

紫罗兰下胚轴原生质体分离条件的研究

马占强¹, 林良斌²

(¹河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471003; ²云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:以紫罗兰 *Matthiola incana* 无菌苗下胚轴为材料, 研究了光照条件、无菌苗日龄、酶液渗透压、酶液组合及酶解时间对其原生质体分离效果。结果表明, 种子在 20℃ 黑暗下萌发 4 d 后, 转移到 2 000 lx 每日光照 14 h 条件下, 约 14 d 苗龄, 用 w 为 1.2% 的纤维素酶 (cellulase onozuka R-10) + w 为 0.8% 的离析酶 (macerozyme onozuka R-10) + 3 mmol/L MES + CPW-10M (CPW + w 为 10% 的甘露醇) 酶组合处理约 12 h, 可以高效分离出有活力的原生质体。

关键词: 紫罗兰; 下胚轴; 原生质体分离

中图分类号: Q942.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2006)01-0072-04

Study on Hypocotyl Protoplast Isolation of *Matthiola incana*

MA Zhan-qiang¹, LIN Liang-bin²

(¹ College of Agronomy, Henan Sci-Tech University, Luoyang 471003, China;

² College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The hypocotyls of *Matthiola incana* seedlings were used as materials. The effects of some factors such as the condition of light, day-age of *M. incana* seedlings, osmotic stabilizer, different combinations of enzyme mixture and digesting time, on protoplast isolation from the hypocotyls of *M. incana* were investigated. The results showed that the protoplasts with higher yield and quality were obtained by treating the hypocotyls with a mixture of cellulase onozuka R-10 ($w = 1.2\%$) + macerozyme onozuka R-10 ($w = 0.8\%$) + 3 mmol/L MES + CPW-10M (CPW and $w = 10\%$ mannitol) for 12 h. The cotyledons from two-week-old seedling (at 20 °C, 2 000 lx, 14 h light every day) were appropriate for isolating protoplasts.

Key words: *Matthiola incana*; hypocotyls; protoplast isolation

紫罗兰 *Matthiola incana* 是十字花科紫罗兰属植物。可供观赏, 其花可入药, 有泻下通经功效。近年来有关学者对紫罗兰开展了系统研究^[1-3], 1994 年 Yaniv 等^[4] 提出紫罗兰是新的特用油料植物, 种子油富含 ω -3-亚麻酸, 为保健珍品。罗鹏等^[3] 对紫罗兰与甘蓝型油菜杂交后的子房进行了培养, 从杂种后代中获得种子油分品质较好的植株。为了利用紫罗兰的有益基因资源进行油菜品质改良, 笔者对其原生质体分离条件和技术进行了研究, 旨在建立高效的紫罗兰原生质体分离技术体系, 为紫罗兰原生质体植株再生以及与油菜进行体细胞杂交等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

紫罗兰 *Matthiola incana* 种子, 购自北京缤纷种子子公司。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗体系的建立 紫罗兰种子在水中浸泡 1 h 后, 用 $\varphi = 70\%$ 乙醇表面消毒 1 ~ 2 min, 再用 $w = 0.1\%$ 的升汞溶液消毒 12 min, 无菌水洗三四次, 接种于不含任何激素的 MS 固体培养基上, 萌发出苗。

1.2.2 酶解液的制备 将 MES [2-(N-吗啡啉)乙磺酸] 溶解在 CPW (101 mg/L KNO₃, 27.0 mg/L

收稿日期: 2004-07-08

作者简介: 马占强 (1979-), 男, 硕士; 通讯作者: 林良斌 (1963-), 男, 教授, 博士, E-mail: linliangbin-63@163.com

基金项目: 云南省自然科学基金 (2001C0034M, 2004C0035M)

KH_2PO_4 , 246 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 480 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 和不同质量分数的甘露醇 (mannitol, 简称 M) 组成的混合液中, 再将不同质量分数的纤维素酶 (celluase onozuka R-10) 和离析酶 (macerezyme onozuka R-10) 溶解在其中. 然后调 pH 至 5.6, 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 于超净工作台内将上清液在预先灭菌的过滤器 (孔径 0.45 μm) 中过滤灭菌.

1.2.3 原生质体的分离和纯化 取无菌苗的下胚轴 1 g, 纵切后置于 CPW-13M (CPW + w 为 13% 的甘露醇) 中质壁分离 1 h, 再在 10 mL 酶液中进行酶解 (25 $^{\circ}\text{C}$, 黑暗, 静止), 用 200 目的尼龙网过滤, 滤液 500 r/min 离心 5 min, 倒去上清液, 用 CPW-13M 悬浮沉淀, 500 r/min 离心 5 min, 取含原生质体的上清液, 重复上述处理 2 次, 最后将上清液加入原生质体培养基后混匀, 500 r/min 离心 5 min, 倒去上清液, 加 1 mL 原生质体培养基悬浮沉淀, 获得原生质体悬浮液备用.

1.2.4 原生质体产量的测定 取少量上述原生质体悬浮液滴在血球计数板上, 当原生质体溶液充满计数室后, 在显微镜下计数, 计算 4 个角上的中格和中央的中格 (共 5 个中格) 内的总原生质体数, 此过程重复 3 次, 最后计算原生质体的浓度和产量.

原生质体浓度 (个/mL) = 5 个中格内总原生质体数 / $80 \times 400 \times 10^4 \times$ 原生质体稀释倍数.

原生质体产量 (个/g) = 原生质体浓度 $\times$ 稀释后体积 $\div$ 下胚轴的质量.

1.2.5 原生质体活力的测定 用 CPW-10M (CPW + w 为 10% 的甘露醇) 溶液配制 $w = 0.1\%$ 的 Evans Blue 染色液备用. 取 5 μL 原生质体悬浮液滴在载玻片上, 滴加 5 μL Evans Blue 染色液于原生质体上, 盖上盖玻片后在显微镜下观察, 被染上蓝色的是死原生质体, 而活原生质体不染色, 每个样品重复 3 次, 按下式计算原生质体的活力:

原生质体活力 = (未被染上蓝色的原生质体数 $\div$ 观察的原生质体总数) $\times 100\%$.

1.2.6 原生质体的培养 原生质体培养基为改良 KM8p 培养基 (其微量元素及维生素成分改用 B5 的成分和剂量), 并附加 2, 4-D 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + BA 0.5 mg/L + 0.3 mol/L 蔗糖 + 0.1 mol/L 葡萄糖, pH 5.8. 采用液体浅层培养法, 在直径为 6 cm 的培养皿中, 加入 2 mL 的培养液, 原生质体密度为 5×10^4 个/mL, (25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 下黑暗培养, 每周加少量新鲜培养液, 培养到第 10 d 统计分裂频率. 分裂频率 = (分裂的原生质体数 $\div$ 观察的原生质体总数) $\times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 无菌苗培养条件对原生质体分离效果的影响

以不同培养条件下获得的无菌苗的下胚轴为材料分离制备原生质体, 其原生质体产量、活力和分裂频率均有差异 (表 1). 以黑暗培养 4 d 后再转到光照 14 h/d、2 000 lx 培养 10 d 的无菌苗为材料, 分离制备的原生质体活力最高, 细胞分裂频率也最高. 而以直接在光照 14 h/d 下培养的无菌苗为材料, 原生质体的活力虽然没有较大差异, 但原生质体的产量和分裂频率却较低. 而只在黑暗条件培养下的黄化苗为材料, 原生质体的活力较低, 分裂频率更低, 而且细胞很易破碎. 此外, 在分离原生质体前, 无菌苗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下低温预处理 6 h, 分离出的原生质体尽管产量没有变化, 但原生质体大小均匀、胞质丰实、活力较高, 更易于分离纯化.

表 1 无菌苗培养的光照条件对原生质体分离的影响¹⁾

Tab. 1 Effects of culture condition on protoplast isolation

培养条件 ²⁾ culture condition	苗龄 age/d	原生质体产量 yield/ ($\times 10^6$ 个 $\cdot$ g $^{-1}$)	原生质体 活力 viability/%	分裂频率 division/%
I	14	0.81	83.5	16.5
II	14	1.82	86.4	23.5
III	14	0.69	63.8	8.3

1) 表中数据为 $w = 1.2\%$ 纤维素酶和 $w = 0.8\%$ 离析酶作用下, $w = 10\%$ 甘露醇为渗透压时, 25 $^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h 的结果; 2) I 为 20 $^{\circ}\text{C}$ 、光照 14 h/d、2 000 lx; II 为 20 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗 4 d, 转移至 20 $^{\circ}\text{C}$ 、光照 14 h/d、2 000 lx; III 为 20 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗

2.2 苗龄对原生质体分离效果的影响

分别取 8、10、12、14、16 和 18 d 苗龄的无菌苗下胚轴分离制备原生质体, 结果 (表 2) 表明, 8 d 无菌苗下胚轴的原生质体产量很低, 且细胞碎片较多, 12 ~ 16 d 无菌苗下胚轴的原生质体产量较高, 而 14 d 无菌苗下胚轴原生质体活力和分裂频率最高. 因此,

表 2 苗龄对紫罗兰下胚轴原生质体分离的影响¹⁾

Tab. 2 The effects of hypocotyls age on protoplast isolation

下胚轴苗龄 hypocotyls age/d	原生质体产量 yield/ ($\times 10^6$ 个 $\cdot$ g $^{-1}$)	原生质体活力 viability/ %	分裂频率 division/ %
8	0.88	69.3	4.8
10	1.32	81.5	10.4
12	1.74	86.2	17.3
14	1.77	88.6	18.1
16	1.73	82.5	13.7
18	1.69	73.7	9.6

1) 以上数据为 $w = 1.2\%$ 纤维素酶和 $w = 0.8\%$ 离析酶作用下, $w = 10\%$ 甘露醇为渗透压时, 25 $^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h 的结果

在进行分离紫罗兰下胚轴原生质体培养时,以 14 d 无菌苗的下胚轴做分离材料较适宜.

2.3 酶类组合对原生质体分离效果的影响

利用不同混合酶液酶解下胚轴分离制备原生质体,结果(表 3)表明,随着酶浓度的增加,原生质体产量逐步提高,酶解时间也逐渐缩短,但当酶浓度达到一定量时,原生质体的产量不再增加,且出现较多破碎的原生质体.从原生质体产量、活力、分裂频率和碎片多少以及酶的使用量几方面综合考虑,适宜的酶组合是 $w = 1.2\%$ 纤维素酶 (celluase R-10) 和 $w = 0.8\%$ 离析酶 (macerzyme R-10).

表 3 不同酶组合对紫罗兰下胚轴原生质体分离的影响¹⁾

Tab. 3 The effects of different enzyme combination on protoplast isolation

w (纤维素酶 celluase)/%	w (离析酶 macerzyme)/%	酶解时间 ²⁾ enzymolysis time/h	原生质体产量 yield/($\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$)	原生质体活力 viability/%	细胞碎片 ³⁾ cell breakage	分裂频率 division/%
0.8	0.6	18	0.76	77.8	+	16.8
1.0	0.6	14	1.20	81.3	+	20.4
1.2	0.8	12	1.74	89.6	+	24.4
1.4	0.8	11	1.77	87.9	++	23.1
1.6	1.0	10	1.79	80.2	+++	17.5
1.8	1.0	9	1.71	72.8	++++	14.7

1)表中数据是在苗龄 14 d、 $w = 10\%$ 甘露醇为渗透压时 25 ℃处理 12 h 的结果;2)指达到最大原生质体释放量的时间;3) + 表示很少,++ 表示少,+++ 表示多,++++ 表示很多

表 4 甘露醇质量分数对紫罗兰下胚轴原生质体分离的影响¹⁾

Tab. 4 The effects of mannitol concentration on protoplast isolation

w (甘露醇 mannitol)/%	原生质体产量 yield/ ($\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$)	原生质体活力 viability/%	分裂频率 division/%
7	0.36	57.4	20.2
8	1.43	68.6	24.8
9	1.67	83.2	24.4
10	1.72	86.7	21.7
11	1.75	81.4	18.3
12	1.59	73.9	15.5

1)表中数据为 $w = 1.2\%$ 纤维素酶和 $w = 0.8\%$ 离析酶、苗龄为 14 d 时 25 ℃处理 12 h 的结果

2.5 酶解时间对原生质体解离效果的影响

酶解时间对紫罗兰下胚轴原生质体分离效果影响很大(表 5).酶解 8 h,仅有少量原生质体游离出来,随着酶解时间的延长,原生质体的产量也随之增加,但原生质体的活力逐步下降,酶解 14 h 细胞碎片开始增多,酶解 16 h 产量最高,此时细胞碎片多,原生质体的活力下降到 81.3%,酶解 18 h,产量和活力略有下降,且破碎细胞进一步增多,随后活力出现大幅度下降.可见,酶解 12 h,应及时收集与纯化,此时为最适宜酶解时间.

2.4 混合酶液中甘露醇质量分数对原生质体解离效果的影响

不同质量分数的甘露醇对紫罗兰下胚轴原生质体解离效果不同(表 4),当酶液渗透压在甘露醇质量分数为 7% 以上时才能获得完整的原生质体,而在 7% 时很多细胞膨胀破裂,造成产量和活力较低.甘露醇质量分数在 9% ~ 11% 之间原生质体的活力没有明显差异,但产量随着质量分数的升高有所增加,而当甘露醇质量分数到 12% 时,分离的原生质体活力和分裂频率都降低.故甘露醇质量分数为 10% 时分离制备紫罗兰下胚轴原生质体较适宜.

表 5 酶解时间对紫罗兰下胚轴原生质体分离的影响¹⁾

Tab. 5 The effects of enzymolysis time on protoplast isolation

酶解时间 enzymolysis time/h	产量 yield/ ($\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$)	活力 viability/%	细胞碎片 ²⁾ cell breakage
8	0.48	93.4	+
10	1.13	90.7	+
12	1.69	87.6	+
14	1.72	86.6	++
16	1.81	81.3	+++
18	1.6	70.8	++++

1)表中数据为 $w = 1.2\%$ 纤维素酶和 $w = 0.8\%$ 离析酶作用下, $w = 10\%$ 甘露醇为渗透压时,25 ℃处理不同时间的结果;2) + 表示很少,++ 表示少,+++ 表示多,++++ 表示很多

3 讨论

建立高效的原生质体分离体系,是进行原生质体基础理论研究和原生质体培养与植株再生以及融合的基础.本研究中发现某些处理措施如对材料进行预处理、增加酶浓度、提高酶液渗透压和延长酶解时间等都可使原生质体的产量有所提高,在某些程度上影响原生质体活力.因而,要建立稳定高效的原生质体分离体系,必须结合考虑其原生质体的产量与活力,以“具有活力的原生质体产量”作为建立原生质体分离体系的指标,才能较客观地反应效果.

影响原生质体的产量和质量因素有多种,如材料生理状态、酶组合及浓度比、酶解时间和酶解液的渗透压等。分离时的多种理化因素都对原生质体的产量和质量发生影响,而来自分离原生质体材料的生理状态影响可能很大,本试验结果表明,完全黑暗条件下和苗龄过长的无菌苗下胚轴产量不但低,而且原生质体培养的分裂频率也很低。因此,分离原生质体下胚轴的生理状态不仅影响原生质体的产量和活力,也与培养时分裂增殖有很大的相关性。

原生质体分离时,对分离效果影响最大的因素是酶液浓度和酶解时间。若酶液浓度较大,酶解时间就较短,就会影响原生质体的活力和分裂能力,且原生质体破裂数增多。反之,酶解时间较长,同样会导致较早分离出的原生质体破裂。原生质体分离时,适宜的酶浓度以及酶解时间因植物的种类不同有很大差异,即使同种植物,起始材料不同,其适宜的酶浓度和酶解时间也不同。黄家总等^[2]游离紫罗兰子叶原生质体的酶浓度和时间就与本试验结果略有不同。因此,对于某个特定的植物材料,建立适宜的“酶解浓度-酶解时间”组合是获得高产优质原生质体的重要条件。

酶液渗透压调节剂的使用原理主要是维持原生质体内外环境的渗透压相对稳定性。在已建立的各种植物原生质体的分离系统中,适宜的酶液渗透压分布于0.40~0.80 mol/L^[5]。分离紫罗兰子叶的适

宜渗透压是0.6 mol/L甘露醇^[2],甘蓝型油菜和紫菜苔花粉则以1.0 mol/L甘露醇最佳^[6]。本试验中分离紫罗兰下胚轴原生质体的适宜渗透压是质量分数为10%的甘露醇。可见,不同植物甚至同一物种不同供体材料所要求的渗透压不尽相同。因此,必须根据起始材料分别进行探索,才能获得较高的原生质体产量和较大的原生质体的活力。

参考文献:

- [1] 徐怀亮,罗鹏,李旭峰,等. 紫罗兰愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报,2002,24(1):19-21.
- [2] 黄家总,冈田芳明,傅家瑞. 紫罗兰与桂竹香原生质体培养及电激细胞融合的研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2003,42(3):64-68.
- [3] 罗鹏,傅华龙,蓝泽莲,等. 甘蓝型油菜与紫罗兰属间杂交的植物学研究[J]. 植物学报,2003,45(4):432-436.
- [4] YANIV Z, SHAFFERNANN D, ZUR M, et al. Cultivation of improved lines of *Matthiola incana*, a source of ω -3-linolenic acid[C]//MONTEIRO A A. Papers of ISHS Symposium on Brassica and Ninth Crucifer Genetics Workshop. Lisbon:Secretariat,1994:33-35.
- [5] 孙勇如,安锡培. 植物原生质体培养[M]. 北京:科学出版社,1991:54.
- [6] 李仕琼,杨弘远,周娥. 甘蓝型油菜和紫菜苔花粉原生质体的大量分离[J]. 植物学报,1992,34(5):339-345.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第71页)

参考文献:

- [1] 肖利贞. 土壤干旱对甘薯生育及产量的影响[J]. 华北农学报,1995,10(2):106-110.
- [2] 张明生,谈锋,张启堂. 快速鉴定甘薯品种抗旱性的生理指标及方法的筛选[J]. 中国农业科学,2001,34(3):260-265.
- [3] 钮福祥,华希新,郭小丁,等. 甘薯品种抗旱性生理指标及其综合评价初探[J]. 作物学报,1996,22(4):392-398.
- [4] 陈京. 抗旱性不同的甘薯品种对渗透胁迫的生理响应[J]. 作物学报,1999,25(2):232-236.
- [5] ZHANG Ming-sheng, XIE Bo, TAN Feng. Relationship between changes of endogenous hormone in sweet potato under water stress and variety drought-resistance[J]. Agricultural Sciences in China,2002,1(6):626-630.
- [6] 张明生,谈锋. 水分胁迫下甘薯叶绿素 a/b 比值的变化及其与抗旱性的关系[J]. 种子,2001,(4):23-25.
- [7] ZHANG Ming-sheng, XIE Bo, TAN Feng, et al. Relationship between soluble protein, chlorophyll and ATP in drought-resistant sweet potato under water stress[J]. Agricultural Sciences in China,2002,1(12):1 329-1 333.
- [8] VILLAREAL R L. Variations in the yielding ability of sweet potato under drought stress and minimum input conditions[J]. Hort Science,1979,14(1):33-34.
- [9] 张明生,谈锋,谢波,等. 甘薯膜脂过氧化作用和膜保护系统的变化与品种抗旱性的关系[J]. 中国农业科学,2003,36(11):1 395-1 398.
- [10] 张明生,彭忠华,谢波,等. 甘薯离体叶片失水速率及渗透调节物质与品种抗旱性的关系[J]. 中国农业科学,2004,37(1):152-156.
- [11] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海:科学技术出版社,1985:67-70.
- [12] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,1990.
- [13] 黎裕. 作物抗旱鉴定方法与指标[J]. 干旱地区农业研究,1993,11(1):91-99.
- [14] 路贵和,安海润. 作物抗旱性鉴定方法与指标研究进展[J]. 山西农业科学,1999,27(4):39-43.
- [15] 王爱国,邵从本,罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨[J]. 植物生理学通讯,1986,(2):55-57.
- [16] LEVITT J. Response of Plants to Environmental Stress: Vol II[M]. New York:Academic Press,1980:211.

【责任编辑 李晓卉】