

影響柑橘不定胚之原生質體分離 之重要因子

黃麗春 陳文玲 唐黛迪 劉良德

中央研究院植物所

摘 要

柑橘未成熟種子內之珠心組織，置於適當培養基上可誘導酸橙、酸桔、粗皮檸檬、黎檬、美女桔、椪柑、柳橙、麻豆白柚及麻豆文旦九珠心胚的分化，誘得之不定胚可繼續細胞分裂產生新胚，以此不定胚為材料分離原生質體，在含 1% Cellulysin, 0.2% Macerace, 0.7M Mannitol 之培養基中 (MS無機鹽類, MT維生素, 10mM MES, 300mg/l Citric acid) 於80rpm振盪下處理16小時後, 再以Mannitol /Sucrose 雙層溶液之離心法淨化分離之原生質體。每克不定胚可分離 $3-4 \times 10^6$ 原生質體, 原生質體於Agarose培養基中3日後見其細胞分裂。

一、前 言

自柑橘之珠心組織誘導珠心胚，本研究室已建立五年，珠心胚之細胞能不斷分裂產生新胚，且具植株分化能力，以此珠心胚為材料從事原生質體培養及不同橘種之細胞融合產生新種，尤其是不能自然雜交的橘種，以試管方法產生結合子以獲得新種為本研究的目的。故柑橘根砧與根砧樹種間，或根砧與接穗樹種間之細胞結合是本研究室正進行的工作，此報告主在敘述柑橘不定胚分離原生質體時，達到高產量及高活力的方法。文獻中已有多篇記載，柑橘癒合組織(10, 11, 12)葉肉細胞(3), 液體培養的細胞(4)或種子內之子葉(1)分離原生質

體，原生質體進而細胞分裂及分化植株，以該法應用於珠心胚之原生質體分離，發現原生質體分離後，渣質多細胞壁不易再生，原生質體逐漸萎縮，故本研究室必須建立一系列的研究，以探討自珠心胚分離高品質的原生質體法，以促使原生質體成活及繼續細胞分裂。

二、材料及方法

(一)珠心胚之誘導及繁殖

柑橘之根砧樹種酸橙 (*Citrus aurantium* Linn, Sour Orange)、酸桔 (*C. sunki* Hort. ex Tan.)、粗皮檸檬 (*C. jambhiri* Lushington, Rough Lemon)、黎檬 (*C. limonia* Osbeck, Rangpur Lime)、美女桔 (*C. reshni* Hort. ex Tan., Cleopatra Mandarin)、枳殼 (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) 及接穗樹種椪柑 (*C. reticulata* Blanco, Ponkan)、柳橙 (*C. sinensis* Osbeck)、麻豆白柚及麻豆文旦 (*C. grandis* cvs. Ma-Dou-Bai-You and Ma-Dou-Wen-Dan)，切取未成熟果實內之珠心組織誘導珠心胚之發育，柑橘珠心胚之誘導法於農委會77年柑橘試驗研究成果專題研討會之報告詳述之。透明年輕之珠心組織置於Murashige & Skoog (MS) (6) 無機鹽類及Thiamine.HCl 1mg/L; Pyridoxine.HCl 0.5mg/L; Nicotinic Acid 0.5mg/L; L-Glycine 2mg/L; i-Inositol 100mg/L; Adenine Sulfate 10mg/L; Malt Extract, 500mg/L; Sucrose 5%; TC Agar 0.8% pH5.7; 可使珠心組織分化不定胚，不定胚長出後加入0.3-10mg/L之BA或2iP可使珠心胚繼續分裂產生新胚 (圖一)。

(二)原生質體分離及培養

新分化之不定胚以刀片切碎，置於酵素溶液中輕微振搖16小時，可分離原生質體，酵素溶液中包括MS無機鹽類，Murashige & Tucker (7) 維生素; i-Inositol 100mg/L; MES (Morpholino Ethane Sulfonic Acid) 10mM; 酵素 Cellulysin、Macerase、Driselase、Pectolyase Y23 及醣類 Mannitol、Sucrose、Inositol或Sorbitol; pH5.7。組織年齡、組織取量、酵素組成、酵素作用時間、滲透壓、其他添加物 Malt Extract、Citric Acid或新鮮橘子汁

之效果一一鑑定之，原生質體分離後先以40u之尼龍網篩濾未分解之殘留組織，經1000rpm(263G)5分鐘離心後原生質體沉於管底，再經兩次培養液之清洗，將原生質體輕置於等濃度之Sucrose上，以比重不同效果離心，淨化原生質體，原生質體取出後，計算其產量及鑑定活力和細胞壁的溶解程度，最後置於 Agarose 培養基中觀察細胞分裂。

原生質體活力的鑑定以 Larkin(5) 的方法，溶解 FDA (Fluorescein Diacetate)於Acetone中，配置0.5%溶液貯存冰箱備用，鑑定時以50倍之高糖溶液稀釋之，再以 UV 或 BV 螢光鑑定放射之螢光強度，近日以 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)溶液溶解FDA，其效果比Acetone更佳。細胞壁之水解程度以Nagata +Takebe(8)方法，將Calcofluor White M2R溶於含滲透壓之溶液中配置0.1%，經過濾後備用之。觀察時以一滴備用液加一滴原生質體混合液後經 20-30秒於 UV 或 BV 之螢光顯微鏡鑑定細胞壁的存在或消失。原生質體產量的分析則以 Colguhoun(2)及Snedecor(9)方法計算平均值之標準誤差 (Standard Error of Mean)。

三、試驗結果

(一)組織的生理年齡

將0.5g新生之淺綠色幼胚及深綠色較大之胚切碎，置於5ml酵素溶液中16小時，結果如表一，新生之幼胚比老胚可分離更多的原生質體，且體積稍大(圖二)。

(二)組織取量

0.5g之幼胚，置於不同體積的酵素溶液中 1、2、3、4、5ml經16小時後計算原生質體的產量，發現5ml之酵素溶液，可使每克不定胚原生質體產量 1.7×10^5 ，此為1ml之132倍，2ml之20倍，3ml之14倍，4ml之2.6倍，另一試驗為5ml酵素溶液處理不同量之不定胚0.125、0.25、0.5及1g，結果以0.5g之不定胚量為最佳，1g及2g並無增進的效果。

(三)酵素組成

之效果——鑑定之，原生質體分離後先以40u之尼龍網篩濾未分解之殘留組織，經1000rpm(263G)5分鐘離心後原生質體沉於管底，再經兩次培養液之清洗，將原生質體輕置於等濃度之Sucrose上，以比重不同效果離心，淨化原生質體，原生質體取出後，計算其產量及鑑定活力和細胞壁的溶解程度，最後置於 Agarose 培養基中觀察細胞分裂。

原生質體活力的鑑定以 Larkin(5) 的方法，溶解 FDA (Fluorescein Diacetate)於Acetone中，配置0.5%溶液貯存冰箱備用，鑑定時以50倍之高糖溶液稀釋之，再以 UV 或 BV 螢光鑑定放射之螢光強度，近日以 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)溶液溶解FDA，其效果比Acetone更佳。細胞壁之水解程度以Nagata +Takebe(8)方法，將Calcofluor White M2R溶於含滲透壓之溶液中配置0.1%，經過濾後備用之。觀察時以一滴備用液加一滴原生質體混合液後經 20-30秒於 UV 或 BV 之螢光顯微鏡鑑定細胞壁的存在或消失。原生質體產量的分析則以 Colguhoun(2)及Snedecor(9)方法計算平均值之標準誤差 (Standard Error of Mean)。

三、試驗結果

(一)組織的生理年齡

將0.5g新生之淺綠色幼胚及深綠色較大之胚切碎，置於5ml酵素溶液中16小時，結果如表一，新生之幼胚比老胚可分離更多的原生質體，且體積稍大（圖二）。

(二)組織取量

0.5g之幼胚，置於不同體積的酵素溶液中 1、2、3、4、5ml經16小時後計算原生質體的產量，發現5ml之酵素溶液，可使每克不定胚原生質體產量 1.7×10^5 ，此為1ml之132倍，2ml之20倍，3ml之14倍，4ml之2.6倍，另一試驗為5ml酵素溶液處理不同量之不定胚0.125、0.25、0.5及1g，結果以0.5g之不定胚量為最佳，1g及2g並無增進的效果。

(三)酵素組成

如圖三，0.5g之幼胚置於5ml之酵素溶液處理16小時，計算不同成份分離之原生質體，發現1% Cellulysin，0.2% Macerace可使每克不定胚分離 4×10^6 原生質體，其次為Cellulysin + Driselase，再次為Cellulysin + Driselase + Macerace。Pectolyase Y23對原生質體產量有害，顯出強烈的反效果。

(四)滲透壓的效果

不同濃度0、0.3、0.7、0.9M之Mannitol、Sucrose、Inositol、Sorbitol之5ml酵素溶液中加入0.5g幼胚，如圖四以Sorbitol為滲透平衡物質於0.7M時原生質體產量可達 1×10^6 ，其次為Sucrose及Mannitol，Inositol之產量最少，另一試驗只比較四種糖類於0.7M之效果，發現Sucrose產量最高 1.5×10^6 ，Sorbitol及Mannitol各為 1.1×10^6 及 1.0×10^6 ，Inositol為 0.4×10^6 ，此一試驗則顯示Sorbitol與Mannitol無差異，以Sucrose調整滲透壓時，培養之原生質體甚易萎縮而放棄之。

(五)酵素作用的時間

0.5g之幼胚置於5ml酵素溶液中處理4或16小時，發現每克不定胚經16小時後可得 3×10^6 原生質體。4小時僅 4×10^5 相差8倍。

(六)Citric acid和Fresh Orange Juice之效果

如表二所示，Citric acid於300mg/L時有增進的效果，但無必要性，因不加入者(對照組)亦獲得高產量高活力的原生質體，比較Citric acid與Fresh Orange Juice之效果如表三，Fresh Orange Juice並無有益，反比Citric Acid更差，40%新鮮橘子汁，導致原生質體產量銳減。

(七)Malt Extract之效果

不同濃度0、0.5、1.0、1.5、2.0g/L之Malt Extract酵素溶液皆減少原生質體產量，最高產量2g/L，產量最低只有對照組之四分之一，對照組(0%)產量為 1×10^5 。

柑橘不定胚分離原生質體時，試驗間產量的變化甚大，此與液體培養的細胞較易得到一致整齊的結果不同，推測此為不定胚細胞大小及年齡之差異比液體培養的細胞為大，且液體培養的細胞呈單個或小團，細胞尚未高度分化，而不定胚已呈一高度分化之器官，細胞間分化的程度相差甚大，故切碎後經酵素水解作用溶解細胞壁時，有些細胞因過度水解而破裂，致使渣雜繁多破裂細胞所釋放之胞器及其他內含物雖經Discontinuous Density Gradient Centrifugation分離亦難得滿意效果，不定胚之原生質體渣質重，可能是與其他研究報告不同的原因所在，本研究所開發之方法，可使分離之原生質體於培養 3日後分裂成 2個子細胞（圖五），且活力佳，如何更進一步的淨化原生質體，是未來一重要問題。

酵素濃度的選用是根據已發表之文獻(1、4、10、11、12)，不同組成影響原生質體產量至巨，試驗結果顯示Pectolyase Y23有強烈之反效果，是否此酵素的成份中含有高濃度的有毒物質，以致原生質體分離後，被侵害而瓦解破裂，尚未證明，依本試驗觀察，Driselase亦有輕微的反效果，與Macerase共同使用時，效果更差，是否 Driselase或Pectolyase Y23的加入與不定胚所釋放之有機物質相合，會減弱Cellulysin的效果亦不明瞭。

Malt Extract、Citric Acid及 Fresh Orange Juice的加入均顯出反效果，且濃度益高，反效果益強，是否天然成份中含有某些有毒物質或與柑橘細胞分泌之有機成份結合致使Cellulysin失效，須繼續探討。

組織取量與酵素溶液體積的關係，影響原生質體產量，此可能與組織量偏多或偏少時，影響細胞之滲透壓致使分離之原生質體不能維持生理平衡而破裂或萎縮。

五、參 考 文 獻

1. BURGER, D.W. and W.P. HACKETT. 1982. The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons. *Physiol. Plant.* 56:324-328.
2. COLQUHOUN, D. 1971. *Lectures on Biostatistics*. Clarendon Press, Oxford.

3. GROSSER, J.E. and J.L. CHANDLER. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus X Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. *Sci. Hort.* 31:253-257.
4. KOBAYASHI, S., I. IKEDA and H. UCHIMIYA. 1985. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:249-259.
5. LARKIN, P.J. 1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta* 128:213-216.
6. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
7. MURASHIGE, T. and D.P.H. TUCKER. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc. First Intl. Citrus Symp.* 3:1155-1161.
8. NAGATA, T. and I. TAKEBE. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92:301-308.
9. SNEDECOR, G.W. 1946. *Statistical Methods*, Fourth edition. Iowa State College Press. Ames, Iowa.
10. VARDI, A., D.J. HUTCHISON and E. GALUN. 1986. A protoplast-to-tree system in *Microcitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus. *Plant Cell Repts.* 5:412-414.
11. VARDI, A. and P. SPIEGEL-ROY. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.* 62:171-176.
12. VARDI, A., P. SPIEGEL-ROY and E. GALUN. 1975. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Sci. Lett.* 4:231-236.

討 論

問：（池仲芸）

由胚分離原生質體後純化的過程。

答：（黃麗春）

percoll density gradient 50%。