

## 通气状况、某些呼吸中间产物和抑制剂对 甘蔗幼叶原生质体酶解释离的影响

何若天

罗 科

(广西农学院林学分院)

(广西农学院热带作物分院)

**摘 要:** 甘蔗幼叶原生质体酶解释离期间呼吸速率逐渐降低。通气良好者原生质体产量高,但各处理原生质体存活率差异不大。以无机盐为稳压剂者,苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙酮酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠等呼吸中间产物均能提高原生质体产量,尤以琥珀酸钠和丙酮酸钠效果最好。而以糖醇为稳压剂者,苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙酮酸钠和琥珀酸钠等有促进作用,柠檬酸钠却有严重抑制效应,产物几全部为具壁细胞。

呼吸抑制剂如碘乙酸、氰化钠、丙二酸、叠氮化钠和2,4-二硝基酚等对原生质体产量和存活率均有抑制作用。随抑制剂浓度增加,呼吸受抑制越甚,原生质体产量和存活率的降低也越甚。琥珀酸能消除丙二酸对呼吸的抑制,并减轻丙二酸对原生质体释离的不利影响。

用酶法从具壁细胞中分离原生质体是既受细胞的代谢水平所调控,又受组成酶液的稳压剂的组分所影响。其原因需进一步研究。

自Cocking(1960)发展了酶法分离植物细胞原生质体的技术<sup>[2]</sup>,解决了去壁困难以来,高等植物原生质体的分离、培养和融合等研究发展相当快。迄今已有三十多种植物(大部分属于茄科)原生质体培养成植株或胚状物<sup>[10]</sup>。游离的原生质体不仅被用作植物杂交育种的有希望的重要材料,且已成为现代植物学研究的一个良好的实验系统,被用于许多研究领域。如何获得高产优质的原生质体是利用原生质体进行各项研究的首要条件。为此,不少研究者曾对试验植株的栽培条件<sup>[4]</sup>、植株年龄<sup>[11]</sup>、生长季节<sup>[7]</sup>、培养物的培养条件<sup>[12]</sup>和试材的预处理<sup>[5,8,9]</sup>等与原生质体产量和活力的关系作过研究。但有关酶解释离原生质体过程中通气状况对原生质体产量的影响,只在微生物研究中有所报导<sup>[1]</sup>,在高等植物中未见有关报告。至于试材细胞的呼吸代谢状况与原生质体产量和活力的关系很少加以考虑。通常分离原生质体时都采用通气不良的密闭容器。Maretzki等曾发现酶解释离原生质体期间呼吸速率逐渐下降的现象<sup>[6]</sup>。本文报导了通气状况、某些呼吸中间产物与呼吸抑制剂对细胞呼吸代谢和原生质体酶解释离的影响。

### 材 料 与 方 法

试材为田间栽培的甘蔗(*Saccharum officinarum* Linn.品种为台糖134)近茎端的梢部幼叶。剥去外层老叶,取长约5—7厘米的内部叶段,置70%乙醇中浸1分钟,用无菌

蒸馏水冲洗三遍。再剥去外部1~2层叶片，留下内部呈黄色的嫩叶供试验用。

用手术刀将嫩叶纵切成四部分，再横切成细条状碎片，称重后置酶液内。酶液由1%（或0.5%）EA<sub>3-867</sub>纤维素酶（上海植物生理研究所产品）溶于稳压剂（2.5%KCl+1%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，或0.69M甘露醇+5mM磷酸盐缓冲液或再加9mM CaCl<sub>2</sub>；个别试验用3.5%KCl+0.5%CaCl<sub>2</sub>）内所组成。pH值为5.6~5.8。经孔径0.45微米滤膜过滤灭菌。置30℃黑暗处保温酶解1.5—2小时。

不同通气条件采用开口大小不同的容器和附加不同的障碍物所组成。

呼吸中间产物采用三羧酸环中的苹果酸、α-酮戊二酸、丙酮酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和乌头酸等。

呼吸抑制剂用丙二酸、碘乙酸、叠氮化钠、氟化钠和2,4-二硝基酚等。

原生质体产量用血球计数板测定。在酶解结束后，置5℃冰箱内降温半小时后轻轻摇匀，取样测定。为消除取样误差，经反复多次取样计数取平均值外，均作3~5次重复试验，结果均一致。

死活原生质体用0.1%酚藏花红（phenosafranine）染色法检定。

呼吸速率用Warburg微量呼吸计于29.5℃中测定。

## 试验结果

### 一、甘蔗幼叶原生质体酶解释离期间呼吸速率的变化

酶解释离甘蔗幼叶原生质体期间，呼吸速率逐步下降。若以酶解20分钟的呼吸水平为基点，酶解1小时，呼吸速率下降了21.5%，酶解1小时40分便降低58%（表1）。主要原因可能是酶液的毒害作用<sup>[6]</sup>和原生质体在高渗溶液中遭受渗透冲击所致。

表1 甘蔗幼叶原生质体酶解释离期间呼吸速率的变化  
（对照为0.1克鲜重叶片+MS培养液（无蔗糖和激素，下同）+0.5M甘露醇；处理为0.1克鲜重叶片+0.5%纤维素酶+MS培养液+0.5M甘露醇。pH值为5.6-5.8）

保温时间（分）		20	40	60	80	100
呼吸速率 (微升O <sub>2</sub> /克鲜重·分)	对 照	7.37	6.78	7.55	8.36	7.98
	处 理	7.92	6.89 (13.0%)	6.22 (21.5%)	4.54 (42.7%)	3.32 (58.1%)

注：表中括号内数值为以酶解20分的呼吸速率为基点时的呼吸下降百分率

### 二、通气状况对原生质体释离的影响

第一组试验结果（表2）表明，不管采用那种稳压剂，半开口培养皿内原生质体产量较高，具玻塞试管内产量较低。以无机盐为稳压剂者，具塞试管内原生质体平均产量只为半开口培养皿内的25~37%；以甘露醇为稳压剂者，则为64%左右。即采用无机盐为稳压剂者差异较大，以糖醇为稳压剂者差异较小。这在酶解不同期间内原生质体产量变化中亦有类似反映（图1）。

第二组试验以KCl和MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O为稳压剂，均以10毫升锥形瓶为容器，唯瓶口采用通气程度不同的纱布、棉花塞或木塞封口，或复盖以石蜡油。结果表明以瓶口完全敞开者，原生质体产量较高。次为用二层纱布封口的。复盖以石蜡油隔绝空气者产量最低（表3）。

表 2

稳压剂类型和通气状况与甘蔗幼叶原生质体产量的关系<sup>③</sup>

稳压剂类型 <sup>1)</sup>	容器 <sup>2)</sup>	原生质体产量							
		重复 1		重复 2		重复 3		平均值	
		$\times 10^6$ / 克鲜重	%						
2.5% KCl + 1% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	半开口培养皿	17.30	100	13.20	100	16.62	100	15.71	100
	具玻塞试管	6.32	36.5	5.15	39.0	6.18	37.2	5.88	37.4
3.5% KCl + 0.5% CaCl <sub>2</sub>	半开口培养皿	4.20	100	2.04	100	1.30	100	2.51	100
	具玻塞试管	0.94	22.4	0.53	25.9	0.42	32.3	0.63	25.1
0.69M甘露醇 + 5 mM 磷酸盐缓冲液	半开口培养皿	6.62	100	7.28	100	6.68	100	6.86	100
	具玻塞试管	3.43	51.8	4.59	63.0	5.30	79.3	4.44	64.7

1) pH值均为5.6; 2) 培养皿直径为4厘米, 具玻塞试管为10毫升; 3) 酶混合液2毫升, 材料0.15克, 28°C, 酶解1.5小时

这与图 1 所示结果很一致。

两组试验结果均表明, 通气是否良好对原生质体产量有显著影响, 但原生质体存活率差异不大(表 3)。很显然, 氧的供应是否充足, 直接影响细胞的呼吸速率, 从而以尚不了解的原因影响原生质体的酶解释离。

### 三、某些呼吸中间产物对原生质体释离的影响

为验证细胞呼吸强弱与原生质体酶解释离的关系, 我们伺以对呼吸速率有促进作用的某些呼吸中间产物如苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙酮酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和乌头酸等。结果表明, 在以 2.5% KCl + 1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 为稳压剂者, 这些三羧酸环中的中间产物, 除乌头酸稍有抑制作用外, 其余均不同程度地提高原生质体产量, 其中尤以琥珀酸钠和丙酮酸钠的促进作用最显著(分别为对照的172%和152.7%)。这与以 0.5M 甘露醇 + 9mM CaCl<sub>2</sub> + 5mM 磷酸盐缓

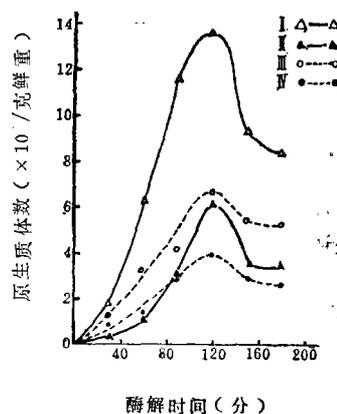


图 1 通气状况与甘蔗幼叶原生质体酶解释离的关系

I 为1%纤维素酶溶于2.5%KCl + 1%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液中, 盛于通气正常的15毫升锥形瓶内; II 酶液同上, 但表层盖以石蜡油隔绝空气。III 为1%纤维素酶溶于0.69M甘露醇 + 5mM磷酸盐缓冲液中, 置通气正常的15毫升锥形瓶内; IV 酶液同上, 但表层盖以石蜡油隔绝空气。pH值均为5.6。30°C中酶解2小时

表 3

通气状况对甘蔗幼叶原生质体释离的影响

(10毫升锥形瓶, 内盛1毫升酶混合液和0.1克叶片, 30°C, 酶解1.5小时)

通气状况	原生质体产量								活原生 质体%	死原生 质体%
	重复 1		重复 2		重复 3		平均值			
	$\times 10^6$ / 克鲜重	%								
瓶口敞开	2.13	100	3.55	100	3.45	100	3.04	100	88.4	11.6
瓶口加棉塞	1.33	62.4	1.80	50.7	2.13	61.7	1.75	57.6	85.7	14.3
瓶口加木塞	1.30	61.0	1.41	39.7	1.97	57.1	1.56	51.3	77.0	23.0
二层纱布包口	—	—	1.94	54.6	2.34	67.8	2.14	70.4	82.6	17.4
液层上复盖石蜡油	1.13	53.1	0.91	25.6	1.57	45.5	1.20	39.5	80.0	20.0

冲液为稳压剂者所得结果一致(表4)。但在后者,柠檬酸钠却有严重抑制作用,所得产物几全为未去壁细胞,多次重复试验结果均同。

表4 某些呼吸中间产物对甘蔗幼叶原生质体产量的影响  
(基质浓度均为0.005M,纤维素酶浓度1%,30°C,酶解1.5小时)

处 理	产 量	2.5%KCl + 1%MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>2)</sup>		0.5M甘露醇 + 9mM CaCl <sub>2</sub> <sup>3)</sup> + 5mM 磷酸盐缓冲液	
		× 10 <sup>6</sup> /克鲜重	%	× 10 <sup>6</sup> /克鲜重	%
对 照		10.74	100	7.44	100
苹 果 酸		13.50	125.7	7.87	105.8
α-酮戊二酸		15.58	145	9.72	130.6
丙 酮 酸 钠		16.40	152.7	12.15	163.3
琥 珀 酸 钠		18.48	172	11.41	153.4
柠 檬 酸 钠		15.36	143	0.07	0.9
乌 头 酸		8.17	76	5.94	79.8

1) pH值均为5.6; 2) 四次试验结果的平均值; 3) 五次试验结果的平均值。

#### 四、呼吸抑制剂对原生质体释离的影响

我们还从抑制呼吸的角度进一步验证细胞呼吸强弱与原生质体释离的关系。所用抑制剂有糖酵解阶段抑制剂碘乙酸和氟化钠,三羧酸环抑制剂丙二酸,末端氧化阶段抑制剂叠氮化钠和氧化磷酸化解偶联剂2,4-二硝基酚等。试验分二组:第一组试验是把抑制剂和酶液与试材等一道保温,或先用抑制剂真空渗入试材组织后,弃去抑制剂,改用无抑制剂酶液。结果表明,上述两种处理均对原生质体产量和存活率有显著抑制作用(表5)。

表5 呼吸抑制剂对甘蔗幼叶原生质体产量和存活率的影响

处 理	试 验 1*			试 验 3**		
	× 10 <sup>6</sup> /克鲜重	占对照%	抑 制 %	× 10 <sup>6</sup> /克鲜重	占对照%	抑 制 %
对 照	11.97	100	0	8.51	100	0
0.05M丙二酸	5.39	45.0	55.0	4.62	54.3	45.7
0.001M碘乙酸	6.67	55.7	44.3	4.50	52.9	47.1
0.001M叠氮化钠	5.12	42.8	57.2	4.88	57.3	42.7
0.01M氟化钠	3.67	30.7	69.3	6.09	71.6	28.4

处 理	活原生质体%	死原生质体%	活原生质体%	死原生质体%
对 照	91.2	8.8	77.1	22.9
0.05M丙二酸	35.0	65.0	64.3	35.7
0.001M碘乙酸	50.7	49.3	49.9	50.1
0.001M叠氮化钠	28.1	71.9	53.0	47.0
0.01M氟化钠	35.8	64.2	61.6	38.4

\*为含呼吸抑制剂的酶混合液(1%纤维素酶+2.5%KCl+1%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)和材料一道保温,未真空渗入;

\*\*先用抑制剂(对照用蒸馏水)真空渗入组织内10分钟后吸去抑制剂,改加无抑制剂酶液。

均在30°C暗处保温1.5小时。

第二组试验是采用不同浓度抑制剂真空渗入试材组织后改用无抑制剂酶液释离原生质体。结果表明,不同浓度呼吸抑制剂对试材的呼吸速率和原生质体释离有明显差异。随抑制剂浓度增高,植物组织呼吸速率受抑制百分率随之增高,而原生质体产量和存活率相应下降(表6)。

表 6 不同浓度呼吸抑制剂对甘蔗幼叶呼吸速率和原生质体酶解释离的影响  
 (试材经不同浓度抑制剂真空渗入 5 分钟后弃去抑制剂,用无菌水洗涤后加入  
 1%纤维素酶+2.5%KCl+1%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O混合液,30°C,暗处保温1.5小时)

抑制剂种类 和浓度 (M)	呼 吸 速 率			原 生 质 体 产 量			活原生 质体%	死原生 质体%
	微升O <sub>2</sub> / 克鲜重·小时	占对照%	受抑制%	×10 <sup>6</sup> /克鲜重	占对照%	受抑制%		
丙二酸*								
0	375.5	100	0	8.23	100	0	61.1	38.9
0.01	207.0	55.0	45.0	4.60	55.9	44.1	45.6	55.4
0.05	202.5	53.9	46.1	3.98	38.6	61.4	32.0	67.0
0.1	166.5	44.3	55.7	2.57	31.2	68.8	36.9	63.1
氟化钠**								
0	478.5	100	0	6.69	100	0	63.6	36.4
0.005	211.5	44.2	55.8	2.87	42.9	57.1	56.5	43.5
0.01	163.5	34.2	65.8	2.08	31.1	68.9	45.7	54.3
0.05	86.5	18.1	81.9	1.27	18.9	81.1	41.5	58.5
叠氮化钠**								
0	392.0	100	0	2.35	100	0	78.6	21.4
0.0005	288.0	73.5	26.5	1.84	78.3	21.7	73.1	26.9
0.001	270.0	68.9	31.1	1.37	58.3	41.7	53.8	46.2
0.005	53.0	13.5	86.5	1.16	49.4	50.6	55.3	44.7
0.01	50.2	12.8	78.2	0.83	35.3	64.7	52.8	47.2
碘乙酸*								
0	379.5	100	0	3.11	100	0	91.9	8.1
0.0005	112.5	29.6	70.4	1.04	33.4	66.6	73.9	26.1
0.001	92.5	24.4	75.6	1.08	34.7	65.3	72.8	27.2
0.005	66.0	17.4	82.6	0.85	27.3	72.7	74.3	25.7
0.01	55.0	14.5	85.5	0.65	20.9	79.1	60.3	39.7
2,4-二硝基酚								
0	503.4	100	0	2.83	100	0	—	—
10 <sup>-5</sup>	516.0	102.5	-2.5	2.30	81.3	18.7	—	—
10 <sup>-4</sup>	143.7	28.5	71.5	1.01	35.7	64.3	—	—
10 <sup>-3</sup>	57.9	11.5	88.5	0.23	8.1	91.9	—	—
10 <sup>-2</sup>	31.6	6.3	93.7	0.10	3.5	96.5	—	—

\*为三次试验结果的平均值, \*\*为四次试验结果的平均值。

### 五、琥珀酸钠对丙二酸抑制作用的解除

鉴于丙二酸为三羧酸环中琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂,于是测定了丙二酸、琥珀酸钠和二者等浓度混合液对试材呼吸速率和原生质体产量的影响。结果表明,琥珀酸钠可解除丙二酸对细胞呼吸的抑制作用,并相应地在一定程度上减轻了丙二酸对原生质体产量的不利影响(表7)。

表 7 丙二酸和琥珀酸钠对甘蔗幼叶呼吸速率与原生质体产量的影响

处 理	呼 吸 速 率			原 生 质 体 产 量*		
	微升O <sub>2</sub> / 克鲜重·分	占对照%	抑 制%	×10 <sup>6</sup> /克鲜重	占对照%	抑 制%
对 照	196.0	100	0	2.90	100	0
0.005M丙二酸	165.0	84.0	16.0	1.41	48.6	51.4
0.005M琥珀酸钠	257.6	131.4	-31.4	6.66	229.0	-129.4
0.005M丙二酸+ 0.005M琥珀酸钠	203.0	103.6	-3.6	2.84	97.9	2.1

\*酶液为1%纤维素酶溶于2.5%KCl+1%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(pH5.6)中,30°C,暗处保温1.5小时。

## 讨 论

我们的试验结果初步证明了细胞呼吸代谢水平与原生质体酶解释离有密切关系。通气良好和某些能提高呼吸水平的呼吸中间产物的加入对原生质体产量有明显促进作用。通气不良,呼吸受抑制均明显地降低原生质体产量与存活率。至于这种关系的实质是什么?是否细胞的代谢活力有可能影响胞壁物质的降解?迄今毫无所知。联系到在其他方面,不少研究者发现植株年龄、生理状况和预处理等对原生质体分离的难易关系甚大。例如Хасапов等<sup>[11]</sup>发现10—12天苗龄的棉苗子叶原生质体产量最高,过幼和过长均低。Kantha等<sup>[4]</sup>发现采用低温(12—21℃)较干旱(相对湿度40—45%)条件下生长的芸苔叶片才能获得产量和存活率均较高的原生质体。这表明栽培条件和植株年龄首先影响植株的生理状态,从而影响原生质体释离的难易。Yukio Fukunaga等<sup>[12]</sup>发现小麦和水稻等细胞培养物经氮饥饿三天后,原生质体产量显著提高。Shahin等<sup>[8]</sup>把木薯叶子预漂浮在含1mM CaCl<sub>2</sub>、1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、1ppm苯乙酸和5ppm苯氨基嘌呤的蒸馏水溶液上,置暗处温育48小时后,获得高产量和高度活力的原生质体。Constabel等<sup>[3]</sup>把切下的豌豆枝条置于维持一定湿度的暗室中1~2天,所得原生质体存活率较高,并能继续分裂。Krishnamurthi<sup>[5]</sup>认为把生长旺盛的甘蔗植株置于暗处培养12小时后再切取茎尖分离原生质体,对嗣后原生质体生长有利。上述实例均表明,通过预处理改变试材的生理状况,对原生质体的分离和活力有明显影响。据上述作者和我们的试验结果,可以认为细胞的代谢水平是决定原生质体酶解释离难易和存活力的基本因素。其机理尚有待进一步研究。

在我们的试验中,采用无糖醇的无机盐稳压剂时,柠檬酸钠能促进细胞壁降解过程;采用含糖醇的稳压剂时,结果完全相反,所得产物绝大部分为未去壁的细胞,为数极少的原生质体脱壁也不完全。结合我们在别的试验中发现高浓度Ca<sup>++</sup>离子会抑制胞壁的酶促降解等现象看来,稳压剂的成分和组分间的相互作用对胞壁的酶促降解有很大影响。其原因也有待进一步研究。

综上所述可见,用酶法从具壁细胞中分离原生质体是个既受细胞的代谢水平所调控,又受组成酶液的稳压剂的组分所左右。

## 参 考 文 献

- (1) 梁平彦、刘宏迪、肖信发, 1981: 植物生理学报, 7: 1—10.
- (2) Cocking, E.C., 1960: Nature, 187: 962-963.
- (3) Constabel, F., J.W.Kirkpatrick & O.L.Gamborg, 1973: Canad. J. Botany, 51: 2105-2106.
- (4) Kantha, K.K., M.R.Michayluk, K.N.Kao, O.L.Gamborg & F.Constabel, 1974: Plant Sci. Lett., 3: 265-271.
- (5) Krishnamurthi, M., 1976: Euphytica, 25: 145-150.
- (6) Maretski, A., & L.G.Nickell, 1973: Colloq. Int. du C.N.R.S. № 212: 51-56.
- (7) Pejnar, E., J.H.M.Willison & E.C.Cocking, 1967: Protoplasma 64: 460-480.
- (8) Shahin, E.A., & J.F.Shepard, 1980: Plant Sci. Lett., 17: 459-465.
- (9) Shepard, J.F., & R.E.Totten, 1977: Plant Physiol., 60: 313-316.
- (10) Vasil, V., & I.K.Vasil, 1980: Theoretical & Applied Genetics, 56: 97-99.
- (11) Хасапов, М.М., И П.Г.Буренко, 1979: Физиол. Раст., 26: 103-108.
- (12) Yukio Fukunaga & John King, 1978: Plant Sci. Lett., 11: 241-250.

# THE EFFECT OF VENTILATIVE CONDITION AND SOME RESPIRATORY INTERMEDIATES AND INHIBITORS ON ENZYMATIC ISOLATION OF PROTOPLASTS OF YOUNG LEAVES OF SUGAR CANE

He Yao-tian

(Forestry Branch, Guangxi  
Agriculture College)

Luo ke

(Tropical Crop Branch, Guangxi  
Agriculture College)

## Abstract

Since respiratory rate of young leaves of sugarcane gradually reduced during enzymatic isolation of protoplasts, it follows that normal level of cell respiration is maintained that is an important factor for obtaining higher yields and vital protoplasts. This paper reports:

1. The yield of protoplasts is higher but the vitality is no different, in spite of organic or inorganic osmosis stabilizing agent was used, when ventilative condition is well.

2. Some respiratory intermediates such as malate,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, pyruvate, succinate and citrate may increase yield of protoplasts, among them usefulness of succinate and pyruvate is best, when inorganic osmosis stabilizing agent was used. On the other hand, only malate,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, pyruvate and succinate have promotion on the yield of protoplasts, and citrate have grave inhibition, all products obtained are almost cells which are not separated from the cell wall, when organic mannitol was used. This indicated that mutual promotion and restraint between the components of osmosis stabilizing agent have remarkable effect on enzymatic isolation of protoplasts.

3. The respiratory inhibitors such as iodoacetic acid, sodium fluoride, malonic acid, sodium azide and 2,4-dinitrophenol have remarkable inhibition on the yield and vitality of protoplasts. The yield and vitality of protoplasts gradually reduced with respiratory rate were inhibited following the concentration of inhibitors increased.

4. It may reduce harmful effects on yield of protoplasts with eliminate inhibition of malonic acid on respiration, when malonic acid is coexist with succinate.

To sum up above experimental results, we considered that to isolate protoplasts from plant cell by enzymatic method is regulated by the metabolic level of cell and influenced by the components of osmosis stabilizing agent. Their reasons are needed to be studied in the future.