豆科牧草百脉根原生质体和外植体植株的再生

吕德扬　马秀叶*　王　超　陈　英

（中国科学院遗传研究所，北京）

百脉根是温带地区的重要牧草之一，具有营养丰富、耐寒冷、耐瘠薄及牲口食用安全等优良性状．百脉根外植体的培养从花药和分生组织诱导植株的再生已成功[1-4]．而百脉根原生质体的培养仅有一篇成功的报道[5]．本文叙述百脉根无菌实生苗原生质体和外植体培养体系建立的初步结果．

材料和方法

1. 无菌实生苗的产生　试验所用的百脉根（*Lotus corniculatus* L.）品种为里澳，种子由中国农业科学院畜牧研究所饲料研究室提供．将种子用75%酒精浸泡2—3分钟，后用0.2%昇汞溶液消毒15分钟然后再用无菌水洗3次，最后接种到洋菜(0.65%)和蔗糖(0.3%)培养基上，置于23±1℃的黑暗或光照培养箱中．

2. 原生质体的游离　把5—7天苗龄的实生苗的黄色和绿色的子叶及胚轴分别切成0.1—0.2cm宽度的片段，放在CPW 13*M*[6]中质壁分离1小时左右，然后在酶液EM-5[7]或EM-7（1.0%半纤维素酶，Rhozyme + 0.4%纤维素酶 Cellulase Onozuka R-10 + 0.1%果胶离析酶，Peetolyase Y23 + CPW9M[6]）中酶解14—16小时（25±1℃）．将原生质体用64μ孔径的尼隆滤网过滤，再用CPW 9M离心漂洗3次，悬浮在原生质体培养基中和用血球计数板计算原生质体的数量和产量．

3. 原生质体的培养　把原生质体以 5×10^4/ml 的密度接种到 1.0 × 5.5cm 的玻璃培养皿内，每个培养皿为2ml．所用的原生质体培养基为 KP_8[8]把培养物置于25±1℃条件下进行暗培养．7天后统计原生质体的分裂频率和用 K_8[8]培养基逐步稀释培养物，并把培养物移至光照培养箱（25±1℃，1000lux，16小时）．

4. 植株的再生　把直径1mm左右的原生质体愈伤组织（培养35—45天）转到含有不同浓度BAP的MS[9]洋菜(0.7%)培养基上，即 MS + 0.2mg/l BAP(MS_{I-1})；MS + 0.1mg/l BAP(MS_{I-2})；MS + 0.05mg/l BAP(MS_{I-3})和MS + 0mg/l BAP（MSO），置于光照培养箱(25±1℃，2000lux，16小时)中．

5. 外植体的培养　把5—10天苗龄的实生苗的子叶切成两半，下胚轴和根切成0.5cm左右长度的小段，分别接种到 MS_{I-1}，MS_{I-2}，MS_{I-3} 和MSO上，置于光照培养室(25±3℃，2000lux，16小时)中．

原生质体培养的试验重复3次．子叶、下胚轴和根的片段的接种数均不少于100个．

本文1985年10月11日收到．

* 中国农科院原子能利用研究所．

6. 原生质体和外植体植株的移栽　将百脉根再生植株移到土钵中，盖上透光好的塑料布，放在低于 28℃、有光的地方，半个月后揭去覆盖物，再过半个月将植株移到田间.

结果和讨论

表 1 显示 EM-5 能游离黄色子叶和胚轴的原生质体，子叶原生质体的产量为 3×10^5/对子叶，但 EM-5 不能释放绿色子叶的原生质体. EM-7 不仅游离出绿色子叶的原生质体，而且产量较高. 由纤维素酶、半纤维素酶 (Rhozyme) 和离析酶组成的混合酶液 (EM-5) 游离多种植物实生苗根[10-12]、子叶[7,13]和叶片[14]的原生质体，但不能释放大豆实生苗子叶的原生质体[15]. Johnson 等[16]用类似的酶液游离天兰苜蓿和 *Medicago disciformis* 的叶片原生质体也未获得成功. 只有在果胶离析酶 (Pectolyase Y-23) 代替其中的离析酶 (Macerozyme) 时，混合酶液才有效地游离出这些植物器官的原生质体[15,16]. 本试验的结果与以前的报道[15,16]一致. 果胶离析酶的作用目前还不完全清楚.

表 1　百脉根原生质体的产量和分裂频率

原生质体的来源		酶　液	原生质体的产量 (每对子叶)	原生质体的分裂频率 % (平均数±标准差)
子　叶	黄　色	EM-5	$3\pm0.2 \times 10^5$	30±5.0
	绿　色	EM-5	0	—
		EM-7	$4\pm0.8 \times 10^4$	17±4.4
胚　轴		EM-5	—	25±7.0

培养基：KP_8.

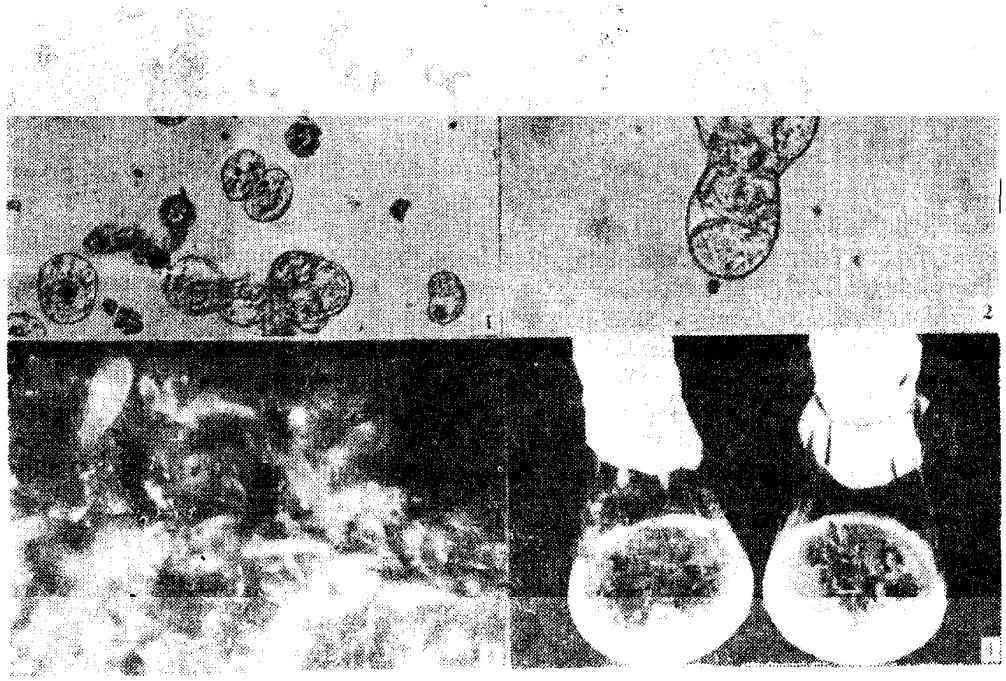

图 1　分裂的子叶原生质体. ×67;
图 2　子叶原生质体细胞团. ×268;
图 3　许多百脉根实生苗子叶原生质体的芽和苗;
图 4　许多子叶原生质体苗和植株

子叶和胚轴的原生质体在 KP_8 中分裂发育成细胞团（图 1、2）。黄色子叶原生质体的分裂频率为 30±5.0%（表 1），绿色子叶原生质体的分裂频率较低（表 1），其原因可能与子叶原生质体在含有活性高的果胶离析酶 EM-7 中的时间较长有关。

原生质体愈伤组织在 MS_{I-1}，MS_{I-2} 和 MS_{I-3} 的三种分化培养基上迅速长大，10—20 天内分化芽。如果及时地转移愈伤组织到分化培养基上，大多数愈伤组织都能分化芽。这些芽进一步发育成苗或植株（图 3、4）。愈伤组织在 MS_{I-2} 上分化芽最多，这些芽发育成苗和植株，一块愈伤组织分化苗数最多的达 41 个。更有意思的是不少苗直接在原来的培养基上发育成植株，并且根系发育良好。部分在 MSO 上的愈伤组织仅分化根。大多数苗在移到 MSO 上后长出了良好的根系。

实生苗的子叶、下胚轴和根三种外植体的片段在 MS_{I-1}，MS_{I-2}，MS_{I-3} 和 MSO 上生长，和 20—25 天内分化出苗和植株。除 MSO 上的外，分化频率几乎为 100%。子叶和下胚轴的片段先从切口处分化芽，而根的切段有时先从中间开始分化芽。苗分化的培养基以 MS_{I-2} 为最好。一个子叶片段在 MS_{I-2} 上可分化 64 个苗和植株。

原生质体和外植体再生植株的移栽成活率高。目前，它们在田间生长良好。

本试验的结果表明百脉根的子叶原生质体容易游离，分裂频率高，植株再生能力很强。百脉根体细胞的全能性是目前豆科植物中最好的。因此百脉根实生苗子叶原生质体和外植体培养体系的建立将促进原生质体的融合[17]、细胞转化[17]、体细胞无性系变异[18]和细胞突变体的筛选[19]等研究。

致谢：作者感谢中国科学院科技合同局对本工作经费的支持。

参 考 文 献

[1] Niizeki, H. and Grant, W. F., *Can. J. Bot.*, **49**(1971), 2041—2051.
[2] Tomes, D. T., *Can. J. Bot.*, **57**(1979), 137—140.
[3] Tomes, D. T. and Peterson, R. L., *Can. J. Bot.*, **59**(1981), 1338—1341.
[4] Orshinsky, B. R., Swanson, E. B. and Tomes, D. T.,*Plant Cell Tissue Organ Culture*, **2**(1983), 341—347.
[5] Ahuja, P. S., Hadiuzzaman, S., Davey, M. R. and Cocking, E. C., *Plant Cell Rep.*, **2**(1983), 101—104.
[6] Frearson, E. M., Power, J. B. and Cocking, E. C., *Dev. Biol.*, **33**(1973), 130—137.
[7] 吕德扬，Cocking, E. C.，科学通报，**29**(1984)，434—436.
[8] Kao, K. N., *Mole. Gen. Genet.*, **150**(1977), 225—230.
[9] Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant.*, **15** (1962), 473—479.
[10] 许智宏，Davey, M. R. and Cocking, E. C.，中国科学，B 辑，**29**(1984), 1012—1018.
[11] Xu, Z. H., Davey, M. R. and Cocking, E. C., *Z. Pflanzenphysiol.*, **104**(1981), 289—298.
[12] ————, *Plant Sci. Lett.*, **24**(1982), 111—115.
[13] Lu, D. Y., Pental, D. and Cocking, E. C., *Z. Pflanzenphysiol.*, **107**(1982), 59—63.
[14] Lu, D. Y., Davey, M. R. and Cocking, E. C., *Plant Cell Rep.*, **1**(1982), 289—292.
[15] Lu, D. Y. et al., *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**(1983), 289—394.
[16] Johnson, L. B. et al., *Plant Sci. Lett.*, **26**(1982), 133—137.
[17] Cocking, E. C., *Lecture Proceedings 6th Intl. Protoplast Sympos.*, 1983, 123—126.
[18] Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R., *Theor. Appl. Genet.*, **60**(1981), 197—214.
[19] Bougins, J. P., *Lecture Proceedings 6th Intl. Protoplast Sympos.*, 1983, 43—50.