

260-264

12067(13) 注册资讯 http://www.cqvip.com

愈伤组织继代接种量、继代周期和年龄 对软紫草原生质体脱壁的影响*

王 黎 张治国
(浙江省医学科学院, 杭州 310013)

王 平 梁海曼
(杭州大学生物系)

Q949.777.4

A

摘要 本文的实验结果表明: 软紫草愈伤组织脱壁所需的适宜酶浓度为: 0.1%果胶酶+0.25%纤维素酶; 酶解处理的适宜时间与愈伤组织年龄有关; 愈伤组织的适宜年龄随其继代周期、愈伤组织继代接种量而有变化。当接种量: 1克/瓶, 转代后7天进行原生质体分离; 接种量3克/瓶, 酶解材料则以培养5天愈伤组织为宜。继代周期13天和15天的比15天和15天的, 适宜脱壁的愈伤组织当代培养天数要提前1天。

关键词 软紫草; 愈伤组织; 原生质体; 脱壁; 年龄; 继代周期

EFFECTS OF SUBCULTURE INOCULUM QUANTITY, SUBCULTURE TIME AND AGE OF CALLUS ON PROTOPLAST ISOLATION OF ARNEBIA EUCHROMA

Wang Li and Zhang Zhiguo
(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)

Wang Ping and Liang Haiman
(Department of Biology, Hangzhou University)

Abstract The result showed: 0.1% Pectinase+0.25% Onozuka R-10 was of benefit to isolate calli of *A. euchroma*; the appropriate time of enzyme treatment was related to callus age. Callus age would vary if either subculture time or callus inoculum quantity was changed. The experiment material of isolating protoplast was 7-day callus when inoculum quantity was 1 g/flask, but 5-day callus when inoculum quantity was 3 g/flask. As the suitable material of enzyme treatment, callus of 15-day and 15-day subculture period might be cultured a fittle longer than that of 13-day and 15-day subculture period.

Key words *Arnebia euchroma*; callus; protoplast isolation; Age; Subculture time

在植物细胞大量培养生产次生代谢产物中, 筛选高产细胞株和建立合理的培养程序、培

* 浙江省科委重点课题

养条件是两个极为重要的方面。Fujita 等^[4]报告,通过原生质体培养从紫草细胞悬浮培养物中,筛选出15个高产细胞系。因此,原生质体培养能为紫草单细胞筛选提供了有效的途径。我们通过愈伤组织进行紫草细胞株筛选时效率不高,为此开展紫草的原生质体培养以期提高细胞株筛选率。由于紫草原生质体培养的报告不多^[4,8],且均为悬浮细胞脱壁。鉴于不同材料的脱壁条件不尽相同,我们就软紫草愈伤组织继代接种量、继代周期、年龄、酶液组成、酶解时间等对原生质体得率的影响进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为继代培养多年的软紫草(*Arnebia euchroma*)根愈伤组织。

1.2 愈伤组织培养

根愈伤组织继代培养于 Ls 附加 0.5mg/L IAA, 1 mg/L KT, 3%蔗糖, 0.8%琼脂培养基中, 25±1℃, 暗培养。继代周期13或15天。

1.3 原生质体分离和培养

0.1%, 0.25%果胶酶(Pectinase)和0.05%, 0.1%, 0.25%的纤维素酶(Onozuka R-10)按不同组合溶于5 ml介质(Ls基本培养基加3%蔗糖, 0.5M甘露醇, pH5.8), 过滤灭菌。1克鲜重愈伤组织, 经切碎后置于混合酶液中, 25℃条件下处理2—12小时。分离的原生质体按常规方法收集。原生质体在25±1℃黑暗条件下浅层液体培养。24小时后, 统计存活率, 并用0.01% FDA 染色观察复壁情况。

2 实验结果

2.1 酶浓度对原生质体得率的影响

按不同酶浓度组合, 将愈伤组织酶解4h, 收集原生质体。荧光增白剂染色、镜检表明, 圆球形细胞即为已脱壁的原生质体。用血球板计数显示(表1), 在不同酶浓度组合中以0.1%果

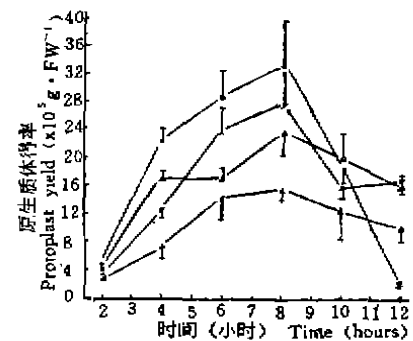


图1 酶解时间对原生质体得率的影响
(愈伤组织为7天龄)

Fig. 1 Effects of time of enzyme treatment on protoplast yield of *A. euchroma* (Callus age: 7 days)

· — · — · 0.1% Pectinase + 0.25%
Onozuka R-10
× — × — × 0.1% Pectinase + 0.25%
Onozuka R-10 + Protective
additive
△ — △ — △ 0.25% Pectinase + 0.1%
Onozuka R-10
▲ — ▲ — ▲ 0.25% Pectinase + 0.1%
Onozuka R-10 + Protective
additive
Protective additive: BSA
Ascorbic acid, Glutathione

表1 不同酶浓度组合对原生质体得率的影响
Table 1 Effects of different combination of enzyme concentration on protoplast yield of *A. euchroma*

果胶酶 Pectinase (%)	纤维素酶 Onozuka R-10 (%)	原生质体得率 Protoplast yield $\times 10^5 \text{gFW}^{-1}$
0.1	0.05	0.791 ± 0.143
0.1	0.1	1.78 ± 0.295
0.1	0.25	3.13 ± 0.797
0.25	0.05	1.24 ± 0.055
0.25	0.1	2.32 ± 0.359
0.25	0.25	1.95 ± 0.162

愈伤组织年龄: 9天
Callus age: 9 days

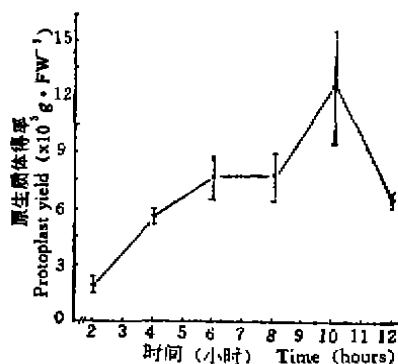


图2 酶解时间对原生质体得率的影响

(愈伤组织为5天龄)

Fig. 2. Effects of time of enzyme treatment on protoplast yield of *A. euchroma*.

(Callus age: 5 days)

胶酶加0.25%纤维素酶, 0.25%果胶酶加0.1%纤维素酶具有相对较高的原生质体得率, 分别为 3.1×10^5 个/克鲜重及 2.3×10^5 个/克鲜重。为了了解单独使用果胶酶, 能否获得密度较高的游离细胞悬液, 进行了果胶酶离析愈伤组织试验。结果如表2所示, 果胶酶处理下的单细胞得率为 0.08×10^5 个/克鲜重, 仅为对照组(0.042×10^5 个/克鲜重)的一倍, 而从标准误差看, 两者差异不显著。因此, 不进行细胞脱壁, 从紫草愈伤组织难以获得高密度单细胞悬液。

2.2 酶解时间对原生质体得率的影响

从图1可以看出, 酶解处理时间长短显著影响原生质体得率。值得注意的是不同组合的酶液的最适处理时间均为8小时左右, 即使在酶液中添加有小牛血

表2 果胶酶对愈伤组织分离单细胞的影响

Table 2 Effects of Pectinase on isolating single cell from callus of *A. euchroma*

果胶酶 Pectinase (%)	单细胞得率 Single cell yield $\times 10^5 \text{ gFW}^{-1}$
0.1	0.080 ± 0.046
0	0.042 ± 0.023

愈伤组织年龄: 9天

Callus age: 9 days

表3 接种量为19克/瓶时, 愈伤组织年龄对原生质体得率的影响

Table 3. Effects of callus age on protoplast yield of *A. euchroma* when inoculum quantity was 1 g/flask

酶组合 Enzyme combination	原生质体得率 Protoplast yield $\times 10^5 \text{ gFW}^{-1}$		
	5d	7d	9d
0.1% Pectinase + 0.25% Onozuka R-10	7.69 ± 1.45	27.6 ± 6.33	16.2 ± 2.57
0.1% Pectinase + 0.25% Onozuka R-10 + Protective additive	5.32 ± 0.80	23.2 ± 2.75	16.0 ± 2.76

继代周期: 15天

Subculture time: 15 days

表4 愈伤组织年龄对原生质体存活率影响

Table 4. Effects of callus age on protoplast survival of *A. euchroma*

酶组合 Enzyme combination	原生质体存活率 Percentage of protoplast survival (%)		
	愈伤组织培养时间 Callus culture time (days)		
	4d	5d	6d
0.1% Pectinase + 0.25% Onozuka R-10	38.5	71	51.03
0.1% Pectinase + 0.25% Onozuka R-10 + Protective additive	94.7	99	54.48

愈伤组织继代周期: 15天

Subculture time: 15 days

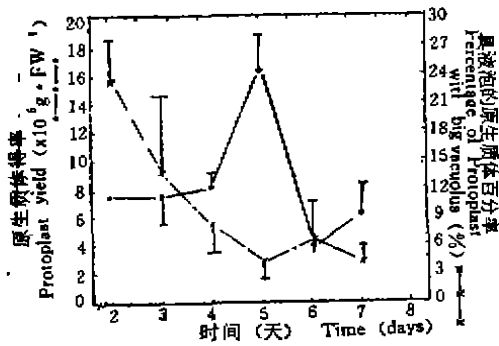


图3 接种量为3克/瓶时, 愈伤组织年龄对原生质体得率的影响 (继代周期: 15天)

Fig. 3. Effects of callus age on protoplast yield of *A. euchroma* when inoculum quantity was 3 g/flask. (Subculture time: 15 days)

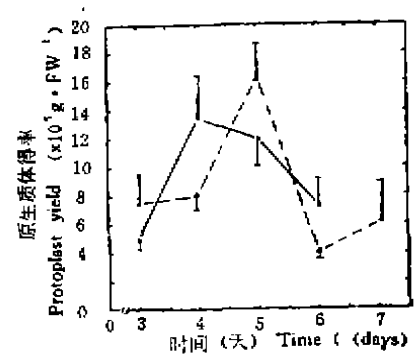


图4 继代周期不同的愈伤组织年龄对原生质体得率的影响

(·—·—·前二次继代周期依次为13天和15天; ▲—▲—▲前二次继代周期为15天和15天; 接种量3克/瓶)

Fig. 4. Effects of callus age with different subculture time on protoplast yield of *A. euchroma*

(—·—· Consecutive times subculture time were 13 and 15 days. ▲—▲—▲ Consecutive 2 times subculture time were 15 and 15 days. Inoculum quantity was 3 g/flask)

清白蛋白、维生素C和谷胱甘肽作为保护剂时亦如此。这一结果表明在紫草根愈伤组织的原生质体脱壁进程是相对稳定的。本实验中没能获得保护剂提高原生质体得率的结果,可能是由于剂量不适所致。

考虑到愈伤组织年龄可能会影响酶解进程,在上一实验基础上,又取5天龄的愈伤组织进行酶解实验(图2),结果5天龄愈伤组织的酶解适宜时间延长为10小时左右,这一事实表明酶解适宜时间还随愈伤组织的年龄而异,提示了进行原生质体培养时,不宜随意变动供体材料的培养天数。本实验事实还提示了应该重视愈伤组织年龄和原生质体得率间的关系。

2.3 愈伤组织年龄和愈伤组织继代接种量对原生质体得率的影响

当代愈伤组织培养天数和愈伤组织继代接种量均显著影响原生质体得率。当继代周期为15天,接种量为1克/瓶时,在5—9龄的愈伤组织中,原生质体得率以7天龄的最高(见表3)。当继代周期仍为15天而接种量为3克/瓶时,则在2—7天龄的愈伤组织中,以5天龄的材料原生质体得率最高,且含液泡的原生质体的百分率也较低(图3)。

2.4 继代周期对愈伤组织分离原生质体的影响

从图4可以看出,接种量均为3克/瓶,而前二代愈伤组织的继代周期依次为13天和15天的,在3—6天龄的愈伤愈伤组织材料中,原生质体得率还以4天龄左右为宜,可比继代周期15天和15天的提前一天。

2.5 愈伤组织年龄对原生质体的存活率、复壁率的影响

从4—6天龄愈伤组织分离的原生质体,进入培养24小时后,观察并计算其存活率(见表4)。结果表明,5天龄的原生质体存活率最高。原生质体24h存活率最高的愈伤组织年龄和适宜酶解的愈伤组织年龄是一致的。实验结果还显示加入保护剂虽然不能明显提高原生

质体得率但可明显提高原生质体24h的存活率,由71%提高到99%。可以在原生质体培养中添加适宜的保护剂还是必要的。

3 讨 论

Akiyama等^[2]指出细胞对果胶酶、纤维素酶的敏感性随培养基的氮源组成和浓度,随细胞的同步化程度而异。Fukunaga和King^[3]报告,细胞生长很好的悬浮培养物,原生质体得率反而较低。这些报告表明营养状况和细胞增长时期会明显影响原生质体释出量。Toriyama和Hinata^[8]报告,水稻细胞悬浮培养物,继代周期14天,转代后4—7天期间进行原生质体分离。赵桂兰^[1]报告,红豆草悬浮细胞培养物,继代周期7天,转代后8天进行原生质体分离。Wang等^[7]报告,籼稻悬浮培养物,继代周期5—7天,转代后2—3天进行原生质体分离。Gill和Eapen^[5]报告,乌头叶菜豆愈伤组织脱壁的适宜年龄为4—5天。以上报告提示:适宜于进行原生质体脱壁的悬浮培养物的培养天数与继代周期的天数有关。看来适宜于脱壁的是处于指数增长期上半期的悬浮培养物。本文实验结果显示,当代7天龄的愈伤组织较9天龄的易于脱壁。继代周期13天和15天的比15天和15天的,适宜脱壁的愈伤组织当代培养天数要减少1天。培养当代的愈伤组织接种量也会显著影响适宜脱壁的当代愈伤组织年龄,接种量大的,用于脱壁的愈伤组织年龄应小些。这些结果表明继代培养物的生长状况显著影响原生质体脱壁效率。进入指数增长期不久的愈伤组织有较好的原生质体得率。镜检表明:原生质体得率高的,具大液泡原生质体%明显较低。愈伤组织年龄适宜时所分离的原生质体体积较小,质浓、液泡小。这些观察所得与上述结果是一致的。本文实验结果与上述引文也是一致的。因此,在从软紫草 *A. euchroma* 愈伤组织分离原生质体时应注意筛选出适宜的继代周期天数、当代培养天数和适宜的接种量,而且,一经确定后,还应保持以上诸参数的稳定才能获得较高、稳定的原生质体得率。

参 考 文 献

- 1 赵桂兰. 红豆草下胚轴悬浮细胞原生质体培养再生植株. 植物学报, 1990, 32(12): 975—976
- 2 Akiyama F, Ohashi Y, Kimura I. Studies on culture condition for efficient protoplast preparation from suspension cultured rice cells. Bull. Nat. Instit. Agrobiol. Res., 1988, (4): 109—126
- 3 Fukunaga Y, King J. Effects of different nitrogen sources in culture media on protoplast release from plant cell suspension cultures. Plant Sci. Lett., 1978, 11(3-4): 241—250
- 4 Fujita Y, Takahashi S, Yamada Y. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cell. agric. Biol. Chem., 1985, 49(6): 1755—1759
- 5 Gill R, Eapen S. Plant regeneration from hypocotyl protoplast of mothbean (*Vigna aconitifolia*). Carr. Sci., 1986, 55(2): 100—102
- 6 Maeda Y, Fujita Y, Yamada Y. Callus formation from protoplasts of cultured *Lithospermum erythrorhizon* cells. Plant Cell Rept., 1983, 2(4): 179—182
- 7 Wang D-Y, Miller PD, Sondahl MR. Plant regeneration from protoplast of indica type rice and CMS rice. 1989, Plant Cell Rept., 1989, 8(6): 329—332
- 8 Toriyama K, Hinata K. Cell suspension and protoplast culture in rice. Plant Sci., 1953, 41(3): 179—183