

文章编号:1001-1498(2005)03-0241-05

地锦与五叶地锦原生质体分离及培养研究

李正红¹, 孙振元^{2*}, 刘秀贤¹, 彭镇华²

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:用纤维素酶、果胶酶、甘露醇的混合酶液提取地锦和五叶地锦无菌苗幼叶、五叶地锦胚乳愈伤组织及地锦幼胚愈伤组织的原生质体,对影响原生质体提取得率及活力因素进行分析,对不同材料原生质体得率进行比较,对提取的原生质体进行液体浅层、固液结合及固体等方式培养,对原生质体形成的愈伤组织以 MS 和改良 B5 培养基附加不同浓度 NAA、6-BA、2,4-D、PEG、KT、ZT 等进行分化培养。试验结果表明:纤维素酶对原生质体提取得率有极显著影响,适宜地锦幼叶原生质体提取的酶液组合为:纤维素酶 0.5%、果胶酶 0.3%、甘露醇 0.6 mol L⁻¹、酶解 8 h;不同材料原生质体提取得率有显著差异;仅五叶地锦胚乳愈伤组织来源的原生质体在固体培养基中形成新的愈伤组织,其它方式培养的不同材料原生质体均无分裂或仅形成数十个细胞的细胞团后便解体;用 30 余组配方进行了五叶地锦胚乳愈伤组织原生质体形成的新愈伤组织的分化培养,继代 6~10 次后仍无分化迹象。

关键词:地锦;五叶地锦;原生质体;培养

中图分类号:S602.4 文献标识码:A

Isolation and Culture of *Parthenocissus tricuspidata* and *P. quenquefolia* Protoplasts

LI Zheng-hong¹, SUN Zhen-yuan², LIU Xiu-xian¹, PENG Zhen-hua²

(1. Research Institute of Resources Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: Mixed enzyme liquid of cellulase R-10, Pectolyase Y₂₃ and mannitol was used to extract the protoplasts from sterilized seedling leaves and endosperm callus of *Parthenocissus tricuspidata* and *P. quenquefolia*. The factors affecting the yield and activities of protoplasts were analyzed and the yield of protoplast from different sources was compared. The protoplasts obtained were cultured by liquid, solid-liquid and solid culture methods. The differentiated cultures were conducted on the callus formed from protoplasts on MS and modified B5 media with different concentrations of NAA, 6-BA, 2,4-D, PEG, KT, and ZT. The results showed that cellulase R-10 had extremely significant influences on the extract yield of protoplasts. The suitable enzyme liquid combination for extracting protoplast of *P. tricuspidata* was: cellulase R-10 0.3%, mannitol 0.6 mol L⁻¹, with enzymolysis time 8 hours. There existed significant differences among different sources in the yield of protoplast. Only the protoplast from *P. quenquefolia* endosperm callus could form new callus on solid media. While the protoplasts from other sources had no division or disintegrated after forming cell groups containing dozens of cells. The new callus tissues formed from endosperm callus protoplasts of *P. quenquefolia* were differentiated cultured with over thirty prescriptions, and no differentiation was found after 6-10 subculture.

Key words: *Parthenocissus tricuspidata*; *Parthenocissus quenquefolia*; protoplast; culture

收稿日期: 2004-12-27

基金项目: 国家“863”资助项目:“地锦种质资源创新及优良品种培育”(2001AA244031)

作者简介: 李正红(1964—),男,云南景东人,副研究员,博士生。

*通讯作者: 孙振元,研究员,博士生导师。

地锦 (*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. & Zucc.) Planch.) 和五叶地锦 (*P. quinquefolia* (L.) Planch.) 为葡萄科 (Vitaceae) 地锦属 (*Parthenocissus* Pl.) 植物, 春夏叶色翠绿, 入秋转为鲜红或紫红, 观赏效果好, 是园林及城市垂直绿化的优良材料, 也是荒漠、石质山地、公路及铁路护坡植被恢复的理想树种^[1, 2]。然而, 两个种均存在各自的缺陷^[3, 4], 为获得综合此二种优良特性的地锦新种质所做的杂交试验表明: 两个种杂交不亲和, 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地锦种质创新, 可望获得理想的优良新种质, 而原生质体培养及植株再生是体细胞杂交的前提。目前国内外对该属植物原生质体提取及培养的研究极少, 仅见 C. Passaquet^[5] 及 Y. Zailly-Fodil^[6] 从地锦根冠瘤分离出原生质体进行 RNA 及氨基酸等代谢的研究, 提取的原生质体培养 3 周后损失约 30%, 再生壁细胞约 10%, 培养开始 1 周内未见细胞分裂迹象, 但原生质体的蛋白质和 RNA 却仍具活性。未见地锦属植物原生质体提取得率、活力及原生质体进一步形成愈伤组织及再生植株的报道。

本试验以地锦及五叶地锦无菌苗幼叶、胚及胚乳愈伤组织为材料, 进行原生质体提取及培养研究, 着重对影响原生质体提取得率及活力因素进行了分析, 并从五叶地锦胚乳愈伤组织提取的原生质体经培养形成新的愈伤组织, 对新愈伤组织进行了分化培养, 以便为地锦属植物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 材料及方法

1.1 影响原生质体提取得率及活力的因素

研究纤维素酶 (Cellulase R-10)、果胶酶 (Pectolyase Y₂₃)、甘露醇浓度及酶解时间对地锦无菌苗幼叶原生质体提取得率及活力的影响。采用 4 因素 3 水平正交设计, 共 9 个组合, 每组合 2 重复 (表 1)。

表 1 影响原生质体提取的因素及水平

水平	Cellulase R-10/ %	Pectolyase Y ₂₃ / %	甘露醇/ (mol L ⁻¹)	酶解时间/ h
1	0.3	0.3	0.2	4
2	0.5	0.5	0.4	8
3	1.0	1.0	0.6	12

取地锦无菌苗 3 周左右幼叶 0.3 g, 切成 0.5~1 mm 细条, 放入含 10 mL 酶液的 6 cm 培养皿中 (材料与酶液比例 1:33 g·mL⁻¹), 置恒温 (25℃) 摇床 (40

pr·min⁻¹) 黑暗中酶解。酶液用 CPW 溶液配制, pH5.8。原生质体-酶混合液用 400 目镍丝网过滤, 除去大的细胞团块, 滤液转移到离心管中, 500 g 离心 3 min, 弃去酶液, 收集原生质体, 再用 CPW 液洗涤 1 次, 用原生质体培养液洗涤 2 次, 最后添加培养液。用血球计数器计算产量, 用 FDA 染色法测定原生质体活力。

1.2 不同材料原生质体得率比较

用相同酶液 (Cellulase R-10 0.5%, Pectolyase Y₂₃ 0.3%, 甘露醇 0.6 mol L⁻¹) 处理地锦和五叶地锦无菌苗幼叶、五叶地锦胚乳愈伤组织、地锦幼胚愈伤组织, 每种材料均为 0.3 g, 加酶液 10 mL, 酶解 8 h, 进行原生质体提取得率比较。

1.3 原生质体培养方式

用 1.2 中提取的原生质体进行不同方式培养。

原生质体培养液: 改良 B5 基本培养基附加水解酪蛋白 300 mg L⁻¹, 谷氨酰胺 150 mg L⁻¹, 甘氨酸 20 mg L⁻¹, 天冬氨酸 20 mg L⁻¹, 葡萄糖 0.5 mmol L⁻¹, 蔗糖 1%, 甘露醇 0.6 mol L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 5 mmol L⁻¹, 6-BA 2 mg L⁻¹, 2,4-D 0.5 mg L⁻¹。固体培养基添加琼脂糖 1.2%。

用培养液将原生质体密度调为 1~2 × 10⁵ 个·mL⁻¹, 以 6 cm 培养皿进行液体浅层、固液结合及固体 3 种方式培养, 每皿加入原生质体 2 mL, 置于生物培养箱中 25℃ 暗培养。液体浅层及固液结合培养每周添加一次新鲜培养基, 渗透压从 0.6 mol L⁻¹ 降至 0.4 mol L⁻¹, 再降至 0.2 mol L⁻¹, 形成愈伤组织后转至改良 B5+6-BA 2+2,4-D 0.5 的固体培养基。

1.4 愈伤组织分化培养

以 MS 和改良 B5 为基本培养基, 添加 30 g L⁻¹ 蔗糖、0.75% 琼脂粉及不同浓度 PEG、6-BA、NAA、2,4-D、KT、ZT、GA₃ 等植物生长调节物质, 对原生质体形成的愈伤组织进行分化培养。

2 结果与讨论

2.1 影响地锦幼叶原生质体提取得率及活力的因素

2.1.1 影响得率因素分析 9 个组合酶液处理中, 原生质体得率最低为处理 1 (8.00 × 10⁵ 个·g⁻¹), 最高为处理 6 (9.85 × 10⁶ 个·g⁻¹), 二者相差近 10 倍。各处理得率排序为: 6 > 7 > 4 > 8 > 9 > 3 > 5 > 2 > 1 (表 2)。

表 2 不同处理原生质体得率及活力

处理	得率/(个 g ⁻¹)	活力/ %
1	8.00 ×10 ⁵	89.74
2	1.13 ×10 ⁶	91.89
3	3.64 ×10 ⁶	81.48
4	9.27 ×10 ⁶	80.61
5	3.56 ×10 ⁶	82.23
6	9.85 ×10 ⁶	81.91
7	9.58 ×10 ⁶	81.63
8	6.40 ×10 ⁶	69.12
9	6.02 ×10 ⁶	80.30

方差分析(表 3)表明,纤维素酶对原生质体提取得率的影响较其它 3 个因素有极显著差异,也即纤维素酶在原生质体提取中起决定性作用;而极差分析表明(表 4),纤维素酶浓度以 0.5 %处理效果最佳。

其它 3 个因素对原生质体得率的影响均无显著差异,相较而言,以酶解时间作用更大,极差分析结果表明,酶解时间以 8 h 为最佳。

综合方差及极差分析,利于提高地锦幼叶原生质体提取得率的最佳组合为:0.5 %纤维素酶,0.3 %果胶酶,0.2 mol L⁻¹甘露醇,酶解 8 h。

表 3 原生质体提取得率影响因素方差分析

变异来源	Df	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
纤维素酶	2	1.562 3E+14	7.811 7E+13	14.855 1	4.26 **	8.02 **
果胶酶	2	2.669 8E+13	1.334 9E+13	2.538 5		
甘露醇	2	1.683E+12	8.415 1E+11	0.160 03		
酶解时间	2	3.562 7E+13	1.781 4E+13	3.387 51		
误差	9	1.051 7E+13	5.258 6E+12			
总和	17	2.307 6E+14				

表 4 原生质体提取得率、活力影响因素极差分析

处理	纤维素酶	果胶酶	甘露醇	酶解时间	得率 ×10 ⁵ /(个 g ⁻¹)	活力/ %
1	0.3	0.3	0.2	4	8, 8	90.47, 88.89
2	0.3	0.5	0.4	8	8.67, 14	90.00, 94.12
3	0.3	1	0.6	12	4.29, 31.4	82.61, 80.00
4	0.5	0.3	0.4	12	87.5, 102	86.84, 76.67
5	0.5	0.5	0.6	4	31.5, 41.4	88.00, 78.37
6	0.5	1	0.2	8	95, 102	82.14, 81.58
7	1	0.3	0.6	8	108, 82	87.18, 78.69
8	1	0.5	0.2	12	67.5, 60.6	66.67, 72.22
9	1	1	0.4	4	52.1, 68.2	86.20, 75.68
R1	74.36	395.5	341.1	209.2		
R2	459.4	223.67	332.47	409.67	得率极差分析	
R3	438.4	352.99	298.59	353.29		
R1	418.88	403.98	385.1	403.29		
R2	391.45	392.48	406	408.62	活力极差分析	
R3	373.15	387.02	392.38	371.57		

2.1.2 影响活力因素分析 原生质体活力最低为处理 8 (69.12 %),最高为处理 2 (91.89 %),其余处理差异不显著,多在 80 % ~ 90 %之间。各处理活力排序:2 > 1 > 5 > 6 > 7 > 3 > 4 > 9 > 8(表 2)。

方差分析结果表明(表 5),处理间差异不显著,相对来说,以纤维素酶浓度及酶解时间影响稍大。据极差分析结果(表 4),利于提高地锦幼叶原生质体提取活力的最佳因素为:0.3 %纤维素酶,0.3 %果胶酶,0.4 mol L⁻¹甘露醇,酶解 8 h。但从所提取的原生质体形态来看,低于 0.4 mol L⁻¹甘露醇处理的

原生质体有吸胀现象,表明渗透压过低,因此适宜的甘露醇浓度应为 0.6 mol L⁻¹。

表 5 原生质体提取活力影响因素方差分析

变异来源	Df	SS	MS	F	F _{0.05}
纤维素酶	2	176.584 9	88.292 44	0.006 449	4.26
果胶酶	2	24.983 51	12.491 76	0.000 912	
甘露醇	2	37.517 38	18.758 69	0.001 37	
酶解时间	2	133.737 2	66.868 61	0.004 884	
误差	9	123 215	13 690.56		
总和	17	123 587.8			

2.2 不同外植体原生质体提取得率比较

相同质量的不同材料间原生质体得率差异极显著(表 6),以五叶地锦幼叶得率最高,达 12.65×10^6 个 g^{-1} ,是得率最低的地锦幼胚愈伤组织(0.856×10^6 个 g^{-1})的近 15 倍。

表 6 不同材料原生质体提取得率比较

材料	五叶地锦 幼叶	地锦 幼叶	五叶地锦 胚乳愈伤	地锦幼胚 愈伤
原生质体得率 $\times 10^6$ (个 g^{-1})	12.65	5.7	1.18	0.856



图 1 新提五叶地锦胚乳愈伤组织原生质体



图 2 原生质体培养 7 d 后开始分裂



图 3 原生质体培养 14 d 后形成的细胞团

2.3 原生质体不同培养方式效果比较

不同材料来源的原生质体在不同培养方式下的表现有所不同,但仅有五叶地锦胚乳愈伤组织来源的原生质体形成了新的愈伤组织(图 1~4),新愈伤组织转入固体培养基中继代 10 个月后仍生长旺盛,其余原生质体均先后解体(表 7)。

2.4 愈伤组织分化培养

对五叶地锦胚乳愈伤组织提取的原生质体形成的愈伤组织进行分化培养,采用多种植物生长调节剂及组合,继代 6~10 次,到目前为止均无植株再生。试验采用的植物生长调节剂及组合如表 8。



图 4 原生质体培养 40 d 后形成的愈伤组织

表 7 不同材料来源原生质体在不同培养方式下的表现

培养方式	五叶地锦幼叶	地锦幼叶	五叶地锦胚乳愈伤	地锦幼胚愈伤
液体浅层培养	无分裂,30 d 后大量解体	无分裂,40 d 左右大量解体	7 d 后第 1 次分裂,14 d 后形成 3 个细胞左右细胞团,后逐渐褐化死亡。	无分裂,20 d 后褐化,并开始解体。
固液结合培养	无分裂,30 d 后大量解体	无分裂,40 d 左右大量解体	7 d 后第 1 次分裂,14 d 后形成 30 个细胞左右细胞团,后逐渐褐化死亡。	无分裂,20 d 后褐化,并开始解体。
固体培养	无分裂,30 d 后开始解体	10 d 后第 1 次分裂,40 d 后形成 20 个细胞左右细胞团,其后不再继续分裂,80 d 后大量解体	7 d 后第 1 次分裂,14 d 后形成 30 个细胞左右细胞团,40 d 后形成 0.2 mm 左右愈伤。继代 10 个月后仍生长盛。	无分裂,40 d 后开始解体。

3 结论与讨论

(1)在酶解 4~12 h 条件下,在本试验浓度范围内,纤维素酶、果胶酶及甘露醇三因素中仅纤维素酶对原生质体提取得率有极显著影响,其余因素对原

生质体提取得率及活力均无显著影响。综合原生质体得率、活力及培养效果,适宜地锦幼叶原生质体提取及培养的酶液组合及处理时间以纤维素酶 0.5%、果胶酶 0.3%、甘露醇 0.6 mol L^{-1} 、酶解 8 h 为宜。

表 8 原生质体形成的愈伤组织分化培养基

编号	培养基	编号	培养基
1	改良 B5 + 6-BA0.5 + NAA0.05 + 2% PEG	17	MS + GA ₃ 3.0
2	改良 B5 + 6-BA0.5 + NAA0.1 + 4% PEG	18	MS + GA ₃ 5.0
3	改良 B5 + 6-BA0.5 + NAA0.5 + 6% PEG	19	MS + GA ₃ 7.0
4	改良 B5 + 6-BA1.0 + NAA0.05 + 4% PEG	20	MS + GA ₃ 1.0
5	改良 B5 + 6-BA1.0 + NAA0.1 + 6% PEG	21	MS + GA ₃ 10.0
6	改良 B5 + 6-BA1.0 + NAA0.5 + 2% PEG	22	MS + KT0.2
7	改良 B5 + 6-BA2.0 + NAA0.05 + 6% PEG	23	MS + KT1.0
8	改良 B5 + 6-BA2.0 + NAA0.1 + 2% PEG	24	MS + KT2.0
9	改良 B5 + 6-BA2.0 + NAA0.5 + 4% PEG	25	MS + KT4.0
10	MS + 6-BA0.5	26	MS + KT1.0 + NAA0.2
11	MS + 6-BA1.0	27	MS + ZT1.0 + NAA0.1
12	MS + 6-BA3.0	28	MS + ZT1.0 + NAA0.2
13	MS + 6-BA1.0 + NAA0.02	29	MS + ZT2.0 + NAA0.2
14	MS + 6-BA1.0 + NAA0.2	30	MS + ZT4.0 + NAA0.2
15	MS + 6-BA1.0 + NAA0.5	31	MS + ZT6.0 + NAA0.2
16	MS + GA ₃ 1.0	32	MS + ZT8.0 + NAA0.2

(2)用相同酶液处理相同时间,不同材料的原生质体得率差异较大,幼叶得率较高,愈伤组织得率较低,可能是愈伤组织含水量较多,单位质量所含细胞数较幼叶为少,因此提取愈伤组织原生质体时单位酶液处理的愈伤组织质量应可有所加大。此外,其它植物原生质体提取的研究^[7~9]表明,不同材料及其生理状态对原生质体提取得率影响较大,因此本试验的酶液组合在应用时应根据实际情况进行调整。

(3)本试验采用的原生质体培养基主要参照于向荣^[10]培养酿酒葡萄原生质体的成功配方,但是仅五叶地锦愈伤组织来源的原生质体在固体培养基中形成新的愈伤组织,其它方式培养的不同材料原生质体均无分裂或仅形成数十个细胞的细胞团后便解体。用 30 余组配方进行了五叶地锦胚乳愈伤组织原生质体形成的新愈伤组织的分化培养试验,继代 6~10 次后仍无分化迹象。上述结果表明地锦及五叶地锦原生质体培养及植株再生较为困难。地锦属植物原生质体培养无形成愈伤组织及再生植株的报道,据同科葡萄属植物原生质体培养研究^[7],葡萄原生质体培养较为困难,从 1974 年开始进行研究,直到 1990 年才从欧洲葡萄(*Vitis vinifera* L.) 悬浮细胞来源的原生质体再生了植株,到目前为止尚未形成完善的技术体系,再生植株仍具有偶然性,品种、材料年龄及生理状态是主要影响因素,成功再生植株的有 4 个基因型,其中 3 个为胚性悬浮细胞系。为

此,地锦原生质体培养的进一步研究应着重进行易再生基因型的选择,诱导胚性愈伤组织并建立胚性悬浮系,以悬浮细胞游离原生质体,同时还需对培养基配方作更多选择。

参考文献:

- [1] 孙振元,陆诗雷. 地锦绿化荒山作用初步研究[J]. 林业科技通讯, 2000(3): 26~27
- [2] 张毅功,陈欣. 人工种植地锦绿化荒山研究简报[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(4): 107
- [3] 朱徐富. 地锦垂直绿化生态效应的初步研究[J]. 江苏绿化, 1994(4): 9~10
- [4] 陆明珍,徐筱昌,奉树成,等. 高架桥下立柱垂直绿化植物的选择[J]. 植物资源与环境, 1997, 6(2): 63~64
- [5] C Passaquet, N Teodorescu-Ionescu, Y Zuily-Fodil, et al. Changes in fatty acid and lipid content in callus and protoplasts of *Parthenocissus tricuspidata* and *Petunia hybrida* during culture[J]. *Physiol Plant*, 1986, 67: 211~216
- [6] Y Zuily-Fodil, R Esnault. Comparative study of RNA metabolism in freshly isolated protoplasts and callus cultures of *Parthenocissus tricuspidata* crown gall[J]. *Physiol Plant*, 1980, 50: 221~226
- [7] 赵俞波,李绍华. 葡萄原生质体培养研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002(4): 19~22
- [8] 肖文言,王连铮. 大豆原生质体培养研究进展[J]. 作物杂志, 1994(3): 23~25
- [9] 杨柏云,沈前华,徐敏,等. 蕙兰原生质体分离条件的研究[J]. 江西农业学报, 1996, 8(2): 108~113
- [10] 于向荣,李佩芬,卢炳芝,等. 酿酒葡萄原生质体再生植株[J]. 果树科学, 1999, 16(2): 115~118