

甘蓝型油菜子叶原生质体培养及植株再生研究

孙慧慧^{1,2}, 闫晓红², 叶永忠^{1*}, 魏文辉^{2*}

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 中国农业科学院 油料作物研究所
基因组学与分子生物学研究室/农业部油料作物生物学重点开放实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 以甘蓝型油菜中双6号子叶为材料制备原生质体, 采用固液结合培养, 探讨了其原生质体分离、培养与再生的优化条件, 获得了再生植株。结果表明: 混合酶液(0.5%纤维素酶+0.1%果胶酶+0.2mol/L甘露醇+80mmol/L CaCl₂)与SCM溶液按3:7的比例混合, 酶解14h可获得高产率中双6号子叶原生质体; 原生质体在前人设计的B、C固液相结合培养基上培养效果好; 最佳分化培养基为E培养基+1.0g/L 6-BA+0.1g/L NAA+0.02g/L GA₃+30 μ mol/L AgNO₃; 所有再生芽均在无激素的MS培养基上生根。研究结果为建立成熟的甘蓝型油菜原生质体再生体系提供了新的配方与依据。

关键词: 甘蓝型油菜; 子叶原生质体; 原生质体培养; 植株再生

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)06-0035-05

The Cotyledon Protoplasts Culture and Plant Regeneration of *Brassica napus* L.

SUN Hui-hui^{1,2}, YAN Xiao-hong², YE Yong-zhong^{1*}, WEI Wen-hui^{2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Department of Genomics and Molecular Biology, Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Oil Crop Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract: Protoplasts were prepared from the cotyledon of *Brassica napus* cultivar Zhongshuang 6, cultured with solid-liquid combined method. The optimized conditions about the isolation, culture and regeneration of protoplast were tested and ultimately the regeneration plantlets were obtained. The results indicated that high recovery of protoplast could be achieved with enzyme mixture (0.5% cellulase, 0.1% pectolyase + 0.2 mol/L mannitol + 80 mol/L CaCl₂) diluted with SCM solution as 3:7 ratio. It is fine to culture protoplast on solid-liquid combined media B and C. The optimum differentiation medium was E + 1.0 g/L 6-BA + 0.1 g/L NAA + 0.02 g/L GA₃ + 30 μ mol/L AgNO₃. The best rooting media was MS without hormones. This study provided new formula and data for establishing sophisticated protoplast regeneration system of *Brassica napus* L..

Key words: *Brassica napus* L.; Cotyledon protoplast; Protoplast culture; Plant regeneration

利用原生质体进行转基因及体细胞杂交试验获得再生植株是作物育种与遗传改良的有效途径之一^[1]。体细胞杂交避免了有性杂交过程中的不亲和障碍, 在获得种间、属间甚至科间杂种方面均发挥着

重要作用。甘蓝型油菜是我国主要油料作物之一, 尽管其原生质体培养与植株再生已有很多成功的报道^[2-7], 涉及甘蓝型油菜体细胞杂交再生植株亦有较多成功的范例^[8-10], 但该项技术在实际应用中仍存

收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671312); 湖北省自然科学基金一般项目(2009CDB191)

作者简介: 孙慧慧(1983-), 女, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物原生质体融合。

*通讯作者: 叶永忠(1957-), 男, 湖北黄梅人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生理、生态学研究。E-mail: yeyzh@163.com

魏文辉(1971-), 男, 湖北红安人, 副研究员, 主要从事遗传学、基因组学和分子生物学研究。

E-mail: whwei@oilcrops.cn

在许多问题, 如对基因型依赖性大、试验结果重演性小、部分试剂昂贵等, 从而限制了原生质体培养与融合技术在油菜遗传改良中的应用。为此, 对甘蓝型油菜子叶原生质体再生的影响因子进行了探讨, 成功获得了甘蓝型油菜中双6号的原生质体再生植株。这一结果为进一步利用中双6号在原生质体水平上进行体细胞杂交, 以及以原生质体为材料进行转基因研究等, 提供了必要的技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为甘蓝型油菜品种中双6号。

1.2 试验方法

1.2.1 中双6号无菌苗的培育 种子经70%乙醇表面消毒30s, 接着用2%的次氯酸钠浸泡15min, 无菌水清洗3~5次, 接种于无激素的MS培养基上(24~25℃, 16h/d光照)。

1.2.2 原生质体分离与纯化 取3~7d苗龄幼苗的下胚轴和子叶游离原生质体; 3周左右苗龄幼苗完全展开的叶片用于原生质体的分离。下胚轴切成约1mm的小段, 子叶、完全展开的叶片切成约1mm的细条, 在黑暗、室温(约25℃)、50r/min条件下酶解14~20h。酶液成分为0.5% Cellulase Onozuka R10, 0.1% (W/V) Pectolyase Y23, 0.2mol/L Mannitol, 80mmol/L CaCl₂。酶液以3:7的比例与SCM溶液(0.5mol/L Sorbitol, 10mmol/L CaCl₂, 5mmol/L MES, pH 5.8)混合。酶解约14h后, 以50μm孔径的尼龙膜过滤收集原生质体于10mL离心管。以W5溶液^[11]清洗, 65g条件下离心5min, 弃上清液收集原生质体, 以2mL W5溶液重新悬浮, 轻轻加在5mL Sucrose+MES界面, 同样条件离心5min, 然后收集W5溶液与蔗糖层之间的原生质体带, 再以W5溶液清洗2次, 最后以原生质体培养基清洗1次。

1.2.3 原生质体培养 将原生质体以B培养基^[12]悬浮, 通过0.1mm血球计数板统计原生质体产量, 调密度至 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/mL, 加在B固体培养基上(0.8%琼脂, 其余成分同B液体培养基), 25℃黑暗条件下培养(玻璃培养皿直径60mm, 高10mm)。每天跟踪观察原生质体的分裂生长状态。

1.2.4 植株再生 当培养皿里出现肉眼可见的小愈伤组织时, 及时将小愈伤组织转至C培养基^[13]扩增, 25℃、16h/d弱散射光条件下培养, 当愈伤直径

长至3~5mm时, 将愈伤转至E培养基^[12]诱导芽的分化。芽长至2~3cm高时将其切下转至生根培养基上生根。

2 结果与分析

2.1 萌发条件对原生质体产量的影响

首先设计了无激素的1/2MS、MS(24℃, 16h/d光照)2种培养基, 发现2种条件下原生质体的产量差别不大。根据Chen等^[13]报道, 1/2MS(添加0.1mg/L 6-BA)培养条件下的无菌苗制备原生质体较好, 因此又比较了2种培养基添加6-BA与不加该激素的差别, 发现两者原生质体产量也无明显差别, 最终以无激素的MS作为萌发培养基。此外, 设计了光照(24℃, 16h/d光照)、黑暗2种萌发条件, 比较其他条件一致的情况下原生质体产量, 发现相同片数子叶、黑暗条件下的黄化苗子叶原生质体产量不如光照条件下的绿苗子叶高。这可能是黄化苗子叶完全展开的叶片少, 而且其展开面积小的缘故。

2.2 苗龄对原生质体产量的影响

苗龄7d的每苗产量为 2.06×10^4 个, 6d的每苗约 1.82×10^4 个, 5d的每苗约 1.14×10^4 个, 4d的每苗约为 1.15×10^4 个, 而3d的每苗仅为 0.17×10^4 个(图1)。尽管苗龄6~7d的子叶原生质体产量很高, 但破裂的原生质体及碎片杂质也较多, 不易纯化。3d的原生质体产量偏少, 4~5d的原生质体产量较高, 也较易清洗干净, 原生质体较圆。因此使用苗龄4~5d的子叶制备原生质体。

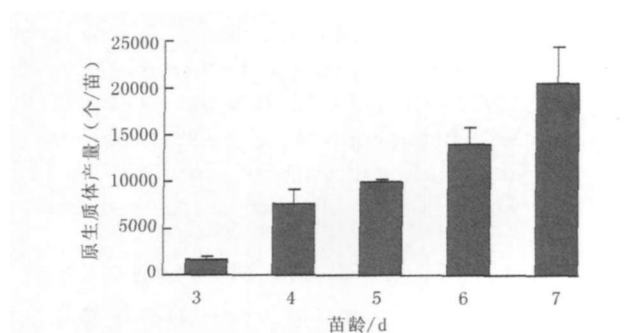


图1 苗龄对中双6号子叶原生质体产量的影响

2.3 不同材料原生质体分裂能力

使用甘蓝型油菜品种(系)南京8953、中油821、中双6号3种材料, 进行品种(系)的选择, 发现同一条件下仅中双6号原生质体产量、原生质体分裂能力较高, 这可能与中双6号苗生长健壮、生理状态一致有关, 故选作试验材料。

以往的研究多采用下胚轴作为分离原生质体的

材料,然而很多报道其原生质体产量较低^[1,14],因此比较了中双6号下胚轴、子叶原生质体的产量,结果发现,3~5d苗龄的下胚轴原生质体产量约 2.6×10^3 个/苗,产量较低,需要大量的种子来满足试验要求,而子叶和完全展开的幼嫩叶片可得到大量的原生质体。随后比较了子叶及真叶原生质体的分裂能力,结果显示,子叶原生质体的分裂频率远比真叶原生质体的分裂频率高,并且真叶原生质体酶解液中,导管、碎裂的原生质体、破碎的细胞壁等杂质较多,清洗多次仍不能纯化干净,容易导致原生质体培养过程中发生褐化,故选择子叶作为分离原生质体的材料。

2.4 酶浓度对中双6号子叶原生质体产量的影响

原生质体分离常用的酶为纤维素酶(Cellulase Onozuka R10)、果胶酶(Pectolyase)、离析酶(Maceroyzme R10)和半纤维素酶(Hemicellulase)。这些酶无论是分开依次使用还是混合使用,都能从植物组织中游离出大量($>1\times 10^6$ 个/mL)有活力的原生质体^[15]。为摸索出最适宜的酶解条件,本研究借鉴前人经验,采取酶解14h,设计了I、II、III个酶浓度梯度处理,原生质体产量结果见表1。处理I和II得到的原生质体活力较高,但处理I产量不如II高。处理III尽管产量也不低,但伴随着酶浓度的提高,酶液中杂质、碎片也增多,不易纯化,影响后期培养,综合考虑后采用处理II制备原生质体。

表1 酶浓度对中双6号原生质体产量的影响

项目	处理		
	I	II	III
纤维素酶/%	0.2	0.5	0.5
果胶酶/%	0.1	0.1	0.2
CaCl ₂ /(mmol/L)	80	80	80
甘露醇/(mol/L)	0.2	0.2	0.2
酶解时间/h	14	14	14
原生质体产量/ (个/苗)	0.63×10^4	1.14×10^4	0.88×10^4

2.5 原生质体培养条件

原生质体必须在适宜密度下才能形成新的细胞壁,进行持续有丝分裂及形成愈伤组织。低密度培养的原生质体不能分裂,而密度过高则又导致原生质体集聚、褐化,从而降低植板率和再生率。不同植物对原生质体培养密度要求不同,一般 $5\times 10^2\sim 1\times 10^6$ 个/mL^[15]。拟南芥在 $5\times 10^3\sim 1\times 10^4$ 个/mL的低密度下即可进行持续分裂并发育成细胞团^[16]。Chen等^[17]研究表明,芸薹属红甘蓝和茎用芥菜的适宜培

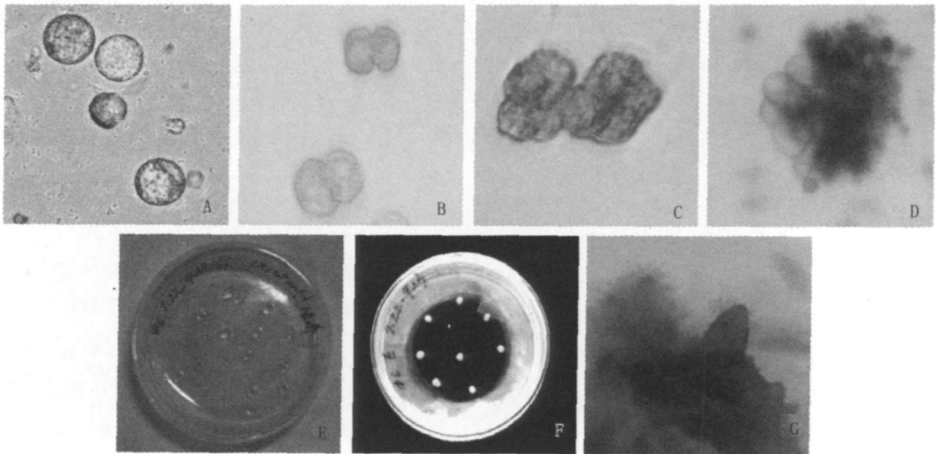
养密度为 5×10^5 个/mL。本试验设计了不同密度处理,发现子叶、真叶原生质体在 $5\times 10^3\sim 1\times 10^4$ 个/mL密度下,3~10d内很少分裂; $5\times 10^4\sim 1\times 10^5$ 个/mL细胞3d左右进行第1次有丝分裂,7d左右进行第2次有丝分裂; $5\times 10^5\sim 1\times 10^6$ 个/mL密度下,细胞粘连现象严重,褐化而不生长,即使有些细胞能进行1~2次有丝分裂,最终因不能持续分裂而死亡。因此表明,中双6号子叶适宜在 $5\times 10^4\sim 1\times 10^5$ 个/mL密度下培养。

有关B、C培养基的激素配比参照了Pelletier等^[12]的设计,对于旨在得到再生植株的试验来说,得到完整透亮、再生能力旺盛、活力强的愈伤至关重要^[18,19]。为此,对诱导芽的培养基E进行了一系列改良,探索了适合愈伤生长及分化条件,发现在仅含GA₃,不含NAA及2,4-D的E培养基上,愈伤褐化死亡,而在含0.2mg/L NAA和1mg/L 6-BA、不含2,4-D的E培养基上愈伤生长良好,呈疏松透亮的淡黄绿色。说明2,4-D对于愈伤的诱导分化不是必需的,而NAA(1g/L)、6-BA(1g/L)和GA₃(0.02g/L)的配合使用效果较好,培养基仅含GA₃时也不能满足愈伤分化的需要(表2)。关于愈伤的培养,Chen等^[1]将2,4-D、NAA和6-BA结合使用发现,生长素对愈伤扩增有重要影响,培养基含2,4-D(0.25mg/L)配合NAA(0.25mg/L)得到的愈伤完整透亮、活力较高,含NAA而不含2,4-D愈伤诱导出发状根,最终不能诱导出芽,此研究认为,对茎用芥菜愈伤的分化,2,4-D是必需的,与本研究结果不同,这可能是由不同品种再生需要的条件不同造成的。

原生质体的高频率分裂是细胞进行持续分裂得到愈伤及再生植株的先决条件。图2A显示新鲜的子叶原生质体,原生质体第3天进行第1次有丝分裂(图2B),第2次有丝分裂出现在第6~7天(图2C),细胞团在培养40d时出现(图2D)。在原生质体培养5~6周后出现肉眼可见的微愈伤组织(图2E),形成百分率为26.34%,此时转至扩增培养基C。愈伤直径介于3~5mm时转至E培养,可成功诱导愈伤分化(图2F)。得到完整而透亮的愈伤是成功诱导出芽的关键。本试验发现,NAA及6-BA配合使用对于芽的诱导是必要的,在不含NAA及6-BA的E培养基上,原本有活力的愈伤会褐化死亡,不能诱导出芽,但是在6-BA(1mg/L或2mg/L)结合NAA(0.1mg/L)及GA₃(0.02mg/L)的E培养基上,约生长87d时可诱导出芽(图2G)。

表 2 培养基的激素配比

培养基	6-BA/ (mg/L)	2,4-D/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	GA ₃ / (mg/L)	葡萄糖/%	蔗糖/%	甘露醇/%	琼脂/%
原生质体培养基 B	1	0.25	1		2		7	8
增殖培养基 C	1		0.2			2	4	8
分化培养基 E	1		0.1	0.02		1	2	8
生根培养基 MS						8		8



A. 5d 苗龄子叶游离出来的新鲜原生质体(× 400); B. 生长至 3d 原生质体进行第 1 次有丝分裂(× 400); C. 6~7d 时部分原生质体进行第 2 次有丝分裂(× 600); D. 生长至 40d 原生质体分裂形成细胞团(× 600); E. 肉眼可见的小愈伤转至 C 培养基扩增培养; F. 愈伤转至 E 分化培养基诱导芽分化; G. 愈伤在改良 E 培养基上生长 87d 诱导出芽

图 2 甘蓝型油菜子叶原生质体植株再生

2.6 AgNO₃ 对诱导芽的影响

试验过程中检测了 AgNO₃ 对诱导芽分化的影响,中双 6 号原生质体来源的愈伤在 0 μ mol/L 和 30 μ mol/L 2 个水平的 AgNO₃ 培养基上培养,结果表明,加有 AgNO₃ 的培养基植株再生频率有所提高,说明 30 μ mol/L 的硝酸银对甘蓝型油菜植株再生有促进作用。

3 讨论

本试验采用了 Pelletier 等^[12]设计的一套系列培养基(采用了其中的 B、C、E 培养基)。此前有许多报道用该培养基获得了再生植株^[7, 8, 12, 20-22]。与前人相比,本研究采用固液相结合培养法,省去了价格昂贵的培养膜,且培养效果很好,容易为一般实验室和研究者接受、采纳。

对于制备高质量的原生质体来说,前期无菌苗的萌发条件无疑很重要。培养基添加激素 6-BA 时,3~5d 苗更矮壮,但下胚轴易轻微木质化,子叶也比无激素培养条件下的子叶成熟,这表明无激素培养基更易于获得幼嫩外植体,从而得到较高质量的原生质体。值得一提的是,本研究发现,黑暗条件下原生质体直径较光照条件下的小,由于其展开叶片相对较

少,原生质体产量较低,故选择光照条件制备无菌苗,结果原生质体生长良好,表明光照条件下萌发的甘蓝型油菜也是制备原生质体的较好材料。而 Zhao 等报道^[5, 23]来自芸薹属甘蓝型油菜、白菜型油菜和甘蓝的 14 个栽培种,黑暗条件下的黄化苗子叶原生质体均表现出非常高的分裂频率,而光照条件下绿色苗子叶原生质体的分裂频率非常低。这表明不同试验材料对原生质体培养条件要求不同。

本试验中,原生质体分离出来之后,其直径并不一致,直径较大的原生质体所占比例较大。Dovzhenko 等报道^[16],一些相对较小的拟南芥原生质体(直径 20~30 μ m)在培养时最先分裂,而大多数较大的原生质体(直径 40~60 μ m)在 2~3d 后才分裂。大、小原生质体哪一类更早进行分裂,需通过显微镜进行长期、大量观察,对于人力、精力要求较多,因此,对此未做更细致的研究。

培养过程借鉴前人经验,尝试了不同培养基(如 MS、B5、B 培养基)、不同培养方式(如液体浅层培养、固体包埋培养)培养,发现在以上条件下,甘蓝型油菜中双 6 号原生质体几乎不分裂或者仅能分裂 1~2 次,伴随着褐化不能持续分裂。这可能是由于培养基组成、激素配比不适合其分裂,不同种属或不同品种

植物原生质体对培养基要求存在差异。本试验在 Pelletier 等^[12]设计的 B 培养基上,采用固液相结合培养,无需频繁打开培养皿,中双 6 号原生质体可以持续分裂。培养基、培养条件对其培养影响较大。培养中需要当注意的是,当出现肉眼可见的小愈伤组织时,应及时转移至扩增培养基,否则易因褐化而不能继续生长。

中双 6 号属于半冬性中早熟甘蓝型油菜品种,芥酸、硫甙含量低。本实验室以农杆菌介导进行转基因研究,发现中双 6 号易转化。本研究探讨了中双 6 号子叶原生质体培养条件,并建立了甘蓝型油菜原生质体培养及植株再生的体系,为此后的原生质体转基因及相关的体细胞杂交等研究奠定了一定的基础。

致谢:本试验得到中国农业科学院油料作物研究所胡琼研究员、华中农业大学李再云教授的指导,在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] Chen L P, Zhang M F, Hirata Y, *et al.* Efficient plant regeneration from cotyledon-derived protoplasts of cytoplasmic male-sterile tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee) [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2001, 27(5): 437-440.
- [2] Klimaszewska K, Keller W A. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, 8(3): 225-233.
- [3] Swanson E B, Coumans M P, Brown G L, *et al.* The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspores and protoplasts [J]. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(2): 83-87.
- [4] Simmonds D H, Long N E, Keller W A. High plating efficiency and plant regeneration frequency in low density protoplast cultures derived from an embryogenic *Brassica napus* cell suspension [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 27(3): 231-241.
- [5] Zhao K N, Bittisnich D J, Halloran G M, *et al.* Studies of cotyledon protoplast cultures from *Brassica napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. I: Cell wall regeneration and cell division [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 40(1): 59-72.
- [6] Zhao K N, Bittisnich D J, Halloran G M, *et al.* Studies of cotyledon protoplast cultures from *B. napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. II: Callus formation and plant regeneration [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 40(1): 73-84.
- [7] Hu Q, Andersen S B, Hansen L N. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species [J]. *Plant Cell, Tissue and Culture*, 1999, 59(3): 189-196.
- [8] Hu Q, Hansen L N, Laursen J, *et al.* Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2002, 105(6/7): 834-840.
- [9] Hu Q, Andersen S B, Dixelius C, *et al.* Production of fertile intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* for the enrichment of the rapeseed gene pool [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 21(2): 147-152.
- [10] Yarrow S A, Burnett L A, Wildeman R P, *et al.* The transfer of Polima cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion [J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 9(4): 185-188.
- [11] Menczel L, Nagy F, Kiss Z S, *et al.* Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana* I: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, 59(3): 191-195.
- [12] Pelletier G, Primard C, Vedel F, *et al.* Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion [J]. *Molecular and General Genetics*, 1983, 191(2): 244-250.
- [13] Chen L P, Zhang M F, Xiao Q B, *et al.* Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleracea*) by using nurse cultures [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 77(2): 133-138.
- [14] Jaiswal S K, Hammatt N, Bhojwani S S, *et al.* Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Brassica carinata* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 22(3): 159-165.
- [15] Davey M R, Anthony P, Power J B, *et al.* Plant protoplast technology: current status [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2005, 27(1): 117-129.
- [16] Dovzhenko A, Bosco C D, Meurer J, *et al.* Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Protoplasma*, 2003, 222(1/2): 107-111.
- [17] Chen L P, Zhang M F, Li C S, *et al.* Production of interspecific somatic hybrids between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*Brassica oleracea*) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 80(3): 305-311.
- [18] Jiang W, Cho M J, Lemaux P G. Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars [J]. *Plant Biotechnology*, 1998, 15(2): 63-69.
- [19] 陈占洲, 周涛. 烟草花叶病毒影响烟草细胞活力的初步研究 [J]. *河南农业科学*, 2008(3): 62-64.
- [20] Walters T M, Earle E D. A simple, versatile feeder layer system for *Brassica oleracea* protoplast culture [J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 9(6): 316-319.
- [21] Hu Q, Andersen S B, Hansen L N. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in *Isatis indigotica* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 55(2): 155-157.
- [22] Hansen L N, Earle E D. Regeneration of plants from protoplasts of rapid cycling *Brassica oleracea* L. [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(6): 335-339.
- [23] Zhao K N, Whitecross M I, Bittisnich D J. Studies on plant regeneration from cotyledonary protoplasts in *Brassica campestris* [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(3/4): 164-170.