

“索蚌”百合原生质体分离及培养的研究

孙晓梅¹, 王 晶², 罗凤霞³, 杨宏光¹, 孙素芬²

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161; 2 北京市农林科学院信息所, 北京 100097; 3. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘 要: 用纤维素酶、离析酶、果胶酶、山梨醇的混合酶液提取“索蚌”百合的幼叶和愈伤组织原生质体。对影响原生质体提取率因素进行分析, 用液体浅层培养法在 MS、改良 MS 和 NLN 培养基附加不同浓度 6-BA, 2, 4-D 等进行培养。结果表明: 纤维素酶和酶解时间对原生质体提取率有极显著影响, 最适合百合幼叶原生质体提取的酶液组合为: 2% Cellulase R-10, 0.5% Macerozyme R-10, 酶解 4 h。百合愈伤组织原生质体提取的酶液混合液组合为: 2% Cellulase R-10 + 0.5% Macerozyme R-10 + 0.05% Pectolyase Y₂₃ + 147 mg/L CaCl₂ · 2H₂O + 976 mg/L MES + 0.6 M Sorbitol。进行原生质体的培养仅愈伤组织为来源的观察到细胞的分裂, 幼叶为来源的原生质体几乎没有分裂, 但两者最终都没有形成愈伤组织。

关键词: 百合; 原生质体; 提取; 培养

中图分类号: S 682.2⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)10-0170-03

“索蚌”(Sorbonne)花大娇艳, 气味芳香, 具有较高的观赏价值和经济价值, 在百合鲜切花市场中倍受欢迎。由于百合品种间杂交与父母本之间的亲缘关系远近、胚囊发育状况、雄配子育性、授粉受精方式等多因子有关, 品种间杂交大多不亲和。因此, 采用体细胞杂交、物理及化学诱变等现代生物技术进行百合种质创新, 可望获得理想的优良新品种, 而原生质体培养及植株再生是体细胞杂交的前提。试验以“索蚌”百合的叶子和愈伤组织为材料, 进行原生质体提取及培养研究, 以便为百合原生质体再生植株及进一步的体细胞杂交提供技术资料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料来自北京市农林科学院蔬菜中心花卉组培室“索蚌”百合的无菌幼苗, 以百合的叶子和愈伤组织为材料, 进行百合原生质体提取和培养的研究。

1.2 方法

1.2.1 叶片原生质体分离的影响因素 采用 L₉(3⁴) 正交试验设计(表 1), 研究纤维素酶(Cellulase Onozuka R-10), 离析酶(Macerozyme R-10)及酶解时间对百合原生质体提取率。将上述药品溶于含有 147 mg/L CaCl₂ · 2H₂O, 976 mg/L 2-N-吗啉乙烷磺酸(MES),

0.4M 山梨醇(Sorbitol)溶液中。取百合无菌苗的叶片 0.5 g, 沿叶脉垂直 0.5~1 mm 宽的羽状细条, 放入含 5 mL 酶液的直径 6 cm 培养皿中, Parafilm 封口。置恒温(25℃)摇床(30 rpm)上黑暗条件酶解。每隔 1 h 在倒置显微镜下观察一次, 原生质体开始出现后, 以观察时原生质体的平均密度对比前 1 h 不再增加为最适的解离时间, 以游离出最大量完整的原生质体来探讨较好的酶解条件。用孔径为 50~80 μm 的尼龙网将原生质体酶解液过滤至无菌的离心管中, 以除去未酶解完全的材料及大量细胞团。750 rpm 离心 3 min, 弃去上清液。再缓慢加入 5 mL 的 0.6 M 的蔗糖溶液将原生质体悬浮, 上层加入 1 mL 0.6 M 的山梨醇溶液分层, 在 1 000 rpm 离心 5 min, 这时在两个液面间出现一条乳白色的原生质体带, 用吸管小心地吸出漂浮于溶液界面的原生质体于一个新的离心管中, 用山梨醇溶液洗涤 1 次, 用 750 rpm 离心 3 min。用血球计数器计算产量。

表 1 叶片原生质体分离的影响因素

水平	Cellulase R-10/%	Macerozyme R-10/%	酶解时间/h	ε(误差)
1	1	0.2	3	
2	2	0.5	4	
3	3	1	5	

1.2.2 愈伤组织原生质体分离的影响因素 取索蚌百合诱导出 0.5 g, 3×3 mm 大的愈伤组织放入含 5 mL 酶液(表 3)的 6 cm 培养皿中, 置恒温(25℃)摇床(30 rpm)上黑暗中酶解 4 h, 分离及纯化方式同上, 进行原生质体提取率比较。对叶片和愈伤组织提取的原生质体进行培养。用培养液将原生质体密度调为 1~2×10⁵/mL, 取 3 mL 原生质体在 6 cm 培养皿进行液体浅层培养, 用

第一作者简介: 孙晓梅(1970-), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事园林植物遗传育种教学研究。E-mail: xiaomei7280@126.com。
通讯作者: 罗凤霞(1958-), 女, 北京市农林科学院研究员, 硕士, 从事花卉育种和植物组织培养研究工作。E-mail: luofx@126.com。
收稿日期: 2007-06-04

Parafilm 封口, 在 25℃ 恒温箱中暗培养。在倒置显微镜下观察原生质体分裂情况。

表 2 愈伤组织分离原生质体的酶液

酶液	成分
1	1%Cellulase R-10+0.2%MacerozymeR-10+147 mg/L CaCl ₂ ·2H ₂ O+976 mg/L MES+0.6M Sorbitol
	2%Cellulase R-10+0.5%MacerozymeR-10+147 mg/L CaCl ₂ ·2H ₂ O+976 mg/L MES+0.6M Sorbitol
2	2%Cellulase R-10+0.5%MacerozymeR-10+147 mg/L CaCl ₂ ·2H ₂ O+976 mg/L MES+0.6M Sorbitol
	2%Cellulase R-10+0.5%MacerozymeR-10+0.05%Pectolyase Y23+147 mg/LCaCl ₂ ·2H ₂ O+976 mg/L MES+0.6M Sorbitol
3	

表 3 原生质体培养基

培养基成分	培养基序号 /mg·L ⁻¹		
	1	2	3
基本培养基	MS	改良 MS	NLN
葡萄糖/M	0.5		0.5
蔗糖/M		0.4	
甘露醇/M		0.48	
6-BA/mg·L ⁻¹	2	1	0.5
2,4-D/mg·L ⁻¹		0.5	0.5
pH	5.7	5.7	5.7

2 结果与分析

2.1 影响叶片原生质体分离的影响因素分析

9 个组合酶液处理中, 原生质体得率最低处理为 6.70×10⁵个·g⁻¹, 最高为 13.90×10⁵个·g⁻¹。方差分析(表 4)表明, 纤维素酶和酶解时间对原生质体提取得率的影响有极显著差异, 并且纤维素酶在原生质体提取中所起的作用更大, 离析酶对原生质体提取得率无显著差异。

而从极差分析表(表 5)得出, 利于提高百合幼叶原生质体提取得率的最佳组合为: 2%Cellulase R-10, 0.5%MacerozymeR-10, 酶解 4 h, 这一组合并未在试验中出现。极差 R 值越大的因素对指标影响越显著, 试验中, 各因素主次关系为纤维素酶> 酶解时间> 离析酶。

表 4 原生质体提取得率影响因素方差分析表

项目	平方和	数据	均方	F	Sig.
Corrected Model	43.253	6	7.209	16.261	0.059
Intercept	900.000	1	900.000	2030.075	0.000
Cellulase R-10	22.887	2	11.443	25.812	0.037
Macerozyme R-10	1.140	2	.570	1.286	0.437
酶解时间	19.227	2	9.613	21.684	0.044
Error	.887	2	0.443		
Total	944.140	9			
Corrected Total	44.140	8			

注 R Squared=0.980 Adjusted R Squared=0.920

2.2 愈伤组织原生质体分离的影响因素分析

相同质量的愈伤组织在不同的酶液中的原生质体得率不同。酶液 1, 2, 3 得率分别为 7.9×10⁵, 11.4×10⁵, 12.1×10⁵。纤维素酶在 2%的情况下较合适, 但加入果胶酶的影响并不十分显著, 酶液 3 比 2 的得率略有提高。

2.3 原生质体的培养

不同材料来源的原生质体在不同培养基中的表现有所不同。从叶片游离得到的原生质体基本没有分裂或极少经过 1~2 次分裂, 30 d 后大量解体。从愈伤组织得到的原生质体在培养基 2, 3 中, 部分 7 d 后第 1 次分裂, 14 d 后形成 2~3 个细胞团, 但逐渐解体或褐化死亡。

表 5 原生质体提取得率影响因素极差分析表

试验号	A	B	C	误差	得率×10 ⁵ /个·g ⁻¹	X=(1+p) ^{1/2}
1	1	1	1	1	8.50	3.082207
2	1	2	2	2	12.30	3.6469165
3	1	3	3	3	7.90	2.9832868
4	2	1	2	3	13.90	3.8600518
5	2	2	3	1	10.60	3.4058773
6	2	3	1	2	11.90	3.591657
7	3	1	3	2	6.70	2.7748874
8	3	2	1	3	8.60	3.0983867
9	3	3	2	1	9.60	3.2557641
K1	28.70	29.10	29.00	28.70		
K2	36.40	31.50	35.80	30.90		
K3	24.90	29.40	25.20	30.40		
k1	9.57	9.70	9.67	9.57		
k2	12.13	10.50	11.93	10.30		
k3	8.30	9.80	8.40	10.13		
R	3.83	0.80	3.53	0.73		

3 结论与讨论

通过 9 种酶液配方对百合幼叶的原生质体提取的结果进行方差和极差分析, 选出最适合的酶液组合为: 2%Cellulase R-10, 0.5%Macerozyme R-10, 酶解 4h。纤维素酶和酶解时间对原生质体提取得率的影响有极显著差异, 并且纤维素酶在原生质体提取中所起的作用更大。百合愈伤组织的原生质体提取的酶液混合液组合为: 2%Cellulase R-10+0.5%MacerozymeR-10+0.05%Pectolyase Y23+147 mg/L CaCl₂·2H₂O+976 mg/L MES+0.6M Sorbitol。

试验进行原生质体的培养, 仅愈伤组织为来源的观察到细胞的分裂, 幼叶为来源的原生质体几乎没有分裂, 但两者最终都没有形成愈伤组织。Mii M. 从 Lilium×formolongi 愈伤组织的悬浮细胞分离出原生质体, 用平板培养法将原生质体包埋在含有 4.1μM picloram 的 MS 培养基中, 成功的形成了细胞团并形成植株。Tanimoto S 采用双层培养法在培养基中加入 0.1μM 2,4-D 使细胞分裂率达到 6%。因此, 对于“索蚌”百合原生质体进一步的研究应该着重于原生质体的培养方式, 基本培养基及激素的选择, 原生质体来源的愈伤组织的继代次数, 以及百合易再生基因型的选择。

参考文献

[1] Mii M, Yuzawa Y, Suetomi H, et al. Fertile plant regeneration from protoplasts of a seed-propagated cultivar of Lilium X formolongi by utilizing meristematic nodular cell clumps[J]. Plant-Sci, 1994, 100: 221-226.

- [2] Famelaer J, Bordes M, Balu E, et al. The use of morphogenic suspension cultures for the development of a protoplast regeneration system in lily[J]. Acta-Horticulturae 1997, 430, 339-345.
- [3] Goto T, Matsui K, Kida T, et al. Effect of sugar type on the efficiency of plant regeneration from protoplasts isolated from shoot tip-derived meristematic nodular cell clumps of Lilium Xformolongi Hort[J]. Plant-Cell-Re

ports 1996, 15, 6, 401-404.

- [4] 王槐, 陈正华. 植物体细胞杂交的进展[J]. 生命科学, 1999, 6(11): 100-103.
- [5] 向凤宁, 黄贤荣, 王颖, 等. 柴胡与高寒藏药一川西獐芽菜科间体细胞杂交[J]. 山东大学学报, 2003, 38(2): 93-97.

Isolation and Culture of lily "Sorbonne" Protoplasts

SUN Xiao-mei¹, WANG Jing², LUO Feng-xia³, YANG Hong-guang¹, SON Su-fen²

(1. Forestry College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Information Research Center of Beijing Academy of Agricultural and Forestry Science, Beijing 100097, China;

3. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097, China)

Abstract: Mixed enzyme liquid of cellulase R-10, Macerozyme R-10, Pectolyase Y₂₃ and Sorbitol was used to extract the protoplasts from sterilized seedling leaves and callus of lily "Sorbonne". The factors affecting the yield of protoplasts were analyzed and the yield of protoplast from different sources was compared. The protoplasts obtained were cultured by liquid on MS, modified MS and NLN media with different concentrations of 6-BA, 2, 4-D etc. The results showed that cellulase R-10 and enzyme time had extremely significant influences on the extract yield of protoplasts. The suitable enzyme liquid combination for extracting protoplast of seedling leaves was: 2% Cellulase R-10 + 0.5% Macerozyme R-10, 4 hours; suitable enzyme liquid combination for extracting protoplast of callus was: 2% Cellulase R-10 + 0.5% Macerozyme R-10 + 0.05% Pectolyase Y₂₃ + 147mg/L CaCl₂ · 2H₂O + 976mg/L MES + 0.6M Sorbitol. Only the protoplast from callus could observe cell divisions, protoplast from seedling leaves had no division, but none of them form the new callus.

Key words: Lilium; Protoplasts; Isolation; Culture

★最受农民欢迎的报刊

农业信息 周刊

主办:山西省农业科学院 刊号:CN14-0048

《农业信息周刊》(即原《农业信息报》)四天八版,每周一期。主要以农民朋友、基层干部和涉农部门为服务对象;以引导农民依靠科技、利用信息致富奔小康为办报宗旨;以宣传党的农村政策、沟通农业生产和市场信息、分析和预测农产品市场走势、推广农业实用技术为已任;以信息的实用性、准确性和可操作性为主要特点。创刊十多年来,深受读者的喜爱和好评。

全国各地邮政局(所)
均可订阅

全年定价仅
28元

欢迎订阅刊发广告

邮发代号:21-83

社址:太原市农科北路64号 邮编:030031

电话:(0351)7122943(编辑部)

7121194(广告部)

7122487(服务部)

来函即赠送样报

网址: <http://www.sxagri.ac.cn>

E-mail: nyxxb@sina.com.cn