

- [9] Rosenstraus, M. J., et al., 1982, *Dev. Biol.*, 89: 516-520.
- [10] Cleaver, J. E., 1967, In "Frontiers of Biology". (E. L. Tatum and A. V. Neuberger, eds.), Vol. pp 245-247.
- [11] Adamson, E. D., et al., 1985, *Differentiation*, 29: 68-76.
- [12] Solter, D., et al., 1971, *Exp. Cell Res.*, 64: 331-334.
- [13] Rayner, M. I. and Graham, C. F., 1982, *J. Cell Sci.*, 58: 331-334.
- [14] Mummery, C. L., et al., 1984, *Dev. Biol.*, 104: 297-307.
- [15] Prescott, D. M., 1976, The reproduction of eukaryotic cells. Academic Press, New York.
- [16] Gamow, E. I., and Prescott, D. M., 1970, *Exp. Cell Res.*, 59: 117-123.
- [17] Streffer, C., et al., 1980, *Cell Tissue Kinet.*, 13: 135-143.
- [18] Sennerstam, R. and Strömberg, J. O., 1984, *Dev. Biol.*, 103: 221-229.
- [19] Sherman, M. I., and Miller, R. A., 1978, *Dev. Biol.*, 63: 27-34.
- [20] Jacob, H., et al., 1973, *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 124 B, 269-282.

## 花烟草叶肉原生质体再生植株

王光远 夏镇澳

(中国科学院上海植物生理研究所)

花烟草是一种观赏植物,染色体数少( $2n=18$ ),植物形态和花型与其他烟草有较大差异,是较好的细胞融合材料。文献中已报道了从花烟草叶肉原生质体再生植株,但都是由愈伤组织分化芽而来<sup>[1,2,3]</sup>;尚未见有经胚状体途径的资料。而这一途径已在多种植物的组织培养中观察到,并越来越多地引起人们的重视。本文报道在花烟草叶肉原生质体培养过程中形成大量球形胚,心形胚,再生成完整植株的结果。

### 材料和方 法

**实验材料** 花烟草(*Nicotiana glauca*) (由中国农业科学院烟草所提供)种子播于温室(日25℃,夜13℃,自然光照),用45天以上苗龄的伸展叶片。取下叶片用肥皂水表面清洗后放入3%漂粉精水溶液内表面灭菌15分钟,无菌水洗涤二次滤纸吸干。撕去下表皮,放入已抽滤的酶液内(酶液组成 EA 3-867 纤维素酶1%,甘露醇0.6 mol/L, pH 5.5),28℃恒温箱内保温4小时;然后过滤,离心,洗涤,用原生质体培养基(NT)制备成 $2.1 \times 10^4$ 个/ml原生质体悬浮液。

原生质体培养基: NT<sup>[4]</sup>培养基,附加2,4-D

2 mg/l, KT 0.25 mg/l, 蔗糖2%,甘露醇0.6 mol/L, pH 6.0。

愈伤组织继代培养基: 改良的MS (MS的大量元素和微量元素, B<sub>5</sub> 维生素), 附加2,4-D 2 mg/l, 蔗糖3%, pH 6.0。(液体培养基中不加琼脂)。

分化培养基: 与上述改良的MS相同, 附加6-BA 2 mg/l, IAA 0.25 mg/l。

### 结果和讨论

**一、原生质体培养** 将制备好的原生质体悬浮液进行浅层培养(图1)。24小时原生质体明显长大,3天后有70%原生质体呈椭圆形。7天出现一次分裂(图2),15天观察到2-3次细胞分裂(图3),5周后观察到细胞团(图4),而且有20%左右的球形而结构紧密的细胞团。将细胞悬浮液移入新鲜NT培养液内继续培养,(甘露醇降低为0.2 mol/L)。组织移入改良的MS眼可见的愈伤组织,把2 mm大小的愈伤组织移入改良MS培养基上继代培养,愈伤组织继续生长一个月后,将愈伤

\* 照片由陈乃先同志帮助拍摄,特此致谢

组织移入改良的 MS 液体培养基中进行悬浮培养(90 转/分),在此条件下细胞迅速生长,球形紧密结构愈伤组织增多,达40—50%,明显增大,肉眼可见(图5)。每15天转接一次新鲜液体培养基,继续培养一个月。在解剖镜下观察,有心形胚,约有10%(图6),未见明显鱼雷胚。然后将悬浮液过滤(100目不锈钢网),将以上球形胚、心形胚组织移入固体分化培养基上。

**二、分化** 上述材料移入分化培养基上培养二个月,出现了又有子叶又有根的苗(图7),出苗率为80%左右。将2厘米高的带有根的苗移入 $\frac{1}{2}$ MS<sub>0</sub>( $\frac{1}{2}$ MS大量元素,微量元素和维生素)固体培养基上继续生长。当苗长到3—4厘米高时移入土壤内盆栽。三个月后全部移栽植株正常开花结实(图8)。以上实验三次重复。

在实验中我们观察到愈伤组织继代培养一年半,紧密球形愈伤组织会逐渐变成疏松,球形结构只有12%。二年后几乎全是疏松愈伤组织,生长较快,细胞已易老化,将这类愈伤组织放在分化培养基上一直未见分化出苗。进行细胞染色体观察,发现有4.2%的细胞染色体数有变化 $2n=36$ 。

从以上结果看出,花烟草叶肉原生质体培养所得的愈伤组织当继代培养较长时间后,细胞会丧失分化能力。因此,用于细胞融合或其他有关研究应当注意选用继代培养时间较短的细胞系为材料。

在实验中,将具有球形胚的愈伤组织放入

MS<sub>0</sub>培养基上没有观察到球形胚诱导出苗,当移入MS分化培养基上培养一个月左右观察到球形胚诱导出子叶和根的分化。这一现象有待进一步研究。

### 摘 要

用自制的纤维素酶(EA 3-867)从花烟草(Nicotiana glauca)叶肉细胞制备大量有活力的原生质体。在NT培养基(内含2,4-D 2, KT 0.25毫克/升)上观察到原生质体长大,分裂,形成愈伤组织。愈伤组织悬浮在含有2,4-D 2 mg/升的MS培养基上诱导出球形胚,移入MS(BA2, IAA 0.2 mg/l)培养基上出苗。小苗移植土壤中正常生长、开花、结实。

### 图 版 说 明

1. 花烟草叶肉原生质体 (10×16×4)
2. 培养7天出现一次分裂 (10×40×4)
3. 培养15—20天出现2—3次分裂 (10×40×4)
4. 培养5周后的细胞团 (10×16×4)
5. 结构紧密的球形愈伤组织 (15×4)
6. 心形胚结构 (40×4)
7. 由原生质体培养分化的子叶苗
8. 由原生质体培养再生完整植株

### 参 考 文 献

- [1] Bourgin J. P., and Missonier, C., 1978, *Z. Pflanzenphysiol.* 87: 55—64
- [2] 张鑑铭, 1981, 植物学报 23(6):496—498.
- [3] 李向辉等, 1982, 遗传 4(3): 33—34.
- [4] 上海植物生理研究所细胞杂交组, 1977, 遗传学报 4(3): 233—241.