

大豆叶肉细胞原生质体的游离和培养

罗希明 简玉瑜

(吉林省农业科学院大豆所)

植物体细胞杂交由于能通过不同科、属、种植物原生质体融合和引入外源遗传物质,具有改良植物经济性状和创造植物新类型的可能和巨大潜力,而引起国内外广泛注意。这一研究的首要环节是,必须获得大量的原生质体,并促进原生质体再生植株。近十多年来,这方面的研究发展迅速,目前原生质体可以从许多植物中游离出来,有三十多种植物的原生质体通过培养再生成完整植株。

大豆是重要的经济作物。大豆原生质体培养方面的研究已进行多年,许多学者作了大量工作,从根的培养细胞(Kao, 1970)⁽³⁾,根(许智宏, 1982)⁽⁷⁾,叶(Schwenk, 1981和Gamborg, 1983)^(2, 5),荚(Zing和Outka, 1980)⁽⁶⁾,幼嫩子叶(简玉瑜, 1983)⁽¹⁾,实生苗子叶(吕德扬, 1983)和下胚轴培养细胞(Gamborg等, 1983)⁽⁵⁾游离出原生质体。目前只从荚皮、根和幼嫩子叶获得愈伤组织并见根的分化^(6, 7, 1),至今未见大豆原生质体再生植株的报道。

从大豆培养细胞中获得原生质体比较容易,能经过分裂产生多细胞团,但是分化出苗很困难,因此很有必要扩大大豆其它组织的原生质体来源,加速大豆原生质体的分化。而叶肉细胞是一个容易获得遗传学上一致的细胞来源。目前大豆叶肉细胞原生质体培养国内外还未最后获得成功,虽然大豆叶肉细胞原生质体游离国外曾有报道^(2, 5),但是没有详细地研究大豆叶肉细胞原生质体游离与培养的密切关系。本文报道从大豆叶肉细胞游离出大量原生质体并找到了适合这种原生质体培养的最佳酶解条件,游离的原生质体经培养已再生壁,目前正在培养之中,并初步探讨了大豆叶肉细胞原生质体游离与培养的关系。

材 料 和 方 法

供试材料为大豆(*Glycine Max* L.)吉林3号、吉林8号、吉林13号。大豆植株生长在装有石英砂的花盆中,用Hoagland营养液浇灌,温度控制在25℃左右,室内自然光照和湿度。取5--20日龄的真叶及由较嫩到较老的复叶,在0.9%次氯酸钠溶液中灭菌6分钟,用无菌水冲洗3~4次。用刀片将豆叶切碎放入渗透稳定剂,振荡30分钟,用60微米不锈钢网过滤,离心(1000转/分)6分钟收集单细胞,然后将单细胞放进酶液和原生质体培养基混合液(1:1)中酶解1~10小时,每小时观察一次,细胞密度为 $1-2 \times 10^6$ 个/5ml,放在室温(25℃)摇床下(60rpm)暗酶解。

混合酶液为:0.05~0.2%Pectolyase Y-23(果胶酶之一种),0.4%纤维素酶Onozuka R-10,8%甘露醇,0.12%CaCl₂·2H₂O, pH5.7。

渗透稳定剂为:8%甘露醇,0.12%CaCl₂·2H₂O, pH5.7。

原生质体培养基为：①SH培养基 (Schwenk, 1981)⁽²⁾；②高国楠原生质体培养基 (Kao, 1982)⁽⁴⁾；③改良“②” (本试验改动②中的糖成分)。

酶解后，离心 (1000rpm, 4~6分钟) 收集原生质体，用原生质体培养基连续冲洗4次，然后将原生质体重新用培养基形成0.01—0.2%悬浮液，再滴入Falcon 1007塑料培养皿中，悬滴培养。培养皿用石蜡膜封口，在25℃暗光塑料盒内培养。

结果 和 分 析

一、叶龄

不少学者强调植株的生长环境、叶片的大小和生理状态等条件影响原生质体的产量，但有的作者认为植株的年龄不是原生质体产量的关键因子。本试验采用5~20日龄的真叶和从嫩绿色到深绿色较老的复叶，分别作8个大小不同叶片的处理：①5~7日龄真叶；②8~10日龄真叶；③11~13日龄真叶；④14~16日龄真叶；⑤17~20日龄真叶；⑥嫩绿色未平展的幼嫩复叶；⑦刚平展的复叶；⑧深绿色较老复叶。(叶片的叶龄由出苗之日算起) 分别用4个酶浓度：①0.05% Pectolyase Y-23 (果胶酶的一种) 加0.4%纤维素酶Onozuka R-10；②0.1% Pectolyase Y-23加0.4%纤维素酶Onozuka R-10；③0.15% Pectolyase Y-23加0.4%纤维素酶Onozuka R-10；④0.2% Pectolyase Y-23加0.4%纤维素酶Onozuka R-10；进行酶解1—10小时，其原生质体产量详见图1。结果发现在本试验条件下8~10日龄的真叶和刚平展的复叶经过酶解产生的原生质体最多，可达90%以上。因此可以认为：在本试验条件下叶龄与原生质体产量关系极大，叶龄为8~10天的真叶及刚平展的复叶是游离叶肉细胞原生质体的最佳材料。

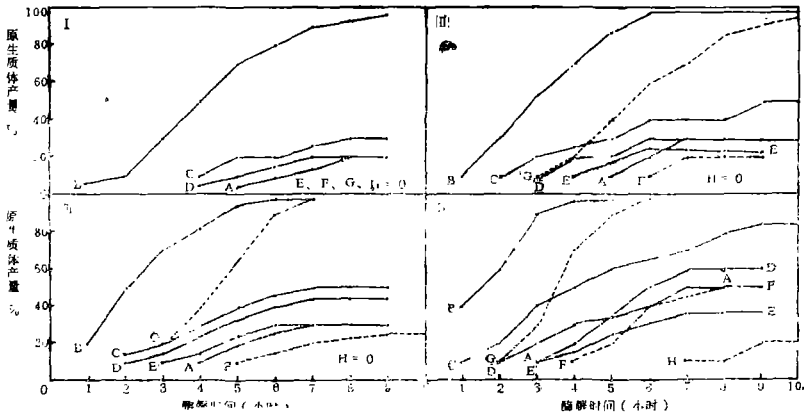


图1 大豆吉林8号真叶及复叶不同叶龄原生质体产量

说明：叶日龄由出苗日算起。A=5~7日龄真叶，B=8~10日龄真叶，C=11~13日龄真叶，D=14~16日龄真叶，E=17~20日龄真叶，F=嫩绿色未平展复叶，G=刚平展复叶，H=深绿色较老复叶。

混合酶浓度：I、0.05% Pectolyase Y-23+0.4% Cellulase,

II、0.1% Pectolyase Y-23+0.4% Cellulase,

III、0.15% Pectolyase Y-23+0.4% Cellulase,

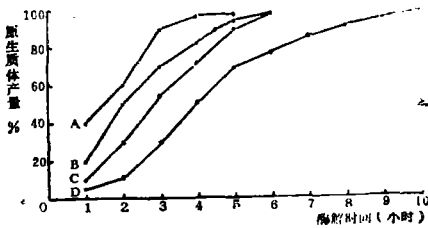
IV、0.2% Pectolyase Y-23+0.4% Cellulase.

Cellulase为纤维素酶Onozuka R-10.

二、原生质体游离

混合酶的种类及其浓度是游离原生质体的关键问题之一。本试验分别用：0.1~2%果胶酶Pectinase, 0.2~4%纤维素酶Onozuka R-10, 0.4~2%半纤维素酶Sigma, 0.3~1%离析酶 Macerozyme R-10和0.05—0.2% Pectolyase (果胶酶之一)游离上述不同叶龄的叶片。其结果是：果胶酶Pectinase, 纤维素酶Onozuka R-10, 半纤维素酶Sigma, 离析酶Macerozyme R-10, 单独及它们的交叉混合酶液均不能游离出上述不同叶龄的叶片的叶肉细胞原生质体, 而只有用Pectolyase Y-23和纤维素酶 Onozuka R-10 适当浓度的混合酶液可游离出8~10日龄真叶及刚平展复叶的大量叶肉细胞原生质体。

用不同浓度的混合酶：0.05% Pectolyase Y-23和0.4% 纤维素酶 Onozuka R-10, 0.1% Pectolyase Y-23和0.4%纤维素酶Onozuka R-10, 0.15% Pectolyase Y-23和0.4%纤维素酶 Onozuka R-10, 0.2% Pectolyase Y-23和0.4%纤维素酶 Onozuka R-10, 酶解8—10日龄真叶及刚平展复叶, 得出不同的原生质体产量(图1中4条B线和3条G线)。将图1中4条B线移入图2, 根据图2中a、b、c、d四点(原生质体产量达90%)可计算出酶浓度与酶解时间的相关系数 $r = -0.954$, 经过显著性测定为“显著”。可以看出酶浓度与酶解时间呈负相关, 即：酶的浓度越高所需的酶解时间越短, 反之越长。



- A、Pectolyase Y-23浓度为0.2%,
纤维素酶浓度为0.4%;
- B、Pectolyase Y-23浓度为0.15%,
纤维素酶浓度为0.4%;
- C、Pectolyase Y-23浓度为0.1%;
纤维素酶浓度为0.4%;
- D、Pectolyase Y-23浓度为0.05%,
纤维素酶浓度为0.4%;

图2 大豆吉林8号真叶(叶龄8—10天)

在不同酶浓度及酶解时间下原生质体产量

三、原生质体游离与培养的关系

大豆叶肉细胞原生质体游离已获成功。从上述分析中可以看出有多种不同酶浓度(Pectolyase Y-23, 纤维素酶)与酶解时间的处理可产生90%以上原生质体, 但是这些原生质体是否能生长分裂还存在着问题。首先必须尽量降低酶对原生质体的毒害作用, 用低浓度酶液、短时间酶解, 还要不影响原生质体产量。为了更直观地看出两者关系并利用这一关系, 当原生质体产量达90%时, 绘出酶浓度与酶解时间的回归直线(图3)。从直线中可估计到“x'y'”这一区间有可能解决这个问题, 因此, 在“x'y'”区间选择4个处理：①酶浓度为0.15%, 酶解时间为4小时；②酶浓度为0.125%, 酶解时间为5小时；③酶浓度为0.1%, 酶解时间为5小时；④酶浓度为0.1%, 酶解时间为6小时。分别用SH培养基、高国楠原生质体培养基和改良高国楠培养基(本试验将高国楠培养基中的葡萄糖换成8%甘露醇)进行培养, 共十二个处理, 三次重复。试验表明：只有0.15%果胶酶(Pectolyase)Y-23, 0.4%纤维素酶, 酶解4个半小时左右, 用高国楠培养基及改良高国楠培养基, 大豆叶肉细胞原生质体才得到存活。也就是图3中“A”

点。可见“A”点为本试验条件下的最佳点。目前培养的原生质体已再生细胞壁，正在培养之中，而其它的不同处理都不能使原生质体存活，可见游离原生质体的酶浓度与酶解时间是原生质体培养成功与否的关键之一，培养基是另一重要因素。

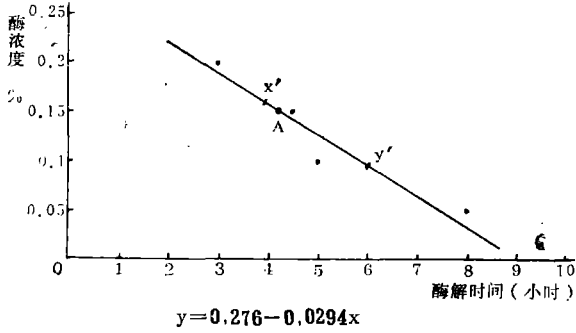
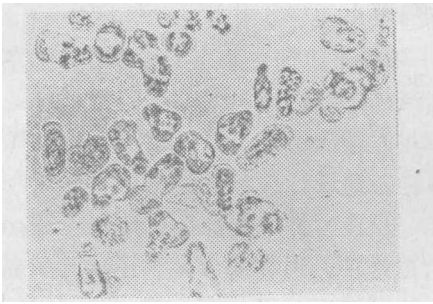


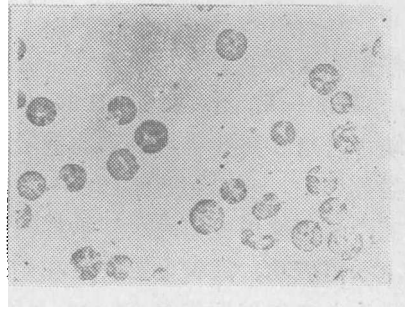
图3 大豆吉林8号真叶原生质体游离的酶浓度及酶解时间的直线关系

本试验叶龄为8~10天；原生质体产量为90%；酶浓度：0.05~0.2% Pectolyase Y-23, 0.4% 纤维素酶 Onozuka R-10。

图片说明：1、机械分离的大豆叶肉细胞



2、游离的大豆叶肉细胞原生质体



参 考 文 献

- (1) 简玉瑜, 大豆科学, 1983, 2(2), 101-103.
- (2) F.W.Schwenk, C.A. Pearson and M.R.Roth: Plant Sci. Lett. 23(1981) 153.
- (3) K.N.Kao, W.A.Keller and R.A.Miller: Exp. Cell Res. 62(1970) 338.
- (4) K.N.Kao, In L.R.Wetter and F.Constabel(Eds.) Plant Tissue Culture Methods, 1982, 52.
- (5) O.L.Gamborg, B. P. Davis and R. W. Stahhut: Plant Cell Reports, 2(1983) 213-215.
- (6) R. G. Zieg and D. E. Outka: Plant Sci. Lett. 18(1980) 105.
- (7) Z. H. Xu, M. R. Davey and E. C. Cooking: Plant Sci. Lett. 24(1982) 111.