

## 可乐茄叶肉原生质体培养再生植株

陈如珠 张兰英 李耿光 江经瑞

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 本文报道茄属果树可乐茄(*Solanum quitoense* Lam.)叶肉原生质体的分离、培养及植株再生。幼嫩叶片原生质体经酶游离、纯化后,以 $1 \times 10^4$ 个/ml密度培养于稍加改良K8p(附加2,4-D  $0.5\text{mg L}^{-1}$ 、NAA  $1.0\text{mg L}^{-1}$ 和BA  $0.5\text{mg L}^{-1}$ )的培养基中,三天后开始分裂,一周分裂3-4次。一个月形成小细胞团,植板率为0.1-0.2%。小细胞团转培养于MS+2,4-D  $0.5\text{mg L}^{-1}$ 上增殖后进行分化。原生质体来源愈伤组织在IAA( $0.1-1.0\text{mg L}^{-1}$ )与BA或ZT组合的培养基中能诱导器官发生,芽分化率最高可达42.9%;但IAA、BA、ZT三者一起使用未见任何器官分化。小芽在MS+IAA  $0.2\text{mg L}^{-1}$ 中生根成植株。可乐茄叶肉原生质体的植株再生,可应用于育种和茄属植物遗传工程研究。

**关键词** 可乐茄; 叶肉原生质体; 植株再生

## PLANT REGENERATION FROM MESOPHYLL PROTOPLASTS OF *SOLANUM QUITOENSE* LAM.

Chen Ruzhu Zhang Lanying Li Gengguang Jiang Jinrui

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

**Abstract** A procedure for isolation, culture and plantlet regeneration from mesophyll protoplasts of *Solanum quitoense* Lam. was reported. Young leaf protoplasts from aseptic plants grown in controlled environment were plated at  $1 \times 10^4$  protoplasts  $\text{ml}^{-1}$  on modified K8p medium with 2,4-D  $0.5\text{mg L}^{-1}$ +NAA  $1\text{mg L}^{-1}$ +BA  $0.5\text{mg L}^{-1}$ . Protoplast division was initiated after 3 days, and one week later the 3rd and 4th divisions were observed. After culture for four weeks the protoplast-derived calli grow to a size of 1-2 mm in diameter, and the planting efficiency (PE) amounted to 0.1-0.2%. Protoplast-derived calli were transferred onto MS+2,4-D  $0.5\text{mg L}^{-1}$  for proliferation. One month later the calli were transferred again onto MS+IAA+BA (or ZT). Subsequently, shoots occurred at 42.9% efficiency on MS+IAA  $1\text{mg L}^{-1}$ +ZT  $5.0\text{mg L}^{-1}$ . Shoots were rooted on MS+IAA  $0.2\text{mg L}^{-1}$  successfully.

**Key words** *Solanum quitoense* Lam.; Mesophyll protoplasts; Plant regeneration

国家“八·五”攻关任务

甘世南工程师协助照相, 特此致谢。

1993-08-16 收稿; 1994-11-29 修回

可乐茄 (*Solanum quitoense* Lam.) 英文名“Naranjilla”。原产于哥伦比亚及厄瓜多尔, 有“安第斯金果”之称, 是茄属植物中很有发展潜力的新型果树。果实不但味美多汁, 而且广泛用于制作调味品、嗜喱、果酱及天然色素等<sup>[1]</sup>。在华南地区已有少量引种, 但产量、品质与原产地相差较大。因此, 运用植物生物技术改良可乐茄, 使之适应本地区栽培条件, 具有一定的实际意义。我们于一九八七年建立了可乐茄组织培养无性系, 在这一基础上开展原生质体分离培养, 从中筛选有价值的种质。本文首次报道原生质体培养的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

可乐茄种子来自华南植物园, 经酒精消毒片刻后, 0.1%  $\text{HgCl}_2$  再消毒 15min, 然后播种在只含 MS 大量元素的固体培养基上。二周后取 1cm 长茎尖于  $\text{MS} + \text{BA } 1.0\text{mg L}^{-1}$  (单位下同) 中繁殖与继代培养。25℃, 日光照 12-14h。从生长健壮的无菌小苗, 取充分展开的嫩叶作原生质体分离材料。

### 1.2 原生质体分离与培养

取无菌苗嫩叶去除主脉后, 切成宽 0.1-0.5mm 的长条, 放入离解液中保温培养。离解液成份由 1 份含 2% 纤维素“Onozuka R-10”、1% 离析酶 R-10、0.5% 崩溃酶的缓冲液 (3mmol/L  $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 0.55mol/L 山梨糖醇) 和 3 份  $\text{K}_3$  培养基组成。酶解开始温度为 24-25℃, 静止培养 4-5h 后, 转移于 26-27℃、转速 30xg 的摇床上继续解离。待叶片完全解离后, 将混合液用 300 目网筛滤去残渣。滤液于 1000xg 离心收集的原生质体用 20% 蔗糖液纯化 10min, 吸取纯净原生质体悬浮液, 经 0.6mol/L 山梨醇缓冲液冲洗二次, 最后用 0.4mol/L  $\text{K8p}$  培养基洗一次, 并调整原生质体的培养密度。

纯净的原生质体以  $1 \times 10^4$  个/ml 的密度培养于稍加修改的  $\text{K8p}$  培养基中<sup>[2]</sup>, 修改后糖为 0.4mol/L 葡萄糖, 生长调节剂及浓度为 2,4-D 0.5, NAA 1.0, BA 0.5。采用微滴培养, 于  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  下暗培养, 保持一定的湿度。培养过程中定期观察原生质体的生长状况。当原生质体分裂 3-4 次后, 开始加入稀释培养基 ( $\text{K8p}$  附加 2,4-D 0.5, BA 0.5 及 2% 蔗糖和 0.5% 葡萄糖)。培养 30d 统计原生质体植板率 (PE), 并将形成的小愈伤组织转至  $\text{MS} + 2,4\text{-D } 0.5$  的固体培养基中增殖。

### 1.3 植株再生

原生质体来源并经增殖的愈伤组织, 转接在 MS 基本成分附加不同激素组合的培养基中进行分化试验。激素组合有: IAA+BA, IAA+ZT 和 IAA+BA+ZT。培养光照为 2000lx, 每天 12-14h, 温度 25℃。40d 统计分化结果, 并将长约 3.0cm 的芽切下接种到 MS 附加 IAA 0.2 中生根形成完整植株。

## 2 结果与讨论

可乐茄无菌叶片在离解液中 2h 后, 切口处细胞的壁开始溶解, 原生质体似蜂窝状紧密排列

于一起, 5h后原生质体游离出来。这时置于25-27℃、30xg转速的摇床上, 则叶片解离速度加快, 12h左右完全解离。每克叶片约可得 $1-2 \times 10^6$ 个原生质体, 游离的原生质体大小均匀, 质膜完整(图版I: 1)。实验观察到, 原生质体的数量和质量与叶片年龄、解离温度及离解液浓度有关。采用充分展开的幼叶, 原生质体的得率高, 大小均一, 离心时不易破碎, 且再生壁的能力强。原生质体在密度 $1 \times 10^4$ 个/ml时培养, 三天即可见90%以上细胞再生壁, 体积膨大一倍左右(图版I: 2), 出现第一次分裂(图版I: 3,4)。培养一周后, 原生质体分裂达3-4次(图版I: 5)。通过加入新鲜的稀释培养基, 多数小细胞团继续生长, 直至形成小愈伤组织(图版I: 6); 但对照则变褐、停止生长, 培养一个月后, 出现肉眼可见的小愈伤组织, 植板率仅0.1-0.2%, 多数原生质体再生壁后收缩死亡。

在茄属植物原生质体培养过程中, 可乐茄要求的培养基条件比较高。我们曾试验了茄属植物原生质体培养基SCM<sup>[9]</sup>、LCM<sup>[4]</sup>, 结果都不适合它的生长。经采用修改后的K8p培养基, 即K8p的糖类改用0.4mol/L葡萄糖, 少数再生细胞能继续分裂、生长。说明葡萄糖作为碳源适合可乐茄的原生质体培养。

原生质体来源的细胞团达到1-2mm大小时, 移至MS+2,4-D 0.5mol/L的固体培养基中增殖, 开始一周在黑暗条件下培养, 生长和增殖较缓慢。继之移于散射光下(约300lux), 增殖加快, 一个月后形成白色或奶黄色、外表疏松的团块结构。说明改变培养环境有利于小愈伤组织增殖。

表1 分化培养基成份对叶肉原生质体来源愈伤组织再生芽的影响

Table 1 Effects of the components of differentiation medium on shoot regeneration from mesophyll protoplast-derived calli

分化培养基 Differentiation medium (mg L <sup>-1</sup> )	接种愈伤组织数 No. of calli inoculated	分化愈伤组织数 No. of calli with shoots	平均芽数 Average shoots/callus	分化率 %
IAA 0.1+BA 0.5	27	2	1.0	7.0
IAA 0.1+BA 2.0	23	4	4.5	17.4
IAA 0.1+ZT 0.5	24	6	3.7	25.0
IAA 0.1+ZT 2.0	27	8	3.4	29.6
IAA 0.1+ZT 5.0	20	2	4.0	10.0
IAA 1.0+ZT 2.0	24	8	6.3	33.3
IAA 1.0+ZT 5.0	28	12	4.1	42.9
IAA 1.0+ZT 1.0+BA 1.0	31	0	0.0	0.0

原生质体来源的愈伤组织转移至附加不同浓度生长素(IAA 0.1-1.0)和细胞分裂素(BA 0.5-2.0或ZT 0.5-5.0)组合的MS培养基上进行分化。培养一周后, 愈伤组织出现紫红色的点状结构, 接着在紫红色点状结构中央形成绿芽点, 继续发育则形成芽(图版I: 7,8)。愈伤组织的分化能力在不同激素配比的培养基中明显不同(表1)。当IAA与BA组合时, 高浓度的BA有利于芽的形成, 出芽数量多; BA浓度低时, 分化的芽少, 但生长快。IAA(0.1mg L<sup>-1</sup>)与ZT组合时, 在使用的ZT浓度范围内, 以2mg L<sup>-1</sup>的分化效果最好, 分化率达29.6%。但每块愈伤组织平均芽

数则无显著差异。IAA  $1.0\text{mg L}^{-1}$  与 ZT 组合时, 则以 ZT  $5.0\text{mg L}^{-1}$  效果最佳, 分化率为 42.9%。结果表明, 愈伤组织的分化与 IAA 和 ZT 的浓度比值有关。然而, 当 IAA+ZT+BA 三者一起使用时, 尽管愈伤组织增殖很快, 但未见任何分化。推测可能 BA 和 ZT 在可乐茄原生质体愈伤组织分化中有相互拮抗作用, 而菜心等作物愈伤组织的分化则要求 BA 和 ZT 的配合<sup>[1]</sup>。

将愈伤组织分化芽切下移入生根培养基中, 10d 即可出根, 半个月后生长成完整植株(图版 I: 9)。植株的移植及变异分析正在进行中。本试验结果表明, 利用可乐茄叶片分离原生质体培养成完整植株, 可获得大量的原生质体无性系。由于植株起源于单个原生质体, 不同植株之间可能存在一定差异。因此, 通过进一步的筛选及繁育, 有希望获得品质好, 适应性强的新种质。同时, 原生质体培养程序又可应用于抗性基因转移及体细胞杂交研究, 这对于改良可乐茄品种, 将具有重要意义。

### 参考文献

- 1 张兰英, 李耿光, 陈如珠等. 菜心下胚轴原生质体培养植株再生. 植物学报, 1994, 36(2):105-110
- 2 张兰英, 陈如珠, 李耿光. 香瓜梨叶片原生质体培养高频率形成愈伤组织及植株再生. 植物学报(待发表)
- 3 Everett T H. *Solanum quitoense*. In: The New York Botanical Garden Illustrated Encyclopedia of Horticulture. New York: Garland Publishing Inc., 1982, 9:3177
- 4 Tan M-LMC, Ellan GAM, Van Marrewijk et al. Régénération of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*): factors important on effecient protoplast culture and plant regeneration. Plant Cell Reports, 1987, 6:172-175
- 5 Tan M-LMC, Hedwig S, Boerrigter S et al. A rapid procedure for plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures and leaf mesophyll cells of wild *Solanum* species and *Lycopersicon pennellii*. Plant Science, 1987, 49:63-72

### 图版说明

可乐茄叶肉原生质体的分离、培养及植株再生。

1. 刚游离出来的叶肉原生质体; 2. 培养后原生质体再生壁、膨大; 3, 4. 原生质体第一次分裂; 5. 小细胞团;
6. 小愈伤组织; 7, 8. 愈伤组织再生芽; 9. 芽生根成完整植株。

### Explanation of plate

Isolation, culture and plant regeneration from mesophyll protoplasts.

1. Freshly isolated protoplasts; 2. Cell wall recovery of enlarged protoplast; 3, 4. First division (after 3 days);
5. Cell colony (after one week); 6. Small protoplast-derived callus (after one month); 7, 8. Shoots occurred on differentiation medium; 9. Regenerated protoplast-derived plants