

## 提高马铃薯原生质体细胞分裂频率的研究<sup>X</sup>

李 韬<sup>XX</sup> 戴朝曦<sup>XXX</sup>

(甘肃农业大学农业生物工程研究所, 甘肃兰州, 730070)

**提 要** 为了提高马铃薯原生质体培养时的细胞分裂频率, 对原生质体游离、纯化、培养过程中的几个重要环节进行了研究。结果表明: 以蔗糖作为渗透压调节剂游离原生质体时, 原生质体的损伤小、活力好、分裂频率高、原生质体自发融合频率低; 采用看护培养时, 在同一属内, 马铃薯物种的异同, 饲养层愈伤组织与培养细胞的亲缘关系的远近, 对饲养效果并无显著影响; 进行单个原生质体培养时加入 1.2% 的马铃薯块茎浸提液可明显提高细胞分裂频率; 酶的纯度也是影响原生质体游离效果的重要因素之一。

**关键词** 马铃薯; 原生质体; 细胞分裂频率

## Studies on Improving the Cell Division Frequency of Potato Protoplasts

L I T a o D A I C h a o X i

(Agricultural Biotechnology Institute, Gansu Agricultural University, Lanzhou, 730070)

**Abstract** The low cell division frequency of the protoplasts is one of the main problems in potato protoplast manipulation. The present studies aimed at solving the problem. The results showed that the protoplasts had good vigor, high cell division frequency and low cell self-fusion frequency as well as less cell damage frequency when sucrose was used as osmotic regulator during the isolation of protoplasts. Using nurse culture system, the cell division frequency of protoplasts could be increased but no significant effects could be found from different potato species and different blood relationship to the culture results. Using single protoplast culture system, good results were also obtained when the 1.2% potato tuber extraction solution was supplied into the medium. The purity of the enzymes used to isolate protoplasts was also one of the important factors which affect the yield and the vigor of protoplasts.

**Key words** Potato; Protoplast; Cell division frequency

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是粮菜兼用型作物, 原生质体的培养在遗传操作及育种研究中有着重要的意义, 它既是体细胞融合与杂交的基础, 同时也是获得体细胞变异的一个重要手段。马铃薯原生质体培养最早获得成功的是美国的 Shepard<sup>[1]</sup>。截止目前, 马铃薯原生质体培养取得了很大进展, 共有 80 多个品种或品系的马铃薯原生质体培养再生了植株<sup>[2]</sup>, 其中包括四倍体栽培品种、双单倍体品系和野生种。原生质体来源于不同的器官或组织, 以叶片来源的最多, 此外还有悬浮培养的细胞、芽、叶柄、块茎贮藏细胞、根尖和实生苗子叶及下

X 国家自然科学基金资助项目; 国家“九五”重点科技攻关资助项目。

XX 现在地址: 扬州大学农学院农学系, 江苏扬州, 225009。

XXX 联系人

收稿日期: 1999206203, 接受日期: 2000201215

胚轴。因此,马铃薯是原生质体培养再生植株涉及品种最多的作物<sup>[3]</sup>。虽然前人在原生质体研究中做了许多富有成效的研究工作,但是原生质体的操作技术还不完善,有许多方面的问题仍需解决,主要是原生质体的得率和分裂频率较低,操作重复性差。本文对原生质体游离、纯化、培养过程中的几个重要环节进行了比较深入的研究,旨在进一步改善原生质体的生理状态,提高原生质体的得率、细胞分裂频率和实验结果的重复性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料的来源及繁殖

实验材料来源于甘肃农业大学农业生物工程研究所用花药培养法产生的普通栽培种 (*Solanum tuberosum* L.) 双单倍体品系 84237 ( $2n = 2x = 24$ ), 一个二倍体野生种 *Solanum bulbocastanum* ( $2n = 2x = 24$ ) 和一个四倍体栽培品种 Russet Burbank ( $2n = 2x = 48$ ) 的无菌试管苗。

材料的繁殖采用带有 1~2 个腋芽的茎切段扩大繁殖的方法,以继代培养 15~25d 的无菌试管苗的中上部幼嫩叶片作为游离原生质体的供体材料。同时取上述三种材料的一部分,分别以其无菌苗叶片为外植体来源诱导愈伤组织。以培养 30d 左右形成的具有旺盛分裂能力的愈伤组织作为看护培养时原生质体的饲养层。所有材料均置于  $25 \pm 2$ 、2000lx 连续光照的培养室中培养。

### 1.2 原生质体的游离

在无菌条件下,分别剪取继代培养 15~25d 的无菌试管苗中上部幼嫩叶片约 1.0g,放入一 60 mm × 15 mm 的培养皿中,将 10 mL 酶液(表 1)用装有孔径为 0.2 μm 微孔滤膜的细菌过滤器过滤两次(第一次用单层膜,第二层用双层膜)。然后将酶液倒入培养皿中,材料在酶

表 1 酶液组成成分

Table 1 Composition of enzyme solution	
组成成分 Components	浓度 Concentration
纤维素酶(Cellulase R210)	1.2%
离析酶(Macerozym R210)	0.3%
聚乙烯吡咯烷酮(PVP10000)	2.0%
2-N-吗啉乙烷磺酸(MES)	3.0 mmol/L
酪蛋白水解物(CH)	0.01%
渗透压调节剂(Osmotics) <sup>1)</sup>	0.30 mol/L
pH	5.6

注: 1) 分别为蔗糖、甘露醇, 以及 103 葡萄糖 + 203 甘露醇。

Note: 1) They are sucrose mannitol and 103 glucose + 203 mannitol, respectively.

液中剪碎后连同酶液一起倒入 15 mL 的抽滤瓶中,用真空抽气泵在压力为 0.05 MPa 下抽气使酶液渗进组织,直至在组织的边缘和表面不冒气泡为止,约需抽气 10 min。然后将组织和酶液转入另一 60 mm × 15 mm 的培养皿中,用 Parafilm (石蜡薄膜)封口后,置于可调温摇床上,在 25~30、40 rpm、黑暗或弱光条件下轻摇 6~8h,在原生质体游离终止前 2h 用镊子夹挤或用解剖针撕裂未被酶液消化的大块组织,降低摇床速度至 20 rpm,继续轻摇 2h 后纯化原生质体。

### 1.3 原生质体的纯化

原生质体的纯化采用漂浮法和沉降法相结合的方法<sup>[2]</sup>。

### 1.4 原生质体的培养

1.4.1 液体浅层静止培养 将上述纯化后的原生质体分别用原生质体培养基 RA<sup>[4]</sup>调整,使其密度为  $1 \times 10^4$  个/mL,然后移入 15 mm × 10 mm 的小培养皿中,用 Parafilm 封口,在  $23 \pm 2$ 、黑暗条件下静止培养。培养两周后,在倒置显微镜下统计细胞分裂频率,此后每隔两周补充新鲜等渗的原生质体培养基 RA 少许。

1.4.2 看护培养 分别在三个 60 mm × 15 mm 的培养皿底部铺一层愈伤组织诱导培养基 CI(M S+ 2.0 mg/L NAA), 将预先由双单倍体 84237, 二倍体野生种 *Solanum bulbocastanum* 及四倍体栽培品种 Russet Burbank 诱导 30d 左右的小愈伤组织, 用无菌镊子轻轻分成直径约为 4 mm 的小颗粒状, 分别均匀接种于 3 个不同培养皿中的愈伤组织诱导培养基上, 其上铺上无菌的双层滤纸, 滤纸孔径小于原生质体直径且滤纸边缘略高于培养基平面。调整悬浮液中原生质体的密度至  $1 \times 10^2$  个/mL 左右, 然后用吸管转移原生质体悬浮液至滤纸上。悬浮液液面不得高于滤纸边缘, 以免分散的愈伤组织单细胞和小细胞团混杂于原生质体悬浮液。用 Parafilm 封口后, 置于  $23 \pm 2$  °C、黑暗条件下静止培养, 培养 2 周时, 用吸管吸取悬浮液 0.2 mL 置于倒置显微镜下统计细胞分裂频率, 此后每隔一周补充新鲜降渗 (约 0.025 mol/L) 的原生质体培养基少许。

### 1.5 单个原生质体的培养

将塑料多孔细胞培养板 (8 × 12 个孔柱) 在 75% 的酒精溶液中浸泡 2h, 然后用无菌水冲洗 2~3 次, 置于超净工作台上吹风兼紫外线照射 30min 后备用。

培养方法: 将纯化的原生质体悬浮液调整成密度为  $1 \times 10^2$  个/mL 后, 分两次各吸取 1 mL, 分别用原生质体培养基 RA 和修改后的原生质体培养基 RA (附加 1.2% 的马铃薯块茎浸提液) 稀释 50 倍, 用微吸管每次吸取稀释后的原生质体悬浮液约 0.5 mL 注入细胞培养板的孔中, 盖上盖子后, 置于倒置显微镜下标记出只有单个原生质体的孔柱, 将其在  $23 \pm 2$  °C、黑暗条件下培养, 培养 2 周时统计单个细胞的分裂频率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同种类的渗透压调节剂对原生质体游离、纯化和培养的影响

在以往关于马铃薯原生质体培养的报道中, 不同研究者使用蔗糖<sup>[6-8]</sup>或甘露醇<sup>[13]</sup>作为渗透压调节剂, 有的还加入了葡萄糖<sup>[5, 6]</sup>。由于这些研究都是用不同基因型材料作为原生质体的供体, 且在不同的条件下进行的, 所得结果无法进行比较。为了比较这三种类型的渗透压调节剂在马铃薯原生质体游离、纯化及培养过程中的优劣, 本研究采用同一基因型的相同组织作为原生质体的供体材料, 在其它条件均相同的情况下, 对这三种不同的渗透调节剂的游离效果进行了对比实验, 结果列于表 2。结果表明: 以蔗糖作为渗透压调节剂明显地优于甘露醇和葡萄糖+甘露醇。其原因可能是由于蔗糖分子较大, 在同样的渗透压下具有较高的浮力, 原生质体一旦游离出来就漂浮于酶解液表面, 减少了用分子量较小的甘露醇或甘露醇加葡萄糖作为渗透压调节剂时由于原生质体沉底使原生质

表 2 不同类型渗透压调节剂对原生质体细胞分裂频率的影响

Table 2 Effects of different osmotics on protoplast division frequency			
渗透压调节剂类型	原生质体的细胞分裂频率 <sup>1)</sup>		平均 <sup>2)</sup>
Types of osmotics	Cell division frequency of protoplasts (%)		Average (%)
蔗糖 Sucrose	27.0	23.1	19.4
甘露醇+葡萄糖 Mannitol+ Glucose	11.5	22.0	17.7ab
甘露醇 Mannitol	14.4	9.3	10.6

注: 1) 所有的原生质体培养细胞均来自双单倍体品系 84237, 并用液体浅层培养。

2) 采用邓氏新复极差法进行差异显著性测验, 凡数字后面有相同字母者表示差异未达到 5% 显著水平。

Note: 1) All the protoplasts came from the dihaploid strain 84237 and cultured in thin layer solution media

2) The numbers of average followed by same letter mean that no significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test

体与未解离的碎片发生碰撞而破裂的损失。此外,甘露醇只能作为原生质体游离的渗透压调节剂,而不能为细胞吸收利用,而蔗糖和葡萄糖可被细胞吸收作为碳源加以利用,这对于较长时间游离原生质体时保持细胞的旺盛生活力是比较有利的。用蔗糖作为渗透压调节剂的缺点是:由于蔗糖会被细胞吸收,若游离时间过长会使渗透压降低,从而引起部分原生质体破裂,因此,掌握好游离时间是十分重要的。由于以不同基因型材料或同一基因型不同组织作为供体游离原生质体时,细胞的渗透压变化较大,不是一个固定的数值,究竟用多大渗透压和多长的游离时间只能根据实验中的多次观察确定。以甘露醇作为渗透压调节剂时,原生质体游离时间若超过6h,原生质体之间会发生不同程度的粘连现象,这可能是由于长时间的游离使得原生质膜表面的电荷发生改变,从而导致膜极性的改变而发生的。据我们多次的观察,发生粘连的原生质体对纯化漂浮和以后的培养均会产生不利的影响,但以蔗糖作为渗透压调节剂时,即使游离时间长达12h,对原生质体的培养效果并没有显著影响。此外,用蔗糖作渗透压调节剂在原生质体纯化过程中可从酶液直接漂浮,再经过用相同(或较高)渗透压的蔗糖漂浮2~3次即可。不过以蔗糖作为渗透压调节剂进行漂浮离心时对离心力要求严格,掌握不好会浪费一部分较好的原生质体,甚至根本漂不起来,用甘露醇或甘露醇+葡萄糖作为渗透压调节剂时,最初只能用沉淀法,然后再用价格较贵的Percoll或Ficoll漂浮,在经济性方面也不如用蔗糖。

在不同类型渗透压调节剂下原生质体细胞的分裂频率以及差异显著性测验结果列于表2,表中每个数据为10个观察视野( $10 \times 25$ )的平均值。可以看出,在原生质体来源、游离时间及苗龄均相同的条件下,采用不同类型渗透压调节剂时,原生质体细胞分裂频率有显著差异,细胞分裂频率以蔗糖为调节剂时最高。

## 2.2 看护培养时不同饲养层对原生质体细胞分裂频率的影响

原生质体培养方法也明显影响原生质体细胞的分裂频率,已报道的培养方法可大致归结为液体培养(包括液体浅层静止培养、微滴培养、悬滴培养、微室培养等)、固体培养、看护培养(即饲养层培养)。液体浅层静止培养简单易行,已被大多数研究者采用。固体培养在琼脂糖包埋和更换培养基过程中,很容易破坏原生质体,并且琼脂糖包埋后空气交换受到影响,对原生质体生长不利。看护培养虽然比较繁琐,但原生质体细胞的分裂频率较高。据已有的报道,看护培养的看护层(即饲养层)有多种形式,如核失活的原生质体、离散的细胞、悬浮培养细胞、愈伤组织等<sup>[3]</sup>。我们以不同基因型来源的愈伤组织作为饲养层对同一来源的原生质体的细胞分裂频率的影响进行了研究,结果列于表3。

表中所有数据也是10个观察视野( $10 \times 25$ )的平均值。结果表明,以同一属内的相同或不同马铃薯种诱导产生的愈伤组织作为饲养层,虽然其基因型不同,但在其它条件均相同的情况下,原生质体细胞分裂频率并无显著差异。这一结果与一些研究者认为饲养层与培养细胞只有在基因型保持一致的情况下饲养效果较好的观点不一致<sup>[3]</sup>,其原因尚待进一步研究。

此外,对表2和表3的数据进行比较可以看出,在其它条件均相同的情况下,采用看护培养时原生质体的细胞分裂频率明显高于液体浅层培养时原生质体的分裂频率,这可能是由于饲养层愈伤组织能够提供给原生质体分裂时所需的天然营养物质,其中某些成分是人培养基无法提供或没有提供的缘故。

## 2.3 单个原生质体培养

单个原生质体的分离培养有着重要的理论和实践意义,特别适用于原生质体得率极少的

场合, 并且容易观察培养时原生质体的分裂和分化以及植株再生的过程, 还能得到单一的细胞无性系。单个原生质体的分离和培养最早由 Koop 等<sup>[9, 10]</sup>报道, 他们将烟草的单个原生质体通过手工操作转移到培养基中进行微滴培养, 得到再生苗, 后来单个原生质体的培养方法有了

表 4 马铃薯块茎浸提液浓度对单个原生质体培养中细胞分裂频率的影响

Table 4 Effects of potato tuber extraction solution on cell division frequency in single protoplast culture

浸提液浓度 Concentration of extracts (%)	分裂频率 <sup>1)</sup> Cell division frequency (%)			平均 <sup>2)</sup> Average (%)
0.0	0.0	0.4	0.1	0.2e
0.4	8.2	8.4	7.6	8.1c
0.8	11.0	10.4	10.5	10.6a
1.2	12.0	11.8	10.8	11.5a
1.6	9.2	9.5	9.8	9.5b
2.0	5.3	5.3	6.9	5.8d

注: 1)和2)同表2。 Note: 1) and 2) are the same as table 2

较大的改进<sup>[11, 12]</sup>。关于马铃薯单个原生质体的分离和培养近年来也有研究报道, 如 Hunt 和 Helgson<sup>[13]</sup>在 Kao<sup>[12]</sup>等的 KM 培养基的基础上进行修改并加入了 0.1%~0.2% 的脱脂脂肪酸牛血清, 用多孔培养板、半固体琼脂糖包埋培养, 在普通栽培种和野生种 *Solanum cardiophyllum* 中, 均高频率地得到了单细胞无性系和植株分化。本实验采用高度稀释的方法, 用附加了 1.2% 的马铃薯块茎浸提液的原生质体培养基以改善原生质体的营养状态。培养 48h 后观察, 绝大部分原生质体体积增大、细胞伸长、颜色变浅, 在 72h 后发生第一次分裂, 培养 2 周时统计分裂频率, 可达 11.5%。而培养基中未加马铃薯块茎浸提液的原生质体几乎不分裂(表 4)。加入马铃薯块茎浸提液之所以能够显著提高细胞的分裂频率, 这是因为它不仅能够提供原生质体培养基中的营养成分, 而且还提供了原生质体生长和分裂所需的其它天然营养物质, 其中某些成分是人工培养基无法提供或没有提供的。此外, 培养基中马铃薯块茎浸提液的浓度不同, 细胞的分裂频率也有较大差异。但加入马铃薯块茎浸提液的浓度若超过 1.2%, 原生质体分裂频率反呈降低趋势, 且极易发生出芽现象。一些研究者认为, 原生质体的出芽现象是原生质体抵御外界不良环境的正常生理反应<sup>[5]</sup>。但根据本实验结果, 这种出芽的原生质体不再发生分裂, 培养 3~4d 后全部褐化死亡。至于高浓度的马铃薯块茎浸提液导致出芽现象的原因, 有待于进一步探讨。单个原生质体的操作和培养可为原生质体的微融合奠定坚实的基础。但根据笔者的实验观察, 原生质体在游离过程中存在低频率的自发融合现象, 而且原生质体的渗透压调节剂不同, 自发融合发生的频率也不相同, 以甘露醇作为渗透压调节剂时, 自发融合发生的频率高于以蔗糖作为渗透压调节剂时的自发融合频率。因此, 在进行单个原生质体的操作时, 为了尽量减少这种不必要的融合, 酶液的渗透压调节剂最好用蔗糖。

此外, 在实验中还观察到酶的质量也对原生质体的游离效果有重要影响。来自不同厂商的酶的游离效果差异较大, 以日本产“ONA ZU KA”牌的纤维素酶(Cellulase R 210)配合以同一厂牌的离析酶(Macerozyme R 210)效果较好。但即便是来自同一厂商的酶, 由于购买的时

表 3 饲养层愈伤组织的不同来源对原生质体分裂频率的影响

Table 3 Effects of feeder layer calli with different origin on protoplast division frequency

饲养层愈伤组织来源 Callus origin	原生质体分裂频率 <sup>1)</sup> Division frequency of cells (%)			平均 <sup>2)</sup> Average (%)
<i>S. tuberosum</i> L.				
Dihaploid strain "84237"(2x)	29.2	30.4	27.3	29.0a
cv. "Russet Burbank"(4x)	31.7	31.5	29.0	30.7a
<i>S. bulbocastanum</i> . (2x)	32.6	29.8	35.8	32.7a

注: 1)和2)同表2。 Note: 1) and 2) are the same as table 2

较大的改进<sup>[11, 12]</sup>。关于马铃薯单个原生质体的分离和培养近年来也有研究报道, 如 Hunt 和 Helgson<sup>[13]</sup>在 Kao<sup>[12]</sup>等的 KM 培养基的基础上进行修改并加入了 0.1%~0.2% 的脱脂脂肪酸牛血清, 用多孔培养板、半固体琼脂糖包埋培养, 在普通栽培种和野生种 *Solanum cardiophyllum* 中, 均高频率地得到了单细胞无性系和植株

间不同,其效果也有较大差异。由于确定酶的质量无具体指标,因而只能从总的游离效果来观察。根据我们的观察,在其它条件均相同的情况下,若用酶离解开的细胞几乎全部皱缩不圆,并且形状极不规则,加无菌水数滴调节渗透压也毫无效果,这在很大程度上可能是由于酶的不纯引起的。因为若酶不纯,其中含有少量蛋白酶或脂肪酶可溶解镶嵌在质膜上的蛋白质或脂肪,从而引起质膜不可逆性破裂,导致了细胞内容物的泄漏而死亡。

## 参 考 文 献

- 1 Shepard J F, R E Totten *Plant Physiol*, 1977, 60: 313~ 316
- 2 戴朝曦,孙顺娣,李继红 农业科学集刊(第二集),北京,中国农业出版社 1995, 144~ 151
- 3 李耿光,张兰英 见:孙勇如,安锡培主编 植物原生质体培养 北京,科学出版社 1991, 172~ 178
- 4 Dai Chaoxi, D. Mertz, V. N. Lambeth *Plant Sci*, 1987, 50: 70~ 84
- 5 Sylvia Warra, Anita W Ilin, Agneta Ottosson et al *Plant Sci*, 1991, 21: 257~ 265
- 6 Koop H U, H J Schweiger *J. Plant Physiol*, 1985, 121: 245~ 257
- 7 Koop H U, H J Schweiger *J. Cell Biology*, 1985, 39: 46~ 49
- 8 Iuts Eigel, H U Koop *J. Plant Physiol*, 1989, 134: 577~ 581
- 9 Schweiger G, J Dirk, H U Koop et al *Theor Appl Genet*, 1987, 73: 769~ 783
- 10 Spangenberg G, H U Koop, R L ichter et al *Physiol Plant*, 1986, 66: 1~ 8
- 11 Hunt G J, J P Helgson *Plant Sci*, 1989, 60: 251~ 257
- 12 Kao K N, M R M ichayluk *Euphtica*, 1975, 126: 105~ 110
- 13 Shepard J F. *Genetic Improvement of Crops* In: Emergent Techniques Univ. M innesota Press, 1980, 185: 201~ 215

## 敬 告 读 者

2000年世纪交替之年,适逢我刊创刊50周年。为了回顾我国农业科学家所取得的重要成果,展望新世纪的发展趋势和生命科学对农业带来的机遇与挑战,现出版专辑1期,全刊篇幅为352面,定价45.00元。

欲购本刊者,请汇款到下列地址:北京市海淀区白石桥路30号,中国农业科学院内《作物学报》编辑部;联系人:杜凤琴;收款后,即寄发票和刊物。

欢迎订阅,欢迎购买!

## 敬 告 读 者

由于近期以来纸张、材料费又有一定的上调,加之本刊正文、封面用纸进行了全面改善,全刊容量增加,致使制作成本进一步加大。为维持本刊的正常运作,有必要对本刊定价做相应的调整。因此,自2001年第一期起本刊的定价调整为20元/册,特此公告,望读者海涵。