

决明原生质体的分离与培养研究*

周延清¹ 苑保军² 张根发³ 卢龙斗¹

(1 河南师范大学生物系, 新乡 453002 2 河南周口地区农科所;

3 北京师范大学生物系)

摘要 用决明 (*Cassia obtusifolia* L.) 子叶和下胚轴为材料, 游离和培养原生质体。结果表明, 15日龄无菌苗的子叶和下胚轴比较适于游离原生质体, 每 1g 材料的原生质体产量高达 1.6×10^4 个; Pectolyase Y-23 是分离原生质体所必需的; 用含 2.4-D 0.4 mg/L (以下单位同), NAA 1.0 与 KT0.1 的 KM 8P 漂浮培养利于原生质体的分裂。培养 4d 后, 原生质体开始分裂, 15d 后其植板率约为 19%, 30d 形成了细胞团或小愈伤组织。增殖愈伤组织在分化培养基上培养, 可分化出芽。芽在生根培养基上培养 14d 生根, 从而再生决明小植株。

关键词 决明 原生质体 再生植株

植物原生质体作为细胞融合、外源 DNA 转化的良好材料日益受到人们重视。近年来, 豆科植物的原生质体分离培养已取得相当大的进展, 但对其籽粒型药用植物的原生质体培养的研究较少^[1, 2, 9]。豆科决明的种子——决明子是常用中药, 可代茶, 具有降压、缓泻、收缩子宫、清肝明目、祛风和通便等作用^[3]。目前, 未见其原生质体培养的报道。本研究以决明子叶和下胚轴为材料, 研究其原生质体分离培养及其影响因素的作用, 以期利用原生质体转化方法改良作物品种提供重要的理论依据和技术依据。

1 材料和方法

1.1 材料

决明子分别浸泡于浓硫酸 (40m in), 0.1% 升汞 (10m in)^[4] 和无菌水 (4~5 次) 进行消毒。然后将种子植于无激素 MS 培养基上, 于 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 2500~3000lx 光照强度下培养, 每天光照 14h, 制备无菌苗。

1.2 原生质体的分离与培养

将决明无菌苗子叶和下胚轴切成约 1mm 长的小段, 放于 CPW -13M^[5] 中预质壁分离 1.5h, 而后, 在 1g 材料加入 8m 酶液, 26°C 、40rpm 振动的条件下暗解离。解离时间和酶液组成如表 1 采用文献 [6] 的方法漂浮、纯化与收集原生质体。用原生质体培养液 KM 8P (含

0.45 mol/L 葡萄糖, 10g/L 蔗糖, 2, 4-D 0.4 mg/L NAA 1.0 mg/L 与 KT 0.1 mg/L 调原生质体密度为 5×10^4 个/ml 以每个平面 ($D = 33\text{mm}$) 1.5ml 悬液进行暗培养 (26°C), 10d 后移到弱光下培养。待小愈伤组织出现后 (肉眼可见), 将悬液放于固化的 KM 8P (含 NAA 0.2 mg/L 与 6-BA 0.5 mg/L) 上进行光照培养, 以增殖愈伤组织。然后转入分化培养基 MSB (含 NAA 0.15 mg/L 与 6-BA, KT 和 ZT 各 0.5 mg/L) 上诱芽。

1.3 植株再生

当芽长约 3cm 时, 将其切下, 放入生根培养基 $1/2\text{MS}$ (含 IBA 0.2 mg/L) 上, 以获得完整再生植株。

2 结果与讨论

2.1 酶液组成对决明子叶与下胚轴原生质体分离的影响

适当的酶组成是快速分离优质高产原生质体的关键之一。研究结果表明 (表 1), 果胶离析酶 Pectolyase Y-23 对决明原生质体的游离是必要的, 它能够在短时间内最大限度地游离原生质体。这与 Johnson^[8] 的结果一致。如果用果胶酶或半纤维素酶代替果胶离析酶, 不但解离时间长, 而且不能够得到大量的原生质体, 酶液中含有大量的未解离的单细胞或小细胞团。

2.2 无菌苗日龄对分离决明子叶与下胚轴原生质体的影响

决明无菌苗日龄对其子叶和下胚轴原生质体的分离效果有很大影响。较老的无菌苗的子叶和下胚轴的细胞难于游离出原生质体; 太幼嫩的无菌苗的子叶与下胚轴的细胞易于游离出原生质体, 但是, 它们的细胞膜也容易破损。因此, 为了获得游离原生质体的合适材料, 我们研究了决明无菌苗日龄对游离原生质体的影响。研究结果 (表 2) 表明, 14~15 日龄的决明无菌苗的子叶和下胚轴可作为游离原生质体的合适材料。

表 2 决明无菌苗日龄对游离子叶和下胚轴原生质体效果的影响

日龄 (d)	颜色	原生质体产量 (ml) 及其始释时间 (d)	漂浮	原生质体活力 (%)
5~6	淡黄色	$1.5 \times 10^6 \text{NO.}$, 5	+	30
14~15	淡绿色	$8 \times 10^6 \text{NO.}$, 7	+++	70
20~21	绿色	$7 \times 10^6 \text{NO.}$, 8	++	60

注: +: 少; ++: 多; +++: 更多。漂浮于 2% 蔗糖溶液表面

表 1 酶液组成对游离原生质体的影响

酶液组成 (W/V, %)	酶解时间 (h)	原生质体产量 (个/g)	小细胞团	
纤维素酶	3			
果胶酶	0.5	24	1.8×10^2	+++
半纤维素酶	0.5			
纤维素酶	3			
离析酶	0.2	18	5.4×10^2	++
半纤维素酶	1			
纤维素酶	3			
果胶离析酶	0.2	8	1.6×10^4	+

注: 表中 +, ++, +++ 与 + 依次表示更多、多与少。

表 3 不同培养方法对原生质体分裂的影响

培养方法	分裂率 (%)	终发育阶段
浅层培养	2.9	小细胞团
琼脂糖包埋培养	7	二次分裂
漂浮培养	9.7	小愈伤组织

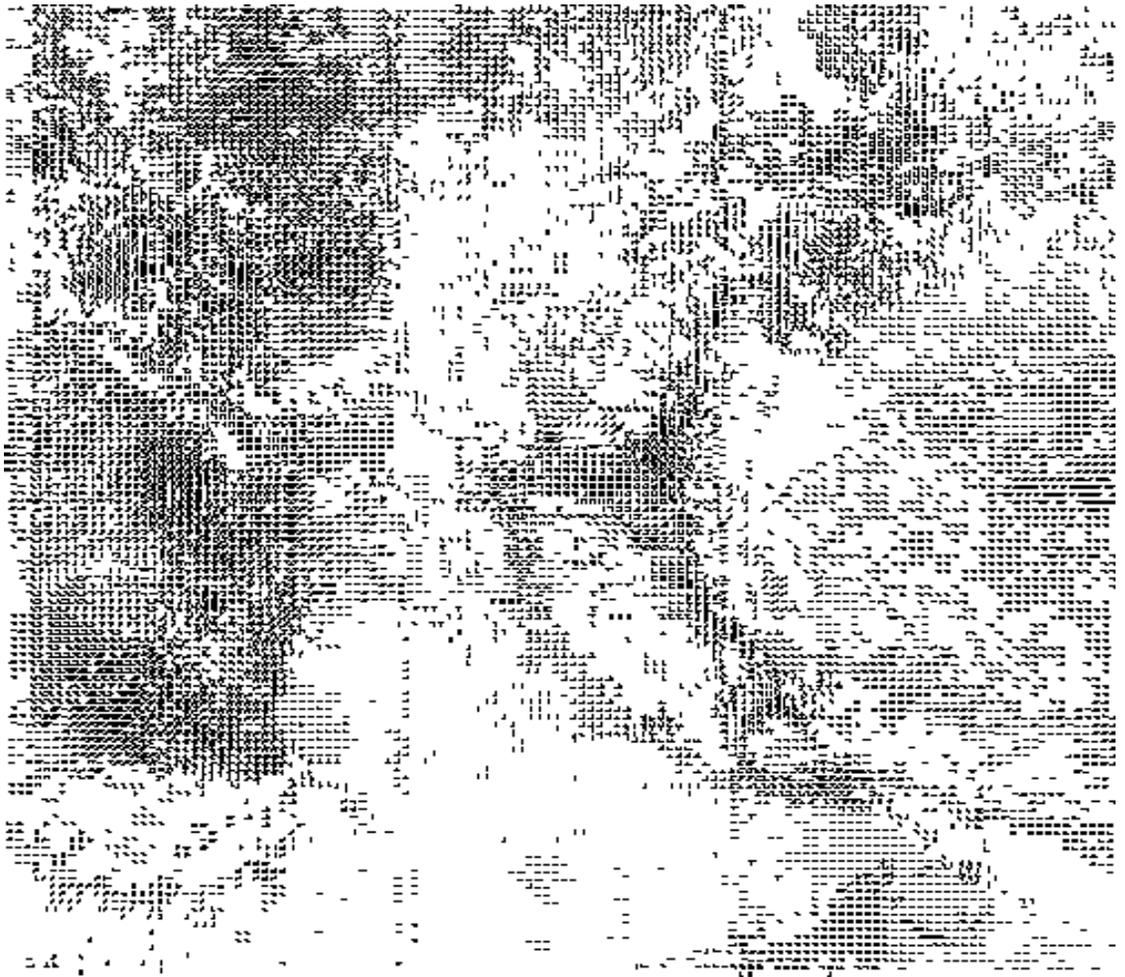


图 1 决明子叶与下胚轴原生质体培养再生植株形成过程

A 从决明子叶与下胚轴刚游离出的原生质体; B 原生质体的第一次分裂; C 原生质体的出芽生殖;
D 细胞团; E 肉眼可见愈伤组织块; F 分化芽; G 完整再生小植株

2.3 不同培养方法对原生质体分离的影响 (基本培养基为 KM 8P)

培养方法对原生质体分裂有重要影响。本研究结果如表 3 由表 3 可见, 漂浮培养的效果最佳。它使原生质体分裂多 (97%) 且形成小愈伤组织, 使褐化程度降低。

刚分离得到的原生质体呈球形 (图 1-A), 有大小两种类型。小型者具有浓厚的细胞质, 内含物比较丰富; 大型者具有比较稀薄的细胞质, 内含物比较贫乏。原生质体在合适的培养条件下培养 3d 后, 开始变形, 4~5d 可见第一次分裂 (图 1-B)。分裂方式多为不等分裂。随后原生质体迅速分裂。在此分裂过程中, 偶尔见原生质体进行出芽生殖 (图 1-C)。然后, 移到弱光下培养, 并且有规律地加入液体培养基降低其渗透压, 以利于再生细胞持续分裂和细胞团的形成 (图 1-D)。培养 15d 后, 统计植板率 (再生愈伤组织的原生质体数与总原生质体数之百分比) 约 19.2%; 培养 30d 时可见小愈伤组织块 (图 1-E)。当愈伤组织处于生长旺盛且未发生褐化时

期,尽快转入固化的 KM 8P 培养基上增殖。增殖后的愈伤组织在分化培养基上,经过 10~ 15d 延缓期后,生长加快。有的愈伤组织块渐变为暗褐色,形成白色根毛。根毛也逐渐褐化,但是,其生长相当快,从而抑制了芽的分化;有的逐渐变为暗绿色,具有分化为芽的潜力,20d后分化出淡黄色芽点。多数芽点变为绿色,分化为芽(图 1-F)。当芽长约 3cm 时,从愈伤组织块上切下,放于生根培养基上,两周后,形成具有较发达根系的再生植株(图 1-G)。

褐化是植物原生质体培养和豆科植物组织培养中普遍发生的现象。其主要原因是细胞释放出的多酚类物质积累并且被氧化为醌类物质^[7]。本研究发现静置培养时,原生质体沉淀是导致其生长不良、破裂与褐化的重要原因。这可能是由于沉淀于培养液底层的原生质体容易形成集群,造成通气和营养不良,或者是造成局部密度过高,使原生质体难以再生细胞壁;随着稀释液的加入,无壁的原生质体由于培养液的渗透压的改变而破裂,释放出酚类物质;酚类物质被氧化成醌类使原生质体褐化。愈伤组织的褐化则与小细胞团形成后加入新培养液的时机和增殖后被转入分化培养基上的时间、光照以及分化培养基中所含激素的比例等因素有关。漂浮培养可以部分解决原生质体褐化问题。

由决明子叶与下胚轴的原生质体的分离和培养再生植株的成功有助于用无性系变异的筛选、细胞融合和基因转化等遗传操作技术对决明进行改良和驯化,为野生中草药资源的开发利用提供新技术。决明原生质体培养植株再生频率的提高与褐化现象的消除等研究工作还在进行。

参 考 文 献

- 1 盛世红,陈惠民. 防风悬浮细胞的原生质体再生植株. 植物学报, 1990 32(4): 268~ 273
- 2 李学宝,许志智,等. 豇豆原生质体培养中体细胞胚胎发生与植株再生. 植物学报, 1993 35(8): 632~ 636
- 3 连文琰. 中国决明属药用植物简报. 中草药, 1986 17(7): 27~ 30
- 4 安利佳. 豆科植物组培的研究. 植物学报, 1992 34(10): 743~ 752
- 5 罗希明. 大豆原生质体的植株再生. 植物学报, 1990 32(8): 616~ 621
- 6 DaiChaoxi Mertz D, Lambeth V. Improved procedures for the isolation and culture of potato protoplasts. Plant Science, 1987, 50: 79~ 84
- 7 Barsby T L, Yarrow S A, Shepard J F. A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *B. rassa napus*. Plant Cell Rep, 1986 5: 101~ 103
- 8 Johnson L B, Stuteville D L, Higgins R K. Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. Plant Sci Lett, 1982 26: 133~ 137
- 9 Renate L M, Jacobson H J. Plant regeneration from pea protoplasts via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 1989 8: 379~ 382

A Study of Influence Factors on Isolation Culture of Cotyledon and Hypocotyl Protoplasts from *Cassia obtusifolia* Seedlings

Zhou Yanqing¹ Yuan Baojun² Zhang Genfa³ Lu Longdou¹

(1 Department of Biology, Henan Normal University, Xinxing 453002, 2 Zhoukou Prefecture Institute of Agricultural Sciences, 3 Department of Biology, Beijing Normal University)

Abstract The culture of protoplast derived from cotyledon and hypocotyl of *Cassia obtusifolia* seedlings was studied. About 1.5mm long sections of cotyledons and hypocotyls were digested in any enzyme solution for a certain time. The protoplasts were cultured in a liquid medium at a density of 5×10^4 No./ml and transferred onto a solid medium for callus culture and shoot regeneration. Some factors affecting protoplast isolation and division were studied. The results showed that 15 day-age seedlings' hypocotyls and cotyledons used as donor tissues were suitable for their protoplast isolation and the yield of their protoplasts amounted to 1.6×10^4 No./g FW; Pectolyase Y-23 was indispensable to their protoplast isolation. KM8P medium supplemented with 0.4mg/L 2,4-D, 1.0mg/L NAA and 0.1mg/L KT as well as floating culture fitted in the division of protoplast derived cells. After a culture of 3 days, the first division was observed. The plating frequency was about 29% in 15 days. Complete plantlets were regenerated 14 days after the shoots, 3mm or so, were transferred onto 1/2MS medium containing 0.2mg/L IBA.

Key words *Cassia obtusifolia*; Cotyledon and hypocotyl protoplast; Plant regeneration