

马蹄金子叶原生质体的分离技术

严寒 田志宏*

长江大学生命科学学院, 荆州 434025

Techniques for Isolation of Protoplast from Cotyledon of Creeping Dichondra (*Dichondra repens* Forst.)

YAN Han, TIAN Zhi-Hong*

College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025

提要 分离马蹄金无菌苗子叶的原生质体的结果表明, 光下生长12 d的子叶置于含2%纤维素酶和0.8%果胶酶的酶解液中酶解9 h后, 游离原生质体的产率和活力分别为 2.75×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)和90%, 酶解液中渗透剂——甘露醇的浓度以 $0.5 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 为最适宜。

关键词 马蹄金; 子叶; 原生质体分离

马蹄金(*Dichondra repens* Forst.)为旋花科马蹄金属的多年生蔓性常绿草本, 是优良的地被兼观赏植物^[1]。马蹄金有性繁殖较难, 不易结实, 其品种改良在一定程度上受到了制约, 而生物技术育种则为克服这一障碍开辟了一条可能的新途径。我们实验室已经建立了马蹄金的组织培养植株再生体系^[2,3], 这是开展原生质体培养和融合及转基因工作的基础。原生质体是研究细胞生理现象的理想材料, 也是遗传转化的理想受体^[4]。有关马蹄金原生质体的研究国内外未见报道。本文以马蹄金无菌苗子叶为材料, 对其原生质体的制备条件进行了研究, 旨在为马蹄金原生质体水平上的遗传转化、突变体筛选以及体细胞融合育种提供必要的技术途径。

材料与方法

马蹄金(*Dichondra repens* Forst.)种子系从美国引进, 由中国种子集团公司草业有限责任公司提供。无菌苗培养参照前文^[3]的方法稍作改进。取适量的马蹄金种子, 先用自来水洗净表面的包衣剂, 至露出褐色表皮, 再用洗洁精清洗1次后于流水中冲洗10 min, 而后用70%酒精消毒30 s, 再以0.1% HgCl_2 浸泡12 min, 最后用无菌水冲洗3次, 接种于MS培养基^[5]中, 分别置于黑暗处及光照下萌芽和生长。培养温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光照度 $0.028 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

原生质体游离参照前文^[6,7]的方法并作一些修

改。取萌发不同时间(6、8、10、12、14、16 d)的马蹄金无菌苗子叶约1 g, 将其用解剖刀切成 $0.5 \sim 1 \text{ mm}$ 宽的小条, 置于盛有CPW-13M(含13%甘露醇)溶液^[8]的培养皿(直径7.5 cm)中, 在室温下质壁分离 $0.5 \sim 1 \text{ h}$ 。然后换入10 mL酶解液, 放在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 摇床上遮光轻轻摇动($50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)酶解。酶解液成分为: 分别将一定含量的纤维素酶(cellulase, Onozuka R-10)、半纤维素酶(hemicellulase, Sigma)和果胶酶(pectinase, Fluka)溶解在含有一定甘露醇浓度的CPW溶液中, 并附加 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小牛血清白蛋白(BSA)和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)。待酶完全溶解后, 调节pH值为5.7, 然后通过直径 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤灭菌。

在原生质体酶解过程中, 每隔2 h在倒置显微镜下观察一次, 以观察到原生质体的平均密度较前1 h不再增加为最适酶解时间。以最适酶解时间时所观察的酶解液与游离原生质体混合液中原生质体占原生质体、细胞团和单细胞总含量的百分比来探讨较好的酶解条件。酶解充分后, 用 $50 \mu\text{m}$ (300目)孔径的尼龙网过滤酶解分离的原生质体, 将滤液收集到10 mL的尖底离心管中, 以500

收稿 2004-04-07 修定 2004-11-09

资助 湖北省重点科技发展计划项目(992P0603)和湖北省教育厅重大项目(992007)。

* 通讯作者(E-mail: hntzh@263.net, Tel: 0716-8066858)。

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 再用 CPW-9M (含 9% 甘露醇) 溶液洗涤 2 次, 将留下的原生质体悬浮于 2 mL CPW-9M 溶液中, 然后在另一只 10 mL 的尖底刻度离心管中加入 8 mL CPW-21S (含 21% 蔗糖), 在此液面上缓缓加入上述的 2 mL 原生质体悬浮液, 再以 $500 r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。这时, 在两个液面中间出现一条绿色原生质体带 (图 1), 用吸管小心地吸出漂浮于溶液界面间的原生质体。最后, 用原生质体培养液清洗 1 次, 即可获得纯化的马蹄金子叶原生质体 (图 2)。

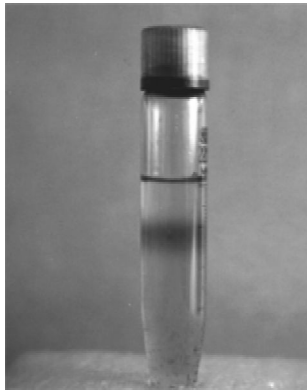


图1 界面离心形成的原生质体带

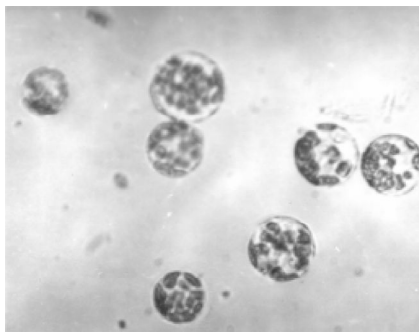


图2 纯化的原生质体

原生质体产量用 0.1 mm 血球计数板计数统计, 单位为: 个 (原生质体) $\cdot \text{g}^{-1}$ (子叶), 原生质体活力用 0.1% Evans 蓝染色测定。

结果与讨论

1 子叶叶龄和光照条件对原生质体游离的影响

图 3 和 4 表明, 从光下培养生长的马蹄金无茵苗子叶游离的原生质体, 无论是产量还是活力

都比黑暗下的高。在光照条件下生长的马蹄金子叶游离原生质体的产量和活力的峰值出现在十二天龄时, 分别为 1.45×10^6 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ (FW) 和 89%; 超过十二天龄的子叶, 其游离的原生质体个体较大, 活力较差。而黑暗条件下生长的马蹄金子叶游离原生质体的产量和活力的峰值则出现在十天龄时, 分别为 0.52×10^6 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ (FW) 和 64%。这可能与黑暗条件下原生质膜发育不好和液泡化有关。因此, 马蹄金无茵苗子叶生长时的光照条件和发育时期是获得高产量和高活力原生质体的一个重要因素。

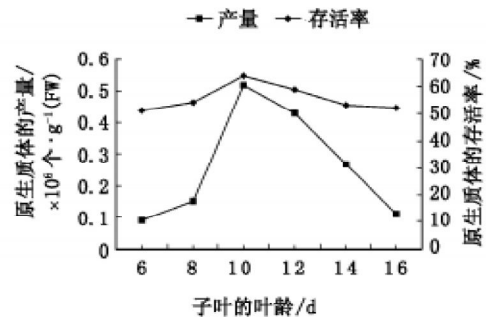


图3 黑暗条件下不同叶龄子叶的游离原生质体的产量和活性

酶解液含 2% 纤维素酶、0.5% 果胶酶和 CPW-9M, 酶解 10 h 后观察结果。

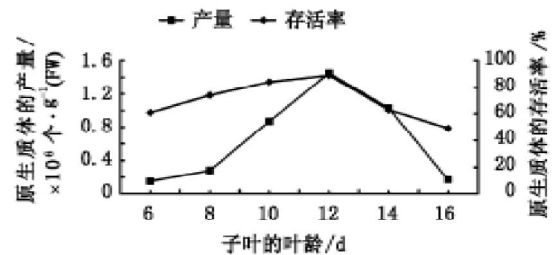


图4 光照条件下不同叶龄子叶的游离原生质体的产量和活性

酶解液含 2% 纤维素酶、0.5% 果胶酶和 CPW-9M, 酶解 10 h 后观察结果。

2 不同酶的浓度组合对游离原生质体产量的影响

采用不同浓度的纤维素酶、果胶酶和半纤维素酶组合酶解光照条件下萌芽生长的十二天龄的无茵苗子叶, 其游离原生质体的产量明显不同。从表 1 可见, 纤维素酶浓度以 2% 为宜, 过高 (3%) 或过低 (1%) 对游离原生质体的产量均有不良影响。果胶酶浓度则以 0.8% 较为合适。半纤维素

表1 不同酶的浓度组合对原生质体产量的影响

酶解液编号	纤维素酶浓度 /%	果胶酶浓度 /%	半纤维素酶浓度 /%	产量 / $\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)
ES1	1	0.5	0.5	0.70
ES2	1	0.5	0	0.79
ES3	1	0.8	0.5	0.82
ES4	1	0.8	0	0.75
ES5	2	0.5	0.5	1.25
ES6	2	0.5	0	1.43
ES7	2	0.8	0.5	1.86
ES8	2	0.8	0	2.26
ES9	3	0.5	0.5	0.30
ES10	3	0.5	0	0.35
ES11	3	0.8	0.5	0.29
ES12	3	0.8	0	0.27

表中数据为(26 \pm 1) $^{\circ}C$ 、黑暗条件下酶解 10 h 后观察的结果。

酶对原生质体的游离是不必要的, 当纤维素酶浓度为 2%、果胶酶浓度为 0.8% 时, 添加 0.5% 的半纤维素酶反而使游离原生质体的产量降低, 酶解液中原生质体的碎片较多, 可能是酶解液中酶的浓度过高的原因。

3 不同酶解时间对原生质体游离的影响

用 2% 纤维素酶和 0.8% 果胶酶组合对光照条件下萌芽生长的十二天龄的无菌苗子叶进行原生质体游离。开始酶解后 3、5、7、9 和 11 h, 观察的酶解效果明显不同。表 2 显示, 当酶解时间为 3 h 时, 只有极少量的原生质体释放; 随着酶解时间的延长, 原生质体的产量逐渐增高, 酶解 9 h 时, 其产量达到最高; 当酶解 11 h 时, 原生质体的产量又逐渐下降, 酶解液中碎片较多, 说明原生质体产量下降是最早游离的原生质体大量破碎所致。

表2 不同酶解时间对子叶原生质体游离效果的影响

酶解时间/h	原生质体产率/ $\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)
3	0.03
5	0.23
7	1.57
9	2.75
11	2.18

4 不同浓度渗透压稳定剂——甘露醇对游离原生质体产率的影响

在原生质体游离过程中, 将十二天龄的绿色子叶用含 2% 纤维素酶和 0.8% 果胶酶的酶解液酶

解, 在不同浓度渗透压稳定剂——甘露醇的条件下, 游离原生质体产率明显不同(图 5)。在 0.3~0.5 mol $\cdot L^{-1}$ 的甘露醇范围内, 原生质的产率明显上升, 0.5 mol $\cdot L^{-1}$ 时达到最大[2.75 $\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)], 活性为 90%。游离的原生质体形状、大小基本一致, 胞质浓, 内含物丰富, 叶绿体清晰可见(图 2)。随着浓度的进一步升高, 其产率逐渐下降。故我们采用 0.5 mol $\cdot L^{-1}$ 的甘露醇(CPW-9M) 作为渗透压稳定剂。

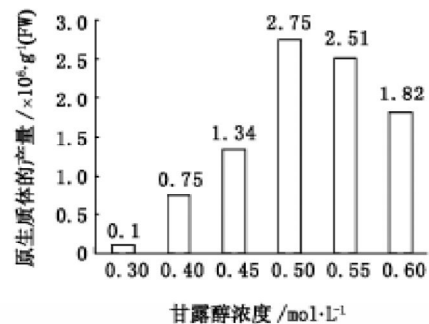


图5 不同浓度甘露醇对子叶原生质体产量的影响
(26 \pm 1) $^{\circ}C$ 、黑暗条件下酶解 9 h 后统计。

总之, 原生质体分离极大程度地受到供体组织、细胞壁降解酶及渗透压稳定剂等因素的影响^[4]。单子叶植物原生质体游离大多采用的是胚性悬浮细胞, 而双子叶植物中无菌苗的各个部分都是理想的供体材料。茄科植物一般选用幼嫩的叶片分离原生质体, 十字花科植物选用下胚轴较好, 而在豆科植物中以未成熟胚的子叶游离的原生质体得率

高、活力强。本文仅选用了马蹄金无菌苗子叶游离原生质体,以光照条件下萌发生长的十二天龄的子叶效果为好,但并未与其它外植体作对比。降解高等植物细胞壁一般由纤维素酶、果胶酶及半纤维素酶中的一种或者多种配合使用。纤维素酶Onozuka R-10具有较强的纤维素酶及一定的果胶酶的活性,一般情况下与一定量的果胶酶配合使用效果更佳。试验表明,马蹄金无菌苗子叶在含2%纤维素酶和0.8%果胶酶的酶解液中进行酶解9 h后,游离原生质体的产率和活性均较高,且酶解液中渗透压稳定剂——甘露醇的浓度以 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。供体组织经过酶解后除得到大量的完整原生质体外,酶解液中还会有一些未消化的细胞团以及破碎的细胞,这将对原生质体培养产生不良影响,因此可选择界面离心法纯化原生质体,整个操作过程要细心,动作不要过大。由于 CaCl_2 是普遍使用的原生质膜稳定剂,MES可以刺激原生质体的释放,BSA可以减少或防止降解细胞壁过程中对细胞器的破坏,适量加入这些

原生质膜稳定剂后,可以分离到较高产率和高活性的原生质体。

参考文献

- 1 韩烈保,杨碚,邓菊芬. 草坪草种及其品种. 北京: 中国林业出版社, 1999. 175~176
- 2 田志宏,严寒. 马蹄金的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 481
- 3 田志宏,严寒,李秋杰等. 马蹄金愈伤组织诱导及植株再生研究. 华中农业大学学报, 2003, 22(4): 403~407
- 4 周维燕主编. 植物细胞工程原理与技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 163~180
- 5 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~497
- 6 Tian Z, Meng J. Plant regeneration from cultured protoplasts of *Moricandia nitens*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1999, 55(3): 217~221
- 7 田志宏,孟金陵. 甘蓝型油菜原生质体培养及植株再生的研究. 中国油料作物学报, 2002, 24(2): 10~13
- 8 Frearson EM, Power JB, Cocking EC. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol*, 1973, 33: 130~137

风范永存

——纪念《植物生理学通讯》公开发行人第一任主编倪晋山先生逝世二周年

陈因

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

毕生淡泊明志,博古通今,对事业勤勤恳恳,不浮不躁,探赜索隐,取精用弘,处处以完美为度,可谓儒林典范。

一世安贫乐道,殚见洽闻,做学问兢兢业业,慎独慎行,穹源竟委,务实求真,事事唯严谨是从,堪称学界楷模。