



大豆愈伤原生质体的制备和培养方式探究

苏彤¹, 姚陆铭¹, 张鑫², 王彪¹, 武天龙¹

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 具有植物细胞全能性的原生质体是探究植物遗传转化和基因功能的理想材料, 为了高效率制备大豆原生质体及其稳定培养, 以交大 05-133 大豆未成熟子叶诱导的愈伤组织为材料, 采用正交设计, 对纤维素酶、果胶酶和离析酶等酶解液成分进行分析, 研究原生质体高效制备方法的酶解液配比, 同时探讨不同酶解时间对原生质体产量的影响, 以确定最佳的原生质体酶解条件; 通过对比在低熔点琼脂固体液滴培养与液体培养这两种不同培养方式下细胞的增值速率, 以期建立高效的愈伤原生质体再生体系。结果显示, 最佳酶解液配比为: 2% 纤维素酶 + 0.1% 果胶酶 + 1% 离析酶, 在该酶解液配比下酶解 5 h, 所得到原生质体产量和活力最高, 达到 $(3.976 \pm 0.86) \times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$ 。用 KP8 培养基对原生质体进行培养, 结果显示固体液滴的培养方式更适合原生质体的分裂, 原生质体植板率高于液体培养, 并且在 25 d 内分裂形成致密的细胞团。

关键词: 大豆; 愈伤组织; 原生质体; 再生; 正交设计

Study on the Preparation and Cultivation of Soybean Callus Protoplasts

SU Tong¹, YAO Lu-ming¹, ZHANG Xin², WANG Biao¹, WU Tian-long¹

(1. School of Agricultural and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Protoplasts with cell totipotency are ideal materials for exploring genetic transformation and gene function of plants. In order to product and culture effectively protoplast of soybean, the callus induced by immature cotyledons of Jiaoda 05-133 was used as materials preparing for protoplasts in this study. Cellulase onozuka R-10, pectolyase Y-23 and macerozyme R-10 were designed according to the orthogonal array, at the same time, the influence of different enzymatic hydrolysis time on the protoplast yield were explored for optimizing protoplast preparation conditions. Two culture methods with agarose bead and liquid culture were compared to establish an efficient protoplasm regeneration system. The results showed that, the enzyme combination containing cellulase onozuka R-10 (2%), Pectolyase Y-23 (0.1%), macerozyme R-10 (1%) was the optimal for protoplasts isolation of Jiaoda 05-133 callus. Under this condition, the appropriate time for Jiaoda 05-133 callus protoplasts isolation was 5 h in enzyme solution and the amounts of protoplasts reaching $(3.976 \pm 0.86) \times 10^6 \cdot g^{-1}$ with high quality and vigour were attained. Comparing the two culture methods, the results showed that the agarose bead culture with higher plating rate is more suitable for the cell division, and there are many dense cell clusters only within 25 d.

Keywords: Soybean; Callus; Protoplasts; Regeneration; Orthogonal design

原生质体具有植物细胞的全能性, 是进行遗传转化的理想材料, 通过转基因技术向细胞中导入特定基因, 可以改良植物的品质、产量和抗性^[1-2]。目前原生质体技术成功地应用于多个领域, 包括原生质体培养获得再生植株、基因的瞬时表达、蛋白质互作以及基因编辑等^[3-6]。然而, 应用原生质体为材料进行的遗传操作必须建立在其有效分离技术基础之上。原生质体再生通过体细胞胚胎发生途径获得再生植株, 诱导单个细胞形成愈伤, 直接发育成体细胞胚, 进而发育成完整植株。

目前原生质体再生途径在水稻、玉米、甘蔗、小麦等多种作物成功应用, 主要是通过外植体诱导胚性愈伤组织建立胚性悬浮系, 利用悬浮细胞分离出原生质体, 然后培养原生质体获得再生植株^[7]。大豆原生质体的培养材料多为来源于未成熟胚^[3]、叶肉细胞、子叶、悬浮细胞系等^[8-10]。首次报道大豆原

生质体再生体系的建立是 1988 年 Wei 等^[3] 用大豆未成熟种子的子叶分离原生质体经培养得到了再生植株, 但再生率很低, 重复性差。Christon 等^[11] 也用未成熟胚为材料制备原生质体进行电穿孔的遗传转化, 但未能再生成植株。1992 年 Dhira 等^[12] 成功运用此方法获得了再生植株, 并通过电穿孔获得了转基因植株, 原生质体研究得到了进一步发展。利用叶肉细胞、子叶、下胚轴等其它外植体一直未有原生质体再生成功的公开报道。目前有学者利用大豆原生质体技术评估了 CRISPR/Cas9 的突变效率, 但未实现原生质体再生^[13]。因原生质体培养操作复杂, 制备的原生质体再生困难等问题, 导致原生质体再生方法没有广泛应用到后期大豆的遗传转化中。而在拟南芥、烟草、玉米等其它植物上已成功实现原生质体的瞬时转化、蛋白互作以及通过 CRISPR/Cas9 技术进行基因定向突变和转基因

收稿日期: 2018-06-28

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0101500); 国家自然科学基金 (31601321, 31871645)。

第一作者简介: 苏彤 (1994 -), 女, 硕士, 主要从事豆类分子生物学研究。E-mail: st_ajd@sjtu.edu.cn。

通讯作者: 王彪 (1973 -), 男, 博士, 副研究员, 主要从事作物遗传育种与分子改良研究。E-mail: wangbiao@sjtu.edu.cn。

植株的再生^[4,14-15]。关于胚性悬浮细胞系建立大豆再生体系已有大量的报道,其中 Finer 等^[16]取得突破性成果,显著提高了大豆再生体系的效率,本实验室在 Finer 成果的基础上建立了成熟的胚性愈伤再生体系。研究表明,胚性愈伤组织还可以进行继代培养,将这种愈伤组织细胞分离出来培养可迅速增殖^[7]。目前大豆愈伤组织原生质体培养再生体系的研究尚未报道,因此本研究利用不断继代的胚性愈伤组织为材料分离原生质体,探讨制备高质量愈伤原生质体的条件,以及使其保持不断增殖的培养方式,以期得到肉眼可见的愈伤组织,为进一步再生成完整植株以及以原生质体为受体材料进行的各种遗传操作提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为交大 05-133^[17],采用播种后约 75 d 的新鲜幼荚(开花后 14 d,幼胚直径 3~7 mm)作为诱导胚性愈伤组织^[18]的外植体。

1.2 试验设计

1.2.1 优化酶解液配比 纤维素酶(Yakult,日本)、果胶酶(Yakult,日本)、离析酶(Yakult,日本)的 L₁₆(4³)正交试验设计表如表 1 所示,共 16 种酶处理组合,用于分离原生质体,酶解时间为 6 h。

表 1 正交试验设计

| Table 1 Orthogonal design of the test (%) | | | |
|---|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 编号 No. | A 纤维素酶 Cellulase onozuka R-10 | B 果胶酶 Pectolyase Y-23 | C 离析酶 Macerozyme R-10 |
| | | | |
| 1 | 1.0 | 0.1 | 0 |
| 2 | 1.0 | 0.2 | 0.5 |
| 3 | 1.0 | 0.3 | 1.0 |
| 4 | 1.0 | 0.4 | 1.5 |
| 5 | 1.5 | 0.1 | 0.5 |
| 6 | 1.5 | 0.2 | 1.0 |
| 7 | 1.5 | 0.3 | 1.5 |
| 8 | 1.5 | 0.4 | 0 |
| 9 | 2.0 | 0.1 | 1.0 |
| 10 | 2.0 | 0.2 | 1.5 |
| 11 | 2.0 | 0.3 | 0 |
| 12 | 2.0 | 0.4 | 0.5 |
| 13 | 2.5 | 0.1 | 1.5 |
| 14 | 2.5 | 0.2 | 0 |
| 15 | 2.5 | 0.3 | 0.5 |
| 16 | 2.5 | 0.4 | 1.0 |

1.2.2 优化酶解时间 选取继代培养 15~20 d 的愈伤组织,在确定的最佳酶解液组合中进行酶解,设置酶解时间为 3,4,5,6,7 和 8 h,酶解纯化后测定每个处理所得到的原生质体的产量及活力,以确定各处理最佳酶解时间。

1.2.3 不同培养方式下原生质体分裂情况比较 原生质体的起始培养液为 KP8 培养基(葡萄糖含量 68.4 g·L⁻¹),在培养过程中通过加入 K8 培养液(葡萄糖含量 30 g·L⁻¹,蔗糖 10 g·L⁻¹)不断降低渗透压保持原生质体的不断分裂。在液体和固体液滴两种培养方式下对原生质体的分裂情况进行定期观察,对比两种不同培养方式下细胞的增殖速率。

1.3 方法

1.3.1 原生质体的酶解 酶溶剂为 CPW(溶解组成为 KH₂PO₄ 27.2 mg·L⁻¹、KNO₃ 101.0 mg·L⁻¹、CaCl₂·2H₂O 1 480.0 mg·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 246.0 mg·L⁻¹、KI 0.16 mg·L⁻¹、CuSO₄·5H₂O 0.025 mg·L⁻¹)和甘露醇(Mannitol)的混合溶液 9% CPW,pH5.8。选取继代培养 15~20 d 的愈伤组织 0.2 g,与 5 mL 不同处理的酶解液混合,在黑暗条件下 25℃、50 r·min⁻¹酶解 3~8 h,每个处理重复 3 次。酶解后用 200 目细胞筛过滤分离原生质体 2 次,以 800 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清酶解液收集原生质体,用 KP8(Phyto Technology Laboratories,美国)^[19]培养基洗涤 2 次,得到纯化的原生质体。

1.3.2 原生质体产量的测定 原生质体产量测定采用血球计数板计数。吸取少量纯化后的原生质体悬浮液于 25×16 的血球计数板上,在显微镜下统计原生质体数量,重复 3 次。原生质体的密度(个·mL⁻¹)=大方格(0.1 mm³,即 0.1 μL)的原生质体数×10⁴,原生质体产量(个·g⁻¹)=原生质体密度×原生质体悬浮液总体积(mL)/制备原生质体所用愈伤的鲜重。

1.3.3 原生质体活力的测定 原生质体活力检测采用二乙酸钠荧光素(Fluorescein diacetate, FDA)染色法。FDA 用丙酮溶解配制成 5 mg·mL⁻¹母液,然后按照 25 μL FDA mL⁻¹进行染色,静置 5~10 min 后,吸取 1 滴原生质体悬浮液置于载玻片上,在荧光显微镜(LEICA DM2500,美国)下随机选取 3 个视野,在蓝光 495 nm 下检测,原生质体的活力值用有荧光并完整的原生质体占该视野中所有原生质体总数的百分数来表示。原生质体存活率(%)=(有活力的原生质体数/原生质体数)×100

1.3.4 原生质体的培养 采用 LMP(Low Melting Point)琼脂固体液滴培养和液体浅层培养两种方法^[20]在不同原生质体的培养密度条件下进行培养,以期得到最佳培养条件。

(1) 固体液滴培养

将原生质体用溶解的 KP8 培养基(附加 1.2% LMP 琼脂)稀释至 2.5×10⁵ mL⁻¹,以每滴 25 μL 培养在 60 mm×15 mm 的无菌塑料培养皿中(每培养皿 10 滴),待 LMP 琼脂固体培养基冷却 6~8 h 后,

每个培养皿再附加 5 mL 的 KP8 液体培养基以维持原生质体渗透压。用封口膜将培养皿密封后,25℃ 黑暗条件下静止培养,10 d 后移至弱光(500 lx)下培养,期间通过不断降低渗透压以促进原生质体不断分裂,每隔 7 d 分别用体积比为 2:1、1:1、0:1、0:1 的 KP8:K8(Phyto Technology Laboratories, 美国)^[21] 混合培养基更换液体培养基,培养 7 d 后即可观察原生质体的分裂情况统计植板率。植板率(%) = 总克隆数/(总克隆数 + 总原生质体数) × 100

(2)液体培养

将原生质体用 KP8 培养基(附加 2% Ficoll + 40 mM MES)^[22] 稀释至 $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,在 60 mm × 15 mm 无菌塑料培养皿中每个滴加 2.5 mL,置于摇床 25℃ 转速 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 黑暗条件培养,10 d 后移至弱光(500 lx)下培养,培养期间每 7 d 附加 0.25 mL 体积比 1:1、1:2 的 KP8:K8 混合培养基,以降低渗透压促进原生质体分裂。定期用显微镜观察原生质体分裂情况,7 d 后即可统计植板率。

1.4 数据分析

数据用 Excel 2010 处理后,用 SPSS 16.0 软件进行方差分析,多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 不同酶解液配比对原生质体产量的影响

用不同的酶解液分离继代培养 15 ~ 20 d 的愈伤组织后,方差分析正交设计的 16 种酶组合处理对原生质体产量的影响,结果显示:不同类型酶对原生质体产量均有影响,其中纤维素酶、离析酶对原生质体产量的影响达到极显著水平($P < 0.05$),果胶酶对原生质体产量影响则不显著($P > 0.05$)(表 2),3 种酶之间的互作效应进行方差分析结果表明:3 种酶之间两两互作影响不显著($P > 0.05$),即每种酶对原生质体的制备属于独立事件,相互之间不存在互作效应。

表 2 不同类型酶及酶组合的方差分析

Table 2 Variance analysis of different types of enzymes and enzyme combinations

| 影响因子 Factor | $F(\alpha = 0.05)$ | P |
|----------------|--------------------|-------|
| A | 4.38 | 0.012 |
| B | 0.28 | 0.841 |
| C | 4.20 | 0.015 |
| A × B | 2.15 | 0.061 |
| B × C | 2.21 | 0.054 |
| A × C | 0.84 | 0.586 |
| A × B × C | 1.08 | 0.374 |

进一步对 3 种酶各水平间的处理结果进行 LSD 多重比较分析显示,纤维素酶、离析酶的各水平间存在显著差异(图 1 和 3);当纤维素酶的浓度为 2%

时原生质体产量显著高于其它水平($P < 0.05$);离析酶浓度为 1% 时原生质体产量显著高于其它水平($P < 0.05$);而果胶酶的处理对原生质体产量影响无显著差异(图 2),因此将最低浓度 0.1% 确定为最适果胶酶浓度。综上所述确定游离愈伤原生质体的最佳酶解液组成为纤维素酶 2.0% + 果胶酶 0.1% + 离析酶 1%。

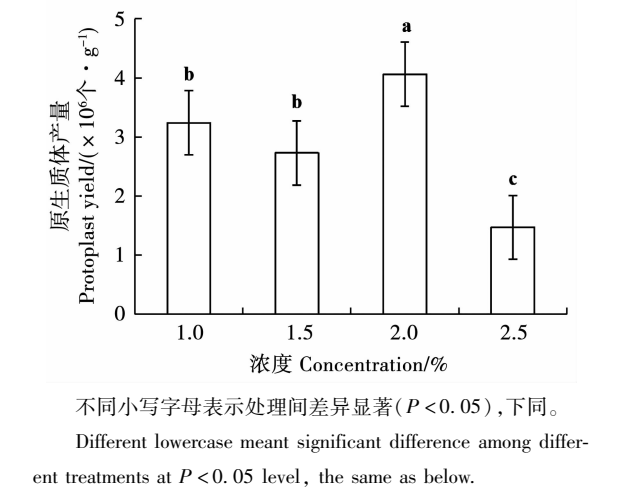


图 1 纤维素酶各水平的产量均值 LSD 比较

Fig. 1 LSD comparison of the average yield at each cellulase level

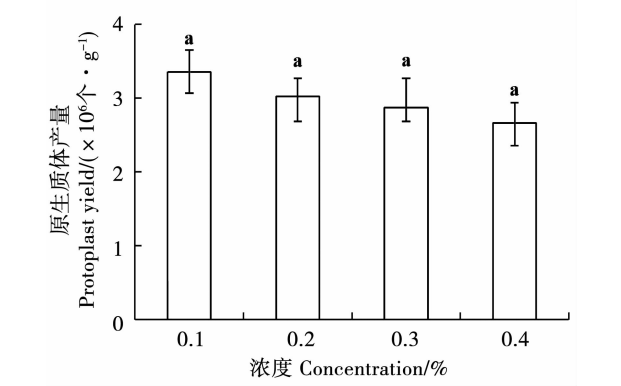


图 2 果胶酶各水平的产量均值 LSD 比较

Fig. 2 LSD comparison of the average yield at each pectolyase level

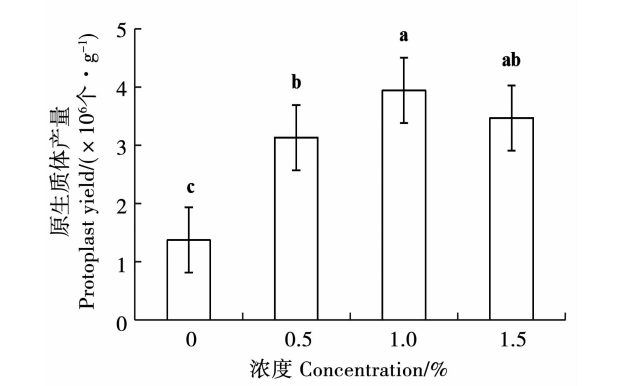


图 3 离析酶各水平的产量均值 LSD 比较

Fig. 3 LSD comparison of the average yield at each macerozyme level

2.2 不同时间处理对原生质体产量的影响

在最佳酶解液组合确定后,将愈伤组织置于最适条件下分别进行 3,4,5,6,7 和 8 h 不同时间段的酶解处理,观察酶解时间对原生质体产量的影响。结果显示,不同酶解时间处理对原生质体产量的影响存在显著差异($P < 0.05$) (图 4),酶解时间不足 3 h 时,愈伤组织细胞尚未完全游离,释放的原生质体数量较少,无法达到后期原生质体培养密度的要求;当酶解时间大于 8 h 时,原生质体破裂严重,细胞碎片显著增多,酶成分及其杂质会破坏原生质体膜上的蛋白物质而导致活力下降,不利于细胞培养^[23];酶解时间为 5 h 时,原生质体产量达到最大值为 $(3.976 \pm 0.86) \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$,原生质体呈现最佳状态,存在较少的细胞碎片,并且是分散开来的球状细胞(图 5),因此将 5 h 定为最佳酶解时间。

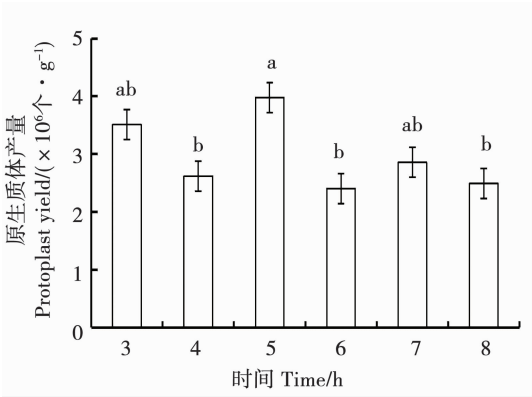
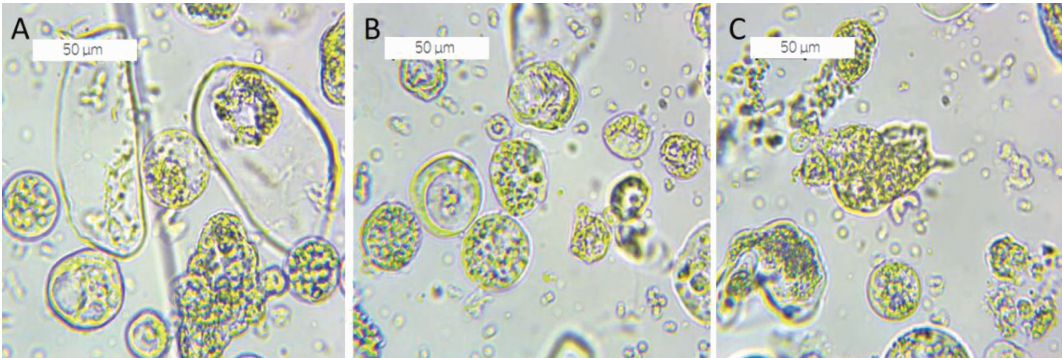


图 4 酶解时间对原生质体产量的影响
Fig. 4 Effect of enzymatic hydrolysis time on protoplast yield



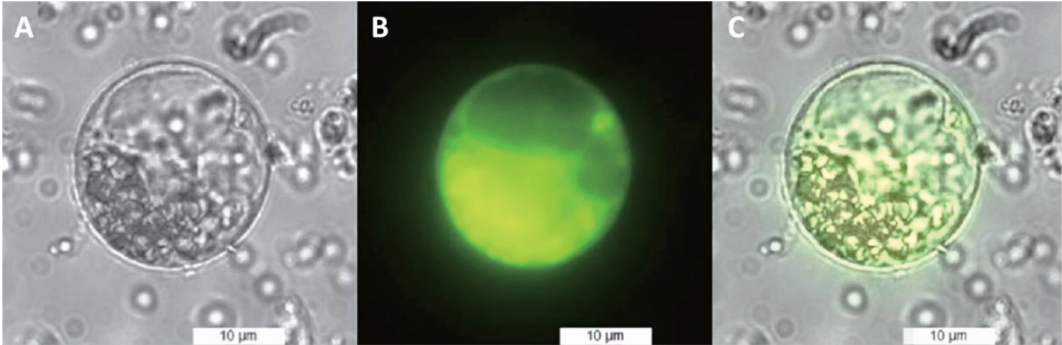
A:酶解 3 h; B:酶解 5 h; C:酶解 8 h。
A:Enzymolysis 3 h; B:Enzymolysis 5 h; C:Enzymolysis 8 h.

图 5 不同酶解时间原生质体产生情况
Fig. 5 The protoplasts condition under different enzymatic time

2.3 优化条件下原生质体活力的检测

在获得最佳酶组合配比和酶解时间后,对原生质体的活力进行检测,FDA 染色结果显示,在试验

得出的最优的酶解条件下原生质体保持着较高的活力,原生质体存活率总体为 60% ~80% (图 6)。



A:FDA 染色后明场;B:FDA 染色后荧光检测;C:叠加。
A: Bright field after FDA staining; B: Florescent detection after FDA staining; C: Merged.

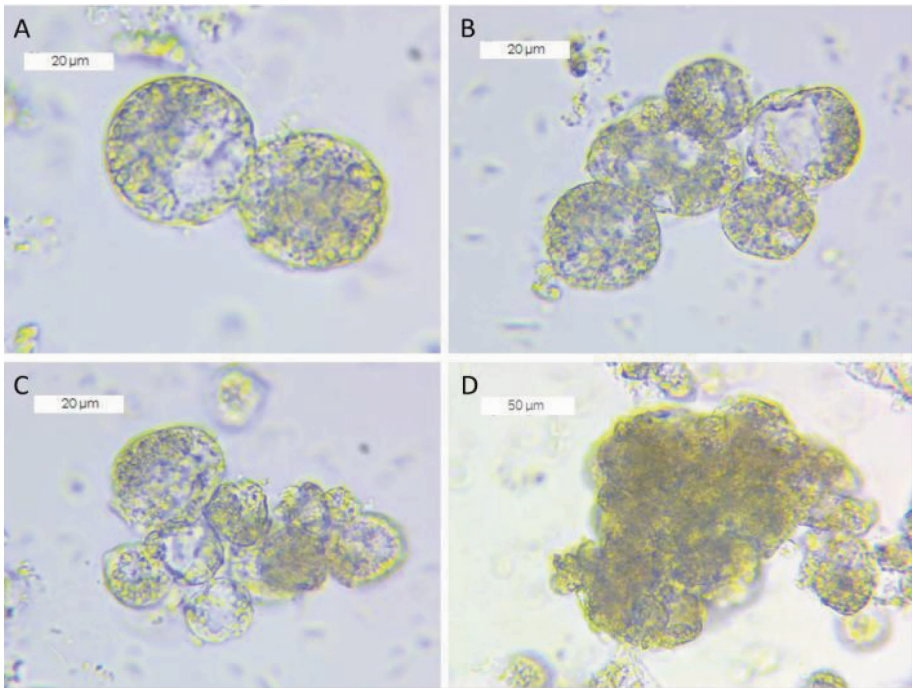
图 6 原生质体活力检测
Fig. 6 The detection of protoplast vitality

2.4 不同培养方式原生质体分裂情况比较

在液体和固体液滴培养方式下对原生质体分裂情况进行观察,结果发现,原生质体发生第一次分裂的时间不一样,固体液滴培养方式下经过 48 h 细胞第一次分裂,液体培养 3 d 后可见到细胞第一次分裂(图 7A);培养 7 d 后两种培养方式均可见到少数细胞发生二次分裂(图 7B),此时统计两种培养方式的细胞植板率;14 d 后,两种培养方式的大多数细胞均发生二次分裂,并伴随有小细胞团的

形成(图 7C);培养 25 d 后液体培养方式的原生质体无明显变化,仍保持二分裂或小细胞团的状态,而固体培养方式可观察到有致密的细胞团形成(图 7D)。

原生质体培养 7 d 后,统计固体、液体培养原生质体的植板率。固体液滴培养方法的植板率为 30% ~ 40%,液体培养的植板率为 20% ~ 30%,说明固体琼脂液滴的培养方式更适合原生质体分裂。



A: 一次分裂的原生质体; B: 二次分裂的原生质体; C: 培养 14 d 后二、三次分裂均出现;
D: 培养 25 d 后形成小细胞团。
A: 1st cell division from cultured protoplasts; B: Second cell division from cultured protoplasts;
C: Second/third cell divisions after 14 d cultured; D: Small colonies formation after 25 d cultured.

图 7 不同培养时间原生质体生长情况

Fig. 7 Protoplast growth in each culturing period

3 讨 论

3.1 酶解液、酶解时间对原生质体制备的影响

不同类型的植物细胞壁中,都是以纤维素作为细胞壁骨架,半纤维素、果胶及木质素等多糖通过物理和化学作用镶嵌到纤维素中,因此分离原生质体常用的酶类主要是纤维素酶类和果胶酶类。而细胞壁骨架中各组分在分子结构、种类及含量上具有较大的异质性,所以酶的种类及浓度是分离原生质体的重要因素^[24]。罗希明等^[8]利用 0.4% 纤维素酶 + 0.2% 果胶酶的酶解液分离出大豆叶肉原生质体;肖文言等^[25]利用 1% 纤维素酶 + 0.1% 果胶酶的配比分离出大豆幼荚子叶原生质体;Shu 等^[26]采用 0.5% 纤维素酶 + 0.8% 半纤维素酶 + 0.8% 离析酶 + 0.4% 果胶酶的酶解液配比分离出

大豆的叶肉原生质体。由此可见,前人在游离大豆原生质体时均采用两种以上的酶,纤维素酶类对于溶解植物细胞壁必不可少,搭配以不同种类的果胶酶,有助于游离出完整的、分散开来的原生质体,因此酶解不同组织的细胞壁所需的酶种类及浓度也不尽相同。

根据试验结果,3 种酶之间不存在显著的互作效用,推测可能在复杂的细胞壁成分中,纤维素合成酶和多糖合成酶(半纤维素、果胶等)是通过不同的路径合成,使两者在细胞壁骨架中分别发挥不同的保护作用^[24]。同时,纤维素酶是构成植物细胞壁的基本骨架,与预期结果相同,此酶对于游离出完整的原生质体的确具有显著的效果。

肖文言等^[25]在探究酶的种类和浓度对大豆幼苗子叶原生质体产量的影响中,当采用仅含有 1%

纤维素酶 + 0.1% 果胶酶的酶溶液游离原生质体时,产量为 5.1×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$,当采用 1% 纤维素酶 + 0.5% 离析酶的酶溶液后原生质体产量降为 3.5×10^4 个 $\cdot\text{g}^{-1}$; Shu 等^[26] 对大豆幼嫩叶片原生质体的游离试验中,当酶解液配比为纤维素酶、半纤维素酶和离析酶时,原生质体产量为 0.64×10^7 个 $\cdot\text{gFW}^{-1}$,活力为 53%,去除离析酶后,产量提高到 0.85×10^7 个 $\cdot\text{gFW}^{-1}$,活力也上升到 78%;而在本试验中发现,不加离析酶时,在任意浓度组合的纤维素酶和果胶酶处理下,愈伤组织原生质体产量为 2.75×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$,而当加入 1% 的离析酶时,相应的原生质体产量达到最大为 3.6×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$, $P < 0.05$ 。虽然离析酶与果胶酶都属于果胶类酶,但不同组织的细胞壁果胶成分也有所差异, macerozyme R-10 是一种具有多种均衡的果胶酶成分的离析酶,更有助于分解愈伤组织细胞壁,从而获得完整的单细胞原生质体^[27]。

罗希明等^[8] 对大豆叶肉细胞酶解时,发现酶浓度和酶解时间是培养原生质体成功与否的主要原因。在探究不同浓度的混合酶在不同酶解时间下原生质体的产量和活力时,发现酶浓度越高所需酶解时间越少,而酶浓度越高和酶解时间越长,原生质体产量和活力也有所降低。为了获得再生能力高的原生质体,降低高浓度酶对原生质体的毒害作用,因此采取低浓度的酶溶液和短时间酶解^[8]。本试验探究了在最佳酶解液配比的条件下酶解时间对原生质体产量的影响,在显微镜下观察发现,当酶解时间小于 3 h,愈伤组织细胞壁不能被充分酶解,游离出的原生质体数量少;而大于 8 h 的酶解时间则导致出现细胞碎片数量增加、原生质体破裂的现象,说明已分离出的原生质体过长时间保持在酶溶液中导致原生质体活力下降,对后期原生质体的培养造成不利影响^[28]。

3.2 原生质体的培养

研究表明,采用活力旺盛的胚性愈伤组织是原生质体培养的重要环节。当采用处于非旺盛生长期的愈伤组织分离原生质体时,不仅原生质体的产量低,且制备出来的原生质体大小不一、体积膨大、细胞质稀疏,培养过程中细胞分裂几次后便停止分裂和生长,活性较低^[2-6]。试验中采用继代 15~20 d 的高活力胚性愈伤组织,酶解制备的原生质体大小均匀、形状规则、富含细胞质,并且存在游离细胞分裂的现象,培养过程中细胞保持不断分裂,在 25 d 内便可形成致密的细胞团。

本研究对比了固体琼脂液滴培养和液体培养两种方式对愈伤原生质体增值速率的影响。Dhir

等^[20] 也采用这两种培养方式比较了不同基因型的大豆未成熟胚原生质体在培养过程的变化,供试的 14 个大豆基因型中 80% 的品种均保持着较高的起始分裂速率,而用液体培养时仅 57% 的大豆品种植板率为 40%~63%,其余品种基本保持不分裂,虽然采用固体琼脂液滴的方法不能提高原生质体活力,并且和液体培养方式的分裂频率是一致的,但固体液滴的方法能使原生质体在固体琼脂中被固定,保持了细胞的完整性,降低更换培养液时对原生质体的破坏,不扰乱已分裂形成的细胞团结构,促进原生质体保持不断增殖。本试验的研究结果显示,固体液滴培养方法的植板率要高于液体培养的植板率,并且培养时间在 14 d 内,两种培养方式保持相同的细胞增值速率,继续培养一段时间后,发现液体培养方式的细胞停止增殖或增值速率显著减缓,而固体液滴则保持不断分裂,在培养时间达到 25 d 时,固体液滴培养方式观察到有致密的细胞团形成,而液体培养则无明显变化。该现象可能是因为是在液体培养中细胞分裂过程产生的代谢物累积在培养基中对细胞生长产生有阻碍作用,不断更换培养液也可能会影响到细胞团的形成而降低了细胞的分裂速率,而将原生质体培养在含 1.2% 低熔点琼脂的 KP8 培养基中,则能有效减少细胞分裂过程中色素和酚类化合物的累积,通过定期更换新鲜的液体培养基去除有害代谢物,稳定的维持细胞生长环境的 pH 和渗透势^[12]。因此,本试验结果表明固体液滴的培养方式同样适用于愈伤原生质体。

4 结 论

本研究以“交大 05-133”大豆未成熟子叶诱导的愈伤组织为材料,探究得出最佳酶解液配比:2% 纤维素酶 + 0.1% 果胶酶 + 1% 离析酶和最适酶解时间 5 h,所得到原生质体产量高达 $(3.976 \pm 0.86) \times 10^6$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ 。并对比液体和固体琼脂液滴两种培养方式,得出固体液滴的培养方式更适合原生质体的分裂,在 30 d 内便能见到小细胞团的产生。本研究结果为后续原生质体融合以及转化等研究奠定了坚实的基础。

参考文献

[1] 彭章,童华荣,梁国鲁,等. 茶树叶片和胚根原生质体的分离及 PEG 诱导融合[J]. 作物学报,2018,44(3):463-470. (Peng Z, Tong H R, Liang G L. Protoplast isolation and fusion induced by PEG with leaves and roots of tea plant. (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44 (3):

- 463-470.
- [2] Nanjareddy K, Arthikala M K, Blanco L, et al. Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved Agrobacterium-mediated leaf discinfiltration of *Phaseolus vulgaris*: Tools for rapid gene expression analysis[J]. BMC Biotechnol, 2016, 16: 53.
- [3] Wei Z M, Xu Z H. Plant regeneration from protoplasts soybean [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7: 348-351.
- [4] 张晓慧, 韩榕. 两种瞬时表达体系研究拟南芥 Profilin-1 的亚细胞定位[J]. 生物技术通报, 2017, 33(5): 57-62. (Zhang X H, Han R. Subcellular localization of profilin-1 from *Arabidopsis* utilizing two transient expression systems[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(5): 57-62.)
- [5] Walter M, Chaban C, Schütze K, et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. Plant Journal, 2004, 40(3): 428-438.
- [6] Lin C S, Hsu C T, Yang L H, et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single cell mutation detection to mutant plant regeneration[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 12: 1111-1287.
- [7] 文峰, 肖诗鑫, 聂扬眉, 等. 木薯脆性胚性愈伤组织原生质体培养与植株再生[J]. 中国农业科学, 2012, 45(19): 4050-4056. (Wen F, Xiao S X, Nie Y M, et al. Protoplasts culture isolated from friable embryogenic callus of cassava and plant regeneration[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(19): 4050-4056.)
- [8] 罗希明, 简玉瑜. 大豆叶肉细胞原生质体的游离和培养[J]. 吉林农业科学, 1984, 2: 20-24. (Luo X M, Jian Y Y. Isolation and cultivation of soybean mesophyll protoplast[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 1984, 2: 20-24.)
- [9] 吕慧能, 盖钧锰, 马育华, 等. 不同激素条件下大豆原生质体培养和植株再生[J]. 作物学报, 1993, 19: 328-333. (Lyu H N, Gai J Y, Ma Y H, et al. Soybean protoplast culture under different hormone conditions and plantlet regeneration[J]. Acta Agronomica Sinica, 1993, 19: 328-333.)
- [10] Finer K R, Finer J J. Use of Agrobacterium expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication assisted Agrobacterium mediated transformation treated soybean cotyledons [J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30: 406-410.
- [11] Christou P, Murphy J E, Swain W F. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus [J]. PNAS, 1987, 84: 3962-3966.
- [12] Dhir S K, Dhir S, Savka M A, et al. Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts[J]. Plant Physiology, 1992, 99: 81-88.
- [13] Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system [J]. Scientific Reports, 2015, 5:10342.
- [14] 张龄丹. PEG 介导玉米叶肉细胞原生质体瞬时基因转化体系的应用研究[D]. 安徽:安徽农业大学, 2016. (Zhang L D. A study on the application of PEG-mediated transient gene expression system in maize mesophyll protoplasts[D]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2016.)
- [15] Lin C S, Hsu C T, Yang L H, et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single cell mutation detection to mutant plant regeneration[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 12: 1111-12870.
- [16] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988, 15(2): 125-136.
- [17] 张玉梅, 王彪, 张忠滨, 等. 优质、丰产菜用大豆新品种交大 05-133 的选育[J]. 种子, 2013, 32(3): 102-104. (Zhang Y M, Wang B, Zhang Z B, et al. Breeding for fine quality and high yield of vegetable soybean Jiaoda 133 [J]. Seed, 2013, 32(3): 102-104.)
- [18] 程静琳, 闫军辉, 钟云鹏, 等. 大豆高效体细胞胚诱导和增殖方法的研究[J]. 大豆科学, 2014, 33(3): 305-310. (Cheng J L, Yan J H, Zhong Y P, et al. Research to the effective methods of soybean somatic embryo induction and Proliferation [J]. Soybean Science, 2014, 33(3): 305-310.)
- [19] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [20] Dhir S K, Dhir S, Widholm J M. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): Genotypic differences in culture response[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 285-289.
- [21] Dhir S K, Dhir S, Wildhom J M. Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Report, 1991, 10: 39-43.
- [22] Sarwan K, Dhir S D, Jack M, et al. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]: Genotypic differences in culture response [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 285-289.
- [23] 王娟, 李玉珠, 师尚礼. 苜蓿愈伤组织原生质体游离与培养[J]. 草地学报, 2010, 18(2): 258-262. (Wang J, Li Y Z, Shi S L. Dissociation and culture of callus protoplasts of *Medicago sativa* L [J]. Acta Agrectir Sinica, 2010, 18(2): 258-262.)
- [24] 公维丽, 王禄山, 张怀强. 植物细胞壁多糖合成酶系及真菌降解酶系[J]. 生物技术通报, 2015, 31(4): 149-165. (Gong W L, Wang L S, Zhang H Q. Diverse synthetases and fungi degradation enzymes for the polysaccharides of plant cell walls [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(4): 149-165.)
- [25] 肖文言, 王连铮. 大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生[J]. 作物学报, 1994, 20(6): 665-670. (Xiao W Y, Wang L Z. Protoplast culture and plant regeneration of immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 1994, 20(6): 665-670.)
- [26] Shu Y J, Huang L Y, Chen M, et al. Establishment and optimization of systems for protoplasts isolation of soybean and chickpea that used in subcellular location[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33: 976-985.
- [27] 林开江, 袁康培, 王坤元, 等. 植物细胞离析酶的制备和应用[J]. 生物工程学报, 1994, 10(1): 71-75. (Lin K J, Yuan K P, Wang K Y, et al. Preparation and application of Maceration enzyme from *Aspergillus* sp [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1994, 10(1): 71-75.)
- [28] 陶草, 李玉珠, 王娟, 等. 扁蓿豆愈伤组织原生质体分离条件的研究[J]. 草业学报, 2011, 19(2): 288-293. (Tao R, Li Y Z, Wang J, et al. Protoplasts isolation conditions of *Melilotoides ruthenica* Callus [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 19(2): 288-293.)