤组织的增殖培养基成分对以后的分化也有较大的影响,例如,由增殖培养基 MS + 0.5mg/l BA + 0.2mg/l NAA 而来的愈伤组织在分化培养基 MS + 1.0mg/l ZT + 0.5mg/l IAA 上的分化频率为 23%,而由增殖培养基 MS + 0.2mg/l BA + 0.2 mg/l NAA 而来的愈伤组织在上述相同的分化培养基上,分化频率为 0.

当分化出的芽长到 1—2cm 高的小苗时,将小苗从基部切下,转到无激素的 1/2MS 培养基上,10 天以后小苗长出根,形成完整植株(图版 I-6).

虽然 Russell 和 McCown(1986,1988) 报道了由杨树(银白杨×大齿杨)原生质体培养成功,并获得了再生植株,本文所报道的毛白杨原生质体再生植株的结果与其相比,有以下几个方面的改进。

首先,我们改用了在原生质体培养研究中广泛使用的 KM8p 培养基,而不是 Russell 等认为对于木本植物较为合适的 WPM 培养基,从而获得了较高的分裂频率。其次,在毛白杨的原生质体培养中仍采用液体浅层培养,用这种方法培养后一星期就可观察到细胞分裂,而在 Russell 等报道中所用的浮片法 (liquid floating-disc system) 第一次细胞分裂的时间约需培养 6—8 星期。另外,在诱导原生质体来源的愈伤组织分化时, Russell 等选用了较不常用的 thidiazuron,而在毛白杨中采用常用的玉米素和吲哚乙酸,即可诱导芽的分化,并形成再生植株。

综上所述,本文报道的毛白杨原生质体培养成功的结果提供了一种较方便并适于常规应用的原生质体培养技术。这对于开展其它种杨树的原生质体培养以及进行基因转移等遗传操作的研究均具有重要意义。

承河北省林业科学研究所惠赠毛白杨试管苗,陈乃光同志协助摄影,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 王善平、许智宏,细胞生物学杂志,11(1989),14—18.
- [2] Rao, P. S. et al., *Protoplasma*, 124(1985), 80—86.
- [3] Sticklen, M. B. et al., *Plant Science*, 47(1985), 29—34.
- [4] Russell, J. A. & McCown, B. H., *Plant Science*, 46(1986), 133—142.
- [5] Russell, J. A. & McCown, B. H., *Plant Cell Reports*, 7(1988), 59—62.
- [6] Attree, S. M. et al., *Bio/Technology*, 7(1989), 1060—1062.
- [7] 王善平、许智宏、卫志明,植物学报,32(1990),172—177.
- [8] Murashige, T. & Skoog, F., *Physiol. Plant*, 15(1962), 473—497.
- [9] Power, J. B. & Davey, M. R., *Laboratory Manual: Plant Protoplasts*. Dept. of Bot., Univ. of Nottingham, 1979.
- [10] Kao, K. N. & Michayluk, M. R., *Planta*, 126(1975), 105—110.