

# 由黄瓜子叶原生质体得到愈伤组织及根形成

马蓉丽 (译)

作为新的作物育种法,在细胞选择,细胞融合、遗传因子导入等的细胞水平上的育种技术发展很快,原生质体培养就是这一基础技术之一。有关原生质体培养,在茄科和十字花科作物上已经有许多报导,由原生质体得到再生植株比较容易,但在黄瓜等葫芦科作物上的研究很少,培养困难。

本文为了阐明黄瓜原生质体的基本培养条件,用子叶进行了原生质体的分离培养,下面是有关结果。

把黄瓜(*Cucumis Sativus* L. 品种:玉金促成)种籽,在70%酒精中浸泡1分钟,再用有效盐浓度0.5%的次氯酸钠浸泡30分钟,然后在10%的过氧化氢中浸泡20分钟,表面杀菌后,用灭菌水清洗三次。把灭菌种籽放在加有8g/LBCP(日水制药)的培养基上,在25℃、16小时光照条件下培养,促进发芽、生育,大约1周后,在含CPW无机盐0.5M甘露醇的无机盐溶液,将展开的子叶切碎,放入含0.05%果胶酶Y-23、1%纤维素分解酶(RS)、0.5%葡聚糖硫酸钾、0.5MCPW无机盐溶液、PH为5.8的酶液中,在27℃、80rpm条件下往复振荡两个小时,然后将含有原生质体的酶液,用165目不锈钢筛网过滤,再以100×g离心3分钟后,回收沉淀物原生质体。在CPW无机盐溶液里悬浮、离心、回收的操作反复进行三次,完全除掉酶液。洗干净的原生质体,以 $2 \times 10^5$ /ml的密度悬浮在甘露醇里。

原生质体培养基,是把MS培养基的无机盐稀释2倍、添加0.5M甘露醇作为基本培养基,其激素NAA、BA以及zip浓度的配制如表1(略)所示。原生质体在黑暗处培养三周、观察初期分裂,把分裂物转入甘露醇浓度终止0.25M的培养基上,在16小时光照(5000lux)下培养2~3周,促进细胞团形成。把生长到直径0.5mm左右的细胞团,转移到相同激素浓度的0.8%琼脂的MS培养基上,在16小时光照下(光照强度同上),培养3~4周,形成了愈伤组织。在生长到2mm以上大小的细胞团中,调查愈伤组织形成率。为了从愈伤组织上诱导再生植株,把在NAA0.5mg/L+BA0.5mg/L及NAA2.5mg/L+BA0.5mg/L的培养基上形成的愈伤组织,转到NAA+BA、IAA+BA+GA<sub>3</sub>、IAA+玉米素、2.4-D+BA的复合MA培养

基上,在25℃、16小时光照(强度同上)条件下培养。

在本试验的酶处理条件下,原生质体大量地酶解出来,每片子叶大约为 $3 \times 10^5$ 个(图1略),所有供试的激素条件,原生质体均能在约第4天开始分裂。在NAA0.5mg/L和zip5mg/L或和BA0.5,2.5mg/L组成的激素条件下分裂率高,在BA,zip两者为0.1mg/L的低浓度条件下分裂率很低。可见,分裂率与NAA浓度无关(表1、图2略)。

关于细胞团形成以后的生育情况,激素组合以NAA+BA为好,NAA+zip的激素组合,是在NAA为0.05mg/L的低浓度时,原生质体的初期分裂能够进行,但以后的分裂停止,以至不能形成细胞团。细胞团培养5~6周、直径达到0.5mm左右时,无论哪个培养基上都是绿色的(图3略,表1)。从移植到不含甘露醇琼脂培养基上的细胞团形成愈伤组织比率可见,细胞团的生育在适当的激素条件下形成率高,特别是在NAA0.5mg/L+zip0.1mg/L、NAA2.5mg/L+BA0.5mg/L的培养条件下形成率高,把原生质体分裂率和愈伤组织形成率相乘比较,算出成活率(表1)。因此得出:原生质体培养的适宜激素条件是NAA+BA,最适浓度是NAA0.5mg/L+BA0.5,2.5mg/L。

根的形成,多认为以NAA+zip的组合较好,试验结果也表明,在NAA0.5mg/L+zip0.1mg/L培养基上,根的形成率高。根也能由2mm以下的细胞团形成,在本试验的激素条件下,反映出根的分化是从早期就开始的。

为了尝试从愈伤组织进行植株再生,我们把在成活率高的NAA0.5mg/L+BA0.5mg/L、NAA2.5mg/L+BA0.5mg/L的培养基上形成的愈伤组织,转移到以IAA、NAA、BA、玉米素、GA<sub>3</sub>各种不同浓度组成的培养基上进行培养,没有得到再生植株。

Orczyk和Malepsy用品种Gy-3,在NAA5mg/L+zip3mg/L的培养基上,得到了由黄瓜原生质体形成的再生植株。本试验用品种“玉金促成”,在同样的激素条件下试验培养,只得到了分裂和细胞团,没有形成再生植株。原因可能是植物体再分化能存有品种间差异所致,和Jia等的黄瓜原生质体培养以及Wehner等的黄瓜子叶愈伤组织培养中得出的结果相吻合。另外黄瓜中即使存有从原生质体能再生植株的品种,其再分化率也不会高,所以选择适当的品种,建立原生质体培养系是很重要的。

在黄瓜原生质体培养中,一般使用子叶或真叶作为原生质体的酶解材料。而在难以培养的水稻上,至今仍是培养细胞来酶解原生质体,形成再生植株。因此有必要就黄瓜原生质体的酶解材料进行研究。(山西省农科院蔬菜所 译自《植物组织培养》(日)6(2)1989 回稿时间1996年11月10日)