

红豆草 (*Onobrychis viciaefolia* Scop)

原生质体的游离和培养*

罗希明 赵桂兰

(吉林省农科院大豆所)

刘艳芝

(吉林省农科院畜牧所)

摘 要

本文报道了红豆草原生质体培养获得多细胞团的研究结果。试验采用红豆草无菌苗的绿色和黄色下胚轴和子叶作原生质体游离的材料。游离的酶液为EM₇(1%半纤维素酶HP150、0.4%纤维素酶R-10、0.1%果胶酶Y-23、CPW 9M、pH=5.8)。游离条件为: 16—18小时、暗处、28℃、15rPm。在试验材料中,黄色下胚轴的原生质体产量最高。将游离出的原生质体放入K8p原生质体培养基中悬滴培养,第3天出现第一次分裂,第15天形成多细胞团。在原生质体培养过程中,必须每隔7天加入新鲜培养基,并逐步降低渗透压。红豆草下胚轴原生质体适于暗处培养。

引 言

红豆草 (*Onobrychis viciaefolia* Scop) 是一种具有优良性状的重要豆科牧草,在我国西北一些省(区)已有大面积种植。国内外的许多学者对红豆草的应用和基础研究已作了大量的工作,以红豆草为材料开展原生质体培养的研究,也越来越受到人们的重视。目前,红豆草叶肉细胞原生质体培养已获得再生植株(Ahuja P.S.1983)^[3]。但在我国还未见到有关研究的报道。为了深入研究红豆草原生质体再生植株技术,使红豆草原生质体高效成株,并探讨应用生物技术来提高牧草的品质和产量,我们对红豆草原生质体的游离和培养进行了研究。

材 料 和 方 法

试验材料为生产上广泛应用的红豆草。种子来源于吉林省农科院畜牧所草原室。从干荚中取出种子,用75%乙醇浸泡1分钟后转入2%次氯酸钠溶液中灭菌10分钟,然后用无菌蒸馏水冲洗3—4次,将灭菌后的种子种植在无激素的MS固体培养基上。无菌苗在两种不同的条件下生长。①无光的培养箱内,温度为25—28℃,幼苗的下胚轴和子叶为黄色;②有光照(1500—2000Lux)的培养箱内,温度为25—28℃,幼苗的下胚轴和子叶为绿色。分别取用7—15天的无菌苗绿色和黄色子叶和下胚轴作游离材料,用刀片切成薄片放在cpw13M^[1]中质壁分离1小时,然后放在混合酶液EM₇中(1%半纤维素酶 hemicellulase HP150, 0.4%纤维素酶 Cellulase Onozuka R-10, 0.1%果胶酶 Pectolyase Y-23, cpw9M、pH 5.8)游离16—18小时。游离条件为:暗处,28℃,

* 在作试验计划时得到简玉瑜先生的指导,在此深表谢意。

15转/分。游离出来的原生质体用c_pw⁹M洗3次，第4次用c_pw⁹M: k₈p = 1 : 1溶液冲洗，然后用300目镍丝网过滤原生质体，离心收集（1000转/分）。用k₈p原生质体培养基（Kao, 1977），以10³—10⁴个/ml的密度悬滴在塑料培养皿中，用石蜡膜封口，放在培养箱内培养（暗，28℃）。每隔7天加入新鲜培养基，每次加液降低一次渗透压：k₈p和k₈（Kao, 1977）分别采用2 : 1，1 : 1，1 : 2，0 : 1。当形成多细胞球时加入k627—1（Kao, 1977）培养基。培养到第7—8天时，取出一部分培养物放在光（1000—1500Lux）下培养，用倒置显微镜观察分裂情况并统计分裂频率。

结 果

一、原生质体的游离

本试验分别取用7—8天，9—10天和11—15天无菌苗的黄色和绿色下胚轴和子叶作原生质体游离材料，原生质体游离的结果见表1。从试验的结果中可以看到，在光下生长的无菌苗，其下胚轴和子叶游离原生质体的产量很低；而暗处生长的无菌苗，其下胚轴和子叶游离原生质体的产量较高。这可能是由于在光下生长的下胚轴和子叶细胞的细胞壁与在暗处生长的细胞壁的组成成分不同所致。在本试验条件下，游离红豆草原生质体的最佳苗龄为9—10天，较好组织部位为下胚轴。经4次重复试验从下胚轴和子叶（黄色）游离材料中均游离出大量原生质体（图1）。

表1 不同游离材料的原生质体产量*

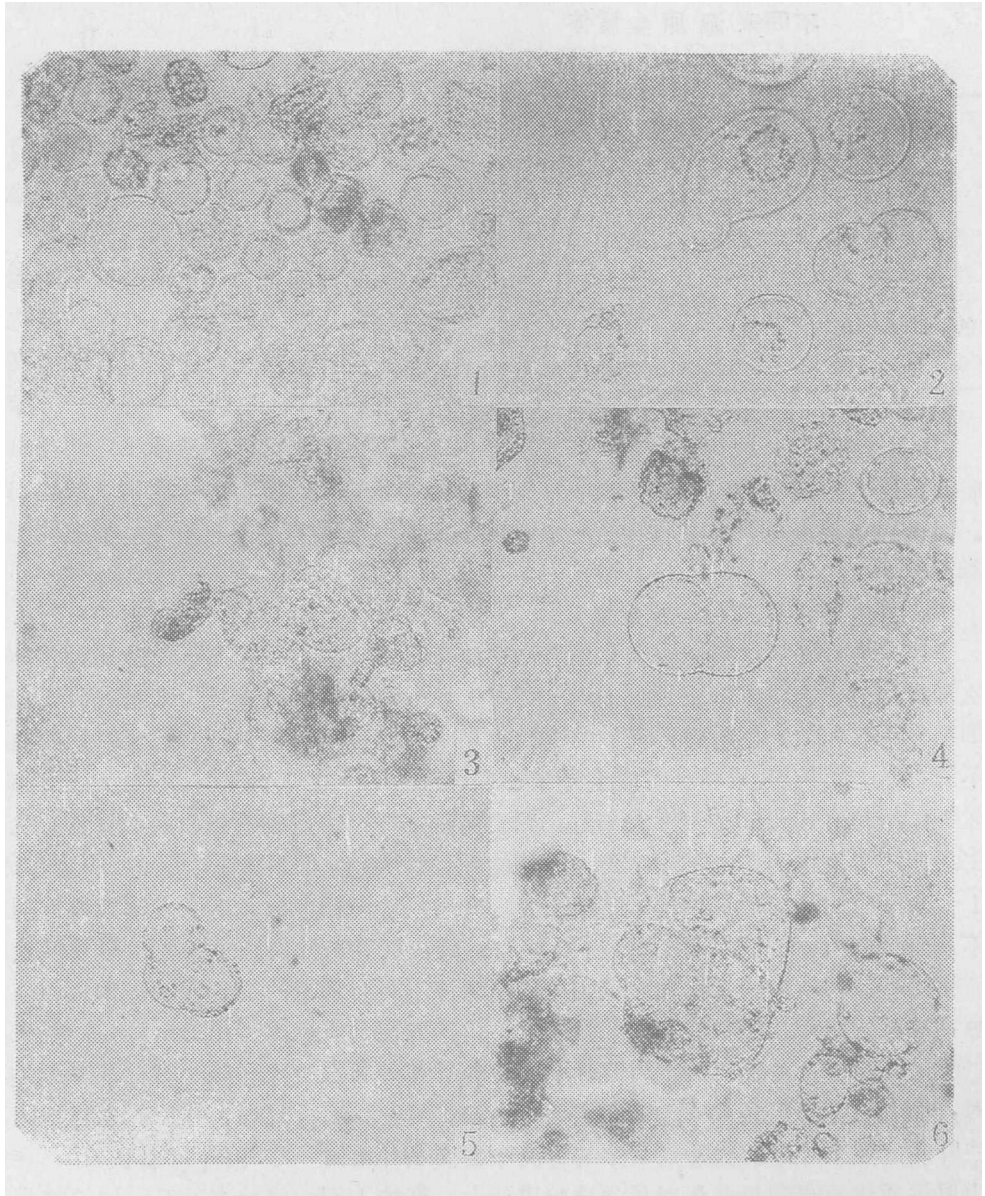
组织部位	幼苗生长条件	苗龄(天)	原生质体产量
子 叶 (黄色)	暗	7—8	低
		9—10	较高
		11—15	低
子 叶 (绿色)	光	7—8	低
		9—10	低
		11—15	低
下胚轴 (黄色)	暗	7—8	低
		9—10	最高
		11—15	低
下胚轴 (绿色)	光	7—8	低
		9—10	低
		11—15	低

* 酶液为EM7，游离条件为：c_pw 13 M 1小时，28℃、15转/分。

红豆草下胚轴原生质体培养不适于光照条件。子叶原生质体培养不适于本试验条件，生长缓慢，没有观察到再生细胞分裂，在培养的第3天死亡，从我们的试验结果来看，只有苗龄9—10天的黄色幼苗的下胚轴原生质体在暗处培养形成了多细胞团（图6）。

二、原生质体的培养

我们将暗处生长9—10天的无菌苗黄色子叶游离出来和下胚轴游离出来的大量原生质体，用k₈p培养基以悬滴培养的方法放暗处培养。下胚轴原生质体在培养的第2天开始膨大变长，细胞质浓厚，原生质体成活率可达95%以上，原生质体已再生细胞壁。第3天观察到再生细胞的第一次分裂，分裂率可达20—30%。细胞分裂有两种情况：一种是豆科植物原生质体常见的出芽分裂（图2）；一种是匀等分裂（图3、4）。第4天观察到第二次分裂（图5），其余的细胞大部分进行第一次分裂。培养第7天，将具有第一、二次分裂的细胞培养物取一部分放在光下培养（1000—1500Lux）。结果在光下培养的细胞逐渐停止生长而老化，细胞质稀少，液泡化程度高，一个多月以后死亡。看来



图版说明:

图1 红豆草下胚轴原生质体。

图2 原生质体的出芽分裂。

图3—4 原生质体的第一次分裂。

图5 原生质体的第二次分裂。

图6 多细胞团。

不同来源原生质体 培养的分裂情况

表2

原生质体来源	培养条件	分裂情况		
		第一次分裂 (第3天)	第二次分裂 (第7天)	细胞团 (第15天)
黄色子叶原生质体	暗光	无 —	无 —	无 无
黄色下胚轴原生质体	暗光	有 —	有 —	有 无

* 培养基都为k8p, 每7天加入新鲜培养基并逐步降低渗透压。

原生质体游离的酶液中高渗条件所要求的原生质体培养基k8p的渗透压要高于细胞内部渗透压。因此必须逐步地使细胞周围的渗透压适合于细胞生活所需要的条件, 细胞才能正常地生长与分裂。

二、原生质体游离和培养方法

一般来说, 在原生质体游离与培养的试验中, 所用的物种相同, 试验的外植体不同, 那么采取的方法也应不同。Ahuja P.S.等人的红豆草原生质体再生植株的研究, 采用叶肉细胞为游离和培养的材料, 我们的试验也用的是红豆草, 但以下胚轴为试验材料, 在方法上不同。Ahuja P.S.用混合酶液1% Cellulase R-10+0.5% Macerozyme R-10+1% Rhozyme HP150游离叶肉细胞, 用15%蔗糖+cpw盐溶液离心漂浮收集原生质体, 原生质体培养基用的是KM8P, 我们用混合酶液EM₇游离下胚轴, 用cpw 9M和k8p(1:1)离心收集, 原生质体培养基是k8p。当然, 游离某种材料原生质体效果好的混合酶液不止一种, 但是从我们的试验看出用EM₇游离红豆草叶肉细胞原生质体效果就不好。

同样是豆科植物的下胚轴作试验材料, 物种不同而采用的试验方法基本上相同。例如大豆, 豆科牧草百脉根和红豆草下胚轴原生质体游离的酶液都可用EM₇, 其结果都比较好, 产量很高, 只是游离的时间略有不同: 大豆和百脉根为14—16小时、红豆草为16—18小时, 而其它的游离条件(渗透稳定剂cpw 9M, 暗, 28℃, 15 rpm等)也都相同。又如白三叶和红豆草叶肉细胞原生质体的游离和培养条件相同⁽³⁾。因此可以认为: 在豆科植物中原生质体游离和培养在所用的试验方法上, 物种之间的差异小于不同组织部位间的差异。这可能是不同组织的细胞在结构上高度分化, 在生命活动中各自执行不同的功能, 导致产生这样大的差异。

参 考 文 献

- (1) 吕德扬等: <科学通报>, 1986, 10: 770—772.
- (2) 张谦: <植物生理学报>, 1986, 5: 66—76.
- (3) Ahuja P. S. et al: Plant cell RePorts, 1983, 2: 269—272.

讨 论

一、培养基渗透压

在原生质体培养的过程中及时加入新鲜培养基, 并逐步降低培养基的渗透压, 这是原生质体培养成功的关键之一。随着培养时间的延长, 由于细胞不断地生长与分裂, 培养基中的成分发生了变化, 加上水分蒸发与消耗, 渗透压有所增高, 而且在开始培养的时候, 培养基中的渗透压已经高于细胞内部的渗透压, 这是由于在原生质体培养的过程中及时加入新鲜培养基, 并逐步降低培养基的渗透压, 这是原生质体培养成功的关键之一。

ISOLATION AND CULTURE OF PROTOPLASTS
FROM SAINFOIN
(*Onobrychis viciaefolia* Scop)

LuoXiming Zhao Guilan

(*Institute of Soybean, Jilin Academy of Agricultural Sciences*)

Liu Yanzhi

(*Institute of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Sciences*)

ABSTRACT

This paper reported hypocotyl protoplasts from sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop) to form embryonic cell colonies. Protoplasts isolation of green hypocotyl and cotyledon and yellow hypocotyl and cotyledon from aseptic seedling of sainfoin was achieved in an enzyme solution consisting of 1% Hemi-cellulase HP 150, 0.4% Cellulase Onozuka R-10, 0.1% Pectolyase Y-23, cpw9M, within 16-18hr., at dark, 28°C, 15 rpm. Yield of protoplasts from yellow hypocotyl was the highest. Then the protoplasts isolated were cultured in the protoplasts culture medium K8P. After 7 days of culturing, fresh medium with a slightly lower osmolality was added. The protoplasts went through first division after 3 days of culturing, the division rate was 20-30%. The protoplasts divided and developed into globular embryo after 15 days of culturing.