

栽培番茄“红玫瑰”叶肉原生质体培养研究

张长远 吴定华

(华南农业大学园艺系, 广州, 510642)

STUDY ON MESOPHYLL PROTOPLAST CULTURE OF *Lycopersicon esculentum* var. “RED ROSE”

Zhang Changyuan Wu Dinghua

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

关键词 “红玫瑰”番茄; 叶肉原生质体

Key words *Lycopersicon esculentum* var. “RED ROSE”; mesophyll protoplasts

中图分类号 Q 343.6

番茄原生质体培养是番茄细胞融合的前提和基础, 同时利用该技术也可建立起高效的遗传转化体系, 从而为利用野生番茄资源及转化有利基因, 服务于番茄育种, 创造良好条件. 本实验的目的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 材料

栽培番茄品种“红玫瑰”(*Lycopersicon esculentum* var. “RED ROSE”)

1.2 供体植株的培养

“红玫瑰”番茄无菌苗的培养参照张长远等(1998), 发芽、无菌苗的培养均在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 1 200 lx, 光照 12 h/d 下进行.

1.3 原生质体游离、纯化

将 2~3 周苗龄的无菌苗, 置于 6°C 冰箱中冷处理 1 周, 取完全展开的叶片, 用尖头镊子撕去下表皮, 置于 CPW9(李向辉等, 1988)液中预培养 1 h, 然后将叶片转移至酶液中, 在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 30 r/min 的恒温摇床中酶解 5.5 h. 酶解液经 $64\ \mu\text{m}$ 尼龙网过滤至 10 mL 离心管中, 离心 5 min, 弃上清液, 采用界面法收集原生质体, CPW9 液清洗纯化 3 次. 离心均在 500 r/min 下进行.

1.4 原生质体的培养

清洗纯化后的原生质体用 $\text{D}_{2\text{a}}$ (李向辉等, 1981)培养基重新悬浮, 血球计数板计数, 伊文思蓝(evans)检测活力, 调整密度至 1×10^8 个/L, 接种到 $d = 3.5\ \text{cm}$ 的培养皿中浅层培养(每皿约 1 mL), 第 4 d 用降低了渗透压的 $\text{D}_{2\text{a}}$ 即 $\text{D}_{2\text{b}}$ (李向辉等, 1981)0.1 mL 稀释 1 次, 以后每隔 4 d 添加 0.2 mL $\text{D}_{2\text{b}}$; 当形成小细胞团时, 静置培养皿, 轻轻吸出旧培养基, 添加新鲜 $\text{D}_{2\text{b}}$, 保持 1 mL 左右.

2 结果与讨论

2.1 原生质体的游离

果胶酶对“红玫瑰”叶肉原生质体游离的影响: 在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 30 r/min 的酶解条件下, 设定纤维素酶的质量浓度(10 g/L), 分别试用了 1.0、1.5、2.0 g/L 的 Macerozyme R-10, 结果发现该离析酶对“红玫瑰”叶肉原生质

体的游离效果影响显著;3种质量浓度下原生质体产量分别为 6.3×10^6 、 4.8×10^6 、 3.2×10^6 个/g,且后二者中破碎的原生质体远比前者多。据此,本试验确定采用 $10 \text{ g/L Cellulase "onozuka" R-10} + 1 \text{ g/L Macerozyme R-10} + 5 \text{ mmol/L MES}$ 的混合酶液酶解“红玫瑰”叶片,获得原生质体。

无菌苗的生长季节:生长季节对叶肉原生质体游离的显著影响主要表现在2个方面:(1)影响原生质体产量与活力。从4月至7月下旬,“红玫瑰”叶肉原生质体产量与活力急剧下降,4、5、6、7月份产量分别为 6.3×10^6 、 1.2×10^6 、 5.0×10^5 、 2.4×10^5 个/g,活力也从4月份的80%以上下降到7月份的50%左右;不同品种(种)受季节的影响程度会有所差异,在同样的酶解条件下,秘鲁番茄叶肉原生质体产量5月份为 8×10^5 个/g,6月份为 2×10^5 个/g,7月份产量极低,不足培养的产量,8~10月份则不论是采取一步法、二步法还是不同酶浓度酶解,均不能获得叶肉原生质体。(2)达到上述各产量所需的酶解时间亦需相应延长。4月份酶解“红玫瑰”叶片时,3 h后即开始有大量原生质体释放,5.5 h即可达 6.3×10^6 个/g,5、6、7月份适宜的酶解时间分别为7.5、9、11 h。季节对叶片酶解效果的影响可能是改变了叶片的生长结构的缘故,如细胞/叶片比值变小、细胞壁成份改变难以酶解等。虽然所用试材均在人工控制条件下培养的,但生物体固有的生物钟反应是不可能短期内受外界条件影响就可完全改变的。

2.2 原生质体培养效果

原生质体培养结果与杨华杰(1997)相似:每个培养皿中只有7~8个小细胞团,以后不论是采取连续加液,还是离心换新鲜培养液,均不能使之增大,似乎停滞在该阶段不能继续分裂。 D_{2a} 中的椰乳似乎对培养效果没有影响,“红玫瑰”叶肉原生质体在不含椰乳的 D_{2a} 培养基中能取得同样的培养结果。

利用叶片作为原生质体外植体,受到的影响因素较多,如株龄、供体植株生理状况、预处理(Shahin, 1985);及本文论及的季节等,这些因素都可能在不同程度上影响叶肉原生质体的培养效果。虽然不排除叶肉原生质体在一定阶段,适宜的分离时期能够表达其全能性,但这同时也可能是其原生质体培养重演性较差的原因之所在,因此利用叶片作为原生质体外植体局限性较大。为了扩大栽培番茄品种原生质体培养成功的范围,减少影响因素,提高重演性,参考张长远等(1998)方法,采用茎段作为原生质体外植体应是一种较有效的途径。

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(1981). 北京:科学出版社,77~78
- 李向辉,何卓培,钱迎青,等. 1988. 植物遗传操作技术. 北京:科学出版社,153~154
- 杨华杰,吴定华,李伟华. 1997. 番茄叶肉原生质体培养的研究. 华南农业大学学报,18(4):36~41
- 张长远,吴定华. 1998. 秘鲁番茄茎段原生质体再生成株的研究. 华南农业大学学报,19(3):15~20
- Shahin E A. 1985. Totipotency of tomato protoplasts. Theor Appl Genet, 69:235~240

[责任编辑 柴 焰]

本刊启事

为促进国内外学术交流,本刊已入编《中国学术期刊(光盘版)》,并以摘要形式进入广东金科网络系统。来稿一经本刊录用,将同时被光盘版收录和进入有关的网络,并在印刷版出版后一次性发放稿酬。

华南农业大学学报编辑部