

芝麻菜下胚轴原生质体的分离培养及再生植株

张传利^{1,2}, 桂雪梅^{1,3}, 朱媛¹, 刘雅婷¹, 毛孝强¹, 林良斌¹

(1 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2 云南热带作物职业学院,
云南 普洱 665000; 3 云南普洱市种子管理站, 云南 普洱 665000)

摘要:以芝麻菜 *Eruca sativa* Mill 无菌苗下胚轴为材料,研究了光照条件、苗龄、酶液组合、酶解时间、酶液中甘露醇浓度及纯化条件对其原生质体分离制备的影响。以附加不同激素组合的改良 KM8p 培养基进行液体浅层培养。结果表明,无菌苗的下胚轴酶解 10 h,用“过滤-离心-漂浮法”进行纯化后,可高效分离出有活力的原生质体;在改良的 KM8p 培养基的进行原生质体培养,当密度为 $7 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 时,分裂频率最高,为 24.8%。4 周后形成大量的细胞团和肉眼可见的小愈伤组织,植板率为 5.6%。然后转移到培养基上使其增殖,当愈伤组织长至 3~5 mm 时,将其转到分化培养基上诱导芽的分化,芽分化率为 33.6%。当芽长 2~3 cm 时,将其切下插入生根培养基上诱导生根,可获得完整植株。

关键词:芝麻菜; 下胚轴; 分离; 原生质体培养; 再生植株

中图分类号: Q942.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)02-0063-06

Plant Regeneration and Hypocotyl Protoplasts Isolation of *Eruca sativa*

ZHANG Chuan-li^{1,2}, GUI Xue-mei^{1,3}, ZHU Yuan¹, LIU Ya-ting¹, MAO Xiao-qiang¹, LIN Liang-bin¹

(1 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2 Yunnan Vocational College of Tropical Crops, Pu'er 665000, China;

3 Yunnan Pu'er Seeds Management Station, Pu'er 665000, China)

Abstract: The hypocotyls from aseptic seedlings of *Eruca sativa* Mill were used as materials for protoplast isolation. The effects of the light, concentration of mannitol, the seedling grown days, combinations of different enzyme, digesting time, the methods of protoplast purification, on protoplast isolation were studied. The protoplasts were cultured in modified KM8p medium supplemented with different phytohormone by “thin liquid layer” method. The results showed that the protoplasts with higher yield and quality were obtained by treating the hypocotyls for 10 h with the combination of enzyme. The hypocotyls were appropriate for protoplasts isolation. When the protoplasts were cultivated in the modified KM8p medium at the density of $7 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, the division frequency was up to 24.8%. The small calli could be obtained in four weeks, and then transferred to the proliferation medium, the plating frequency was about 5.6%. Calli of 3–5 mm in diameter were transferred on differentiation medium, the frequency of shoot regeneration was 33.6%. Plantlets were obtained upon transferring 2–3 cm shoots to 1/2 MS medium with 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L 6-BA.

Key words: *Eruca sativa*; hypocotyls; isolation; protoplast culture; plant regeneration

收稿日期: 2007-05-18

作者简介: 张传利(1981—), 男, 讲师, 硕士, 现在云南热带作物职业学院工作; 通讯作者: 林良斌(1963—), 男, 教授,

E-mail: linliangbin-63@163.com

基金项目: 云南省自然科学基金(2004C0035M)

芝麻菜 *Eruca sativa* Mill 是十字花科 Cruciferae 芝麻菜属 *Eruca* 一年生草本植物,是世界干旱半干旱地区的重要油料作物^[1],也是迄今为止人们发现的最为抗旱耐瘠的十字花科油料作物^[2]. 在我国北方,尤其在西北干旱地区普遍种植. 芝麻菜叶子可做色拉用,种子富含对人体有益的4-甲基硫代葡萄糖苷(4-methylthiobutyl glucosinolates)^[3]和生产工业润滑油原料棕榈油^[4]. 芝麻菜具有抗旱、耐瘠、抗(耐)病、耐盐碱等优点,因此,芝麻菜是芸薹属油料作物乃至整个十字花科植物育种的重要资源. 朱媛等^[5]对芝麻菜与甘蓝型油菜远缘杂交亲和性进行了研究,结果发现二者为高度不亲和. 本研究以芝麻菜的下胚轴为供体材料,对原生质体分离与培养条件进行了研究,并获得了再生植株,为通过原生质体融合利用芝麻菜的有益基因资源改良油菜品种提供了技术支持.

1 材料与方法

1.1 材料

芝麻菜 *Eruca sativa* Mill,由云南农业大学农学与生物技术学院实验室提供.

1.2 方法

1.2.1 无菌苗体系的建立 选取籽粒饱满、大小均一的芝麻菜种子,在水中浸泡1 h后,用 $\varphi = 70\%$ 乙醇表面消毒1 min,再用1 g/L HgCl₂溶液消毒10 min左右,无菌水漂洗4次,接种于不含激素的B₅固体培养基上^[6],在不同温度和光照条件下萌发和生长,光照度为2 000~2 500 lx.

1.2.2 原生质体的游离与纯化 待芝麻菜无菌苗长至3~5 cm时,取其下胚轴约1 g,纵切成约1 mm大小的细条,置于附加130 g/L甘露醇的CPW盐溶液(101 mg/L KNO₃,27 mg/L KH₂PO₄,246 mg/L MgSO₄·7 H₂O,1 480 mg/L CaCl₂·2H₂O)^[7]中质壁分离1 h后,转移到盛有10 mL酶液的直径60 mm培养皿中,在25℃、黑暗、静止条件下酶解,接着在25℃恒温摇床上45 r/min振荡游离1 h,以分离原生质体. 酶液为10 g/L纤维素酶(onozuka R-10)+7 g/L离析酶(onozuka R-10)+3 mmol/L MES+CPW-9M(CPW+90 g/L甘露醇),pH5.6. 将酶解后的混合物用300目的尼龙网过滤,滤液500 r/min离心5 min,收集原生质体并悬浮于洗涤液(附加90 g/L甘露醇的CPW盐溶液)中. 用CPW-18S(含 $w = 18\%$ 蔗糖)悬浮原生质体,以800 r/min离心8

min. 在溶液的界面用Pasteur吸管将原生质体收集于新的玻璃离心管,加入原生质体洗涤液,以500 r/min离心5 min. 倒去上清液,按同样的方法用洗涤液再洗1次,培养液洗1次,获得纯净的原生质体. 原生质体产量用血球计数板记数,原生质体活力测定用1 g/L的伊文斯蓝染色检测,以未染色的原生质体占原生质体观察总数的百分数表示.

1.2.3 原生质体的培养及愈伤组织的形成 以改良KM8p培养基^[8]为原生质体培养基,并附加0.058 mol/L蔗糖、0.055 mol/L葡萄糖、0.32 mol/L甘露醇、3.0 mmol/L MES及不同浓度配比的激素,pH5.8. 采用液体浅层培养法,在直径为60 mm的培养皿中,加入2 mL的培养液,原生质体密度为 $7 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 黑暗培养,每周加0.5 mL新鲜培养液. 培养开始后每天观察原生质体的分裂和生长状况. 相对分裂频率以培养8 d时发生分裂的原生质体数占植板的存活原生质体总数的百分数表示. 培养2周,原生质体分裂形成小细胞团,此时,加入的新鲜培养基的渗透压稳定剂浓度要逐渐降低,以便再生细胞壁的细胞生长. 培养4周左右,产生肉眼可见的愈伤组织. 然后将小愈伤组织转至增殖培养基(B₅:盐+0.087 mmol/L蔗糖+0.2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L 6-BA+5 g/L琼脂,pH5.8),在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、弱光(500 lx)、光照16 h/d增殖培养.

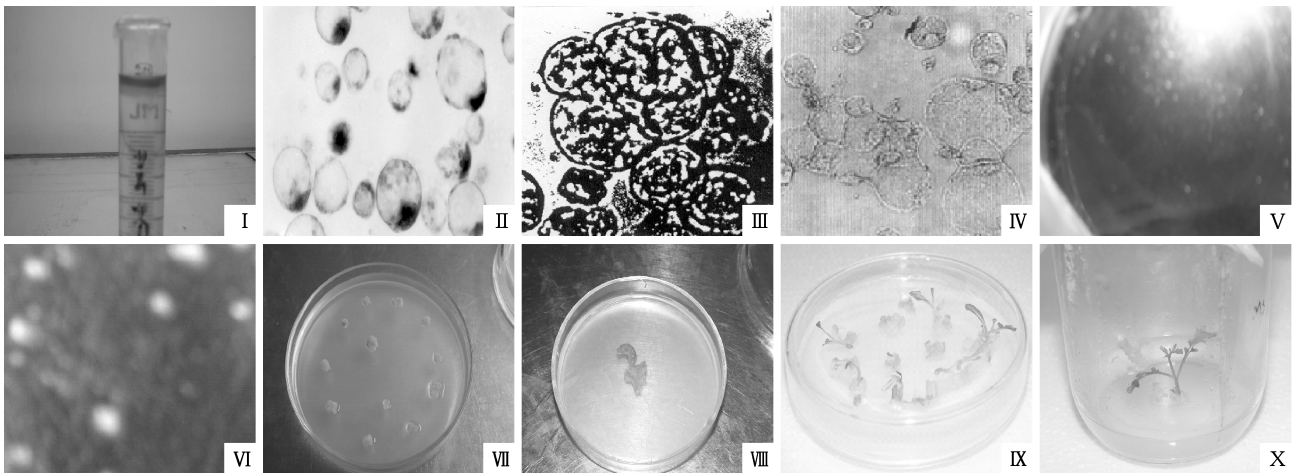
1.2.4 植株再生及生根 待愈伤组织长至3~5 mm时,转移到分化培养基(MS:盐+0.087 mol/L蔗糖+0.1 mg/L IAA+0.8 mg/L 6-BA+7 g/L琼脂,pH5.8)中诱导不定芽分化. 当不定芽长至2~3 cm时将其切下,插入含有0.5 mg/L IBA+0.2 mg/L 6-BA的1/2MS生根培养中诱导生根.

2 结果与分析

2.1 无菌苗的培养条件对原生质体产量和活力的影响

2.1.1 萌发条件对原生质体分离效果的影响 以不同培养条件下获得的芝麻菜无菌苗的下胚轴为材料分离制备原生质体,其原生质体产量、活力均有差异(图1、表1).

表1的结果表明,芝麻菜原生质体产量和活力以无菌苗在15℃、黑暗培养4 d后再转到光照(14 h/d)培养6 d的最高,分别为 $1.78 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ 和87.2%,其培养细胞分裂频率也最高,为24.2%. 与



I:悬浮得到的原生质体;II:刚分离出的原生质体($\times 400$);III:细胞团($\times 400$);IV:细胞粘连($\times 400$);V:小愈伤组织($\times 10$);VI:愈伤组织($\times 10$);VII:愈伤组织增殖;VIII、IX:不定芽;X:再生植株

I: aerosol obtains protoplast; II: protoplasts isolated from hypocotyls of *Eruca sativa* ($\times 400$); III: cell clones ($\times 400$); IV: cell adhesion ($\times 400$); V: callus formation ($\times 10$); VI: callus ($\times 10$); VII: protoplast multiplication; VIII and IX: regenerated plantlet; X: regenerated plants

图1 芝麻菜下胚轴原生质体分离培养及植株再生

Fig. 1 Plant regeneration and hypocotyl protoplasts isolation of *Eruca sativa*

表1 无菌苗萌发条件对原生质体活力和分裂的影响¹⁾

Tab. 1 Effect of culture conditions of protoplast isolation and division of *E. sativa*

培养条件 culture condition	产量 yield/($\times 10^6 \text{ g}^{-1}$)	活力 viability/%	$t_{\text{第1次分裂}}$ $t_{\text{the first division}}/\text{d}$	分裂频率 division frequency/%
25 °C 光照 10 d 25 °C light 10 d	1.62	69.4	4	19.2
15 °C 黑暗 4 d, 然后 25 °C 光照 6 d 15 °C dark 4 d, then 25 °C light 6 d	1.78	87.2	3	24.2
25 °C 黑暗 10 d 25 °C dark 10 d	0.64	53.8	6	11.8

1) 10 g/L 纤维素酶 R-10 + 7 g/L 离析酶 R-10 + CPW-9M 酶组合处理约 10 h

有光照的培养相比,直接在黑暗条件下培养的无菌苗得到的原生质体产量和活力明显较低且在分离过程中细胞很易破碎.这可能是由于不同材料,其种子萌发和生长的条件不同而造成的.此外,在分离原生质体前,无菌苗在 4 °C 下低温预处理 4~6 h,分离出的原生质体尽管产量没有变化,但原生质体活力较高,更易于分离纯化.

2.1.2 苗龄对原生质体分离制备效果的影响 从表2可以看出5 d 无菌苗下胚轴的原生质体产量和活力都很低,且细胞碎片较多,随着无菌苗苗龄的延长,原生质体的产量和活力相应提高,10、11 d 无菌苗下胚轴原生质体活力(87.2%)与产量($1.82 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$)分别达到最高,12 d 的无菌苗下胚轴原生质体产量和活力开始下降.可见,在进行分离芝麻菜下胚轴原生质体培养时,以 10 d 无菌苗的下胚轴做分离材料相对最佳.

表2 苗龄对芝麻菜下胚轴原生质体解离的影响¹⁾

Tab. 2 The effects of hypocotyls age on protoplast isolation of *E. sativa*

苗龄 seedling grown days/d	原生质体产量 protoplast yield/($\times 10^6 \text{ g}^{-1}$)	原生质体活力 protoplast viability/%
5	0.39	52.2
7	0.88	67.3
9	1.65	78.4
10	1.78	87.2
11	1.82	81.6
12	1.72	76.7

1) 10 g/L 纤维素酶 R-10 + 7 g/L 离析酶 R-10 + CPW-9M 酶组合处理约 10 h

2.1.3 酶液中甘露醇质量浓度对原生质体分离效果的影响 由表3可知,随着酶液中甘露醇质量浓度的升高(70~110 g/L),原生质体的产量和活力都有一定的增加.原生质体的产量在甘露醇质量浓度

表3 甘露醇质量浓度对芝麻菜下胚轴原生质体解离的影响¹⁾Tab.3 The effects of mannitol mass concentration on protoplast isolation of *E. sativa*

$\rho_{\text{甘露醇}}$	原生质体产量 protoplast	原生质体活力	原生质体形态
$\rho_{\text{mannitol}}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	yield/ $(\times 10^6 \text{g}^{-1})$	protoplast viability/%	protoplast shape
70	0.84	56.3	胀大或破裂
80	1.67	72.2	稍微膨胀
90	1.76	86.9	正常
100	1.82	83.4	正常
110	1.86	79.5	稍微收缩
120	1.68	68.6	收缩

1) 10 g/L 纤维素酶 R-10 + 7 g/L 离析酶 R-10 酶组合处理约 10 h, 苗龄为 10 d

为 110 g/L 时, 达到 $1.86 \times 10^6 \text{g}^{-1}$, 活力在甘露醇质量浓度为 90 g/L 时达到最高 (86.9%)。而当甘露醇质量浓度到 120 g/L 时, 分离的原生质体活力和分裂频率都降低。表明较高的酶液渗透压可对芝麻菜下胚轴原生质体造成明显伤害。此外, 当甘露醇质量浓度在 70 g/L 以下时, 较多细胞胀大或膨胀破裂, 造成产量和活力较低。综合考虑原生质体产量和活力, 认为甘露醇质量浓度为 90 g/L 时分离制备下胚轴原生质体较适宜。

2.1.4 酶类组合对芝麻菜下胚轴原生质体分离效果的影响 不同酶组合、不同酶解时间, 分离制备原生质体的效果不同 (表 4)。不同酶液配比对原生质体分离有明显影响, 随着纤维素酶和离析酶的浓度升高, 原生质体产量增加, 尤其是增加离析酶的量, 原生质体产量增加明显。工作酶液中纤维素酶质量浓度为 10 g/L、离析酶质量浓度为 7 g/L, 酶解 10 h, 分离制备原生质体的效果较理想, 产量为 $1.78 \times 10^6 \text{g}^{-1}$, 活力为 87.2%。这与范春雨等^[9]在甘蓝型黄籽油菜原生质体的游离中的结果一致。

表4 不同酶组合对芝麻菜下胚轴原生质体分离的影响¹⁾Tab.4 The effects of different enzyme combination on isolation *E. sativa*

$\rho_{\text{纤维素酶}}$	$\rho_{\text{离析酶}}$	$t_{\text{酶解}}$	产量	活力
$\rho_{\text{cellulase}}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{macerozyme}}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$t_{\text{enzymolysis}}/\text{h}$	yield/ $(\times 10^6 \text{g}^{-1})$	viability/%
6	3	15	0.98	73.8
8	5	13	1.49	80.3
10	5	11	1.51	85.9
10	7	10	1.78	87.2
12	7	9	1.82	83.5
14	7	8	1.63	72.6

1) 苗龄 10 d, 甘露醇质量浓度为 90 g/L 渗透压时处理 10 h 的结果

2.1.5 纯化条件对原生质体活力的影响 对芝麻菜下胚轴游离出的原生质体采用过滤 - 离心 - 漂浮

法进行纯化, 采用不同质量浓度的蔗糖溶液对原生质体进行漂浮, 并采用不同的离心速度离心来纯化。用 180 g/L 的蔗糖漂浮效果相对较好, 离心速度为 1 000 r/min 时, 原生质体破裂得较多, 有活力的原生质体少, 500 r/min 离心时, 形成的界面不明显, 漂浮的原生质体少, 800 r/min 离心较好。可见, 180 g/L 的蔗糖溶液、800 r/min 的离心速度对原生质体进行纯化, 杂质较少, 原生质体破裂得少, 得到较好的纯化效果 (表 5)。

表5 纯化条件对原生质体活力的影响¹⁾

Tab.5 The effects of purify condition on protoplast viability

$\rho_{\text{蔗糖}}$	离心速度	活力
$\rho_{\text{sucrose}}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	centrifugalization/ $(\text{r} \cdot \text{min}^{-1})$	viability/%
180	1000	59.5
180	800	87.4
180	500	56.7
210	1000	58.2
210	800	87.2
210	500	54.6

1) 10 g/L 纤维素酶 R-10 + 7 g/L 离析酶 R-10 + CPW-9M 酶组合处理约 10 h, 苗龄为 10 d

2.1.6 酶解时间对原生质体分离制备的影响 比较了酶解 8~12 h 对于芝麻菜下胚轴原生质体的解离效果 (表 6), 酶解时间在 8~11 h 范围内, 随酶解时间的增加, 原生质体产量提高, 酶解 11 h 原生质体产量可达 $1.81 \times 10^6 \text{g}^{-1}$, 继续增加酶解时间原生质体产量下降, 同时可以观察到酶液中原生质体碎片增多。可见长时间酶解可以导致原生质体解体。长时间的酶解对原生质体活力也会造成不利影响, 酶解时间为 9~11 h 所得到原生质体的活力相近, 再继续增加酶解时间原生质体活力则下降。综合考虑原生质体产量和活力 2 个因素, 酶解 10 h 分离芝麻菜下胚轴原生质体效果较好。

表6 酶解时间对芝麻菜下胚轴原生质体游离的影响¹⁾

Tab.6 The effects of enzymolysis time on protoplast isolation

$t_{\text{酶解}}$	产量	活力
$t_{\text{digestion with enzyme}}/\text{h}$	yield/ $(\times 10^6 \text{g}^{-1})$	viability/%
8	1.38	78.6
9	1.72	86.4
10	1.78	87.2
11	1.81	85.8
12	1.68	76.9

1) 10 g/L 纤维素酶 R-10 + 7 g/L 离析酶 R-10 + CPW-9M 酶组合处理约 10 h, 苗龄为 10 d

2.2 芝麻菜原生质体培养

2.2.1 培养密度对芝麻菜下胚轴原生质体培养的影响 在芝麻菜下胚轴原生质体培养中,培养密度对原生质体的分裂频率影响很大(表7)。培养密度为 $7 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 效果较好,分裂频率达 23.2%,植板率达 5.1%。当培养密度为 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,原生质体开始分裂的时间较长且分裂频率较低。当培养密度低至 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,不能形成愈伤组织。当细胞培养密度过大时,尽管细胞开始分裂较早、频率较高,却易导致细胞聚集、粘连,影响细胞进一步分裂,最后导致褐化死亡。

表7 培养密度对芝麻菜下胚轴原生质体分裂的影响¹⁾

Tab. 7 Effects of different culture density on the cell division and colony formation of *E. sativa*

培养密度 density of culture /($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)	$t_{\text{第1次分裂}}$ $t_{\text{the first division/d}}$	分裂频率 division frequency/%	植板率 plating efficiency/%	褐化 browning
1	6	3.2	0.0	无
3	4	15.6	2.6	无
5	3	22.4	4.7	较少
7	3	23.2	5.1	较少
10	3	26.5	3.8	较明显
20	3	21.9	0.0	明显

1) 10 g/L 纤维素酶 R-10 + 7 g/L 离析酶 R-10 + CPW-9M 酶组合处理约 10 h, 苗龄为 10 d

2.2.2 植物激素对原生质体分裂的影响 在芝麻菜下胚轴原生质体培养中,培养基中不同的激素组合和浓度对细胞分裂有很大的影响(表8)。从表8可知,1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA 效果最好,分裂频率高达 24.8%。培养基中不含 NAA 对细胞分裂的频率影响不大,但在不含 2,4-D 的培养基中,细胞分裂的频率较低(4.9%),且持续分裂形成小细胞团的能力也较差。单独使用 2,4-D 时分裂频率较好,且随着 2,4-D 质量浓度(0.5 ~ 1.5 mg/L)升高,细胞分裂频率也相应增高(18.8% ~ 22.8%),但植板率下降(4.8% ~ 2.3%),这就要求在形成细胞团或小愈伤组织时要降低 2,4-D 的浓度。而在不含 6-BA 的培养基中分裂频率都较低,因此,在芝麻菜下胚轴原生质体培养中所用激素必须是生长素(含 2,4-D)和细胞分裂素按一定比例的组合。

2.3 原生质体的早期分裂

用改良的 KM8p 培养基进行液体浅层培养,原生质体在培养1d后,体积明显增大,有的呈椭圆形,

表8 激素对芝麻菜下胚轴原生质体分裂的影响¹⁾

Tab. 8 Effect of plant hormone on the cell division of hypocotyl protoplasts from *E. sativa*

$\rho_{\text{激素}}$ $\rho_{\text{hormones}}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$			$t_{\text{第1次分裂}}$ $t_{\text{the first division/d}}$	分裂频率 division frequency/%	植板率 plating efficiency/%
2,4-D	NAA	6-BA			
0.5	0	0	5	18.8	4.8
0.5	0.5	0.5	4	16.4	2.3
0.5	1.0	0.5	3	17.5	3.1
0	1.0	0.5	6	4.9	1.2
1.0	0	0	4	19.6	3.9
1.0	0.5	0.5	4	21.2	4.7
1.0	1.0	0.5	3	24.8	5.6
1.0	1.0	0	4	8.5	0.8
1.0	0	0.5	4	20.6	4.2
1.5	0	0	4	22.8	2.3
1.5	0.5	0.5	3	20.7	3.8
1.5	1.0	0.5	3	17.3	3.3

1) 培养以改良的 KM8p 为培养基,培养密度为 $7 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$

2 d 后大多数原生质体变成椭圆形。在培养 3 d 后发生第 1 次细胞分裂,6 ~ 7 d 后,群体的第 1 次细胞分裂达到高峰。4 d 后出现第 2 次分裂,2 周后形成小细胞团(图 1 III)。试验中观察到,胞质较浓的细胞比胞质稀少的细胞容易发生分裂和形成愈伤组织,且在培养过程中发现经常发生集聚、粘连(图 1 IV)而沉降于培养皿底部,因此,在培养过程中要每天定时缓慢摇动 2 ~ 3 次。

2.4 愈伤组织的形成及植株再生

培养 2 周,原生质体分裂形成小细胞团后,继续培养至 4 周左右,原生质体可增殖形成肉眼可见的小愈伤组织(图 1 V、VI)。然后将 1 ~ 2 mm 愈伤组织转至增殖培养基上增殖培养,待愈伤组织长至 3 ~ 5 mm 时(图 1 VII),将其转移到分化培养基中诱导不定芽分化,1 周后出现绿点,2 周左右分化出不定芽(图 1 VIII),分化频率为 32.8%。当不定芽长至 2 ~ 3 cm(图 1 IX)时将其切下,插入含有 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L 6-BA 的 1/2 MS 生根培养基上,12 d 后即可形成再生植株(图 1 X),生根率达 81%。

3 讨论与结论

3.1 起始材料的生理状态对芝麻菜下胚轴原生质体分离的影响

起始材料的生理状态对分离的芝麻菜下胚轴原生质体活力及培养的分裂频率有很大的影响:黑暗

条件下培养的黄化苗分离制备的原生质体的分裂频率(11.8%)不到光照条件下无菌苗的1/2(24.2%),可见光照可使原生质体的分裂频率有很大的提高,程振东等^[10]以甘蓝型油菜下胚轴作材料进行培养也观察到类似的现象.制备原生质体前对材料进行低温处理也有利于获得高活力和高分裂频率的原生质体,本试验结果与他在其他植物原生质体培养中的结果相一致^[11-12].

3.2 芝麻菜下胚轴原生质体分离过程中的影响因素

在工作酶液中,增加离析酶的浓度可提高原生质体的产量且高于增加纤维素酶浓度的效果,但对原生质体的活力影响不大.这与刘选明等^[13]在油菜中的研究结果有差异.用蔗糖漂浮法纯化原生质体时,蔗糖浓度、离心速度和时间是影响纯化的关键因素,直接影响原生质体的稳定性,试验表明,用CPW-18S(含180 g/L蔗糖)、pH5.8、800 r/min离心8 min,可以有效地使原生质体集中在离心管的最上部,获得纯净的原生质体并便于收集.

3.3 激素对芝麻菜下胚轴原生质体培养的影响

原生质体培养基中,不同的激素组合和配比影响着原生质体的持续分裂和愈伤组织的形成.本试验表明,在无2,4-D或6-BA的培养基上,细胞分裂的频率都较低,且持续分裂的能力差.虽然单独的2,4-D就可以诱导细胞的分裂,并且随着浓度升高,细胞分裂频率增高.但2,4-D浓度过高又会抑制细胞的分裂和植板率.因此,在芝麻菜下胚轴原生质体培养中生长素和细胞分裂素配合使用才对细胞分裂起最佳的效果.

3.4 继代培养是芝麻菜下胚轴原生质体培养所必需的

原生质体培养得到的小愈伤组织如不经增殖而直接转移到固体分化培养基上培养,会造成愈伤组织褐化死亡.说明愈伤组织的早期继代培养是必需的.这与其他报道一致^[14-15].经几次继代,要及时将大小适中(3~5 mm)的愈伤组织转移到分化培养基中,转移太晚,愈伤组织会失去分化能力而褐化死亡.当愈伤组织转移到分化培养基后,一部分愈伤组织转变为致密的绿色组织,也能产生绿色芽点,但很难分化出不定芽.只有颜色淡黄绿色、表面呈颗粒状的愈伤组织长出绿色芽点后才进一步分化出芽.

参考文献:

- [1] 孙万仓,官春云,李恂,等.芸芥(*Eruca sativa* Mill.)与芸薹属(*Brassica* L.)3个油用种的远缘杂交[J].作物学报,2005,31(1):36-42.
- [2] 杨玉萍.我国芸芥的分布区域和品质特性及研究价值[J].甘肃农业科技,2001,21(7):354-358.
- [3] ION R, BEMADI R, GUEYRARD D, et al. Formation of glucoraphanin by chemoselective oxidation of natural glucosinolate: A chemoenzymatic route to sulforaphane[J]. Bio-Chemical Letter,1999,9:1047-1048.
- [4] KUMAR P R, TSUNODA S. Variation in oil content and fatty acid composition among seeds from Cruciferae[M]// Anon. *Brassica* crops and wild allies. Tokyo: Japan Scientific Societies Press,1980:235-252.
- [5] 朱媛,林良斌,张传利.甘蓝型油菜与芝麻菜远缘杂交研究[J].云南农业大学学报,2007,22(1):26-29.
- [6] 张传利,林良斌.芝麻菜愈伤组织的诱导及植株再生[J].云南农业大学学报,2006,21(5):560-564.
- [7] FREARSON E M, POUER J B, COCKING E C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplast[J]. Dev Biol,1973,33:130-137.
- [8] KAO K N, MICKAYLUK M R. Nutritional requirements for growth *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media[J]. Planta,1975,126:105-110.
- [9] 范春丽,陶澜,林呐,等.甘蓝型黄籽油菜原生质体的游离和纯化[J].中国农学通报,2005,21(2):43-45.
- [10] 程振东,卫志明,许智宏.甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究生物工科学报[J].1994,10(1):30-33.
- [11] 周云罗,钱迎倩,蔡起贵.龙胆叶原生质体再生愈伤组织的研究[J].植物学报,1985,27(2):149-150.
- [12] 周音,钟维瑾,张智奇.单双低油菜原生质体培养高效成株体系的研究[J].吉林农业大学学报,1994,16(4):77-81.
- [13] 刘选明,官春云.油菜原生质体培养与融合技术的研究进展[J].湖南农业大学学报,1997,23(5):483-491.
- [14] 周邗扬,余建明,陆维忠.甘蓝型油菜原生质体培养获得再生植株的研究[J].作物学报,1991,17(5):340-344.
- [15] 孟征,李世君,李德葆.甘蓝型油菜子叶原生质体培养再生植株[J].浙江农业大学学报,1993,19(4):395-398.

【责任编辑 周志红】