

# 培养矮牵牛叶肉原生质体的几种较好的培养基

张鉴铭

(中国科学院昆明植物研究所)

## 摘 要

本文对培养在8种不同培养基上的矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 叶肉原生质体的生长情况进行了比较。在所用的培养基上, 原生质体都再生了细胞壁、产生了持续的细胞分裂并发育成小细胞团。在其中6种培养基上得到了愈伤组织。最好的两种培养基是我们组合的G培养基及修改的K培养基, 它们的植板效率分别达到56%及70%。

还进行了一些激素组合对愈伤组织生长和分化影响的试验, 某些激素组合对愈伤组织的生长有较大的影响, 在某些激素组合的培养基上愈伤组织已分化出根。

矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 叶肉原生质体是研究体细胞杂交和遗传物质转化的科学工作者所注意的实验材料, 并且已用它得到了原生质体融合的杂种植株<sup>[1]</sup>。

矮牵牛叶肉原生质体培养在不同组合的培养基上生长发育的情况是不同的。在一些培养基上只能形成愈伤组织或不生长<sup>[2]</sup>, 在修改的NT培养基上能培养成愈伤组织并分化出根<sup>[3]</sup>, 在Durand等的培养基上能形成完整的植株<sup>[4, 5]</sup>。但细胞分裂和分化成植株的频率是低的。为了选择矮牵牛叶肉原生质体的培养基, 在我们的实验条件下对8种培养基在完全相同的培养条件下进行了比较研究。

## 材 料 和 方 法

### 原生质体的制备

制备方法同前报<sup>[3]</sup>, 但用通底离心管漂洗原生质体时, 蔗糖溶液的浓度提高为22% (重量/体积, 后同) 这样可以得到比前报更好的效果。

### 原生质体的培养

液体培养: 8种培养基的组合列于表1、表2中, 液体培养基用1*N*的NaOH调pH至5.6, 经孔径为0.45 $\mu$ 的微孔滤膜过滤灭菌后备用。将纯化洗净的原生质体用0.2*M*山梨醇及0.2*M*甘露醇溶液稀释至大约 $10^6$ 个原生质体/毫升, 分别接种于盛有1毫升各种液体培养基的10ml三角瓶中, 最终密度均为 $10^5$ 个原生质体/毫升左右, 用白胶塞塞紧瓶口。经10—14天培养后, 加入等容积不含甘露醇和山梨醇的液体培养基, 以降低原培养基的渗透压。

微室悬滴培养: 将已接种于各种液体培养中的原生质体悬滴于盖片下, 每个滴约30微升, 用白凡士林密封于75×35×6的凹形玻璃片的凹孔内作微室悬滴培养。以便在普

通光学显微镜下连续观察原生质体的生长发育和细胞分裂的进程。

固体平板培养：固体培养基成分同液体培养基，另外加入12克/升琼脂粉，pH调至5.8，热压灭菌后待用。

表1 8种不同组合的培养基

代号	培养基的组合情况
B	完全按照 Pelcher 等1974〔6〕的配方。
D	完全按照 Durand 等 1973〔5〕的配方。
G	自己组合的配方，表2。
Tg	自己组合的配方，表2。
T	根据 Nagata 等 1971〔7〕的配方作如下修改： 减去：原有的 3ppm NAA 及 0.7M 甘露醇。 加入：1 ppm 2,4-D, 20 ml/l 椰乳*，1%葡萄糖，0.2M甘露醇及0.2M山梨醇。
K	根据 Kao 1977〔8〕的配方作如下修改： 减去：原有的丙酮酸钠，氯化胆碱，维生素A及 Sequestrene 330 Fe。 加入：FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O** 27.8 mg/l 及 Na <sub>2</sub> -EDTA 37.3 mg/l。
M <sub>1</sub>	完全按照 Power 等 1977〔2〕的 M <sub>1</sub> 培养基配方。
M <sub>2</sub>	完全按照 Power 等 1977〔2〕的 M <sub>2</sub> 培养基配方。

\* 椰乳从椰子中取出后，60℃下处理30分钟，用孔径为0.45μ的滤膜过滤灭菌贮存于冰箱内，用时加入。  
(后同)

\*\* 先配制成 Fe-EDTA 再加入。(后同)

表2 G和Tg培养基的成分

成分	G 培养基		Tg 培养基	
	mg/l	mM	mg/l	mM
1. 大量元素				
KNO <sub>3</sub>	1515	15	1011	10
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>			800	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	264	2		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	588	4	294	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1233	5	1233	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	680	5	544	4
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8		27.8	
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3		37.3	
2. 微量元素	按照 Nagata 等 1971〔7〕的配方。			
3. 维生素类	mg/l		mg/l	
肌醇	100		100	
烟酸	4		4	
维生素B <sub>1</sub>	5		5	
维生素B <sub>6</sub>	0.5		0.5	
叶酸	0.5		0.5	
D-生物素	0.05		0.05	

4. 其 他				
甘氨酸	2 mg/1		2 mg/ 1	
椰 乳	20ml/1		20ml/ 1	
葡萄糖	10g/1		10g/ 1	
蔗 糖	10g/ 1		10g/ 1	
甘露醇	0.2M		0.2M	
山梨醇	0.2M		0.2M	
2,4-D	1mg/ 1		1mg/ 1	
6-BA	1mg/ 1		1mg/ 1	

植板时将固体培养基(约45°C,未凝固)等体积加入到已接种原生质体的液体培养基中,摇匀后立即平铺在60m/m的培养皿里,每皿约4毫升,或者就铺在三角瓶的底面上,厚度在1mm左右。为了保持空气的湿度,用白胶塞塞紧三角瓶,而培养皿置于玻璃缸中,缸内另放一杯灭菌水。

接种物在25°C,光强约1000勒克司连续光照的条件下培养。

分化和愈伤组织继代培养用的培养基,从表列成分中减去山梨醇、甘露醇、椰乳、葡萄糖、蔗糖和激素类。另外加入蔗糖30g/1,琼脂8g/1及不同组合的激素。pH调到5.8,经热压灭菌后使用。

原生质体形成的愈伤组织长到直径约1mm时,转移到分化培养基上进行培养。培养条件与培养原生质体的条件相同。

#### 显微观察及植板效率计算

微室悬滴培养用光学显微镜连续观察原生质体的生长发育及细胞分裂。液体培养和固体平板培养都用倒置显微镜定期观察、记录。

培养10天以后,细胞团可以用肉眼分辨,肉眼直接观察后用“十”表示细胞团的生长情况,初步比较培养基的差别。

植板效率的计算,原生质体经10—14天培养,在倒置显微镜下统计三个视野中的细胞团(10个以上细胞组成的)数、分裂细胞(10个以下细胞的团)数,未分裂的活细胞数及死细胞数,再计算出植板效率。

$$\text{植板效率} = \frac{(\text{细胞团数} + \text{分裂细胞数})}{(\text{细胞团数} + \text{分裂细胞数} + \text{未分裂活细胞数} + \text{死细胞数})} \times 100$$

统计时细胞生长的各种状态如图4所示。

## 结果和讨论

### 1. 原生质体在不同培养基上小细胞团形成的差别

经漂洗纯化后的原生质体都是单个亮绿色的圆球体,叶绿体均匀分散在球体中或多数叶绿体沿球的边沿排列。培养一天后多数原生质体膨大变形,有部分原生质体变成椭圆形或卵圆形,表明细胞壁已经再生。一般在培养后第三天观察到第一次细胞分裂,一星期后形成约10个细胞组成的小细胞团。在液体悬滴培养的8种培养基中都可以观察到这种小细胞团的形成,并且在不同培养基上可以初步看出差别,在G、K二种培养基上形成较多的小细胞团,生长情况较好。

除M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>培养基外,在其他六种培养基上的细胞均能持续分裂,细胞团继续生长发育。在不同培养基上,细胞团大小的差别越来越明显。液体培养和平板培养中逐渐可以用肉眼分辨出细胞团生长的多少和大小。表3为肉眼观察的一些实验结果,从表3可以看出无论是在液体培养还是在固体平板培养中都以G和K培养基的效果较好。同一种培养基以液体和固体平板两种培养方法作比较时,固体平板都比液体培养好得多,平板培养表面层的细胞团生长得较快较好,G和K培养基上经15天培养后细胞团的直径可达到约1mm。这时可以转移到分化培养基或继代培养基上培养。

液体培养10天后,加入不含甘露醇和山梨醇的液体培养基降低渗透压,细胞团的生长也并不好转,大多数细胞团停止生长,只有少数细胞团长大成愈伤组织。而加入原来的新鲜培养基、或者直接将小细胞团转移到固体培养基上则能继续长大成愈伤组织。液体培养的细胞团长得较慢,20天后才能长到约1mm大。

表3 不同培养基上细胞团生长的情况

实验	培养方法	培养天数	培养基							
			B	D	G	Tg	T	K	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
1	液体培养	20	+++	++	+++ +	+++	++	+++ ++		
	固体平板	20	+++	+++	+++ ++	+++ +	+++			
2	液体培养	13	++	+++	+++ +	++	++	+++ +	-	+
	固体平板	13	++	+++	+++ +	+++	+++	+++ ++	+	+

注: +++++ 细胞团约占80%。      ++ 细胞团约占20%。  
 ++++ 细胞团约占60%。      + 细胞团在10%以下。  
 +++ 细胞团约占40%。      - 培养后很快死亡。

表4 不同培养基上的植板效率(培养14天)

培养基代号	B	D	G	Tg	T	K	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
细胞团数(>10个细胞)	20	15	33	23	10	40	3	4
分裂细胞(<10个细胞)	14	21	21	11	9	10	24	25
未分裂活细胞数	3	21	10	5	14	7	12	22
死细胞数	166	43	31	31	37	14	68	65
植板效率%	17	36	56	49	27	70	25	20

植板密度为 $0.7 \times 10^5$ 个原生质体/毫升。

## 2. 原生质体在不同培养基上的植板效率。

为了严格比较在不同培养基上培养原生质体的差别,把植板的培养皿放在同一个大玻璃缸中,缸内放一杯灭菌水并加盖封闭,使每个培养皿都处在空气湿度相同的条件下。培养14天后,不同培养基上细胞团的生长有显著差别(图1)。在G(图2)和K(图3)培养基上的细胞团生长最好。对各种培养基上的细胞团(多于10个细胞组成的团)数、分裂细胞(少于10个细胞的团都归入分裂细胞)数、未分裂的活细胞及死细胞

数分别进行了统计，计算出植板效率（表4）结果表明，G和K培养基的植板效率分别为56%和70%，在本实验条件下，这两种培养基的植板效率比前用于培养矮牵牛叶肉原生质体的培养基〔5〕的植板效率显著增长。如果进一步考虑形成细胞团的比率，G和K培养基也是最高的，分别为34%和56%。

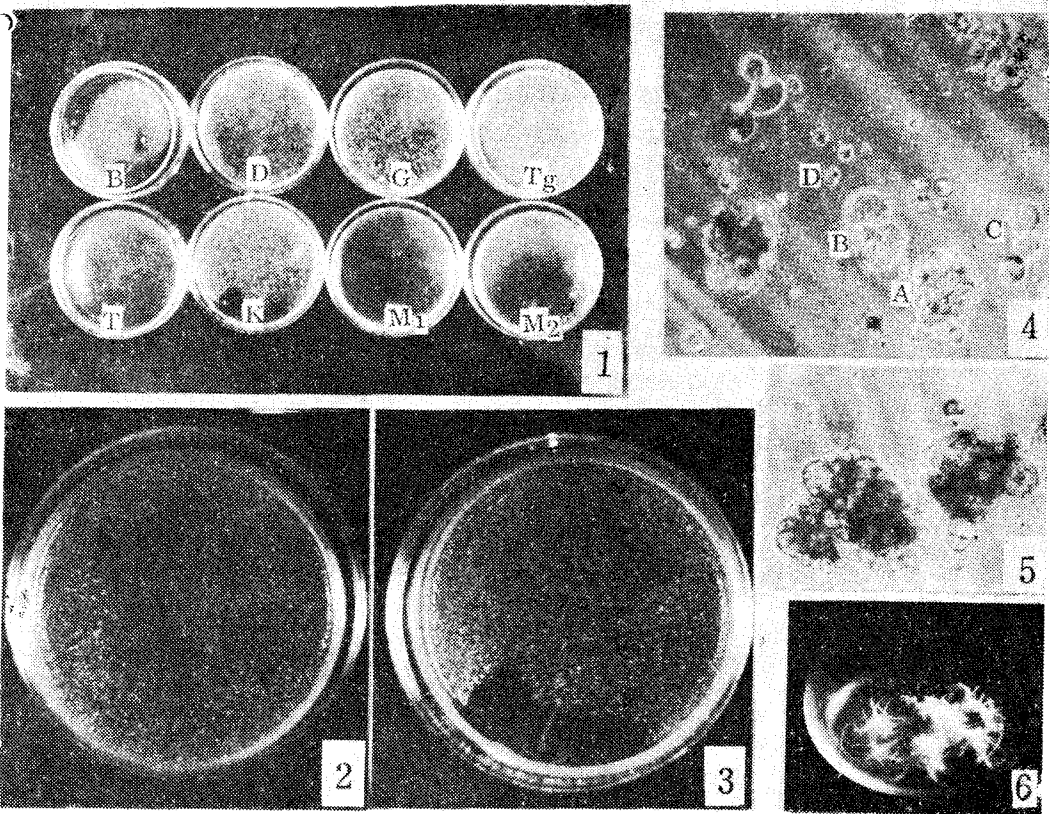


图1.平板培养在8种培养基上14天原生质体形成的细胞团。图2.平板培养在G培养基上14天原生质体形成的细胞团。图3.平板培养在K培养基上14天原生质体形成的细胞团。图4.植板效率统计的各种细胞：(A)细胞团(>10个细胞)，(B)分裂细胞(<10个细胞)，(C)未分裂的活细胞，(D)死细胞。图5.G培养基上的细胞团。图6.由愈伤组织分化的根。

从这两种培养基的成分上分析，K培养基的原配方是Kao〔8〕用于原生质体低密度培养的培养基，被称之为“加强”培养基，增加了很多特殊的有机营养成分，用在本实验中作了稍微修改，也仍保存了很多特有的有机营养成分，从它得到很好的培养效果这是可以理解的。而G培养基只是在一般常用培养的成分上作了调整， $\text{NH}_4$ 态氮源用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，并提高了Ca、Mg和P元素的量，维生素类也作了一些调整。这种培养基比用于矮牵牛叶肉原生质体培养的D培养基〔5〕和T培养基〔3〕却较大地提高了植板效率，形成的细胞团（图5）是正常的。这是一个改进。但对其他植物原生质体的培养是否也是一个合适的培养基，还有待研究。

我们组合的另一个Tg培养基，植板效率也是较高的，但不如G培养基。

### 3.愈伤组织的继代培养及分化问题

由原生质体形成的约1mm大的愈伤组织转移到分化培养基和继代培养基上培养。如

果培养基中保持原来的激素组合,愈伤组织可以继续缓慢生长。根据愈伤组织增长的体积和重量来比较,培养基的基本成分对愈伤组织生长的速度没有显著的影响,而激素种类和比例对愈伤组织生长的影响较大。NAA(或2,4-D)和6-BA对愈伤组织的生长是不可缺少的。愈伤组织生长最快的激素组合是2.5 ppm 6-BA/0.5 ppm NAA,如果再加入5 ppm的赤霉素或1 ppm的激动素,愈伤组织的生长更快,培养1个月后,愈伤组织体积和鲜重的增长比其他激素组合的大4—5倍。在这四种激素(6-BA 2.5, NAA 0.5, 赤霉素 5, 激动素 1 ppm)组合的培养基上,一个月后愈伤组织鲜重的增长平均为接种时的40倍,其他激素组合的培养基上平均只增长6—10倍。多种激素适当组合是矮牵牛叶肉原生质体形成的愈伤组织加速生长的主要因素。

根的分化。转移到分化培养基上的愈伤组织,在激素6-BA/NAA为0.2/1, 0.2/2及0.5/2.5(单位:ppm)的组合上都分化出根,其中以0.2/2的组合分化的根(图6)较早,较好。

至于芽的分化问题,在分化培养基的激素组合中,试验了6-BA/NAA不同比例,与玉米素1 ppm/IAA 2ppm的组合,都未能看到芽的分化,这是值得进一步研究的问题。

### 参 考 文 献

- [1] Power, J.B., E.M. Freason, C. Hayward, George, P.K. Evans, S.F. Berry and E. C. Cocking, 1976; Nature 263; 500—502.
- [2] Power, J.B., S.F. Berry, E.M. Freason and C. Cocking, 1977; Plant Science Letter 10; 1—6.
- [3] 张鉴铭、匡安秀, 1980; 云南植物研究 2(3); 315—318.
- [4] 李文彬、孙勇如、李向辉, 1978; 遗传学报 5(1); 57—60.
- [5] Durand, J., I. Potrykus and G. Donn, 1973; 植物体细胞杂交参考资料, 第一集 100—103页 科学出版社.
- [6] Pelcher, L.E., O. L. Gamborg and K.N. Kao, 1974; Plant Science Letter 3; 107—111.
- [7] Nagata, T. and I. Takebe, 1971; Planta 99; 12—20.
- [8] Kao, K.N., 1977; M G G 150; 225—230.

## SEVERAL BETTER MEDIA FOR CULTURING MESOPHYLL PROTOPLASTS OF PETUNIA HYBRIDA

Zhang Jian-ming

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

### Abstract

The paper reports that growth of isolated *Petunia hybrida* mesophyll protoplasts cultured in eight different media was compared. The protoplasts underwent cell wall regeneration, followed by repeated cell division and developed into colonies in all used media. Calli were obtained in six kinds of these media. Both medium G composed by ourselves and modified medium K are excellent. Their plating efficiency was raised to 56% and 70% respectively.

Effect of some plant hormones on growth and differentiation of the callus was tested. Some hormone combination effected greatly on growth of the callus. Roots had differentiated from the calli in some media containing hormones,