

‘石牌’广藿香叶肉原生质体的分离及纯化

莫小路, 邱蔚芬, 黄珊珊, 陈瑜珍, 严 振

(广东省中药研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 以‘石牌’广藿香无菌苗叶片为材料, 对原生质体分离、纯化方法以及影响因素进行了研究。结果表明: 以继代培养 12~22 d 的无菌苗顶芽下第 3 对展开叶片为材料, 用 0.5% 果胶酶、0.2% 离析酶和 1.5% 纤维素酶作用 8 h, 渗透压调节剂为 11% 甘露醇, ‘石牌’广藿香叶肉原生质体产量达 1.85×10^7 个/g fw, 活力达 89%; 原生质体纯化以 12% 聚蔗糖 (Ficoll) 漂浮法效果最佳。

关键词: ‘石牌’广藿香; 原生质体分离; 叶肉原生质体

Doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2012.03.006

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2012)03-0025-04

Isolation and Purification of Mesophyll Protoplasts of *Pogostemon cablin* cv. *shipaiensis*

MO Xiao-lu, QIU Wei-fen, HUANG Shan-shan, CHEN Yu-zhen, YAN Zhen

(Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, Guangdong China)

Abstract: Mesophyll protoplasts were isolated and purified from leaves of *in vitro* propagated *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. cv. *shipaiensis*, and different factors affecting protoplasts yield and activity were investigated. The results showed that young leaves of seedling subcultured for 12~22 days in the enzyme solution consisting of 0.5% (w/v) pectolyase Y-23, 0.2% (w/v) Macerozyme R-10 and 1.5% (w/v) cellulase R-10, in 11% (w/v) mannitol buffered with 0.1% MES and 0.02% CaCl_2 for 8 h, the yield was 1.85×10^7 protoplasts per gram leaves (fresh weight), the viability was above 89%.

Key words: *Pogostemon cablin* cv. *shipaiensis*; protoplast isolation; mesophyll protoplast

广藿香 (*Pogostemon cablin*) 为唇形科刺蕊草属植物, 原产于东南亚, 我国南方各省均有栽培。中药广藿香为广藿香植物的干燥地上部分, 是广东省的道地药材之一, 具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑^[1]并兼有抑菌抗病毒、抗螺旋体等功效^[2], 是“藿香正气水”、“抗病毒口服液”等多种中成药的重要原料。

广藿香主要产于广东省石牌、高要及湛江地区和海南省万宁地区, 因产地的自然环境条件、种植习惯、栽培管理、采收加工等不同, 其产品形态、气味、质量差异较大^[3], 药材生产传统上认为产于广州石牌地区的广藿香 (俗称“牌香”) 品质最好, 然而由于城市发展耕地消失以及农艺性状不佳等原因, 目前‘石牌’广藿香已濒临灭绝。为保护这一种质资源, 本项目组进行了组织培养快速繁殖研究, 并取得成功^[4]; 而原生质体培养是进行细胞杂交、转基因及植株再生研究的基础, 在诸多植物上已获得成功^[5], 在广藿香原生质体培养方面, 仅有 Kageyam 等^[6]从叶肉细胞分离的原生质体经海藻酸钠包埋并采用看护培养获得了再生植株, 除此之外国内尚无相关研究报道。原生质体分离的产量和活力是后续培养成功的关键, 而用于原生质体分离材料的生理状态、酶解条件、分离和纯化方法等是影响原

收稿日期: 2012-04-28

基金项目: 广东省科技厅粤港关键领域重点突破项目(2009A030901011)、广州市科技计划基础研究项目(2009J1-C201)

作者简介: 莫小路(1967-), 女, 广西柳州人, 教授, 博士, 从事生物技术与药用植物资源研究。E-mail: moxiaolu_7@163.com

注: 严振为通讯作者。E-mail: yanz@gdyzy.edu.cn

生质体产量和活力的主要因素^[5]，本文对‘石牌’广藿香叶肉原生质体分离纯化及其影响因素进行研究，为后续的原生质体培养、体细胞融合及优质高产细胞系筛选提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

‘石牌’广藿香无菌苗按照莫小路等^[4]的方法培养，每 50 d 继代一次，幼叶用于分离原生质体。

果胶酶 (Pectinase, Pectolyase Y-23)、离析酶 (Macerozyme R-10)、纤维素酶 (Cellulase R-10)、甘露醇 (Mannitol)、聚蔗糖 (Ficoll)、MES (2-吗啉乙磺酸) 和 FDA (二乙酸荧光素) 均购自广州威佳生物技术有限公司。

主要仪器：低速摇床、低速离心机、超净工作台、Olympus 倒置显微镜、Leica 荧光显微镜及电子拍照系统。

1.2 方 法

1.2.1 原生质体的分离及相关因素的影响 取继代培养 12 d、位于顶芽下第 3 对展开叶片 (叶片大小约为 1.2 cm×1.5 cm) 的‘石牌’广藿香无菌苗叶片，去除大叶脉，将叶片碎片分别浸入以果胶酶和纤维素酶不同浓度组合的酶溶液中 (表 1)，叶片鲜重与酶液体积=1:20，每组酶溶液均用含 9% 甘露醇、0.1% MES, 0.02% CaCl₂ 溶液配制，pH 5.7，过滤除菌。于 (26±1)°C，置低速摇床上以转速 40 r/min 避光培养 10 h，从 4 h 开始，每隔 2 h 检查一次原生质体产量，确定原生质体分离的最佳酶液组合和酶解时间。确定酶解时间和酶浓度后，分别用含甘露醇 5%、7%、9%、11% 和 13% 的溶液配制酶溶液 (pH 5.7) 进行酶解实验，考察渗透压调节剂甘露醇的浓度对原生质体产量和活力的影响。

表 1 用于‘石牌’广藿香叶片原生质体分离的酶组合

酶液编号	果胶酶 (%)	离析酶 (%)	纤维素酶 (%)
1	0.25	0.2	1.0
2	0.50	0.2	1.0
3	1.00	0.2	1.0
4	0.50	0.2	1.5
5	0.50	0.2	2.5

按上述实验确定的最佳酶液组合、酶解时间和甘露醇浓度对不同继代培养时间的无菌苗幼叶进行酶解，确定取得原生质体最高产量的无菌苗继代培养时间。

1.2.2 材料低温预处理的影响 将待分离的广藿香无菌苗置于 5 °C 低温培养 20 h，将低温预处理后的材料放入酶液中 (同 1.2.1 方法)，测定原生质体分离产量和活力。

1.2.3 原生质体的纯化 分别采用 Ficoll^[6] 漂浮法和蔗糖等密度离心法^[7-8] 对原生质体进行纯化，Ficoll (聚蔗糖) 浓度为 12%，蔗糖浓度为 21% 和 25%。

纯化后的原生质体再用原生质体洗涤液 (用于溶解酶的溶液) 洗涤一次，以转速 500 r/min 离心 3 min，弃上清，沉淀用一定体积的原生质体培养液 (附加 0.05 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L BA 的 MS 液体培养基，含 7% 甘露醇和 0.1% MES) 悬浮。

1.2.4 原生质体产量和活力测定 原生质体数量以血球计数板统计，每个样品计数 3 次，取平均值，计算出 1 mL 溶液中原生质体的数量，按下式计算原生质体产量。

原生质体产量 (个/g fw) = 溶液中的原生质体数量 (个/mL) × 所得原生质体悬液总体积 (mL) / 分离原生质体所用叶片材料鲜重 (g)

原生质体活力测定：采用荧光显色法，将 0.01% FDA 溶液与一定浓度的原生质体溶液混合后，在荧光显微镜下观察发绿色荧光的细胞数量。按下式计算原生质体活力：

原生质体活力 = 有荧光的原生质体数量 / 总原生质体数量 × 100%。

2 结果与分析

2.1 酶液组成和酶解时间对原生质体分离的影响

酶液的组成和浓度直接影响原生质体分离的效果。在植物原生质体分离中最常用的酶是果胶酶和纤维素酶，而低浓度的离析酶可以促进原生质体的解离。本研究试验了不同浓度果胶酶 Y-23、离析酶

和纤维素酶 R-10 的酶液组合对 '石牌' 广藿香叶片原生质体产量的影响。结果显示: 在同一纤维素酶浓度下, 原生质体的产量随着果胶酶浓度的增加而提高; 在同一果胶酶浓度下酶解 6 h, 纤维素酶浓度达到 2.5% 时原生质体产量最大, 但原生质体活力却降低; 继续酶解或提高纤维素酶浓度, 则酶解液中的原生质体大量破裂、解体 (图 1)。原生质体的活力可通过 FDA 染色后在荧光显微镜下观察, 有活力的发出绿色荧光 (图 2-A) 在所试验的 5 个酶液组合中, 4 号酶液作用 8 h 原生质体的产量最高, 达 1.7×10^7 个/g fw。酶解时间超过 8 h, 则因原生质体破裂而使产量降低。因此, 确定 4 号酶液组合 (含果胶酶 0.5% 和纤维素酶 1.5%) 作用 8 h 是原生质体分离的最佳条件 (图 1), 在以后的考察其它影响因素时对原生质体分离都采用此酶组合和酶解时间。

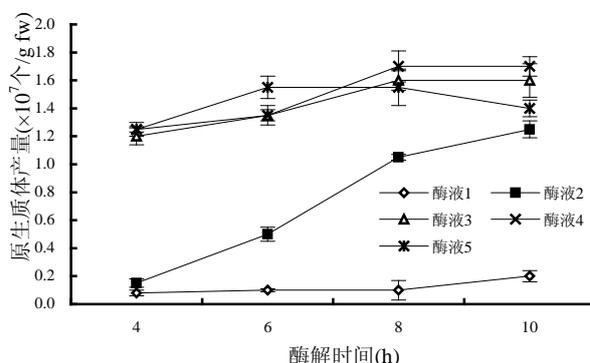


图1 不同酶液对原生质体分离的影响

2.2 渗透压调节剂浓度的影响

采用 5%~13% 甘露醇附加 0.1% MES、0.02% Ca^{2+} 为渗透压调节剂, 比较其对原生质体产量及活力的影响。结果表明: 原生质体的产量随着甘露醇浓度的升高而提高; 活力在甘露醇浓度为 11% 时达到最大, 而甘露醇浓度达到 13% 时, 原生质体形态发生变化, 产量降低, 活力下降 (表 2)。而低浓度的甘露醇虽然能获得较高产量的原生质体, 但原生质体的活力很低, 不能用于后续的培养; 因此, 确定适合广藿香叶肉细胞原生质体分离的渗透压调节剂甘露醇的浓度为 11%。

表 2 甘露醇浓度对叶片原生质体产量和活力的影响

甘露醇浓度(%)	原生质体产量(×10 ⁷ 个/g fw)	原生质体活力(%)
5	0.90±0.06	38.1±1.02
7	1.15±0.08	49.5±1.15
9	1.75±0.10	85.4±1.80
11	1.85±0.06	89.0±1.60
13	1.55±0.11	50.5±2.20

注: 数据为三组重复的平均值 $\bar{x} \pm SD$ 。表 3 同。

2.3 叶片生理状态对原生质体分离的影响

在继代培养后, 不同生长时间 (苗龄) 的幼叶对酶液的敏感性不同, 12~22 d 苗龄的叶片原生质体产量较高 (表 3)。在继代后的一周内, 无菌苗尚未生根; 大约 10~13 d, '石牌' 广藿香无菌苗生根约 0.5~1 cm 长; 40 d 后, 无菌苗的根系发育完全, 充满培养基内, 植株生长较慢。在本研究中, 12~22 d 苗龄的无菌苗生理状态处于生长对数期, 叶片活力较高, 对酶液也较为敏感。

表 3 叶片生理状态对原生质体分离的影响

无菌苗继代培养时间(d)	原生质体产量(×10 ⁷ 个/g fw)	原生质体活力(%)
5	1.15±0.08	46.7±0.08
12	1.75±0.12	88.2±1.03
22	1.80±0.26	89.4±1.14
32	1.35±0.61	85.3±1.24
42	0.80±0.52	60.2±1.32

2.4 叶肉细胞原生质体纯化方法的比较

本研究比较了 Ficoll 漂浮法和蔗糖等密度离心法对广藿香叶肉细胞原生质体纯化的影响, 在蔗糖等密度离心法中, 比较 21% 和 25% 两个浓度的蔗糖溶液。结果表明, 两种方法都能使纯化后的原生质体悬浮液中的杂质碎片含量明显降低, 其中, 12% 聚蔗糖 (Ficoll) 溶液的纯化效果最好 (图 2-B~D)。

2.5 低温预处理对原生质体分离效果的影响

通常, 低温、高渗预处理能提高植物细胞原生质体分离时的产量^[5]。但在本项目研究中, 经 5 °C 低温预处理 20 h 的广藿香叶片在酶解时极易发生褐化, 溶液变成褐色, 原生质体的产量和活力都很低, 即低温处理不能提高 '石牌' 广藿香原生质体的产量。

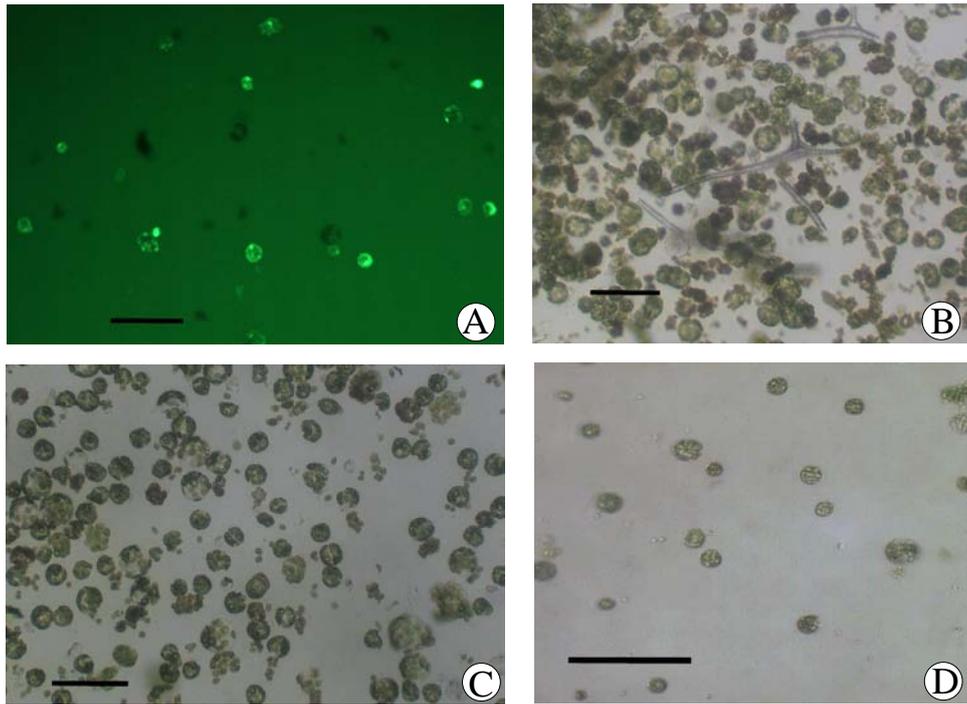


图 2 ‘石牌’广藿香不同处理的叶肉原生质体

注: A. FDA 染色在荧光显微镜下观察, 发荧光的为有活力的原生质体; B. 未纯化的叶肉原生质体; C. 21%蔗糖等密度离心纯化的叶肉原生质体; D. 用 Ficoll 漂浮法纯化的叶肉原生质体。标尺=50 μm。

3 讨论

原生质体培养是进行细胞杂交、转基因及植株再生的研究基础, 在很多植物上都已获得成功, 而在广藿香原生质体培养方面, 目前国内尚未见研究报道。原生质体分离的产量和活力是后续培养成功的关键, 而用于原生质体分离的材料生理状态、酶解条件、分离和纯化方法等是影响原生质体产量和活力的主要因素。本研究对影响广藿香原生质体产量和活力的多种因素进行了研究, 结果表明: 在最佳的酶液组合处理下, 渗透压调节剂的浓度和实验材料的生理状态是影响原生质体分离效果的重要因素。本研究采用继代后 12~22 d 的广藿香无菌苗第 3 对展开叶片为材料, 以 11% 甘露醇为渗透压调节剂, 经 0.5% 果胶酶、0.2% 离析酶和 1.5% 纤维素酶作用 8 h, 原生质体产量达 1.85×10^7 个/g fw, 原生质体活力最大达到 89% 以上, 能满足原生质体进一步培养的要求 Mills 等在桃叶片原生质体纯化时, 采用 21% 蔗糖浓度效果良好^[7], 本研究中以 12% 聚蔗糖 (Ficoll) 漂浮法纯化广藿香叶肉原生质体效果最好。

参考文献:

- [1] 广东中药志编委会. 广东中药志(第一卷)[M]. 广州: 广东科技出版社, 1994.
- [2] 任守忠, 靳德军, 张俊清, 等. 广藿香药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2006(8): 27-29.
- [3] 李薇, 潘超美, 徐良, 等. 不同产地广藿香特征的观测和比较[J]. 中药材, 2002, 25(7): 463-465.
- [4] 莫小路, 汪小根, 邱蔚芬, 等. 组织培养法生产石牌广藿香及其质量分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 840-842.
- [5] 许智宏, 卫志明. 植物原生质体培养和遗传操作[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 11-19.
- [6] Kageyam Y, Honda Y, Sugimura Y, et al. Plant regeneration from patchouli protoplasts encapsulated in alginate beads[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 41: 65-70.
- [7] Mills D, Hammerschlag F A. Isolation of cells and protoplasts from leaves of in vitro propagated peach (*Prunus persica*) plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 36: 99-105.
- [8] 景艳春, 康向阳, 王君, 等. 新疆杨叶肉原生质体游离和纯化的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 509-514.