

软化菊苣高效原生质体培养及植株再生

陈绪清,李宏潮,杜运鹏,张铭芳,薛 静,杨凤萍,张秀海

(北京农业生物技术研究中心,北京 100097)

摘要:为了进行体细胞杂交和基因工程改造的尝试,采用 10 mL 酶解液处理 12 h,1 g 鲜重叶片游离出 $4.5 \sim 5.9 \times 10^6$ 个原生质体,生活率达 78%~85%。原生质体分别用 3 种培养基进行培养,以软化菊苣种子无菌苗的叶片为起始材料进行了叶肉原生质体分离、培养和植株分化的研究,并建立高频率的植株再生系统。结果表明:最适合培养基为改良 KMP,原生质体的分裂率和植板率分别达到 48.0% 和 27.5%。同时对原生质体培养的时间长度与愈伤组织的胚胎发生能力及植株分化频率进行了试验比较,培养时间 28~41 d 为最佳时间,愈伤组织的胚性(81.2%)和分化率(70.9%)最高;培养时间 42~55 d,胚性愈伤及植株分化的比例分别为 55.0% 和 45.2%;培养时间 56~69 d,愈伤组织的胚性(22.5%)和分化率(16.5%)较差。原生质体再生植株在不含激素的 1/2MS 培养基上,部分植株直接生根,未生根植株转至 1/2MS+IBA 0.3 mg·L⁻¹+0.1% 活性炭可以生根。

关键词:软化菊苣;叶肉原生质体;愈伤组织;胚胎发生;植株再生

中图分类号:S644.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)10-0021-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.10.0021

软化菊苣(*Cichorium endivia* L.)又名法国或比利时茼蒿菜、苞菜,属菊科菊属,为多年生草本植物。软化菊苣原产地中海、亚洲中部和北非,是以嫩叶、叶球或叶芽为蔬菜的野生菊苣的变种,在欧洲素有“皇家菜”之美誉、是 2008 年北京奥运会中选蔬菜之一、被视为蔬菜中的上品;其营养价值高、低热量、水溶性纤维丰富,并且含有其它蔬菜不具备的有益成分,如马栗树皮素、野葛苣甙和山葛苣苦素等苦味物质,具有清肝利胆、祛热败火、降压降脂、开胃健脾、瘦身健美之功效。软化菊苣是利用肉质根中积累的营养经保湿软化栽培而萌发的球芽,除喷水之外,不施肥、不喷药、无污染,是真正无公害的绿色蔬菜。此外,菊苣的花朵呈淡蓝色或蓝色,具有较高的观赏价值。

植物原生质体培养是一种非常有效的研究方法和实验平台,已在细胞生物学、生物技术、生理学、遗传学、病理学、病毒学、育种学、种质资源保存等领域得到广泛应用。原生质体由于没有细胞壁,特别有利于细胞融合或体细胞杂交、遗传转

化、变异体筛选、细胞器的分离与转移以及次生代谢产物提取等研究。自从 20 世纪 80 年代起,国外学者对菊苣的原生质体培养做了许多研究,在软化菊苣的原生质体培养方面取得了一些令人鼓舞的进展^[1]。Rambaud 等人^[2-3]对菊苣原生质体培养的某些影响因素进行了研究,得到了原生质体再生植株;并且采取同源和远缘原生质体之间的融合,分别获得了菊苣的四倍体植株和不育系新种质。Wali-Alami 和 Dubois^[4]研究了软化菊苣的原生质体分离及培养,使原生质体的分离产量获得提高。Varotto 等^[5]采用意大利红菊苣进行了原生质体培养,并获得了再生植株。

国内对菊苣原生质体的研究很少,关于软化菊苣的原生质体培养,尚无成功报道。周海鹏^[6]以多年生牧草菊苣为起始材料,进行了叶肉原生质体的初步培养,观察到了原生质体的多次分裂和转基因的瞬时表达,但未能建立原生质体的再生体系。

本研究目的是建立软化菊苣原生质体培养及植株分化的再生方法和技术体系。本文从种子无菌植株的叶片分离出原生质体,经过离体培养,获得了高频率的细胞分裂和植株再生,建立了软化菊苣的原生质体再生体系。

1 材料与方法

1.1 材料

起始试验材料为软化菊苣种子,由北京蔬菜

收稿日期:2017-08-19

项目资助:北京市农林科学院科研创新能力建设专项资助项目(KJCX20150204)

第一作者简介:陈绪清(1972-),男,湖北省大冶市人,博士,副研究员,从事植物生物技术研究。E-mail:chenxuqing@baafs.net.cn。

通讯作者:张秀海(1972-),男,山东省枣庄市人,博士,副研究员,从事植物生物技术研究。E-mail:zhangxiuhai@baafs.net.cn。

工程研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 种子无菌苗培养 在超净工作台内,软化菊苣种子经过流水冲洗 30 min 后,转入 75%乙醇中处理 30 s,用无菌水冲洗 2~3 次,种子再经过优氯净灭菌 30 min,无菌水泡洗 4 次待用。已灭菌的种子沥干水后,接种于萌发培养基 1/2MS+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 7 g·L⁻¹(单位下同)培养,培养条件为 25℃、光照周期 16 h·d⁻¹、光照强度 25 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2.2 原生质体分离和收集 取种子无菌苗的叶片、或生长健壮的组培苗叶片,除去叶片的中央主脉及叶缘后,叶片纵切成为 2~3 mm 的细条,1 g 叶片放入 10 mL 酶解液中,并于 30~40 r·min⁻¹ 的平板摇床上处理 12 h,酶解的条件为无光照、30~32℃。酶解液组份包括:1.0% 纤维素酶 R-10、0.5% 果胶酶 R-10、10 mmol·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 0.7 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 10% 甘露醇、0.1% MES(2-(N-吗啉)乙磺酸),酶解液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤灭菌。酶解处理结束后,酶解产物分别用 200 目和 400 目不锈钢筛过滤,在 1 000 r·min⁻¹ 下离心 8 min,收集原生质体。获得的原生质体用 10 mL 改良 CPW 洗液,在 500 r·min⁻¹ 下离心 5 min,用玻璃吸管弃除上清液及细胞碎片,再加入 10 mL CPW 洗液离心;此过程重复 3 次,得到洁净的原生质体。改良 CPW 洗液的组份为:10 mmol·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 0.7 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 10% 甘露醇、0.1% MES, pH 5.8。

原生质体的分离产量采用血球计数板计数和统计。原生质体的活力按照荧光素双醋酸酯(Fluoresceindiacetate, FDA) 染色法测定。

1.2.3 原生质体培养 用液体培养基将原生质体重新悬浮,吸取 0.1 mL 在倒置显微镜下,利用“血球计数板”统计原生质体数量(4 次重复并取平均值)。根据统计结果,用液体培养基将原生质体的培养密度调整为 15 000 个·mL⁻¹。

为了筛选适宜的培养基配方,比较了 3 种原生质体培养基,分别为:

(1)改良 MS: MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹+谷氨酰胺 380 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+甘露醇 60 g·L⁻¹;

(2)PM1b: PM1+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹+蔗糖 5 g·L⁻¹+甘露醇 80 g·L⁻¹[7];

(3)改良 KMP: KMP+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹+葡萄糖 30 g·L⁻¹+甘露醇 40 g·L⁻¹+谷氨酰胺 380 mg·L⁻¹。

采取的 2 种培养方式为:

(1)浅层液培,2.0 mL 原生质体加入直径 6 cm 的无菌培养皿;

(2)包埋培养:2.0 mL 1.5% Ca-alginate 包埋原生质体。

培养皿均用 Parafilm 封口膜密封,置于 26℃,无光照培养。周期性更换环绕的原生质体培养基,用于诱导细胞团和小愈伤组织的发育。培养 14~27 d 后,将原生质体产生的细胞团和小愈伤组织转至固体培养基上,诱导和繁殖愈伤组织和胚状体;培养条件为:温度为 24℃,光周期为 10 h·d⁻¹,光照强度 10 μmol·m⁻²·s⁻¹,时间为 21~41 d。挑选直径大于或等于 1.0 cm 的愈伤组织和胚状体,移至分化培养基 B5+6-BA 0.15 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹+琼脂 7 g·L⁻¹ 进行器官分化和植株再生培养,诱导再生芽;分化培养的条件为:温度 24℃,光周期 16 h·d⁻¹,光照强度 25 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2.4 原生质体植株的生根培养 将株高 2 cm 或以上的较大植株转移到生根培养基 1/2MS+IBA 0.3 mg·L⁻¹+活性炭 1.0% 上诱导形成根系,生根培养的条件为:温度 22℃,光周期 16 h·d⁻¹,光照强度 25 μmol·m⁻²·s⁻¹。

2 结果与分析

2.1 原生质体分离

原生质体的酶解产量较高,1 g 鲜重叶片可以分离出 4.5~5.9×10⁶ 个原生质体,与前人的报道结果相近[2,7]。洗涤及纯化后的原生质体近球形、细胞质丰富、液泡化程度低(见图 1),生活率达 78%~85%。

2.2 原生质体培养

原生质体培养后 1 d 再生细胞壁,4~6 d 后出现第一次分裂,7~12 d 渐入分裂高峰期(见图 2,图 3,图 4),13~14 d 后细胞团(大约含 6~10 个细胞)进入生长盛期(见图 5),15~20 d 后,出现含 20~30 个细胞的较大细胞团或小愈伤组织(见图 6)。

2.3 3 种培养基比较

3 种培养基对菊苣原生质体的分裂率和植板

率进行了比较,试验结果(4次重复的平均值)表明,改良 KMP 的培养效率最高,PM1 次之,改良 MS 的效率最低。从表 1 可见,使用改良 KMP 获得的原生质体分裂率比改良 MS 高 4~5 倍、植板率高 5 倍多;改良 MS 的培养效果最差,不适用于软化菊苣的原生质体培养;培养基 PM1 得到的分裂率和植板率虽比 Nenz 等^[7]报道的结果低一些,但仍然是较高频率的,比改良 MS 高 3~4 倍,此培养基也具有使用价值。

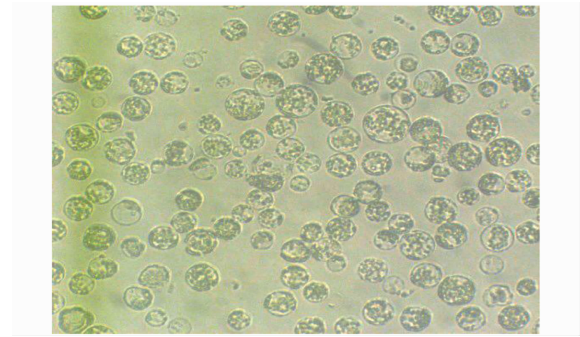


图 1 新分离的原生质体(放大倍数×400),培养第 0 天
Fig. 1 Freshly isolated protoplasts (magnification×400), the day right after isolation

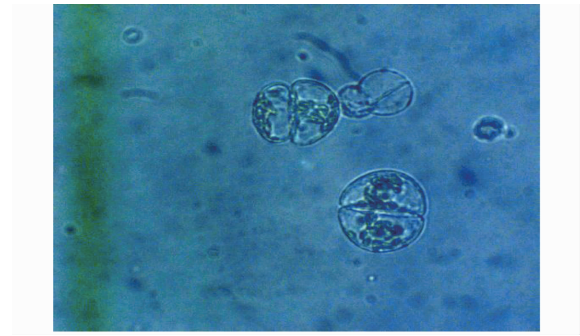


图 2 原生质体第一次分裂(放大倍数×400),培养第 5 天
Fig. 2 First division segregation of protoplast, on the 5th day after culture(magnification×400)

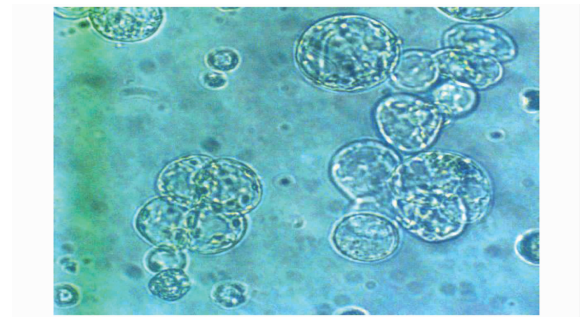


图 3 原生质体第二次分裂(放大倍数×400),培养第 7 天
Fig. 3 Second division segregation of protoplast(magnification×400), on the 7th day after culture(magnification×400)

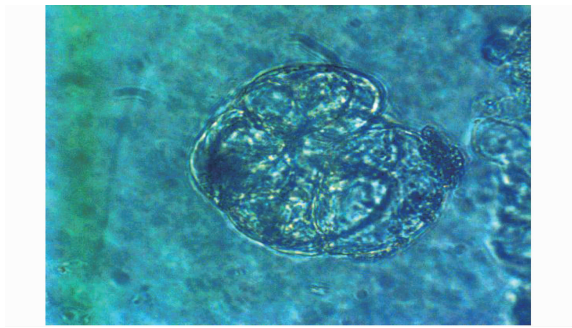


图 4 原生质体多次分裂形成的小细胞团(放大倍数×400),培养第 10 天

Fig. 4 A small cell aggregate derived from multi-division of protoplast, on the 10th day after culture(magnification×400)

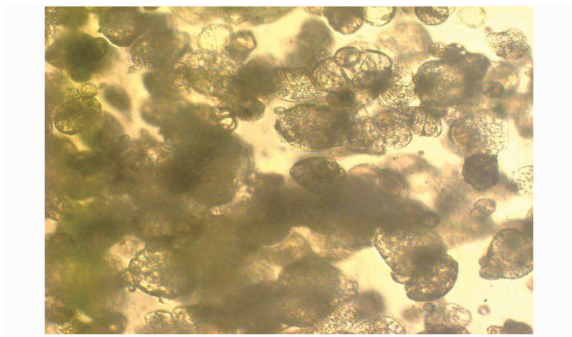


图 5 原生质体产生的细胞团(放大倍数×200),培养第 14 天
Fig. 5 Cell aggregates derived from dividing protoplasts, on the 14th day after culture (magnification×200)

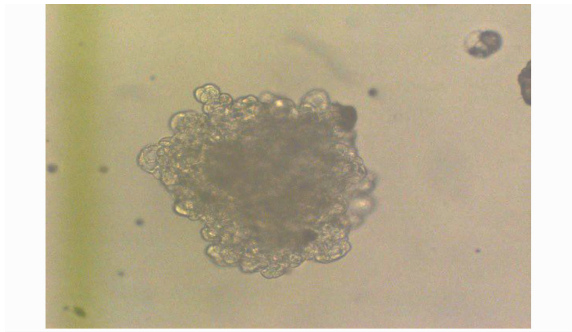


图 6 原生质体产生的大细胞团(放大倍数×100),培养第 19 天

Fig. 6 A protoplast-derived colony, on the 19th day after culture(magnification×100)

2. 4 愈伤组织繁殖与植株分化

2. 4. 1 原生质体产生的愈伤组织繁殖 软化菊苣原生质体培养 28~69 d 后,形成大量的愈伤组织,每培养皿 500~2 000 块或更多(见图 7)。培养后 28~41 d 形成的愈伤组织的质量好,胚性高,达到 78. 1%~84. 0%;42~55 d 形成的愈伤

组织生长快,繁殖系数高,但是其胚性有所下降,达 40%~50%;56~69 d 形成的愈伤组织的生长速度慢,繁殖系数低,胚性愈伤组织的百分率很低,只有 20%~25%。

表 1 3 种原生质体培养基比较

Table 1 Comparison of three media in protoplast culture of chicory(*Cichorium endivia* L.)

培养基 Medium	培养密度/ (个·L ⁻¹) Culture density	分裂率/% Division	植板率/% Plating efficiency
改良 KMP Modified KMP	1.5×10 ⁴	48.0±2.0	27.5±2.5
PM1	1.5×10 ⁴	39.0±2.1	22.0±1.0
改良 MS Modified MS	1.5×10 ⁴	11.5±2.5	5.5±0.5

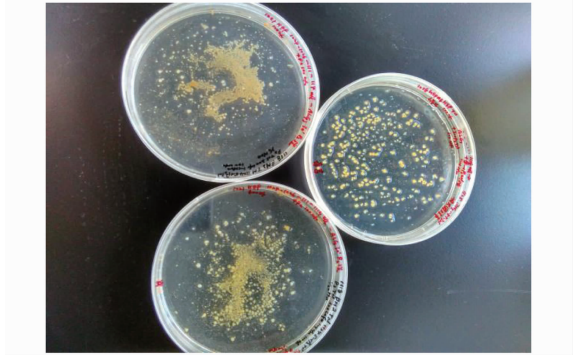


图 7 原生质体产生的小愈伤组织(放大倍数×1), 培养第 21 天

Fig. 7 Protoplast-derived calli, on the 21th day after culture(magnification×1)

2.4.2 原生质体植株分化 菊苣原生质体的植株分化与愈伤组织的继代繁殖时间以及愈伤的胚性高低有密切关系。培养后 28~41 d 形成的愈伤组织的质量好,胚性高(78%~84%),植株分化频率高(见表 2,图 8,图 9),达到 67%~75%,再生的小植株生长快速而健壮;42~55 d 形成的愈伤组织生长快,繁殖系数高,但是其胚性频率有所下降(50%~60%),其植株分化率也随之降低(40%~50%);56~69 d 形成的愈伤组织的质量较差,胚性很低(20%~25%),植株分化率只有 15%~18%,其再生植株生长缓慢而瘦弱。

2.4.3 原生质体植株的生根 原生质体再生植株在不含激素的 1/2MS 培养基上,68%~75%植

株可以直接生根,4 次重复的平均生根率为 69.5%;未生根的植株转移至 1/2MS + IBA 0.3 mg·L⁻¹+0.1% 活性碳的诱导生根培养基,87%~94% 植株诱导出根,平均生根率达 90.8%。

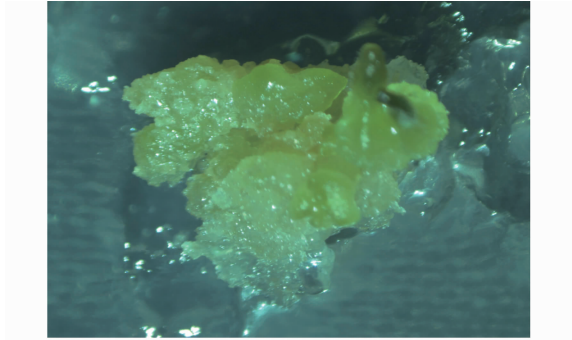


图 8 原生质体产生的胚性愈伤组织(放大倍数×10), 培养第 28 天

Fig. 8 Embryogenic callus formed from protoplast, on the 28th day after culture(magnification×10)

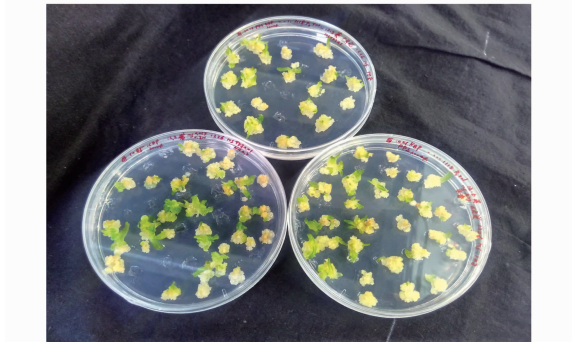


图 9 原生质体再生植株(放大倍数×1),培养第 35~42 天

Fig. 9 Protoplast-regenerated plants, on the 35th~42th day after culture(magnification×1)

表 2 软化菊苣原生质体植株分化

Table 2 Plant regeneration from protoplasts of chicory (*Cichorium endivia* L.)

愈伤组织繁 殖时间/d Growth period of callus	愈伤组织 数/块 Number of callus	胚性频率/% Frequency of embryogenic callus	植株分化 频率/% Frequency of plant regeneration
28~41	20	81.2±3.1	70.9±4.1
42~55	20	55.0±5.0	45.2±5.4
56~69	20	22.5±2.5	16.5±1.5

软化菊苣原生质体的植株分化试验为 4 次重复,表中结果为平均值。
Data represent average ± S. E. of four replicates.

3 结论与讨论

培养基是影响菊苣原生质体的生长和发育的关键因素之一,本文比较了3种基础培养基的培养效果。Nenz等^[7]采用PM1b获得了最高的原生质体分裂率和植板率,优于其它试用培养基;但是,在本研究中,PM1b并非最佳培养基,其培养效果低于改良KMP。KMP是植物原生质体培养最常用的培养基之一,其配方已经商品化,配制非常方便,利用市销KMP基础培养基的固体粉,对其配方进行了一些改良,获得了最理想的培养结果。

原生质体产生的愈伤组织在继代繁殖过程中,其繁殖速度、胚胎发生能力和植株分化频率均可能发生变化,而且与培养时间密不可分。本研究中,原生质体培养28~41 d,愈伤组织的胚性及分化频率均为最高,是最佳培养时期,但由于愈伤组织增值时间比较短,胚性愈伤的数量有限;培养42~55 d,原生质体形成的胚性愈伤和植株分化率虽有下降,但增值时间长,繁殖的愈伤组织数量大,再生的植株总数多,也是比较适宜的培养时期。

采用本文报道的方法及技术参数,从原生质体的分离至植株再生的培养全过程,有可能在

35~42 d完成,而且,操作方法比较简洁,重复性好,培养效率高,具有实用价值。此方法在国内是首例成功的报道,可以为软化菊苣的细胞工程育种和基因转化等研究提供一定的技术支撑。

参考文献:

- [1] Crepy L, Chupeau M-C, Chupeau Y. The Isolation and Culture of Leaf Protoplasts of *Cichorium intybus* and Their Regeneration into Plants[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982, 107(2): 123-131.
- [2] Rambaud C, Dubois J, Vasseur J. Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdebourg chicory (*C. intybus* L. var. magdebourg) [J]. AGRIS, 1991: 767-772.
- [3] Rambaud C, Dubois J, Vasseur J. Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 87(3): 347-352.
- [4] Wali-Alami F, Dubois J. Protoplast culture of *Cichorium intybus* L. Witloof chicory: improvement in protoplasts yield[J]. Plant Physiol, 1988, 26: 210-211.
- [5] Varotto S, Lucchin M, Parrini P. Plant regeneration from protoplasts of Italian red chicory (*C. intybus* L.) [J]. Journal of genetics & breeding, 1998, 51(1): 17-22.
- [6] 周海鹏. 菊苣原生质体培养及瞬时表达体系的建立[D]. 西安: 西北大学, 2015.
- [7] Nenz E, Varotto S, Lucchin M, et al. An efficient and rapid procedure for plantlet regeneration from chicory mesophyll protoplasts[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 62(1): 85-88.

High Frequency Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts in Chicory (*Cichorium endivia* L.)

CHEN Xu-qing, LI Hong-chao, DU Yun-peng, ZHANG Ming-fang, XUE Jing, YANG Feng-ping, ZHANG Xiu-hai

(Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing 100097)

Abstract: In order to make attempts on somatic hybridization and gene transformation, a procedure for high frequency plant regeneration from chicory (*Cichorium endivia* L.) mesophyll protoplasts was developed by using leaves of an *in-vitro* seedling culture as starting materials. Protoplasts with yields of $4.5 \sim 5.9 \times 10^6$, were routinely released from one gram fresh leaf which was digested in 10 mL of an enzyme solution for 12 h. After careful rinsing and purification, viability of protoplasts ranged from 78% to 85%. With the aim at selecting a suitable culture medium, three different media were employed to compare their efficiency in protoplast culture. The results showed that the medium "modified KMP" proved the best, leading to highest rates in cell division (48.0%) and plating efficiency (27.5%), respectively. It was found the length of culture period affected either embryogenesis or regeneration of protoplasts, optimal period was 28~41 d resulting in highest percentages of both embryogenic callus (81.2%) and regeneration (70.9%), followed by 55.0% and 45.2% obtained from sub-optimal period 42~55 d, while poor rates (22.5% and 16.5%) occurred in prolonged period 56~69 d. A part of plantlets regenerated from protoplasts were able to root on hormone-free 1/2MS, whereas rests produced roots after transfer upon the rooting medium 1/2MS + IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 0.1% active charcoal.

Keywords: *Cichorium endivia* L.; mesophyll protoplast; callus; embryogenesis; plant regeneration