

从三叶半夏(*Pinellia ternata* Breit)叶肉原生质体再生植株^{*}

吴伯骥 肖 亮 覃章铮

(中国科学院成都生物研究所)

摘 要

从三叶半夏叶片分离到大量、具活力的叶肉原生质体,采用无机盐、激素、蔗糖浓度不同的液体和固体双层培养基培养。4—7 天内原生质体出现第一次分裂,分裂频率为 3—8%,3 周后形成 80—100 个细胞的细胞团,转入液体培养基中振荡培养,1 月后将形成 1—2mm 直径的愈伤组织再转入固体分化培养基中,愈伤组织先增殖、生长,3—4 周后分化出绿芽和小苗,再 1 月后,由原生质体再生的半夏小植株已长至 6—10cm 高。半夏原生质体再生植株的发生途径有器官型和胚状体型两种方式。比较和讨论了悬浮培养、双层培养和组份浓度差液-固体双层培养对原生质体培养的效果。

植物原生质体的研究是近代实验生物学获重大进展的一个分支,作为植物遗传工程的基础,由于在应用研究和基础研究中的意义,已经引起国内外广泛的重视。自 Takebe 等^[1]首次从烟草原生质体获得再生植株以来,迄今已有数十例成功的报道^[2-4]。到目前为止,普遍适用的规律性条件还不是很多^[5],事实上,每一个新的植物种从原生质体获得再生植株都是一个新的尝试^[6]。继续探讨从多种植物原生质再生植株的原因和意义已经讨论得很多了,这里不再重述。

三叶半夏是我国传统的中药材。我们采用了无机盐、激素、蔗糖浓度不同的液体和固体双层培养基进行培养,从天南星科的三叶半夏叶肉原生质体获得再生植株。现在将主要结果报道如下。

一、材料和方法

1. 材料

三叶半夏(*Pinellia ternata* Breit)的新鲜块茎由四川省外贸公司提供。将新鲜块茎种植在温室中,温度 24—28℃,每天 12h 3000—4000lux 光照,湿度 70—80%。取用出芽后 30—50 天

本文 1985 年 1 月 4 日收到,1985 年 8 月 30 日收到修改稿。

* 四川省农业科学院原子能研究所宋艳同志在我所学习期间参加了部分工作。

本文缩写: VB₁ 为盐酸硫胺素, VB₆ 为盐酸吡哆醇, LH 为水解乳蛋白, 2, 4-D 为 2, 4-二氯苯氧乙酸, KT 为激动素, IBA 为吲哚丁酸。

龄的未开花植株的展开叶片。

2. 叶肉原生质体的制备

(1) 叶片表面消毒 用自来水将叶片冲洗净后,在 5000lux 光下照射 10min。叶片顺序经 75% 的酒精 5s,4% 的安替福民 8 min,0.2% 的升汞 10min,然后用无菌水冲洗 5 次,进行表面消毒。

(2) 酶溶液制备 酶溶液组成如下: 2% 纤维素酶(Onozuka R-10, Kinki Yakult Mfg. Co., LTD., Nishinomiya, Japan), 2.5% 离析酶(Macerozyme R-10, Kinki Yakult Mfg. Co., LTD., Nishinomiya Japan), 0.4% 葡聚糖硫酸钾(含硫 18%, Calbiochem-Behring Corp., La. Jolla, USA)和 5mM 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 0.65M 的甘露醇溶液中, pH5.4。酶液经 6000rpm/min 离心 30min,弃沉淀,上清液经 0.45 μ 微孔滤膜灭菌。

(3) 原生质体分离 去除灭菌后叶片的下表皮和中脉,小心切成 5—8mm 宽的小条,放入盛有酶液的三角瓶中,于 30—32℃ 恒温箱中黑暗保温 5—6h。保温后,轻轻摇动三角瓶,将悬浮液通过 200 目的镍丝网,滤去残渣,低速(100g)离心收集管底原生质体,用 0.65M 甘露醇溶液(内含 0.4% 葡聚糖硫酸钾,5mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH5.4)洗涤离心 4 次,再用原生质体培养液 M_1 洗一次,最后悬浮在一定量的 M_1 培养基中,制成 5×10^3 — 10^4 个/mm 原生质体悬浮液(图版 I, 1)备用。

3. 原生质体的培养和愈伤组织分化

(1) 培养基 原生质体培养基 M_1 : 1/4 MS 培养基^[7]的无机盐,去除 NH_4NO_3 ,另加 VB_1 10mg/l, VB_6 1mg/l,烟酸 1mg/l,甘氨酸 2mg/l,肌醇 500mg/l, LH 200mg/l,生物素 0.01mg/l, 2,4-D 1mg/l,KT 0.5mg/l,蔗糖 10000mg/l, D-葡萄糖 1000mg/l,甘露醇 0.4M, pH5.6。原生质体固体培养基 M_2 : 1/2MS 培养基的无机盐,去除 NH_4NO_3 ,另加 VB_1 , VB_6 , 烟酸、甘氨酸、肌醇、LH,生长素的量与 M_1 培养基相同,2,4-D 0.1mg/l,KT 0.1mg/l,蔗糖 30000mg/l,琼脂粉 7000mg/l, pH5.6。细胞团增殖液体培养基 M_3 : 1/2 MS 培养基的无机盐,去除 NH_4NO_3 ,另加的 VB_1 , VB_6 , 烟酸、甘氨酸、肌醇的量与 M_1 培养基相同, LH 1000mg/l,生物素 0.05mg/l, 2,4-D 0.5mg/l,蔗糖 25000 mg/l, pH5.6。愈伤组织分化固体培养基 M_4 : M_2 培养基^[8]的无机盐和除激素的有机成分,另加 KT 1mg/l, IBA 0.5mg/l,琼脂粉 6000 mg/l, pH5.6。

(2) 原生质体的培养 采用三种方法对半夏原生质体进行培养: 1) 液体悬浮培养法^[9, 10],培养基使用 M_1 液体培养基。2) 液体-固体双层培养法^[11],液体和固体培养基均用 M_1 培养基。3) 组份浓度差液体-固体双层培养法,采用无机盐、激素、蔗糖浓度不同的液体培养基 M_1 和固体培养基 M_2 进行双层培养,先将 M_2 10ml 铺在三角瓶(50mm 装)底,待凝固后,将上述已制备好的原生质体悬浮液取出 3ml 倒入三角瓶中固体培养基平板上,然后加盖封口,置于 26—28℃ 培养室中,每天 12h 漫射光下培养,湿度 70—80%。培养期间,每天早、晚轻摇三角瓶一次,每经过 2 周,向三角瓶中注入新鲜的 M_1 培养液 1ml。待形成几十个细胞的细胞团后,转入 M_3 培养基中进行振荡培养(20 次/min)。

(3) 愈伤组织的分化 将长到 1—2mm 直径的愈伤组织移入 M_4 培养基上诱导分化。培养期间,培养温度、湿度与上述相同,每天 2000lux 光下培养 12h。试验结果重复 5 次。

4. 制片和染色

用作胚胎学观察的材料经卡诺液(3:1)固定,石蜡包埋,铁苏木精染色。

二、结 果

1. 原生质体培养

我们对组份浓度差液体-固体双层培养法, 液体-固体双层培养法和液体悬浮培养法培养原生质体的效果进行了比较观察。结果表明, 用不同方法进行培养, 经过1—2天, 大多数原生质体已再生细胞壁, 叶绿体清晰可见(图版I, 2), 经过4—7天, 一部分原生质体出现第一次分裂(图版I, 3, 4), 分裂频率无明显差异, 大约在3—8%之间。此后三种培养方法培养的原生质体生长和增殖速度逐渐不同。用组份浓度差液体-固体双层培养法所培养的原生质体在第一次分裂完成后较快地进入第二次和第三次分裂(图版I, 5, 6), 统计了完成第一次分裂的64个原生质体, 10天后有42个原生质体相继发生第二次和第三次分裂。2周后可形成30—50个细胞的细胞团(图版I, 7), 增殖到80—100个细胞的细胞团(图版I, 8)大约需3周多时间。用这一方法进行的培养, 产生的细胞团数量多, 同步性好, 实验的重复性强, 在18次试验中全部获得成功。用液体-固体双层法培养的原生质体也能较快地进入第二次分裂, 但频率仅为上法的一半, 继续的分裂前后很不一致, 3周后小的细胞团仅4—8个细胞, 大的细胞团可达80个左右的细胞, 同步性较差。此法也有较好的重复性。用液体悬浮培养的原生质体, 在完成2—3次分裂后就基本停止分裂了, 仅极少数细胞团可发育到80余个细胞, 重复性较差, 18次试验中, 仅3次获得部分结果。最后把已形成80—100个细胞的细胞团转移到液体培养基M₃中, 再经1个月的液体旋转振荡培养可形成1—2mm直径的白色愈伤组织。

试验中我们把经过液体悬浮培养一个月的原生质体培养物倒入组份浓度不同的固体培养基M₂平板上, 再经半个月培养后, 形成了大量30—50个细胞的小细胞团。以上结果表明, 原生质体从分裂到细胞团增殖的不同时期, 它们可能对营养条件的需求是不同的。

2. 愈伤组织的分化

把2 mm直径大的愈伤组织块转移到分化培养基M₄上诱导分化。开始2—3周内愈伤组织较快地增殖、生长, 愈伤组织直径增殖长大到6—10mm后, 表面形成绿色的瘤状突起, 然后进一步分化出很多绿芽和小苗(图版I, 9), 转移或不转移, 再经1月后再生的具根的植株长到6—10cm高(图版I, 10), 完成从原生质体再生植株的全过程。整个过程大约需要5个月左右。

3. 再生植株的分化途径

胚胎学观察表明, 从半夏原生质体再生植株的分化途径有两条。(1)器官发生途径: 在分化培养过程中, 随着愈伤组织的增殖, 组织块内部发生组织分化, 形成芽原基(图版I, 11), 然后从愈伤组织表面分化出芽, 同时产生大量不定根。(2)胚状体发生途径: 随着愈伤组织的增殖, 表面出现很多绿色的结节状小颗粒, 继续发育, 经球形胚状体、心形胚状体、鱼雷形胚状体直至子叶形胚状体(图版I, 12—15), 进一步在上端出芽下端生根, 从愈伤组织块上脱落下来, 长成一棵小植株。通常一整块愈伤组织在分化培养中, 一方面增殖, 另一方面各个时期的胚状体也不断发育, 形成颗粒大小不等(1—5mm)的“葡萄串”样的结构, 其间的愈伤组织逐渐被吸收消失了(图版I, 16), 这个“葡萄串”继续发育成数十棵小植株。这些颗粒结构外面包裹着绿色的外层, 类似半夏的珠芽。

三、讨 论

用原生质体培养已在数十种植物中获得再生植株。从天南星科的植物中用原生质体培养出再生植株目前还是第一次。继续扩大原生质体再生植株的植物科、属、种的范围,特别是一些重要的经济作物,熟练地掌握多种植物原生质体培养的技术和方法,对于植物遗传工程的研究是具有重要意义的。

多年来,国内外许多工作者致力于从多方面改进培养方法和技术,从固体平板培养^[12],液体悬浮培养^[9,10],液体-固体双层培养^[11]等培养方法的建立,到看护培养^[13,14],条件培养^[15],饲喂层培养^[16,17],加强培养基^[18]的使用等方法技术上的改进,都取得一定成效,其机理尚待进一步阐明。我们采用“组份浓度差液体-固体双层培养法”也得到好的结果。这可能是由于液体和固体培养基间不同浓度组份不断地互相渗透,造成了一种动态的培养系统,从而有利于原生质体在培养期间,在不同发育、增殖时期对各个组份的需求。因此,在原生质体培养的研究中,进一步开展对原生质体的动态生理特性的研究,适时地满足它们不同发育时期的生理需要是十分必要的。

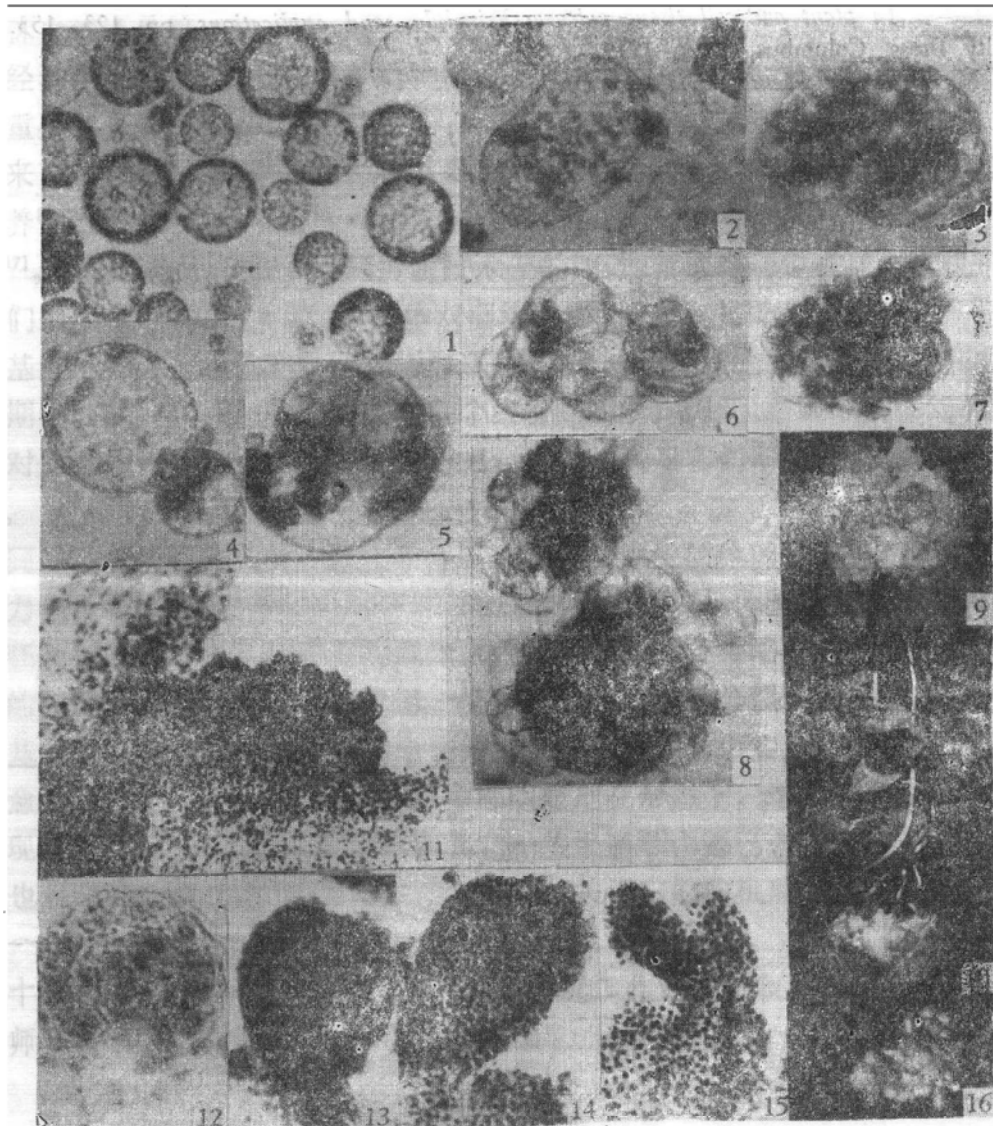
在相同的培养条件和相同的分化条件下,从半夏原生质体诱导的愈伤组织及其分化途径和分化能力也是有差异的。Halperin^[19]和 Street^[20]根据胡萝卜体细胞胚发生的研究认为,胚性细胞和非胚性细胞是不能互相转化的群体。这些作者认为,各种培养条件和培养基有利于促进一种类型的细胞生长和分裂而不利于另一类型细胞的生长和分裂。如果是这样,同一培养条件和培养基就可能培养出一种类型的愈伤组织或细胞群体。事实上,结果并不完全如此。从所诱导的愈伤组织及其在增殖、分化过程中都明显地在形态上,增殖能力上,分化能力和分化途径上表现出差异,这在我们的试验中和其它一些报道^[21]中都已表明,我们在液体分化培养基中的试验也表明这一点,这将在另文中详细报道。关于它们的机理还有待于进一步阐明。

作者十分感谢兰州大学郑国锷教授对此项研究工作的关怀和指导,并感谢郑国锷教授和贾敬芬老师审阅、修改了此文。

参 考 文 献

- [1] Takebe, I., Labib, G., Melchers, G., *Naturwiss.*, 58(1971), 318—320.
- [2] Vasil, I. K., Vasil, V., *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 11B (1980), 1—19.
- [3] Binding, H., Nehls, R., Finger, J., Mordhorst, G., *Z. Pflanzenphysiol.*, 101 (1981), 119—131.
- [4] Gleba, Y. Y., Sytnik, K. M., in *Protoplast Fusion: Culture of Isolated Plant Protoplasts* (Ed. Shoeman, R.), Fed. Rep. of Germany, 5—17.
- [5] 中国科学院植物研究所细胞杂交组, *植物学报*, 19(1977), 297—305.
- [6] Jing-fen Jia, Ingo Potrykus, *Plant Cell Reports*, 1(1981), 71—72.
- [7] Murashige, I., F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 15(1963), 473—497.
- [8] Gamborg, O. L. et al., *Exp. Cell Res.*, 50(1968), 148—151.
- [9] Durand, J. et al., *Z. Pflanzenphysiol.*, 69(1973), 26—34.
- [10] Nitsch, J. P., Ohyama, K., *C. R. Acad. Sci., Paris*, 2730(1971), 801—804.
- [11] 王光远、夏镇澳, *植物生理学报*, 6(1980), 127—131.
- [12] Nagata, T., Takebe, I., *Planta*, 99(1971), 12—20.
- [13] Muir, W. H., Hildebrandt, A. C., Riker, A. J., *Am. J. Bot.*, 45(1958), 589—597.
- [14] Sharp, W. R., Raskin, R. S., Sommer, H. E., *Planta*, 104 (1972), 357—361.
- [15] Staurt, R., Street, H. E., *J. Exp. Bot.*, 20(1969), 556—571.

-
- [16] Rareh, D., Galum, E., *Z. Pflanzenphysiol*, **76** (1975), 76—79.
 - [17] Vardi, A., Raveh, D., *ibid.*, **78**(1976), 350—359.
 - [18] Kao, K. N. et al., *Planta*, **126**(1975), 105—110.
 - [19] Halperin, W., *Exp. Cell, Res.*, **48**(1967), 170—173.
 - [20] Street, H. E., *In plant and cell tissue culture: Principles and applications*, pp. 123—153. Ohio State University Press, Columbus, USA, 1979.
 - [21] Nabors, M. W. et al, *Planta*, **157**(1983), 385—391.



1. 分离的新鲜叶肉原生质体, 2. 长大和再生细胞壁的原生质体, 3—4. 培养 6 天后第一次分裂, 5. 培养 7 天后第二次分裂, 6. 培养 11 天后形成 12 个细胞的小细胞团, 7. 培养 16 天后形成 30—50 个细胞的细胞团, 8. 培养 25 天后形成 80—100 个细胞的细胞团, 9. 增殖形成的具瘤状突起表面的愈伤组织, 10. 从原生质体再生的小植株长到 6—10cm 高, 11. 从愈伤组织分化的芽原基, 12—15. 从愈伤组织分化的球形、心形、鱼雷形和子叶形胚状体, 16. 一堆发育不同时期的胚状体。