

利用负压处理提高小麦原生质体解离效率

杨晓辉* 李宏潮 胡道芬

(北京市植物细胞工程实验室, 北京 100081)

摘 要

利用负压处理酶—愈伤组织或悬浮系的混合物, 可使原生质体产量比各自对照提高2~3倍, 并且可以降低酶使用浓度, 缩短解离时间, 促进生物酶的解离效率。实验证明, 小麦愈伤组织或悬浮细胞在酶液中经700mmHg的负压下处理30分钟后就可使原生质体的产量大幅度提高, 而且不会造成原生质体的破损和生活力的下降。培养7天后统计一次分裂频率, 处理略高于对照。合适的负压处理时间在30~180分钟之间, 具体应根据需要解离材料的来源和细胞状态而确定。结合负压处理, 已成功地从有芒白7号成熟胚愈伤组织及悬浮系中分离出大量生活力高的原生质体, 并得到细胞团和再生愈伤组织。植株的分化实验正在进行。

关键词 负压处理 原生质体分离和培养 小麦

前 言

用生物酶解离植物原生质体是目前广泛使用的方法。虽然这种手段十分有效, 但由于细胞来源及状态不同, 去壁时所需生物酶的种类及浓度各异, 有时需要较高的浓度, 作用较长的时间。这样商品酶中含有的一些杂质或杂酶, 如蛋白水解酶、脂肪酶、核糖核酸酶等对原生质体的毒害作用就会加强, 降低其生活能力。所以, 一般都要求采用低水平的酶液, 作用尽量短的时间, 而且还能得到高质量的原生质体。因此, 为提高酶解效率, 在一些试验中往往把需要解离的材料预先放入高渗溶液中处理一定的时间〔1,3,4〕, 使细胞发生质壁分离后再加入酶液。但这种方法只有在游离叶片原生质体时才显得十分有效。本实验则在愈伤组织酶解时, 利用负压处理酶液—愈伤组织或悬浮细胞的混合物, 从而使酶解速度和效率大大提高, 更多更快地得到生活力高的原生质体。

材料和方法

制备原生质体所用的材料为继代2年的小麦品种有芒白7号和多抗811成熟胚愈伤组

织, 将其在附加5mg/L 2,4-D, 0.5mg/L ZEA及1mg/L IAA激素水平的MS固体培养基上继代培养, 或经含有2.5mg/L 2,4-D, 0.2mg/L KT的MS液体悬浮培养后, 可选择出大量质浓、壁薄和等径的胚性细胞系。用愈伤组织直接解离原生质体时, 选用继代10天左右的材料, 用镊子夹碎后, 放入酶液。对于悬浮细胞系, 则使用换液后培养3天的材料。用吸管吸取三角瓶底部的细小颗粒, 去掉上清液, 加入含有0.05~0.1% Pectolyase Y23, 1~2% Cellulase RS, 1% Macerose R10, 1% $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KH_2PO_4 , 0.01% MgSO_4 及11%甘露醇的酶液, pH为5.8~6.0。酶用量为每5ml酶液解离0.5或1克愈伤组织。负压处理时, 将酶—愈伤组织混合物盛于小瓶中, 一同放入无菌抽滤瓶内, 在700mmHg, 30℃下抽气30分钟或更长时间。然后放入直径6cm的玻璃培养皿内, 在30℃下继续解离。对照则直接在以上温度下暗培养解离, 在此期间用手轻摇几次。每隔一定时间从中均匀取样, 用血球计数板统计原生质体产量, 并用苯胺兰染色鉴定其活性。

原生质体和酶混合液用400目不锈钢镍丝网过滤, 300rpm低速离心收集, 然后用洗液(不含酶成分的等渗溶液)洗两次, 再用相应原生质体培养基洗一次。培养基成分为B5附加1mg/L 2,4-D, 0.2mg/L KT, 200mg/L谷氨酰胺、酵母提取物以及100mg/L肌醇。培养时原生质体均以 $3\sim4 \times 10^5$ 的密度悬浮培养于直径为3.5cm的玻璃皿中或用0.4%的琼脂糖包埋, 每皿加0.5~1.0ml的培养物, 在26℃下暗培养。培养7天后, 统计比较各处理的一次分裂频率。

结果与讨论

一、负压处理对原生质体解离效果的影响

果胶酶Y23和纤维素酶RS是小麦愈伤组织解离中常用的酶类。试验中当RS酶含量为2%时, 在负压处理下, 所设置的二个果胶酶Y23浓度水平组合的解离效果均与各自对照的差异很大(表1)。首先表现出在原生质体游离出的时间上, 在不加负压处理的对照中, 愈伤组织至少要在30℃下静止酶解1小时左右, 原生质体才开始释放出来, 而且数量很少。从倒置显微镜下观察, 可以看到: 由几十个或更多细胞组成的团块与酶解前无多大区别, 比较紧密, 游离出的少数原生质体是由其外部或几个细胞组成的团块上释放出来的。而当这些细胞团块在700mmHg压力、30℃下抽气20~30分钟后, 就已经有部分的原生质体游离出来, 而

表1 不同浓度的Pectolyase Y23 及负压处理对原生质体产量的影响

处 理	Y23 (%)	压力	酶解时间及原生质体产量		收集产量
			60 (min)	180 (min)	
A	0.05	+	6.0×10^5	8.4×10^5	7.8×10^5
ck (A)	0.05	-	1.0×10^5	3.8×10^5	2.2×10^5
B	0.1	+	5.9×10^5	8.0×10^5	7.4×10^5
ck (B)	0.1	-	3.8×10^5	4.5×10^5	3.8×10^5

Cellulase RS含量为2%。负压处理为在30℃, 700mmHg下抽气30分钟

且数量很多, 镜检时, 可以发现较大细胞团块明显散开, 并有大量细胞部分去壁。当 Y23 浓度为 0.05% 时, 酶解 1 小时和 3 小时后, 加负压处理原生质体产量分别达到 6.0×10^5 和 8.4×10^5 , 而不加负压的对照仅为 1.0×10^5 和 3.3×10^5 个, 负压处理比对照高出 4 ~ 6 倍。当 Y23 浓度为 0.1% 时, 处理比对照的原生质体数量也高出 2 倍左右。

从实验结果可看出, 虽然处理 B 的果胶酶 Y23 (0.1%) 水平比处理 A (0.05%) 高出一倍, 但经加负压处理后, 酶解 60 分钟两者的原生质体产量分别达到 6.0×10^5 , 5.9×10^5 个, 180 分钟则分别为 7.8×10^5 、 7.4×10^5 个, 都得到相近的产量, 其解离效果却相差不大。而不加负压的对照 A (1.0×10^5 , 3.8×10^5) 的产量却远远低于对照 B (3.8×10^5 , 4.5×10^5) 的原生质体产量, 即不加负压处理时, 酶的浓度越高, 原生质体产量也越高。这些结果说明负压可促进酶的解离效果, 提高酶的作用效率。即使在较低的酶浓度下, 仍能得到较高的原生质体产量。

二、负压处理时间对原生质体产量的影响

用愈伤组织直接解离, 一般需预先用镊子将愈伤组织尽可能夹碎。这样做虽然有一定作用, 但其中大部分还是由几百个细胞以上组成的大团块, 加入的酶液不能很快渗入到细胞团内, 开始仅作用于外部细胞的裸露部分, 所以原生质体的游离效果不好。酶解 30 分钟后, 品种有 7 和多抗 811 的细胞状态与开始酶解时一样, 没有任何原生质体释放出来 (表 2)。但是加压酶解 30 分钟后, 有 7 的原生质体产量已达 2.9×10^5 , 90 分钟时, 90% 以上细胞壁被降解, 原生质体数量达到了 13.3×10^5 个, 已可进行收集和培养, 而对照此时仅为 4.2×10^5 , 加

表 2 负压处理时间对原生质体产量的影响

品 种	加压	解离材料	加压酶解时间 (min) 及原生质体产量 ($\times 10^5$)				
			30	60	90	180	300
有 7	+	愈伤组织	2.9		13.3	15.0	
		悬浮系		2.3		20.0	26.2
	-	愈伤组织	0		4.2	13.8	
		悬浮系		0.5		7.6	16.1
多抗 811	+	愈伤组织	1.75	5.8	14.5	16.5	
	-	愈伤组织	0	3.1	4.3	6.0	10.5

酶成份: 0.05% Pectolyase Y23, 1% Macerose R10, 1% Cellulase RS

压处理的原生质体产量比对照高出 3 倍。对照在酶解 180 分钟后, 才得到与加压处理 90 分钟时相近的产量; 从有 7 悬浮细胞的酶解结果可以看出, 原生质体产量也是随着负压处理时间的延长而提高的, 在处理的 180 分钟之内, 产量提高很快, 从 60 分钟时的 2.3×10^5 增加到 180 分钟的 20.0×10^5 。处理 300 分钟时原生质体产量仅提高到 26.1×10^5 , 增加不多。但不论是愈伤组织还是悬浮系, 不加压的对照都是在酶解 90 或 180 分钟以后, 产量才开始大幅度提高, 说明在这两种情况下, 酶的作用效果是不同的。以多抗 811 为实验材料时, 结果也是如此, 而且在加压酶解 180 分钟时, 原生质体产量达到 16.5×10^5 , 高于对照酶解 300 分钟时 10.5×10^5 的产量。

负压处理本身并不能提高酶的生物活性,但从实验结果可以看出它确实可以提高酶的解离效率,弥补由于酶浓度水平的降低而造成原生质体产量的下降。分析出现这种效果的一个原因是:负压处理本身是一种抽气的过程。处理细胞团块时,迫使细胞间隙的空气排出,有利于酶液的渗入,使酶接触细胞的表面积增大,这样里外同时作用,加速了细胞团的分散和壁的降解,而不是象对照一样,酶的作用是由细胞团外向内渗透,使酶作用的时间加长,损失了大量酶的活性。从实验结果也可以看出,负压处理的原生质体产量比不加压要多出2~3倍。这种差异随着酶浓度的降低而越发明显。负压处理能提高解离效果的另一个原因是:抽气过程可以促使细胞发生质壁分离。虽然细胞在高渗液中将不可避免地发生质壁分离,但一般需要经过很长的时间,而负压处理,则可加速这种现象的出现,使酶解的效果得到加强。实验结果表明,不论是愈伤组织还是悬浮系,最有效的负压处理时间都在30~180分钟之间。

三、负压处理对原生质体活性及分裂频率的影响

为进一步探讨负压处理对原生质体活性、破碎状况以及一次分裂频率的影响,实验中对原生质体死亡率等进行了统计。结果发现,不论是处理还是对照,解离出的原生质体均无任何破裂,保持完整。用苯胺蓝染色后,鉴定出原生质体死亡率都未超过1%。

表3 负压对原生质体活性及一次分裂频率的影响

处理代号	加压	观察原生质体数(个)	死亡数量(个)	死亡率(%)	一次分裂数(个)	分裂率(%)
A	+	320	3	1	26	7.43
		350				
B	+	260	2	1	23	7.35
		380				
ck	-	350	3	1	18	7.29
		250				

原生质体培养7天后统计细胞的一次分裂频率,加压处理的A、B分别达到7.34%和7.35%,对照的一次分裂频率为7.29%,处理略高于对照。所以,这些结果说明负压处理对于原生质体的完整性、成活率和一次分裂频率均无不利影响。这很可能一方面是由于原生质体是处于等渗溶液中,压力作用于原生质体膜的力量各方面均一致,不会造成受力不均而使原生质体破碎;另一方面是由于原生质体周围有一层质膜的存在,在受压时可阻止压力作用到内部细胞器等导致其结构的破坏。而且,对一些材料来说,这种效果在较短的时间30~90分钟内即可达到。所以这种方法一般对原生质体的活性及分裂能力不会有任何影响。

在酶解时,一般都要求细胞团越小越好,所以固体培养基上愈伤组织都需要经过几个星期或几个月的时间进行液体悬浮培养以获得分散性好的悬浮细胞系,这样不但拉长了原生质体的培养周期,而且对以后再生愈伤组织的分化再生也不利〔2〕。用愈伤组织直接解离时,又因团块较大,需要较高浓度的酶液,较长的作用时间。而结合负压处理,可以克服以上方法存在的缺点,并可降低价格昂贵的果胶酶Y23等的使用浓度,降低实验成本,缩短解离时间,减轻对细胞的毒害作用。实验结果也表明:在酶解过程中结合负压处理可以在酶浓度较

低、较短的时间内得到很高的原生质体产量。而且又不影响细胞的活性和分裂特性, 达到较好的解离和培养效果。结合此方法目前已从冬小麦品种有芒白 7 号成熟胚愈伤组织中成功分离出原生质体, 并得到再生细胞团和愈伤组织。

参 考 文 献

- [1] 錢迎倩: 植物原生质体研究进展, 《国外农业科技资料》, 54 (增刊) 1979: 15—22
- [2] 王海波等. 小麦胚性细胞系的建立及原生质体的培养, 《作物杂志》, 1989(3): 26—23
- [3] Coutts, R. H. A., K. K. Wood: The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts, *Plant Sci. Lett.*, 1975(4): 189—193
- [4] Meyer, Y.: Isolation and culture of tobacco mesophyll protoplast using a saline medium, *Protoplasma*, 1974(81): 363—372.

Enhanced Wheat Protoplast Isolation Through Negative Pressure Treatment

Yang Xiaohui Li Hongchao Hu Daofen

(Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing 100081)

Abstract

When the mixture of enzyme-callus or suspension cells of wheat was treated with negative pressure, the protoplast yields could be doubled or even tripled compared with control. The concentration of enzymes for protoplast isolation could be much reduced without any decrease of protoplast population. This was due to the enhancement of isolation efficiency promoted by the treatment of negative pressure. Results showed that the proper length of time for the treatment ranged from 30 to 180 min. depending on different materials. It presented no harmful effect on protoplast completeness, viability and division ability.

Key words: Negative pressure treatment; Protoplast isolation and culture; Wheat