

番茄叶肉原生质体培养的研究

杨华杰¹ 吴定华¹ 李伟华²

(1 华南农业大学园艺系, 广州 510642; 2 华南师范大学生物系)

摘要 适合番茄叶肉原生质体培养的材料是 3~4 周龄无菌苗顶端开展的叶片, 在 27℃ 下, 采用 10 g/L 纤维素酶“Onozaka”R—10、5 g/L 果胶酶 Pectinase、5 mmol/L MES、90 g/L 甘露糖醇、CPW 盐的酶液游离撕去下表皮的嫩叶, 14~16 h 效果最好。研究表明, “红玫瑰”番茄和 *L. esc.* × (*L. esc.* × *S. ly.*, F₁), BC₁F₁ 的酶解效果最好, 原生质体的产量和活力都最高; 秘鲁番茄和 *L. esc.* × *S. ly.*, F₁ 次之; 而潘那利番茄酶解效果最差, 产量依次为: 4.83×10^6 、 4.55×10^6 、 4.37×10^5 、 2.12×10^5 和 3.03×10^4 个/g。试验中, 对多种培养基及培养方法进行对比研究, 结果表明 D₂ 培养基液体浅层法培养效果最好, TM—2 液体浅层培养和 M8E 琼脂包埋漂浮法次之。在所采用的 5 种试材中, 从“红玫瑰”番茄和 *L. esc.* × (*L. esc.* × *S. ly.*, F₁), BC₁F₁ 的叶肉原生质体获得了愈伤组织。

关键词 栽培番茄; 野生番茄; 叶肉原生质体

中图分类号 Q 343.9

番茄种质资源中, 野生番茄占有重要地位, 它具有普通栽培番茄所缺乏的某些宝贵基因, 然而, 由于番茄远缘有性杂交育种工作中常遇到远缘种杂交不亲和、杂种不稔等困难, 限制了番茄野生资源的利用。本文以栽培番茄和野生番茄的叶肉原生质体进行培养, 目的在于探索番茄原生质体培养的基本技术和条件, 为进一步采用体细胞杂交及有用基因导入原生质体等生物改良番茄品种工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

栽培番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)“红玫瑰”品种、秘鲁番茄(*Lycopersicon peruvianum* Mill)、栽培番茄“粤农二号”和类番茄茄(*Solanum lycopersicoides* Dum.)的 F₁ 代(*L. esc.* × *S. ly.*, F₁)、栽培番茄“粤农二号”和(*L. esc.* × *S. ly.*, F₁)的回交一代 *L. esc.* × (*L. esc.* × *S. ly.*, F₁), BC₁F₁、潘那利番茄(*S. pennellii* Corr.)或(*L. pennellii*)。

1.2 方法

采用 3~4 周龄番茄无菌苗顶端刚伸展开的嫩叶, 用尖头镊子沿中脉处小心撕去下表皮, 撕面向下漂浮在灭过菌的等渗液 CPW9 中(90 g/L 甘露糖醇、CPW 盐、5 mmol/L MES、pH 5.8)质壁分离 1 h, 然后将其转入酶解液, 在 27℃ 黑暗条件下酶解 8、14~16 和 20 h 等。采用界面法收集、纯化原生质体, 然后冲洗、计数, 将 2 mL 原生质体悬浮液均匀地铺在 *d* 为 6 cm 的玻璃培养皿中, 用 Parafilm 封口, 放入 27℃ 恒温箱中, 黑暗条件下静置培养。将获得的原生质体分别在以下几种培养基中培养: M8E(Niedz et al, 1985)、D₂(李向辉, 1981)、TM—2(Shahin, 1985)、MMS(Tan et al, 1987)、MB₅(Tan et al, 1987)、LM(刘育乐等, 1991), 6 种培

培养基的主要成分见表 1。采用以下两种培养方式: 液体浅层培养(Niedz et al, 1985)和琼脂包埋漂浮培养(卫志明, 1992)。

表 1 6 种培养基的主要成分 mol/ L

成分	MMS	MB ₅	M8E	D ₂	TM—2	LM
KNO ₃	0.018 8	0.024 7	0.018 8	0.014 6	0.001 5	0.024 7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.003 0	0.001 0	0.003 0	0.006 1	0.003 0	0.001 0
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.002 7	0.001 8	0.002 7	0.006 5	0.002 7	0.001 8
KH ₂ PO ₄	0.001 3		0.001 3	0.005 9	0.001 3	
NH ₄ NO ₃	0.020 6			0.003 4		
(NH ₄) ₂ SO ₄		0.000 9				0.000 9
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		0.001 1				0.001 1
微量元素	MS	B ₅	8E	DPD	MS	MS
有机成分	MS	B ₅	8E	DPD	TM—2	TM—2
甘露醇	0.494	0.494	0.450		0.025	0.200
蔗糖	0.029	0.029	0.050	0.050	0.199	0.060
葡萄糖	0.028	0.028		0.400		0.028
山梨糖					0.025	0.200
木糖					0.025	0.006
纤维二糖						0.003
NAA	0.5	0.5	1.0	1.5	1.0	1.0
6—BA	0.5	0.5	0.5	0.6		
Zeatin					0.5	0.5
2,4—D	1.0	1.0	1.0	0.5		0.5
椰子乳				5%		
pH	5.8	5.8	5.7	5.8	5.6	5.6
渗透压 ¹⁾	0.55	0.51	0.50	0.45	0.27	0.50

1) 以糖的总摩尔浓度近似地表示培养液渗透压, 以便于比较

2 结果

2.1 影响番茄叶肉原生质体游离效果的几个因子

2.1.1 酶组合 以纤维素酶 Cellulase “Onozaka” R—10、果胶酶 Pectinase 组成不同浓度配比的酶液。试验表明(见表 2)以 10 g/L 纤维素酶和 5 g/L 果胶酶的组合, 对“红玫瑰”番茄的无菌苗叶片, 酶解 14~16 h 取得满意的酶解效果。当配合低浓度(<3 g/L)的离析酶(Macerozyme R—10)对比实验, 叶肉组织离解速度加快, 但出现许多团状未消化的组织以及细胞破碎量增加, 所收集的原生质体产量也低。

2.1.2 酶解时间 试验中找到相对适宜的酶浓度组合之后, 对适宜的酶解时间进行研究。秘鲁番茄叶片在纤维素酶(10 g/L)、果胶酶(5 g/L)的酶解液中(下文简称酶 I), 酶解 16~18 h, 游离效果最好(见表 3), 原生质体产量和活力较高, 在 D₂ 液体浅层培养中有细胞克隆生成。酶解 22 h, 原生质体产量虽有所增加但活力很低, 其在以后的培养中集聚、褐化现象严重。

表 2 纤维素酶和果胶酶不同浓度配比下“红玫瑰”叶肉游离效果

纤维素酶 / $\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1}$	果胶酶 / $\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1}$	酶解 时间/h	原生质体 产量/ $\text{个}^{\circ}\text{g}^{-1}$	原生质体 活力/(%)	培养效果
5	5	20	3.0×10^6	74.1	D ₂ 液体浅层法, 有初分裂
10	5	14	4.5×10^6	83.4	D ₂ 液体浅层法, 少数细胞团
15	5	15	4.6×10^6	85.3	D ₂ 液体浅层法, 少数细胞团
20	5	15.5	4.1×10^6	82.7	MMS 包埋法, 少数细胞团
30	5	14	4.3×10^6	41.0	D ₂ 液体浅层法, 集聚严重

表 3 酶 I 组合下不同酶解时间秘鲁番茄的酶解效果

酶解时 间/h	酶液 颜色	叶片的变 化情况	酶解情况	产量 / $\text{个}^{\circ}\text{g}^{-1}$	活力 /(%)
10~12	黄	完整	很少游离物	—	—
16	浅绿	少许叶脉	游离一些原生质体	4.2×10^5	83.0
18	浅绿	完整叶脉	游离一些原生质体	3.5×10^5	84.2
22	深绿	完整叶脉	游离很多原生质体	5.6×10^5	10.8

“红玫瑰”番茄叶片在酶 I 条件下, 酶解 8 h, 原生质体密度开始增加, 酶解 14~16 h, 叶片上的原生质体基本离解, 仅剩上表皮和网状分布的叶脉。酶解 20 h, 镜检有许多短小叶脉, 而且获得的原生质体破碎量增加, 这表明酶解 14~16 h 最适合。

在酶 I 条件下 $L.esc.\times(L.esc.\times S.ly., F_1)$, BC_1F_1 的叶片酶解 14~16 h 效果最好, $L.esc.\times S.ly., F_1$ 酶解 7~8 h, 潘那利番茄酶解 10~12 h 也有相对较好的酶解效果。

2.1.3 基因型 对 5 种材料的试验表明, 基因型不同的种(品种), 其叶片酶解效果差异很大。在酶 I 条件下, 其效果如表 4。5 种番茄种(品种)的酶解效果排列顺序为“红玫瑰”番茄、 $L.esc.\times(L.esc.\times S.ly., F_1)$, BC_1F_1 > 秘鲁番茄、 $L.esc.\times S.ly., F_1$ > $L.pennellii$ 。

表 4 不同基因型对番茄叶肉原生质体产量的影响

项 目	“红玫瑰”	BC_1F_1	秘鲁番茄	$L.esc.\times S.ly., F_1$	$L.pennellii$
酶解时间/h	14~16	14~16	14~18	7~8	10~12
产量/ $\text{个}^{\circ}\text{g}^{-1}$	4.83×10^6	4.55×10^6	4.37×10^5	2.12×10^5	3.03×10^4

试验中, 虽经多种酶组合试验, 秘鲁番茄和 $L.esc.\times S.ly., F_1$ 的酶解效果始终不及“红玫瑰”番茄和 $L.esc.\times(L.esc.\times S.ly., F_1)$, BC_1F_1 , 而对 $L.pennellii$ 尚未找到适宜的酶组合。

影响番茄叶肉原生质体游离效果的因子还有很多, 譬如, 无菌苗苗龄(“红玫瑰”番茄 3~4 周龄无菌苗叶片, 酶解 14~16 h 便收集到大量原生质体; 而 6 周龄无菌苗叶片酶解困难, 需要 20 h 才收集到少量原生质体, 产量仅为 $7.3\times 10^5\text{个}^{\circ}\text{g}^{-1}$)、子叶作为试材(取“红玫瑰”番茄 3~4 周龄幼苗子叶, 酶解 8 h 便获得 $1.7\times 10^7\text{个}^{\circ}\text{g}^{-1}$ 产量的原生质体, 但在 D₂ 液体浅层培养的初期就完全破碎)、漂浮法纯化原生质体所采用蔗糖浓度(见表 5, 180 g/L 的纯化效果好于 150 和 200 g/L)、收集原生质体时的离心速度及离心时间(见表 6, 以 500 r/min 离心 3 min 效果最好)、甚至在蔗糖漂浮及等渗液冲洗时离心管中原生质体悬浮液的容积(见

表 7, 悬浮液容积以 4 mL 为适宜)等等, 这些都可能引起原生质体活力和培养效果的不同。

表 5 蔗糖漂浮法纯化“红玫瑰”叶肉原生质体的效果

蔗糖质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	150	180	200
产量/ $\text{个}\cdot\text{g}^{-1}$	2.7×10^6	3.5×10^6	4.3×10^6
界面原生质体活力/(%)	88.6	85.7	86.2
沉淀情况	含较多原生质体	少许原生质体	少许原生质体
原生质体悬浮液净度 ¹⁾	+	++	++

1) 净度分 2 级: 破碎细胞少为 ++; 多为 +

表 6 不同离心速率和离心时间的效果比较

离心速率/ $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$	500	500	500	1 000
离心时间/min	3	5	8	1
出现沉淀时间/min	3	3	3	1
上清液净度 ¹⁾	++	++	++	+++
重新悬浮沉淀	易	易	难	难
原生质体悬浮液净度 ¹⁾	+++	++	+	+

1) 净度分 3 级: 破碎细胞及叶绿体小粒少为 +++; 多为 ++; 很多为 +

表 7 原生质体悬浮液容积对收集效果的影响

处理	容积/mL	离心时间/min	离心效果
蔗糖漂浮	6~8	5	界面原生质体层不明显, 大量绿色物未沉入管底
	6~8	10	界面原生质体层明显
	4	5	界面原生质体层明显
等渗液冲洗	6~8	3	离心管中部有大量绿色物
	6~8	6	离心管中部有少量绿色物
	4	3	离心管中部干净

2.2 番茄叶肉原生质体的培养效果

“红玫瑰”番茄叶肉原生质体以 D₂ 液体浅层法培养, 培养第 2 d 观察到原生质体体积略有增大; 之后, 细胞开始膨大、拉长, 这表明原生质体已再生细胞壁; 第 6 d 观察到初分裂相, 以及呈长形、棒形等各种开头的细胞, 而这些异常膨大的细胞在以后培养中细胞质浓密, 不发生分裂; 10 d 后细胞分裂逐渐增多, 有些进入 2~3 次分裂, 分裂高峰在 8~10 d, 但直到两周后仍可观察到初分裂相, 此时分裂发生早的细胞已形成几十个细胞的细胞团, 在同一培养皿中会观察到细胞发育不整齐的观象。每隔 7 d, 添加新鲜低渗培养液, 在这过程中可观察到一些褐化的细胞团边缘又再生出透明状新细胞。继续培养到 1 个月左右, 可观察到淡黄色微愈伤组织(0.5~2 mm)出现。那些发生早, 体积大的细胞团褐化轻, 最早形成肉眼可见的微愈伤组织, 而那些发生迟、生长慢的细胞团则褐化严重, 最终不能形成愈伤组织。

2.2.1 不同基本培养基和培养方式对番茄叶肉原生质体培养效果的影响 试验用了 6 种基本培养基及液体浅层培养和琼脂包埋漂浮培养两种方法, 对“红玫瑰”番茄叶肉原生质体进行培养, 培养效果以 D₂ 液体浅层法最好, TM-2 液体浅层法和 M8E 琼脂包埋漂浮法的培养效果次之。见表 8。

表 8 不同培养基、培养方式对“红玫瑰”叶肉原生质体培养¹⁾的影响

培养基	培养方式 ²⁾	细胞变形 ³⁾ (3~4 d)	21 d P. E. ⁴⁾ /(%)	愈伤形成 /d	愈伤数量 /个·皿 ⁻¹	褐化发 生日期/d	35 d 褐化 情况 ³⁾
MMS	I	+++	0.035 0	—	—	23	++
	II	+	0.008 8	—	—	19	+++
MB ₅	I	+++	0.047 0	—	—	24	++
M8E	I	+++	0.071 0	45	2.5	26	++
	II	+++	0.008 2	—	—	21	+++
D ₂	I	+	0.009 4	—	—	25	++
	II	+++	0.093 0	30	34.0	20	+
TM-2	II	+	0.064 0	32	5.6	24	+++

1)初培养密度 2×10^8 个 L^{-1} ; 2)培养方式: I — 琼脂包埋漂浮法, II — 液体浅层培养; 3)细胞变形及细胞褐化: + 少, ++ 多, +++ 很多; 4)P. E. 为植板率

从表 8 可见, 对 MMS、M8E 培养基, 采用琼脂包埋漂浮法, 原生质体的分裂情况、21 d 植板率及褐化情况均好于液体浅层法; 而对于 D₂ 培养基这种情况刚好相反。MMS、M8E 琼脂包埋培养可阻止原生质体集聚, 有效地防止液体浅层培养中原生质体因粘连而早期发生的褐化。琼脂包埋培养有助于减轻培养早期褐化, 这可能与它避免了细胞间有害代谢产物的相互影响有关。而对于 D₂ 培养基, 琼脂包埋培养效果反而差, 可能与作者尚未找到降低原生质体培养液渗透压的适宜方法有关。

以 TM-2 液体浅层法培养时, 培养初期原生质体破碎十分严重, 这可能与 TM-2 的总渗透压($0.27\text{ mol}\cdot L^{-1}$) 低有关。

当以 LM 液体浅层法培养时(表 8 中未列)培养第 10 d, 约 80% 的细胞出芽, 未观察到初分裂。在以后的培养中, 这些出芽细胞逐渐破裂, 1 个月后全部破裂、消失。

2.2.2 不同基因型的番茄, 其叶肉原生质体培养效果不同 从表 9 可见, 4 种番茄叶肉原生质体以 D₂ 液体浅层培养时, “红玫瑰”番茄和 $L.esc.\times(L.esc\times S.ly., F_1)$, BC₁F₁ 的原生质体培养效果最好, 获得了愈伤组织。秘鲁番茄和 $L.esc\times S.ly., F_1$ 叶肉原生质体培养初期, 细胞伸长和膨大的很少, 在以后培养中, 细胞褐化情况严重, 逐渐破裂, 可能是 D₂ 培养基不适合或与初培养密度低(5×10^7 个 L^{-1}) 有关。另一可能是与叶肉原生质体再生潜能的差异有关。这与前人关于基因型对番茄原生质体培养的影响的报道是一致的。

表 9 不同基因型的番茄叶肉原生质体培养效果¹⁾

基因型	培养密度 /个·L ⁻¹	培养情况	愈伤数量 /个·皿 ⁻¹
“红玫瑰”	2.0×10^8	约第 6 d 有初分裂, 30 d 出现愈伤组织	34
BC ₁ F ₁	1.5×10^8	约第 7 d, 有初分裂, 45 d 出现愈伤组织	7
秘鲁番茄	5.0×10^7	有少量细胞克隆, 褐化	—
$L.esc.\times S.ly., F_1$	5.0×10^7	少量细胞伸长变形, 无分裂相	—

1)采用 D₂ 液体浅层法培养

3 讨论

试验表明, 制备大量、纯净、高活力的原生质体是原生质体培养的首要条件, 而获得健壮

无菌苗是取得高产量、高活力原生质体的基础。适宜的培养基是原生质体培养的主要条件, D_2 培养基的特点是除含有大量 KNO_3 外, 还含有较高水平的 $CaCl_2$ 和 $MgSO_4$, 这有利于膜的稳定; 从碳源构成来看, 它的有利之处在于随着原生质体再生细胞, 消耗葡萄糖的过程中, 能保持一种相适应的渗透浓度, 利于细胞分裂。褐化现象是番茄原生质体培养中的重要障碍, 是影响细胞克隆持续分裂和愈伤组织形成的重要因素。原生质体分裂频率高低是原生质体培养的重要影响因素之一, 作者试验中分裂频率较低, 植板率最高是 0.093%, 其原因可能与初培养时原生原体的活力较低、培养基及培养方法是否最适宜、培养中的褐化现象以及试材的基因型有限等因素有关。

参 考 文 献

- 李向辉. 1982 一种适应性较广的原生质体培养基. 见: 中国科学院遗传研究所编. 研究工作年报 (1981). 北京: 科学出版社, 77~78
- 刘育乐, 米景九. 1991. 番茄原生质体培养及再生植株影响因素初探. 北京农业大学学报, 17(3): 19~22
- 卫志明. 1992 花椰菜叶肉原生质体培养于再生植株. 园艺学报, 19(1): 47~51
- Niedz R P, Rutter S M, Handly L L, et al. 1985. Plant regeneration from leaf protoplasts of six tomato cultivars. Plant Science, 39: 199~204
- Shahin E A. 1985. Totipotency of tomato protoplast. Theoretical and Applied Genetics, 69: 235~240
- Tan M M C, Rietveld E M, Marrewijk G A M Van, et al. 1987. Regeneration of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*L. esculentum*): factors important of efficient protoplast culture and plant regeneration. Plant Cell Report, 6: 172~175

STUDY ON CULTURING PROTOPLASTS OF TOMATO MESOPHYLLS

Yang Huajie¹ Wu Dinghua¹ Li Weihua²

(1 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., 510642 Guangzhou;

2 Dept. of Biology, South China Normal Univ.)

Abstract

Suitable materials for tomato protoplast isolation and culture were leaves from 3~4 week-old axenic seedlings grown in agar(in test tube). The young leaves torn lower epidermis were incubated in an enzyme solution consisting of 10 g/L "Onozaka" R—10 cellulase, 5 g/L pectinase, 5 mmol/L MES and 90 g/L mannitol in CPW salts for 14~16 h at 27 °C. The mesophyll protoplast yields were 4.83×10^6 , 4.55×10^6 , 4.37×10^5 , 2.12×10^5 and 3.03×10^4 protoplasts/gram fresh leaves respectively for *L. esc.* cv. Red Rose, *L. esc.* $\times$ (*L. esc.* $\times$ *S. ly.*, F_1), BC_1F_1 , *L. peruvianum*, *L. esc* $\times$ *S. ly.*, F_1 and *S. pennellii*, all with viability of more than 80% but less than 90%. The D_2 liquid culture was the most suitable in several medium and culture methods. With this method, micro calli had been obtained from the mesophyll protoplasts of *L. esc.* cv, Red Rose and *L. esc.* $\times$ (*L. esc.* $\times$ *S. ly.*, F_1), BC_1F_1 . Transferred to agar medium for enhancement after the calli grew to 1 to 2 mm in diameter, it ceased to grow and came to brown.

Key words *Lycopersicon esculentum* (*L. esc.*); wild tomato species; mesophyll protoplasts