

# 野大麦幼根和幼叶悬浮细胞系的原生质体培养

程肖蕊 张亚兰 杨松涛 李彦舫

(解放军农牧大学生物教研室, 长春 130062)

**摘 要** 以野大麦 (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link) 的幼根、幼叶为外植体, 诱导愈伤组织, 建立悬浮细胞系。利用胚性悬浮细胞系进行质壁分离处理再游离原生质体, 在不同的光照条件下进行原生质体培养, 并由原生质体再生出小细胞团。

**关键词** 野大麦, 原生质体, 细胞分裂

**中图分类号** S543.9

原生质体的研究是一个在理论和实践上皆占有重要地位的研究领域, 以至成为 20 世纪植物学研究领域的一个热点, 并取得了较为重大的进展。野大麦是一种多年生的优质牧草, 具有良好的生产性能和较高的经济价值<sup>[1]</sup>。本研究目的是建立野大麦稳定的原生质体培养体系, 为探索野大麦细胞工程育种和遗传改良的新途径奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 愈伤组织的诱导和继代

参照程肖蕊等<sup>[2]</sup>和张亚兰<sup>[3]</sup>等人的方法

### 1.2 悬浮细胞系的建立

选取胚性愈伤组织来建立悬浮细胞系。在 100 mL 三角瓶中, 散射光条件下, 温度为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 转速为 120 r/min 的旋转式摇床上培养。悬浮系的建立过程分为 3 个时期: 第 1 时期以每 1 g 愈伤组织加入 5 mL 培养液 (MS 无机盐 + CH  $1000 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + L-Pro  $500 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + 肌醇  $250 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + 有机附加液 + 2,4-D  $2.0 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + Sucrose  $30 \text{ g}^\circ \text{L}^{-1}$  pH5.8. 有机附加液: VB<sub>1</sub>  $5.0 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + VB<sub>6</sub>  $5.0 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + Gly  $2.0 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$  + 烟酸  $5.0 \text{ mg}^\circ \text{L}^{-1}$ ) 中进行培养, 每隔 10 d, 用新鲜培养液更换原培养液, 更换时保留 2/3 原培养液; 第 2 时期每隔 1 周更换一次原培养液, 更换时保留 1/3 原培养液; 第 3 时期每 3~4 d 更换 1 次原培养液, 更换时保留 2/3 原培养液, 进行强化继代培养。每次换液时用倒置显微镜进行观察。

### 1.3 悬浮细胞系的质壁分离处理

将胚性悬浮细胞系以 1 g 材料比 15 mL 质壁分离液 (CPW 盐溶液 +  $200 \text{ g}^\circ \text{L}^{-1}$  Sucrose pH5.8) 的比例置 100 mL 的三角瓶中, 在 120 r/min 的摇床上,  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 散射光下处理 30 min。

### 1.4 原生质体的分离和收集

将未经质壁分离处理的材料或经过质壁分离处理的材料以 1 g 细胞团比 10 mL 酶

收稿日期 1997-07-26

课题来源 总后军需部课题资助项目

作者简介 程肖蕊, 女, 1972 年生, 硕士

解液 ( $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Cellulase Onozuka RS  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Pectolyase Y-23+  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Macerozyme R-10+ CPW 盐溶液+  $109.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Mannitol+  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MES pH5.7) 的比例置于培养瓶中,  $28^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下, 在  $80 \text{ r/min}$  的摇床上酶解 4 h. 将解离好的酶解物用孔径  $38 \mu\text{m}$  的镍丝网过滤于  $10 \text{ mL}$  离心管中, 置  $800 \text{ r/min}$  的离心机上离心 5 min 后倒去上层酶液, 收集底部原生质体. 用原生质体洗液 (CPW 盐溶液+  $109.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Mannitol +  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MES pH5.8) 洗 2 次, 培养液洗 1 次, 吸取 1 滴原生质体悬液加入血球计数板内, 在显微镜下统计原生质体的得率, 用相应的培养液将原生质体密度调节到  $7 \times 10^2$  个  $/\text{mL}$ . 原生质体培养液为: Km8pt  $2, 4\text{-D}$   $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + CH  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + Glucose  $68.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  +  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Sorbitol+  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Mannitol, pH5.8.

### 1.5 原生质体的活性检测

吸取原生质体悬液 1 滴置于载玻片上, 于显微镜下检测其活性. 用  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酚藏花红染色剂进行染色, 参照叶和春<sup>[4]</sup>的方法. 检测时, 随机选取至少 3 个视野, 统计原生质体数不少于 300 个.

### 1.6 原生质体的培养

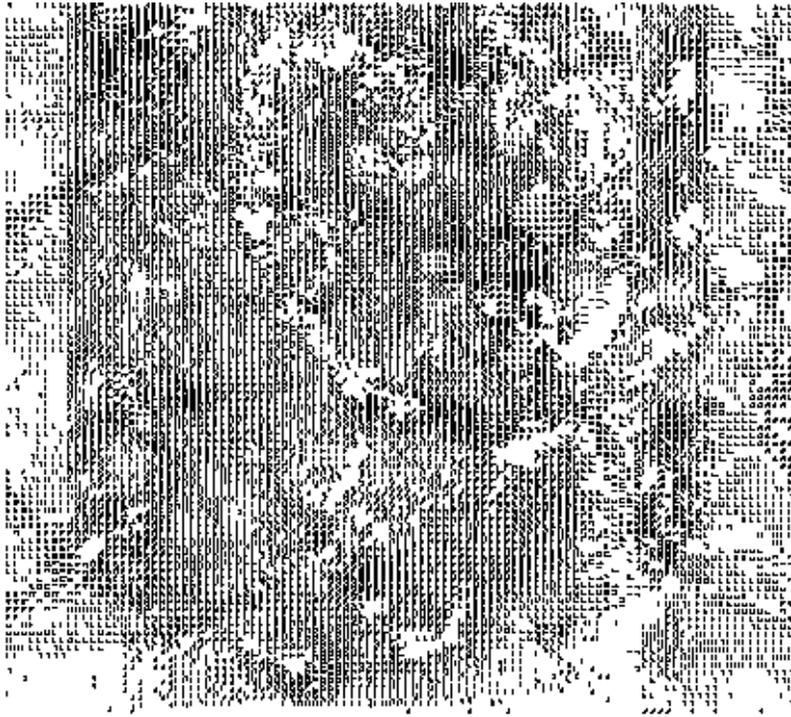
将原生质体一部分置光照强度  $1000 \text{ lx}$ , 每天人工光照  $10 \text{ h}$  的条件下培养; 一部分置弱散光下培养; 一部分进行暗培养. 培养温度皆为  $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ . 培养方式为低熔点琼脂糖包埋培养, 每周添加一次添加培养基 (Km8pt  $2, 4\text{-D}$   $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + CH  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  +  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glucose+  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Sucrose, pH5.8)

## 2 结 果

### 2.1 愈伤组织的诱导和悬浮细胞系的建立

幼根 幼叶切段均可诱导出愈伤组织, 适于建立悬浮细胞系的胚性愈伤组织为黄色或鲜黄色、较干燥、颗粒状、增殖快的胚性愈伤组织.

悬浮细胞系的建立分为 3 个时期. 第 1 时期为愈伤组织适应期, 主要是愈伤组织适应液体培养的过程, 能适应液体培养的愈伤组织仍保持其细胞增殖能力, 不适应液体培养的愈伤组织变褐. 该时期主要由大块愈伤组织 (直径  $3 \text{ mm}$  左右) 组成, 另外在大块愈伤组织的周边及培养物中还有一些长条形、不规则形或近椭圆形, 并具有明显大液泡的细胞. 第 2 时期为细胞增殖期, 愈伤组织适应液体培养后, 细胞分裂开始加快, 小愈伤组织块 (直径  $1 \sim 3 \text{ mm}$ ) 大量形成, 小细胞团 (由 100 个以下的细胞组成) 数量明显增多, 但仍以小愈伤组织块为主. 该时期细胞团周缘细胞的细胞质透明, 具有明显的大液泡, 而中央部位细胞的细胞质较浓厚, 颗粒状内含物较丰富. 第 3 时期为悬浮细胞系建成期, 该时期刚开始时, 小愈伤组织块 (直径  $1 \sim 3 \text{ mm}$ ) 占 90% 以上, 细胞生长快, 呈鲜黄色. 换液 3~4 次后, 则以小细胞团为主 (几个到几十个细胞构成). 这时细胞为圆形或椭圆形, 细胞质浓厚, 颗粒状内含物丰富, 无明显的液泡 (图版 -1). 此时细胞系为胚性悬浮细胞系, 适合于用作分离原生质体的材料. 幼根、幼叶建立悬浮细胞系需要时间分别为  $80 \text{ d}$  或  $45 \text{ d}$ .



图版说明

1. 分离原生质体的悬浮细胞系  $\times 10$ ; 2. 刚分离的原生质体  $\times 25$ ;  
3. 第一次细胞分裂  $\times 40$ ; 4. 再生的小细胞团  $\times 25$

## 2.2 原生质体的分离

将悬浮系细胞进行质壁分离处理,再进行酶解,分离原生质体。结果表明:质壁分离处理组与未经该处理的对照组相比,其原生质体的得率明显增加,可提高 3~4 倍。原生质体活力也有所提高(附表)。

附表 质壁分离处理对原生质体得率和活力的影响

外植体	原生质体得率(个/g)		原生质体活力	
	幼根	幼叶	幼根	幼叶
未处理(A组)	$2.7 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	62.17%	64.31%
处理(B组)	$1.2 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	73.89%	75.56%
B组/A组	4.44	3.85	1.19	1.17

## 2.3 原生质体的培养

2.3.1 原生质体的发育 刚刚分离的原生质体呈圆球形,内含物丰富,无明显液泡(很少有明显液泡),大小较为均一(图版-2)。在弱散光下经培养 1~2 d,原生质体的体积变大,形状从球形变为椭圆形或卵圆形,也有出芽现象。在培养后第 7 天、第 9 天可分别观察到

幼根、幼叶细胞的第一次分裂(图版-3),第 15 天分裂频率分别为 2.15%、1.38%。分别在培养后第 13 天、第 17 天观察到第二次分裂,且第 25 天分裂频率依次为 3.02%、2.52%。继续长时间培养,约 50 d,可观察由几个或几十个细胞构成的大小不等的小细胞团(图版-4),原生质体培养到 150 d,也未见愈伤组织的形成。该工作还需进一步研究。

2.3.2 光照对原生质体发育的影响 原生质体在不同的光照条件下培养,结果表明:在光照强度为 1000 lx 每天人工光照 10 h 条件下培养的原生质体,没有观察到细胞分裂,最后出现变褐现象。在暗环境中培养的幼根、幼叶原生质体,出现第一次细胞分裂的时间分别是在培养的第 10 天和第 14 天,比在弱散光下培养的晚,第 25 天统计的细胞分裂频率,分别为 1.17% 和 1.01%,比在弱散光培养条件下的低,没有观察到第二次细胞分裂和小细胞团的形成。根据该实验结果,认为野大麦的原生质体培养宜在弱散光下进行。

## 3 讨 论

### 3.1 质壁分离处理悬浮细胞系对原生质体分离和培养的影响

对分离原生质体的材料作适宜的处理,这对于一些难以培养的材料或进一步提高已成功原生质体无性系的再生频率是一条有效的途径<sup>[5]</sup>。预处理通常采用的有暗处理、热处理、冷处理、预培养和化学药剂处理等手段。如在菜豆叶肉原生质体培养中,如果直接取自温室中生长的叶片游离,则残片多,产量低,但在 22~25℃,相对湿度为 45%~47% 的条件下暗处理 24 h,则可得到高产的原生质体<sup>[6]</sup>。豌豆的叶片在分离原生质体前,先在黑暗中处理 4~5 d,可以获得活力高的原生质体<sup>[7]</sup>。在野生梨原生质体分离时,如果使用大田生长的植株叶片,经表面灭菌之后,在酶处理之前,需要把叶片在 B<sub>5</sub> 培养基中浸泡 20 h,原生质体活力才较高<sup>[8]</sup>。Revilla 等<sup>[9]</sup>对 14 个基因型的落叶果树和坚果树种的生长于温室的植株及芽培养的叶片进行原生质体分离,取下叶片并切成窄条后,在含 130 g·L<sup>-1</sup> Mannitol+CPW 盐溶液中浸泡 1 h,进行质壁分离处理,结果原生质体的产量和活力均较高。本试验将野大麦的悬浮系细胞置 200 g·L<sup>-1</sup> Sucrose+CPW 盐溶液中 30 min,进行质壁分离处理,原生质体的得率提高了 3~4 倍。该结果与 Revilla 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。质壁分离处理可使原生质体得率提高的原因可能是质壁分离使细胞壁内表面充分暴露,增加胞壁降解酶与细胞壁的接触面,从而提高了单位时间内细胞壁的降解速度。同时,黄百渠<sup>[10]</sup>认为,酶解之前对材料轻微的质壁分离处理可能会有以下几个好处:减轻游离过程对原生质体的损伤,降低自发融合的机率,封闭胞间连丝以防止细胞质物质外流,因为有些胞质成分如核酸酶等进入酶解后会引发原生质体的衰老和溶胞作用。

### 3.2 光照对原生质体发育的影响

光照条件是一个经常被注意到的环境因子。通常认为强光照对原生质体特别对刚分离出的原生质体是不利的。王铁邦等<sup>[11]</sup>将小偃麦的原生质体在弱散光和黑暗条件下进行培养,结果在弱散光下培养的样品中未观察到细胞分裂,而在暗培养下却有愈伤组织形成。Wu 等<sup>[12]</sup>的巴豆杏原生质体培养试验证明了在黑暗条件下细胞增殖比光照(1500 lx)要快。本试验将野大麦的原生质体在每 10 h 1000 lx 的人工光照、弱散光和黑暗条件下进行培养,结果在光下培养的原生质体没有观察到细胞分裂,弱散光下培养的原生质体细胞分裂出现的时间比在黑暗条件下早,分裂频率比在黑暗条件下高,说明弱散光对野大麦原

生质体的生长发育是有利的。与此相反, *Nemesia strummosa* 的原生质体在 80 000 lx 的强光照下生长得最好<sup>[10]</sup>。Ochatt 等<sup>[8]</sup>对野生梨原生质体做了黑暗、连续光照、16 h 光照和 8 h 黑暗的对照处理, 结果 16 h 光照周期的植板率最高, 其细胞分裂频率分别为 6%、12%、28%。从这些实例可以看出, 不同植物原生质体对光照的要求不同, 其变化范围很大, 各自具有不同的调控机制

### 参 考 文 献

- 1 程肖蕊, 杨松涛, 张成武. 草原之星——野大麦. 植物杂志, 1996(6): 12
- 2 程肖蕊, 张亚兰, 杨松涛等. 野大麦幼根的愈伤组织诱导和植株再生. 吉林农业科学, 1997(2): 94~ 97
- 3 张亚兰, 程肖蕊, 李彦舫. 野大麦幼叶的组织培养. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 359
- 4 叶和春. 水稻细胞悬浮培养及植株再生. 见: 孙敬三, 桂耀林主编. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995. 43
- 5 赵军良, 李昌华, 李小川. 植物原生质体培养在方法学上的进展. 山西农业科学, 1994, 22(1): 55~ 58
- 6 Pelcher L E, Gamborg O L, Kao K N. Bean mesophyll protoplasts production, culture and callus formation. Plant Sci Lett, 1974, 3: 107~ 111
- 7 Costabel F, Kirkpatrick J W, Gamborg O L. Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. Can J Bot, 1973, 51: 2105~ 2107
- 8 Ochatt S T, Caso O H. Shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of wild pear (*Pyrus communi*. var. *pyraster* L.). J Plant Physiol, 1986, 122: 243~ 249
- 9 Revilla M A, Ochatt S J, Daughy S *et al.* A general strategy for the isolation of mesophyll protoplasts from deciduous fruit and nut tree species. Plant Sci, 1987, 50: 133~ 137
- 10 黄百渠编著. 植物体细胞遗传学简明教程. 长春: 东北师范大学出版社, 1991. 121
- 11 王铁邦, 钱迎倩, 李集临等. 小偃麦原生质体培养及植株再生. 植物学报, 1990, 32(5): 329~ 336
- 12 Wu S C, Kuniyuki A H. Isolation and culture of *Almond* protoplasts. Plant Sci, 1985, 41: 55~ 60

## Protoplast Culture from Suspension Cell Line of Young Root and Leaf of Wild Barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link)

Cheng Xiaorui Zhang Yalan Yang Songtao Li Yanfang

(Department of Biology, Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062)

**Abstract** In this study, young roots and young leaves of wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link) were used as explants to induce calli. Through several subcultures, embryogenic calli were selected and adopted to establish suspension cell lines. Protoplasts were isolated from embryogenic suspension cell line after plasmolysis treatment and cultured under different light conditions. Cell mini-clusters regenerated from protoplasts.

**Key words** wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link), protoplast, cell division