

‘陇东’紫花苜蓿原生质体最佳分离条件

陶茸, 师尚礼*, 李玉珠, 李剑锋

甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州730070

摘要: 以‘陇东’紫花苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’)下胚轴愈伤组织为材料, 研究酶液组合、酶解时间、酶液渗透压、愈伤组织继代培养时间及预处理措施对原生质体分离效果的影响。结果表明: 获得产量最高(8.8×10^5 个 $\cdot g^{-1}$)、活力最高(88.55%)的原生质体最佳酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶、酶解时间为10 h、酶液渗透压即甘露醇浓度为 $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 愈伤继代培养天数为12 d、预处理措施为4 °C、黑暗条件下放置24 h。

关键词: ‘陇东’紫花苜蓿; 下胚轴; 愈伤组织; 酶解条件; 原生质体

Study on Protoplasts Isolation Conditions of *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’

TAO Rong, SHI Shang-Li*, LI Yu-Zhu, LI Jian-Feng

Sino-U.S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Hypocotyl callus of wild *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’ was used to study the effect of enzyme combination, enzymolysis time, osmotic pressure, subculture time and pretreatment measures on protoplast isolation. The result showed that the optimum enzyme solution combination for the highest yield ($8.8 \times 10^5 \cdot g^{-1}$) and viability (88.55%) of protoplast were as follow: 2% cellulase + 0.5% pectinase + 0.3% driselase, the optimum enzymolysis time was 10 h, the optimum enzyme osmotic pressure (*viz.* mannitol concentration) was $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the optimum subculture time was 12 d and the optimum pretreatment measure was 24 h in dark at 4 °C.

Key words: *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’; hypocotyls; callus; enzymolysis conditions; protoplast

‘陇东’紫花苜蓿为甘肃陇东、定西发现的野生紫花苜蓿, 主要分布于半阴湿山区山脚地带, 该野生种为根茎型, 主根不明显, 发达的地下茎可萌发出许多地上枝条, 单株覆盖面积大, 地上茎平卧生长, 分枝能力强, 分枝数多于栽培种28% (王亚玲等2008), 这些性状已被研究证实与耐寒、耐牧等抗逆性有关, 适宜黄土高原地区用作水土保持、防风固沙、固坡护土(张雪婷和师尚礼2009)。因此, ‘陇东’紫花苜蓿是具有重要开发潜力的苜蓿种质资源。野生苜蓿相对于栽培苜蓿而言, 具有更强的抗逆性和适应性, 是改良苜蓿种质的重要遗传资源。但野生苜蓿比较少见, 至今通过品种登记的有黄花苜蓿(*Medicago falcate*)和阿勒灰杂花苜蓿(*M. aleze*) (刘英俊等2004)。原生质体是植物遗传改良的重要实验体系之一, 原生质体在无性杂交、细胞生理学和植物病毒学、遗传转化等研究领域有着重要的应用。该技术可以克服远缘杂交的困难, 实现不同种属植物间基因组或特异染色体的融合。在植物转基因育种应用中, 去壁的

原生质体更容易导入外源目的基因, 创造出新的种质资源。而取得数量大且活力高的原生质体是这些研究得以顺利开展的前提(李杰等2003; 黄百渠1991)。本研究以‘陇东’紫花苜蓿为研究对象, 在建立稳定优质的下胚轴愈伤组织体系的基础上, 研究影响其原生质体分离效果的因素, 确定能够酶解出有活力且产量高的原生质体酶解条件, 为其为材料进行体细胞杂交奠定基础。

材料与amp;方法

1 试验材料

‘陇东’紫花苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’)无菌苗下胚轴培育所得的最佳愈伤组织由甘肃农业大学草业学院草业生态系统教育部重点

收稿 2011-03-01 修定 2011-04-12
资助 农业部公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-022)和现代农业产业技术体系建设专项资金。

* 通讯作者(E-mail: shishl@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7632493)。

实验室提供, 获得过程如下: 将种子在98%硫酸溶液中浸泡15 min, 蒸馏水冲洗, 用滤纸吸干种子表面水分后, 放入70%乙醇中振荡30~60 s, 再用0.1% HgCl₂ 消毒10 min, 无菌水清洗4~7次, 置于不含激素的MS固体培养基上。无菌种子在(25±1) °C、12 h光照下培养7~12 d后, 长出幼苗。剪取幼苗下胚轴接种到(MS+2.0 mg·L⁻¹; 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ KT)的愈伤组织诱导培养基上(王娟等2009)。培养2~3个月选疏松、质密、颗粒状明显的浅绿色愈伤组织作为酶解材料(图1-A)。

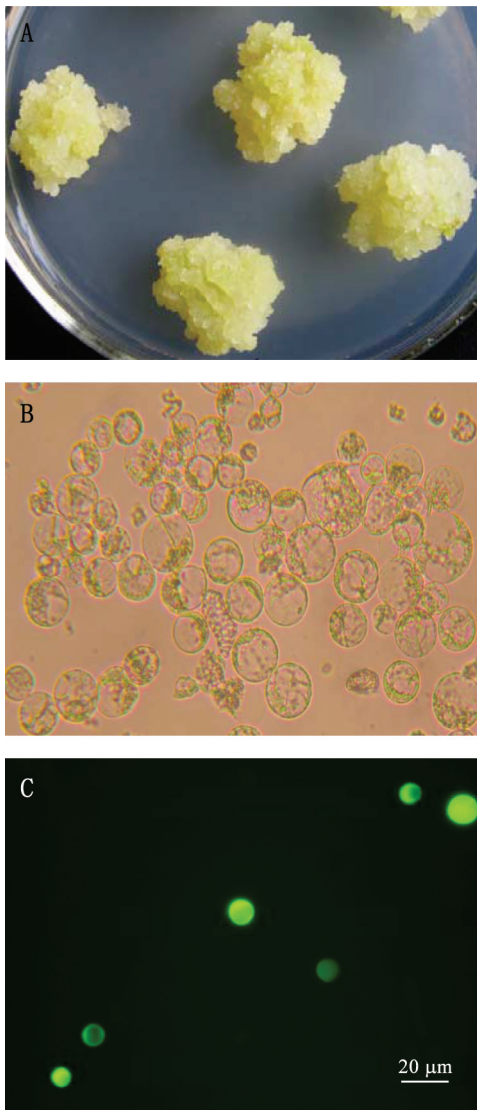


图1 原生质体分离图片

Fig.1 The picture of the isolated protoplasts

A: 用于分离原生质体的愈伤组织; B: 游离出的原生质体; C: 荧光检测下的原生质体。

2 试验方法

2.1 原生质体分离纯化

取1 g左右的材料, 置于盛有10 mL混合酶液的三角瓶(50 mL)中, 在(25±1)°C的摇床中以50 r·min⁻¹的转速于黑暗条件下酶解6~16 h。酶解后的材料经100、400目无菌尼龙网筛过滤以除去没有酶解完全的组织 and 细胞团。滤液在500 r·min⁻¹的转速下离心7~10 min收集原生质体。用CPW-10溶液悬浮, 再离心, 重复操作2~3次。最后用原生质体培养液(KM8P培养基)洗涤2次, 得到纯化的原生质体(王海波和玉永雄2006; 姜淑慧等2006)。

2.2 最佳酶种类和浓度组合的选择

实验设置了5个酶处理组合(表1), 各处理的酶均溶于CPW-10溶液(成分见表2, 赵小强2009), 调节pH值为5.8~5.9后(以下同)以直径0.45 μm的微孔滤膜过滤灭菌后备用。将材料置于不同酶处理组合中酶解12 h, 完成酶解后测定分离出原生质体的

表1 分离原生质体的酶液组合配方

Table 1 The concentration and combination of enzyme for isolating protoplasts

酶液种类	处理号				
	M1	M2	M3	M4	M5
纤维素酶(Cellulase Onozuka R-10)/%	2	2	2	2	2
果胶酶(Pectinase Y-23)/%	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
半纤维素酶(Hemi-cellulase Onozuka)/%		0.3			0.3
离析酶(Macerozyme R-10)/%			0.3		0.3
崩溃酶(Driselase)/%			0.3	0.3	

表2 CPW-10溶液组成

Table 2 The composition of CPW-10 solution

成份	浓度/mg·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	27.2
KNO ₃	101
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 480
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246
KI	0.16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
MES	1 066
Mannitol	1.0×10 ⁵

产量及活力, 以其产量和活力均为最高的酶组合定为最佳酶液组合(赵红娟等2008)。

2.3 最佳酶解时间、酶液渗透压、继代培养时间及预处理措施的选择

材料在优化出的最佳酶组合中进行酶解, 设置酶解时间为6、8、10、12、14、16 h共6个处理梯度。确定最佳酶解时间后, 将材料分别放入甘露醇浓度为0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70 mg·L⁻¹的最佳混合酶液中进行酶解。将愈伤组织更换新鲜继代培养基, 分别培养4、6、8、10、12、14、16 d后, 以已确定的最佳酶解条件参数进行酶解。在进行酶解之前对材料进行预处理, 可以改善细胞及细胞壁的生理状态, 提高原生质体产量和细胞活力, 实验在酶解前选择状态及质量一致的材料, 分别对其进行不同的预处理(表3), 以通常培养条件为对照(CK)。以上完成酶解后分别测定所分离出原生质体的产量及活力, 以确定最佳酶解条件(Gao等2007; Zhang等2007; 金红等2002; 白静仁等1994)。

表3 酶解材料预处理措施

Table 3 Different pretreatment of tested material

处理号	处理条件
1	温度(25±1)℃、黑暗条件下放置24 h
2	温度4℃、黑暗条件下放置24 h
3	温度(25±1)℃、CPW-10溶液中浸泡1 h
4	温度(25±1)℃、0.55 mol·L ⁻¹ 的蔗糖溶液中浸泡1 h
CK	温度(25±1)℃、光强为40 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ 、光照周期16 h

2.4 原生质体产量及活力测定

产量测定: 利用血球计数板计数。吸取少量纯化后的原生质体悬浮于血球计数板上, 在显微镜下观察计数, 统计原生质体的产量, 重复3次。计数时一定要保持显微镜载物台的水平, 不能倾斜, 逐次计算中央大方格内25个中方格里的细胞, 然后再根据下式求出每毫升中的原生质体数(朱至清2003)。

1 mL悬浮液中的原生质体数=1个大方格悬浮液(0.1 mm³, 即0.1 μL)中的细胞数×10⁴。

原生质体的产量(个·g⁻¹)=原生质体的密度(个·mL⁻¹)×原生质体悬浮液的总体积(mL)/材料总质量(g)。

活力测定: 用荧光染料荧光素双醋酸盐(fluo-

rescein diacetate, FDA)活体染色, 对原生质体活力进行染色鉴定。FDA用丙酮配制成5 mg·mL⁻¹溶液, 然后按照25 μL (FDA)·mL⁻¹进行染色。吸取1滴原生质体悬浮液置于载玻片上, 在荧光显微镜下检测其活性。用FDA进行染色静置5 min后观察, 随机选取3个视野统计原生质体的数量(朱至清2003)(图1-B、C)。

原生质体存活率(%)=(有活力的原生质体数/原生质体总数)×100。

2.5 数据处理

用SPSS软件进行数据分析。

实验结果

1 酶液的种类、浓度组合对原生质体分离的影响

当酶液pH=5.8, 甘露醇浓度为0.55 mol·L⁻¹时, 采用不同酶组合分离材料原生质体12 h, 并比较5种酶液组合处理(表1)对材料原生质体分离效果的影响。由图2可以看出: 5种酶液对分离出的材料原生质体产量和活力影响均比较大, 在M1中原生质体产量5.6×10⁵个·g⁻¹, 活力51.55%, 均最低; M4中产量7.33×10⁵个·g⁻¹, 活力76.80%, 均为最高, 产量比M1处理高了23.6%, 活力比M1处理高了25.25%; 不同酶液中分离出的原生质体产量有差异: M4与

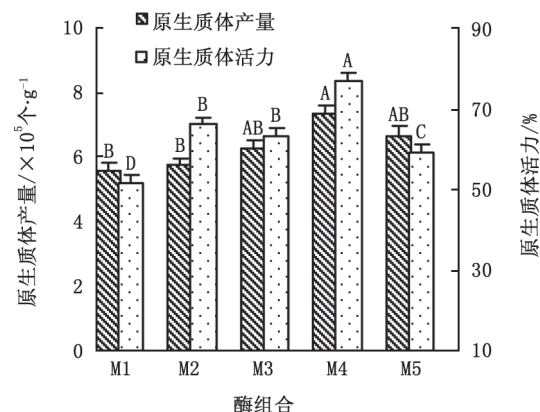


图2 酶组合对‘陇东’紫花苜蓿原生质体分离的影响

Fig.2 Effects of different enzyme combinations on *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’ protoplast isolation

M1为2%纤维素酶+0.5%果胶酶; M2为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%半纤维素酶; M3为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%离析酶; M4为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶; M5为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%离析酶+0.3%崩溃酶+0.3%半纤维素酶; 甘露醇浓度为0.55 mol·L⁻¹; 酶解时间为12 h; pH=5.8。同一测定项目不同大写字母表示在0.01水平上差异显著, 图4、6同。

M1和M2之间均存在极显著差异($P<0.01$, 下同), 但M4与M3和M5之间差异不显著; 不同酶液中分离出的原生质体活力也差异: M4与其余处理均有极显著差异。M2与M3之间差异不显著, 但他们都与M5差异极显著。M5与M1差异也极显著。从产量和活力两方面综合可得, 适宜‘陇东’紫花苜蓿下胚轴愈伤组织原生质体分离的酶组合是M4 (2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶)。

2 酶解时间对原生质体分离的影响

酶解时间是影响原生质体分离的关键因素。实验在筛选出的最佳酶组合条件下比较了不同酶解时间对材料原生质体产量和活力的影响(图3)。由图3可见, 随着酶解时间的延长, 原生质体的产量迅速升高, 达到最大值后又迅速下降; 其活力随酶解时间的延长变化比较平稳。酶解6~10 h被分离出的原生质体产量迅速增加, 10 h时产量 6.75×10^5 个 $\cdot g^{-1}$ 最高, 活力75.4%也最高, 且分离出的原生质体边缘清晰, 内含物多。酶解时间超过10 h后, 被分离出的原生质体产量迅速降低, 并伴有大量碎片产生, 原生质体活力也明显降低。酶解时间达到16 h时, 分离出的原生质体溶液中明显伴有大量碎片, 活力63.29%最低。结合酶液组合对原生质体分离效果的影响, 其最佳的酶解时间定为10 h。

3 甘露醇浓度对原生质体分离的影响

作为渗透压调节物质, 酶液中甘露醇的浓度

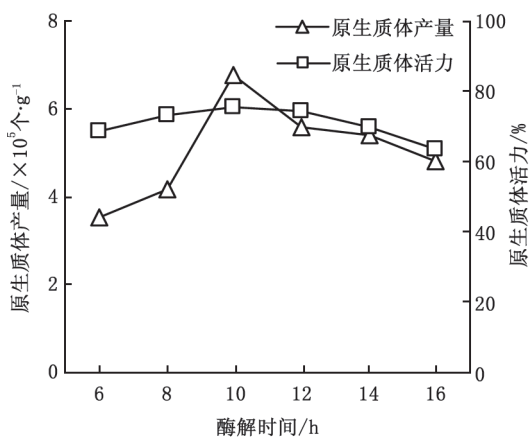


图3 酶解时间对‘陇东’紫花苜蓿原生质体分离的影响

Fig.3 Effects of different enzymolysis time on *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’ protoplast isolation

酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶; 甘露醇浓度为 $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH=5.8。

直接影响材料原生质体的分离效果。将材料置于最佳酶液组合中酶解最佳时间。结果表明, 当甘露醇浓度为 $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 原生质体的产量 8.8×10^5 个 $\cdot g^{-1}$ 最高, 活力次之, 且分离出的原生质体的形状、大小基本一致, 边缘清晰, 内含物多, 碎片少(图1-B); 高于或低于这一浓度原生质体产量均有所下降, 其中低于该浓度的处理下降得较明显。甘露醇浓度为 $0.60 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时被分离出的原生质体活力88.55%最高, 与 $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时没有极显著差异; 但其产量较低, 与 $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时存在极显著差异(图4)。故适宜‘陇东’紫花苜蓿下胚轴愈伤组织原生质体分离的甘露醇浓度为 $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 继代培养时间对原生质体分离的影响

愈伤组织的状态和质量影响到原生质体的分离效果。在以上确定的最佳酶解条件下, 愈伤组织不同继代培养时间对材料原生质体分离效果影响如图5所示, 继代培养4~12 d期间, 其原生质体的产量呈现迅速上升的趋势, 活力呈现依次缓慢上升的趋势, 到第12天时产量 8.27×10^5 个 $\cdot g^{-1}$ 和活力84.15%, 都最高。此时分离出的原生质体浓度, 形状大小较一致。12 d之后的处理, 被分离出的原生质体产量和活力均下降。在第14天时, 其原生质体产量和活力都呈现下降趋势。在第16天时, 其原生质体产量 6.02×10^5 个 $\cdot L^{-1}$ 和活力79.2%都明显下降。可见, ‘陇东’紫花苜蓿下胚轴愈伤组织最佳

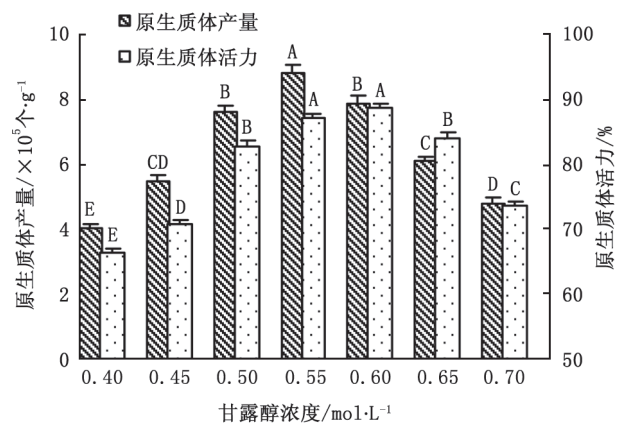


图4 甘露醇浓度对‘陇东’紫花苜蓿原生质体分离的影响

Fig.4 Effects of different mannitol concentration on *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’ protoplast isolation

酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶; 酶解时间为10 h; pH=5.8。

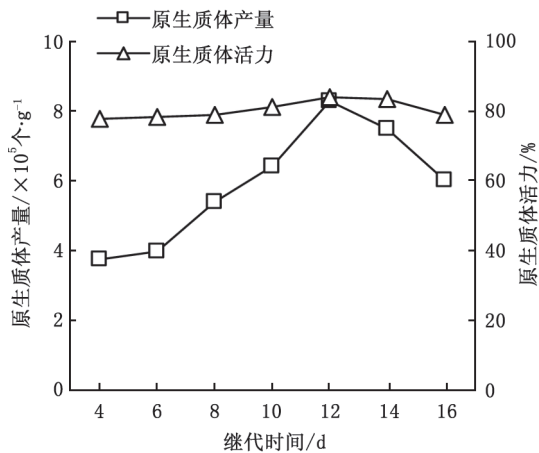


图5 ‘陇东’紫花苜蓿愈伤组织继代培养时间对原生质体分离的影响

Fig.5 Effects of callus age on *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’ protoplast isolation

酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶;甘露醇浓度为0.55 mol·L⁻¹;酶解时间为10 h; pH=5.8。

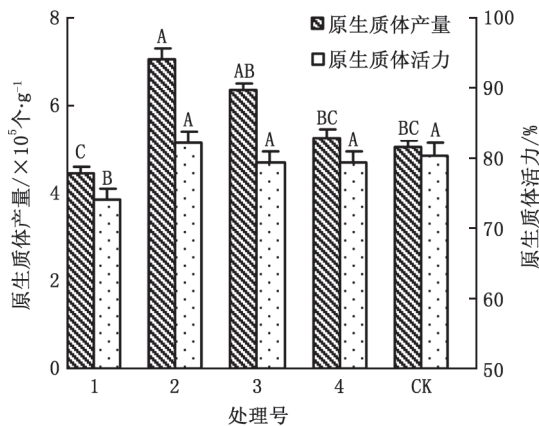


图6 不同预处理对‘陇东’紫花苜蓿原生质体分离效果的差异比较

Fig.6 Comparison in *Medicago sativa* L. cv. ‘Longdong’ protoplast isolation from different pretreatment

酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶;甘露醇浓度为0.55 mol·L⁻¹;酶解时间为10 h; pH=5.8。

酶解的继代培养时间是12 d。

5 预处理措施对原生质体分离的影响

材料的预处理措施对原生质体分离有一定程度的影响。在最佳酶解条件下,不同预处理间材料的原生质体分离效果存在较明显的差异。在4℃、黑暗条件下放置24 h (2号)后,分离出的原生质体产量 7.07×10^5 个·g⁻¹和活力82.05%都最高,均比

对照分别高出28.3%和1.61%,且产量与对照处理分离出的原生质体产量存在极显著差异,活力与1号处理分离的原生质体活力差异显著。2、3、4号处理与对照在原生质体活力上均无差异,1号处理的原生质体活力与对照有差异,但比对照80.44%低。可见2号处理最利于提高愈伤组织原生质体分离的产量和活力,可做为最佳预处理措施。

讨 论

1 酶液的种类、浓度和酶解时间

分离原生质体时,最适的酶液种类、浓度和酶解时间因植物的种类不同有很大差异。本试验研究结果:当酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶,酶解时间为10 h时,最有利于‘陇东’紫花苜蓿下胚轴愈伤组织原生质体的分离;与王海波、白静仁等以苜蓿为材料制备分离原生质体的最佳酶液种类和浓度及酶解时间的研究结果有所不同,这可能由于试验材料的不同所致(赵红娟等2008;金红2002)。实验表明, M4酶液组合在所设计的浓度范围内最有利于材料原生质体的分离,即将酶解材料置于M4酶液组合中酶解10 h后,其分离出的原生质体产量 7.33×10^5 个·g⁻¹和活力76.8%都最高;而在M1处理中可能由于酶液的种类偏少,所分离出的原生质体产量 5.6×10^5 个·g⁻¹和活力51.55%都最低。同时,本研究发现不同的酶解时间对原生质体的产量和活力影响较大:酶解时间较短不便于原生质体的分离,酶解时间过长会导致原生质体活力下降,不利于以后原生质体的培养,酶解时间过长会导致更多分离出的原生质体破碎,本试验中酶解时间长于10 h后,所分离出的原生质体产量和活力均有所降低。

2 甘露醇浓度、继代培养时间及预处理措施

去掉细胞壁的原生质体对渗透压很敏感。渗透压适当,可使原生质体保持圆球状态;渗透压过高,原生质体收缩,影响生活力;渗透压过低会导致原生质体膨大甚至破裂。在本实验中,甘露醇浓度为0.55 mol·L⁻¹时,分离出的原生质体产量和活力都较高。

愈伤组织的生长状况也会影响到原生质体的分离效果。研究表明,愈伤组织在新鲜培养基上

继代培养12 d时,处于旺盛生长期,此时大部分材料较疏松、质密、颗粒状明显,最有利于原生质体的分离,分离出的原生质体产量和活力都比较高。在酶解细胞壁前,为使酶解效率增加,一般先用高渗液处理细胞,使细胞处于微弱的质壁分离状态,有利于完整原生质体的释放。为了改善细胞及细胞壁的生理状态,提高原生质体产量和细胞活力,实验采用了4种预处理措施。结果表明,酶解材料在4种预处理措施中,材料在酶解前置于温度4℃、黑暗条件下放置24 h后可有效提高原生质体的产量和活力,与对照相比产量提高了28.3%,活力提高了1.61%。

参考文献

- 白静仁,何茂泰,袁清,萨仁,李永干(1994). 野生黄花苜蓿叶肉原生质体培养和植株再生. 草地学报, 2 (1): 59~63
- 黄百渠(1991). 植物体细胞遗传学简明教程. 长春: 东北师范大学出版社, 95~96
- 姜淑慧,管荣展,董海滨,杜文明(2006). 播娘蒿愈伤组织原生质体培养体系的研究. 草业学报, 15 (4): 94~98
- 金红(2002). 三种豆科牧草的原生质体培养及体细胞杂交[博士论文]. 西安: 西北大学, 20~27
- 李杰,黄敏仁,王明麻,蔡汝(2003). 植物原生质体培养和体细胞融合技术研究进展. 仲恺农业技术学院学报, 16 (4): 64~71
- 刘英俊,云锦凤,王俊杰,张明,洪杰(2004). 野生黄花苜蓿栽培驯化研究. 中国草地, 26 (6): 40~44
- 王海波,王永雄(2006). 紫花苜蓿原生质体游离条件的研究. 中国草地学报, 28 (5): 33~37
- 王娟,李玉珠,陶茸,赵小强,师尚礼(2009). 陇东地区野生紫花苜蓿植株再生体系的建立. 植物生理学通讯, 45 (12): 1177~1180
- 王亚玲,师尚礼,焦亮(2008). 陇东野生紫花苜蓿的生态特征. 草业科学, 25 (1): 55~58
- 王瑛华,陈刚,贾敬芬,郝建国(2009). 霸王的原生质体培养及植株再生研究. 草业学报, 18 (3): 110~116
- 张雪婷,师尚礼(2009). 陇东野生紫花苜蓿的遗传特异性分析. 草地学报, 17 (3): 343~348
- 赵红娟,张博,陈爱萍,李培英,肖燕(2008). 酶解对苜蓿子叶原生质体分离效果的影响. 草地学报, 16 (1): 50~53
- 赵小强(2009). 草地早熟禾原生质体培养及体细胞杂交[硕士论文]. 甘肃: 甘肃农业大学, 32~40
- 朱至清(2003). 植物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 25~26
- Gao Z, Dai SX, Chen SL, Shen X, Wang RG (2007). Isolation of protoplast from callus of *Populus euphratica* and H⁺ fluxes across plasma membrane under NaCl stress. For Stud China, 9 (3): 198~202
- Zhang Y, Gong SF, Wang JG, Che DD (2007). Research on protoplast preparation and culture in *Gladiolus hybridus* Hort. J Northeast Agric Univ, 14 (1): 5~8