

秘鲁番茄茎段原生质体再生成株的研究

张长远 吴定华

(华南农业大学园艺系, 广州 510642)

摘要 采用秘鲁番茄(*Lycopersicon peruvianum* Mill.)茎段原生质体进行液体浅层培养, 从试用的多种培养基中筛选出了1种适宜的原生质体培养基、2种增殖培养基、2种分化培养基, 在此基础上, 建立了秘鲁番茄原生质体再生成株体系。最短再生周期只需42~45 d。整个实验共获得100多个再生植株, 其中一部分定植到土壤中, 均能正常生长、开花和结籽, 经性状观察及染色体数目分析, 均为正常的二倍体植株。

关键词 秘鲁番茄; 茎段原生质体; 植株再生

中图分类号 Q 343.9

野生型秘鲁番茄(*Lycopersicon peruvianum*)较之栽培番茄(*Lycopersicon esculentum*)对番茄病害有较强的抗性, 有高含量的干物质($w = 12.7\%$)、维生素C($0.565 \sim 1.095 \text{ mg/g}$)以及比较抗寒(能经受 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 低温)。但是秘鲁番茄与栽培番茄的有性杂交存在着严重的不亲和性及杂种不育性(吴定华等, 1964; 吴定华, 1984), 阻碍了秘鲁番茄宝贵基因的直接利用。体细胞杂交为包括秘鲁番茄在内的野生种优良性状转移到栽培番茄中提供了广阔的前景。本文采用茎段获得原生质体, 建立了一种简便、快速、重演性良好的秘鲁番茄原生质体再生成株技术, 期望能为进一步开展番茄体细胞杂交提供基础。

1 材料与方法

1.1 供体植株的培养

秘鲁番茄种子经表面消毒[$\varphi(\text{NaClO}) = 1.5\%$, 10 min, 无菌水冲洗4次]后接种到MS (Murashige et al, 1962)培养基上发芽, 当子叶展平时, 切取上部(长约2 cm)转移到50 #培养基(见表1)上发根成为无菌试管苗, 发芽和试管苗的培养均在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 4 000 lx, 光照12 h/d下进行。

1.2 原生质体游离与纯化

取2~3周苗龄的幼苗, 置于 6°C 黑暗冰箱中冷处理1周。原生质体游离与纯化参考Gledlie (1989)的方法, 在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、30 r/min下酶解8.5 h(每40个切片用酶液8 mL)。酶解液经 $64 \mu\text{m}$ 筛网过滤至10 mL离心管中, 离心5 min, 将含有原生质体的上清液均等移至2个离心管中(各4 mL), 分别加Rinse液(cpw盐+20 g/L KCl, pH 5.8)至10 mL, 混匀, 再离心5 min, 则原生质体沉淀于离心管底部, 弃上清液, 分别加4 mL Rinse液, 离心3 min清洗, 共清洗纯化2次, 2个离心管中的原生质体加原生质体培养基重新悬浮后混合培养。离心速度均为500 r/min。

1.3 原生质体培养

将纯化的原生质体(图版—2)分别用JSCL2.5、D_{2a}培养基(见表1, 以下所用培养基均见表

1)悬浮, 调整密度为 1×10^8 个/L, 每个培养皿($d=3.5$ cm)滴加 1 mL 原生质体悬浮液, 置于 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 黑暗条件下静止培养. 第 4 d, 前者加 0.5 mL Mix 培养基稀释、后者加 0.5 mL D_{2b} 培养基稀释, 并都转移到散射光下培养(温度不变). 以后每隔 3 d 分别用 Mix、 D_{2b} 稀释培养基各 0.5 mL 继续稀释, 当培养物达到 2 mL 时, 便将其中 1 mL 转移到另一个培养皿中.

表 1 试验所试用的培养基¹⁾

培养基名称	代号	成分或来源
原生质体培养基	JSCL2.5	(O'connell et al, 1985)
	D_{2a}	(李向辉等, 1981)
稀释培养基	Mix	1:1 的 JSCL2.5 和 JSR 混合液(O'connell et al, 1985)
	D_{2b}	(李向辉等, 1981)
增殖培养基	MC	MS 大量、微量元素+Nitsch 维生素+0.2 mol/L 甘露醇+7.3 mmol/L 蔗糖+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+8 g/L 琼脂 (Tan et al, 1987)
	MJSC-12	JSC-12 大量元素+JSCL2.5 微量元素+1/2(JSCL2.5 有机成分+JSR 有机成分)+蔗糖 4.7 g/L+甘露醇 109.2 g/L+玉米素 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L
	Z_3	MS+KT 2 mg/L+IAA 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
	Z_4	MS+KT 1 mg/L+IAA 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
分化培养基	YB-1	MS 大量、微量元素+GA ₃ 0.02 mg/L+玉米素 1 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L (柴敏, 1991)
	15 #	MS 大量元素+H 微量元素及有机成分+EDTA-Fe+IAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L
	MST	MS+玉米素 2 mg/L+IAA 0.1 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 6 g/L
发根培养基	50 #	MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L

1) 表中培养基 pH 值均调至 5.8; 原生质体培养基、稀释培养基过滤除菌, 其他高压灭菌

1.4 植株再生

当细胞克隆生长达到直径 1.5 mm 以上时, 一部分直接转入 3 种分化培养基(YB-1, 15 #, MST); 一部分转移到 4 种增殖培养基(MJSC-12, MC, Z_3 , Z_4), 待增大变绿后再转入相应的分化培养基; 余下的小克隆在原培养皿中继续培养.

当分化培养基上的愈伤组织分化出的芽长约 2~3 cm 时(图版-6), 切取芽部转移到 50 #发根培养基上发根. 再生植株培养条件与供体植株相同.

1.5 再生植株移植及性状分析

发根后 1~2 周的再生小植株(图版-7)移至培养室外练苗 3~4 d, 洗净根部培养基移植到经灭菌的松软腐殖土中, 在散射光处缓苗 2 周左右, 待植株完全成活时移栽到土中.

对移栽成活的再生植株进行了以下性状观察分析: 植株外部形态; 气孔密度、大小; 花粉粒形状、大小; 花粉萌发力, 参考陈竹君等(1987)方法; 染色体数目观察, 卡诺固定液固定小花蕾, 卡宝品红染色. 以鉴定是否有变异株和同源原生质体自发融合再生株.

2 结果与讨论

2.1 培养基对原生质体培养的影响

对细胞分裂、细胞团形成的影响: 本试验所采用的 JSCL2.5 和 D_{2a} 培养基对原生质体的培

养效果影响差异十分显著(见表 2)。

表 2 两种原生质体培养基效果的差异

原生质体培养基	第一次分裂期/d	细胞团形成期(20~30个细胞)/d	小愈伤出现期(1~1.5 mm)/d	分裂频率/%	植板率/%
JSCL2.5	2~3	7	12~14	86	48
D _{2a}	3~4	14	30~35	83	11

由表 2 可以看出 2 种培养基显著地影响着细胞分裂速度,但对细胞分裂频率的影响差异不明显;植板率的显著差异主要是由 D_{2a}培养基中出现的严重褐化所造成的,在 D_{2a}培养基上第 7 d 形成的小细胞团(10~20 个细胞)出现明显的褐化,第 14 d 绝大部分细胞团中央严重褐化,不能继续分裂;而 JSCL2.5 培养基中的原生质体,整个培养过程中无褐化现象发生。

表 2 中差异的原因很可能在于 JSCL2.5 中的高水平大量元素和不含 NH₄⁺,见表 3 (其中的 K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 的浓度分别约是 D_{2a}中的 5.30、1.96、1.64 倍),这些高水平的大量元素有可能在稳定质膜、提高原生质体活力等方面起着积极作用;另外碳源的组成差异可能亦有一定影响,JSCL2.5 中除含蔗糖外,还有少量的山梨醇、木糖醇等,可能对原生质体再生新细胞壁和细胞分裂具有一定的促进作用;其较低的渗透压(0.27 mol/L)对秘鲁番茄原生质体表现是适宜的,这也可能是其快速分裂的重要原因。

表 3 JSCL2、JSR、JSC-12 培养基组成成分

培养基成分	JSCL 2.5	JSR	JSC-12	培养基成分	JSCL 2.5	JSR	JSC-12
$\rho(\text{大量元素})/(\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1})$				$\rho(\text{有机物质})/(\text{mg}^{\circ}\text{L}^{-1})$			
KNO ₃	7.6	1.9	1.9	VB ₁	0.05	0.50	0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.76	0.44	0.44	甘氨酸	2	2	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.48	0.37	0.37	烟酸	5	5	5
KH ₂ PO ₄	0.68	0.17	0.17	叶酸	0.5	0.5	0.5
NH ₄ Cl		0.028	0.110	生物素	0.05	0.05	0.05
$\rho(\text{微量元素})/(\text{mg}^{\circ}\text{L}^{-1})$				水解酪蛋白	50	100	100
乙二醇四乙酸钠	18.5	18.5	18.5	肌醇	4 400		100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9	13.9	13.9	硫酸腺嘌呤			40
H ₃ BO ₃	3.1	3.1	3.1	$\rho(\text{糖})/(\text{g}^{\circ}\text{L}^{-1})$			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.9	9.9	9.9	蔗糖	68.0	34.0	4.7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.6	4.6	4.6	甘露醇	4.4	8.8	109.2
KI	0.42	0.42	0.42	山梨醇	4.4		
N ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.13	0.13	0.13	木糖醇	3.8		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.013	0.013	0.013	$\rho(\text{激素})/(\text{mg}^{\circ}\text{L}^{-1})$			
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.015	0.015	0.015	6-BA	0.4	0.2	
				ZT			2
				2,4-D	0.6		

D_{2a}培养基中的褐化现象可由添加 Mix 稀释培养基而逐步得以缓解,最终也能快速地长成

肉眼可见的细胞团。在 D_{2a} 培养基中培养 10 d 后, 改用 Mix 液逐步稀释, 则 10 d 左右即可出现肉眼可见的细胞团。

对愈伤组织增殖的影响: 转入到 4 种增殖培养基上的小愈伤组织, 放在同供体植株相同培养条件下培养。其中 MC 及 MJSC-12 培养基对愈伤组织的增殖效果相似, 7~10 d 体积就已显著增大, 颜色呈淡黄绿色, 2 周左右直径即可达到 5 mm 左右, 颜色呈淡绿色, 紧密度适中。初始转入的小愈伤组织在这 2 种培养基上都没有明显的生长过渡期, 并且初始体积越大, 这种转变速度也越快; 在 Z_3 、 Z_4 培养基上的小愈伤组织 1 周后呈淡黄褐色, 3 周后, Z_3 培养基上的小愈伤组织呈深黄褐色, 体积少量增加; Z_4 培养基上只有极少数小愈伤组织变绿, 体积较 Z_3 上的增加量略多。由此筛选出 MC 和 MJSC-12 两种适宜的增殖培养基。

对愈伤组织分化的影响: 直接转入到 3 种分化培养基上的小愈伤组织, 都能逐渐增大变绿, 先后出现绿色亮点, 最终都能分化出芽。其中以 YB-1 培养基分化速度最快, 当转入到这种培养基后 24~26 d 分化的幼芽即长达 2~3 cm, 较粗壮, 但每块愈伤组织分化成苗数较少, 且盲芽较多, 分化出的苗叶缘呈白化状, 但发根后能够逐渐恢复正常绿色; MST-15 # 培养基分化期需 35 d 左右, 但前者分化出的苗全部玻璃化, 15 # 培养基上每块愈伤组织分化出的苗数最多。

在增殖培养基上培养 2 周的愈伤组织转入 15 # 分化培养基后, 10 d 左右即出现明显分化现象, 4 周左右即可成苗, 且每块愈伤组织分化成苗数更多; 留在原培养皿中继续培养的小克隆也能逐渐增大, 但速度远慢于转入增殖、分化培养基中的小愈伤组织。因逐渐增多的小克隆的形成, 最终长成一整块充满培养皿底部的愈伤组织。

愈伤组织分化出的幼芽, 切下转入 50 # 发根培养基后, 4~5 d 即可产生大量乳白色幼根, 形成完整的植株。实验中, 小愈伤组织直接转入到分化培养基 YB-1 上的处理, 成苗最为迅速, 再生周期只需 42~45 d。

2.2 连续稀释对原生质体培养的影响

连续稀释能在一定程度上缓解细胞褐化, 其中第 1 次加液时间是关键, 培养在 D_{2a} 中的原生质体, 在第 4 d (第 1 次分裂期) 开始加液的部分, 细胞褐化速度较慢、程度较轻, 月余后也能长出肉眼可见的细胞团; 而第 6 d 才加液的部分只有少数几次分裂便停止了, 几次重复均如此; 在 JSCL2.5 培养基中的原生质体分裂速度快, 不存在褐化现象, 但尽早稀释及时一分为二到 2 个培养皿中, 适当降低渗透压, 为迅速分裂的细胞提供足够的营养、氧气和宽裕的分裂空间是必需的。

2.3 再生植株性状分析

再生植株移植到土壤中, 均能正常生长、开花、结果和结籽。性状表现与对照实生苗植株相同; 用显微镜观察及显微测微尺测量其气孔 (密度 216 个/ mm^2) 大小 ($25.6 \mu\text{m} \times 31.2 \mu\text{m}$) 及花粉粒的形态 (近圆形, 一端稍尖)、大小 ($28.4 \mu\text{m} \times 29.8 \mu\text{m}$)、萌发力 (35.95%) 等均与对照植株无差异。进一步对花粉母细胞染色体数目分析, 前期末为 12 对二价体 (图版-11), 后期 2 极各为 12 条染色单体 (图版-10), 故可肯定再生植株均为正常的二倍体, 在培养过程中没有发生自然融合等变异现象。

3 小结

本试验共重复 6 次, 再生性均能高效地重演, 说明本试验技术是成熟的。在茎段原生质体

培养过程中, 正确地选择合适的培养基、每隔 3~4 d 稀释 1 次、及时地将原生质体培养物一分为二至 2 个培养皿中以降低细胞密度等是成功的关键。

参 考 文 献

- 李向辉, 颜秋生, 孙勇如, 等. 1981. 一种适用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. 北京: 科学出版社, 77~78
- 吴定华, 李鹏飞. 1964. 番茄种间杂交结果初探. 园艺学报, 3(4): 369~378
- 吴定华. 1984. 番茄种间杂交的探讨. 园艺学报, 11(1): 35~41
- 陈竹君, 吴定华. 1987. 番茄远缘杂种 F_1 及其双亲花粉萌发力的研究. 中国蔬菜, 3: 12~17
- 柴 敏. 1991. 秘鲁番茄叶肉原生质体再生植株的培养. 北京农业科学, 9(3): 29~31
- Gledlie S, Keller W A, Poysa V. 1989. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of a tomato hybrid. Plant Cell Reports, 8: 212~214
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473~497
- O'connell M A, Hanson M R. 1985. Somatic hbridization between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii*. Thero Appl Genet, 70: 1~12
- Tan Mei-Lie M C, Boerrigter H S, Kool Ad J. 1987. A rapid proceedure for plant regeneration from protoplast isolated from suspension culture and leaf mesophyll cells of *Solanum* species and *Lycopersicon pennellii*. Plant Science, 49: 63~72

PLANT REGENERATION FROM STEM-DERIVED PROTOPLASTS OF *Lycopersicon peruvianum*

Zhang Changyuan Wu Dinghua

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

Abstract

The protoplasts from stem tissue of *Lycopersicon peruvianum* Mill. were cultured in liquid medium and one proper protoplast culture medium, two proliferating media, two shoot regeneration media were selected from various media used in this experiment. Based on the experiment, protoplast-to-plant regeneration system was established for *L. peruvianum* Mill. The shortest time for regeneration from initial culture to regenerated plantlet was 42~45 days. More than 100 regenerated plants were obtained, some of which were transferred into soil and could vigorously grow, blossom and seed. Phenotype observation and chromosome analysis indicated that all of them were normal diploid plants.

Key words *Lycopersicon peruvianum* Mill.; stem-derived protoplast; plant regeneration



- 1 茎段纵切片; 2 游离的原生质体 $40\times 10\times 2.4$; 3 原生质体再生细胞第1次分裂 $40\times 10\times 2.4$;
 4 原生质体再生细胞第2次分裂 $40\times 10\times 2.4$; 5 原生质体再生多细胞团 $10\times 10\times 2.4$; 6 原生质体再生愈伤组织的分代情况; 7 原生质体再生植株; 8 定植于土壤中的再生植株生长情况; 9 再生植株与对照植株的性状比较(左侧为对照); 10 再生植株花粉母细胞减数分裂(I)末期(示12条染色体单体); 11 再生植株花粉母细胞减数分裂(I)前期末(示12对二价体)

图版 秘鲁番茄茎段原生质体再生植株

【责任编辑 柴 焰】