

金线莲原生质体游离的研究

刘欣佳, 杨跃生

(华南农业大学华南药用植物研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 采用生物化学的方法对兰科药用植物金线莲 *Anoectochilus formosanus* Hayata 原生质体的分离进行了试验探讨。结果表明, 从金线莲叶片组织分离原生质体的效率很高, 以含有 $w=1\%$ 的 Macerozyme R-10 和 $w=2\%$ 的 Cellulase ONOZUKA R-10 的酶解溶液进行 5~6 h 的处理, 可以从 1 g 鲜质量的嫩叶材料得到 820 万个以上的原生质体。

关键词: 金线莲; 原生质体; 酶解

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)03-0070-03

Isolation of Protoplasts of *Anoectochilus formosanus*

LIU Xin-jia, YANG Yue-sheng

(Research Center for South China Medicinal Plants, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Isolation of protoplasts of *Anoectochilus formosanus*, a medicinal plant belonging to the orchid family was investigated using biochemical method. Results of the experiments indicate that the isolation of protoplasts from leaf tissues of *A. formosanus* was very efficient, with an enzyme solution of $w = 1\%$ Macerozyme R-10 and $w = 2\%$ Cellulase ONOZUKA R-10, as many as 8.2×10^6 protoplasts could be isolated within 5-6 h of treatment from 1 g fresh leaf tissues.

Key words: *Anoectochilus formosanus*; protoplast isolation; enzymatic digestion

金线莲 *Anoectochilus formosanus* Hayata 为兰科开唇兰属植物, 故又称金线兰, 全草皆可入药, 其味甘, 性平微寒, 是民间珍贵药材之一^[1,2]。除了药用之外, 金线莲的叶和花姿色美妙, 为绝佳观赏植物。多年来, 以台湾和福建省为中心的各研究机构对金线莲开展了大量的研究工作, 展现了金线莲十分诱人的发展前景^[3,4]。植物原生质体在无性杂交、细胞生理学和植物病毒学等研究领域有重要的应用, 而取得数量大和活力高的原生质体是这些研究得以开展的前提。目前, 以兰科植物为材料分离原生质体的报道还很少, 就笔者所知只有蕙兰^[5]和铁皮石斛^[6,7]总共 3 例。本研究开展了金线莲原生质体游离试验并取得了十分理想的结果, 可为相关研究提供具有实用价值的资料。

1 材料与方法

1.1 植物材料和水解酶

植物材料为金线莲的无菌培养苗, 经过 5 个月的增殖培养, 外观活力高, 具有 4 个明显的节, 高度约 12 cm。试验时分别切取无菌苗不同成熟度的叶片和茎间组织为材料进行原生质体的游离。游离原生质体的水解酶为 Macerozyme R-10 和 Cellulase ONOZUKA R-10, 均购自日本的 Yakult Honsha 公司。

1.2 各种溶液的配制

CPW 溶液^[8]为水溶液, 含有 KH_2PO_4 27.2 mg/L、 KNO_3 101 mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 480 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 240 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L; 以 CPW 溶液为溶剂, 溶解 $w = 13\%$ 甘露醇、 $w = 1\%$ Macerozyme R-10 和 $w = 2\%$ Cellulase ONOZUKA R-10, 并

收稿日期: 2005-10-25

作者简介: 刘欣佳(1982-), 男, 学士; 通讯作者: 杨跃生(1957-), 男, 研究员, 博士, E-mail: ysyang@scau.edu.cn

用 1 mol/L 的 HCl 将 pH 调整至 5.5 作为水解游离原生质体的酶液.

1.3 材料的准备和原生质体的游离

准确称取(精确至 1 mg,是计算原生质体游离效率的基础数据)500 mg 的合适叶片或茎组织,用手术刀片将叶片材料切割成宽 0.5 mm 的细条,将茎组织横切成 0.5 mm 的薄片. 将切割好的材料加入到 15 mL 酶解液中,然后置于往复式摇床上轻轻振荡(约 50 次/min,位移约 1 cm),游离时间 4~8 h. 从切割材料到游离处理最初 4 h 在无菌条件下进行,开始取样观察以后在可能有菌的室内环境中进行.

1.4 原生质体的观察和计数

游离处理开始 4 h 之后,每隔 1 h 取原生质体悬浮液样品,在血球计数板上并于倒置显微镜下观察计数. 每次取样 2 个,每个样品 1 小滴,观察计数 2 个视野,再经计算转换得到原生质体的总数平均值及其标准差、每克鲜质量材料的原生质体数量和每毫升酶液所游离的原生质体数量.

2 结果与分析

游离过程中,可以看到切小的植物组织在游离处理开始 2 h 后开始显著变软,3 h 后多数组织块解体,4 h 后酶解液变得浑浊. 这时取酶液在倒置显微镜下观察可以看到大量的原生质体. 图 1 是由叶片分离得到的原生质体的情况. 多数原生质体的直径在 45 μm 左右,部分原生质体内有大量的叶绿体,或同时含有比较多的红色色素,体现了金线莲叶片的颜色特点. 相对而言,茎组织的原生质体比叶片的原生质体稍微大一点,但叶绿体和色素的含量比较少.

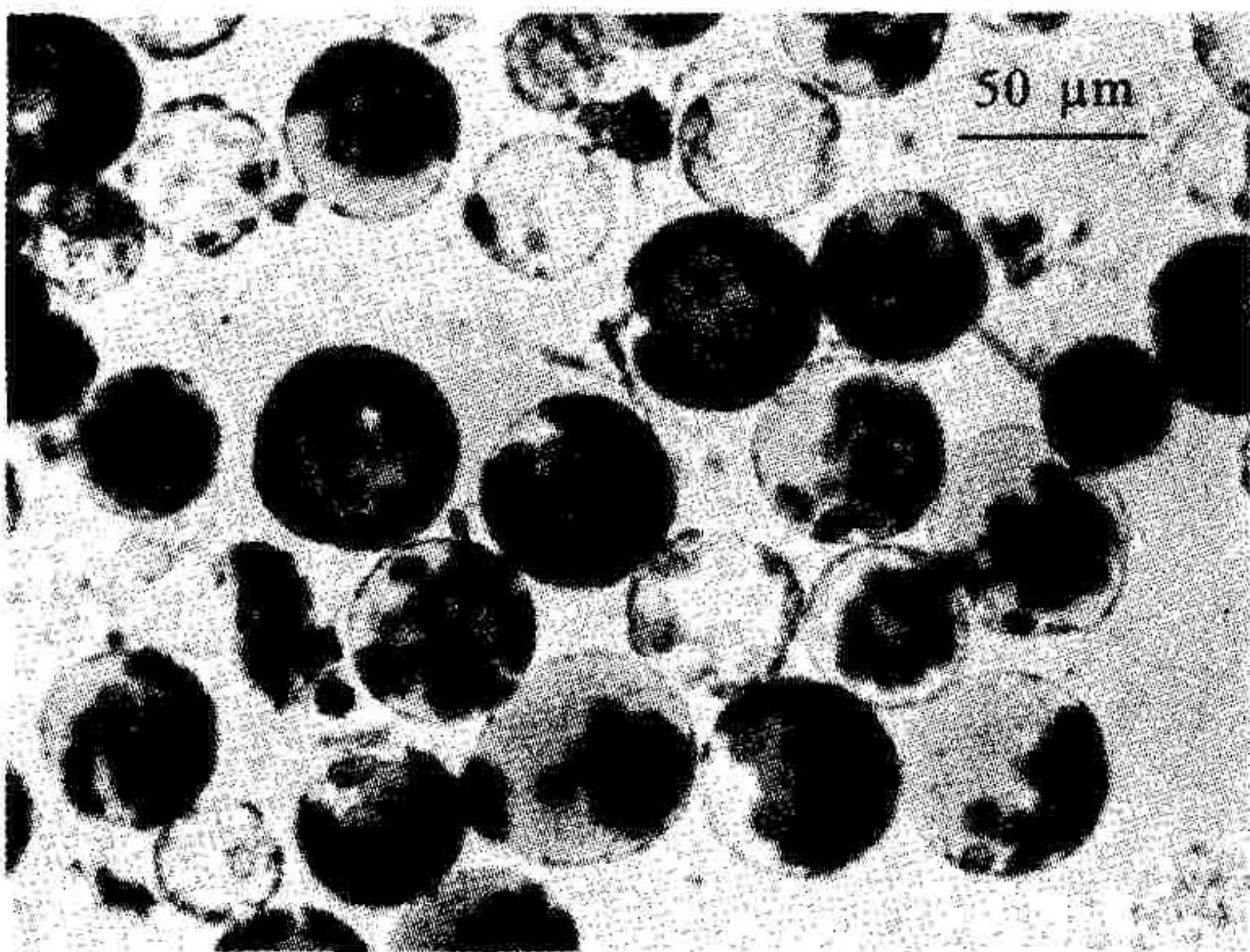


图 1 金线莲叶片组织游离的原生质体
Fig. 1 Protoplasts isolated from leaf tissue of *Anoectochilus formosanus*

表 1 列出了各处理的原生质体的总数、每克鲜质量材料产生的原生质体数量和每毫升酶液所游离得到的原生质体数量共 3 组数据. 其中,第 1 组数据是试验观察的基本数据,但其具体数值受试验时采

用的材料的量的多少所影响,未能够真正反映本质上的效率问题;第 2 组数据扣除了试验材料的量的影响,能够定量地反映出游离效率的高低;第 3 组数据则反映出酶液的有效程度. 从表 1 可以清楚地看到,随着游离时间的延长,原生质体的总数有所增加,但增加的幅度不大;除了下部茎间材料外,原生质体产量在处理 5~6 h 达到峰值. 相对来说,叶片组织的游离效率明显高于茎组织的游离效率,未完全展开的叶片组织的原生质体产量最高,这一点与幼嫩叶片的细胞体积比较小有直接关系.

表 1 原生质体游离情况
Tab. 1 Details of protoplast isolation

材料 material	t(酶解 digestion) /h	原生质体数量 No. of protoplasts/ × 10 ⁴		
		平均 总个数 mean total No.	1 g 鲜质 量材料 1 g fresh material	1 mL 酶液 1 mL enzyme solution
未完全展 开叶片 not fully expanded leaf	4	295 ± 71.5	754.6	19.7
	5	303 ± 34.5	775.4	20.2
	6	321 ± 82.2	821.2	21.4
	7	310 ± 98.7	795.2	20.7
完全展 开叶片 fully expanded leaf	8	208 ± 77.7	720.1	18.7
	4	267 ± 53.5	570.6	17.8
	5	276 ± 62.4	587.0	18.4
	6	272 ± 53.0	578.4	18.1
成熟叶片 mature leaf	7	264 ± 43.7	564.5	17.6
	8	199 ± 12.5	424.5	13.3
	4	312 ± 28.9	651.2	20.8
	5	317 ± 57.1	658.1	21.1
顶端茎间 upper stem	6	294 ± 53.5	613.5	19.6
	7	287 ± 55.5	598.0	19.1
	8	236 ± 47.4	490.8	15.7
	4	176 ± 22.7	463.3	11.7
下部茎间 lower stem	5	186 ± 22.7	488.5	12.4
	6	173 ± 22.2	452.7	11.5
	7	164 ± 8.2	429.0	10.9
	8	152 ± 32.5	398.0	10.1
	4	156 ± 76.0	313.0	10.4
	5	170 ± 32.5	338.7	11.3
	6	173 ± 25.1	344.2	11.5
	7	191 ± 48.1	381.6	12.7
	8	218 ± 56.5	434.3	14.5

3 讨论

原生质体分离时,酶解时间对分离效果影响很大.根据本试验的数据可以认为,金线莲叶片的最佳酶解时间是5~6 h.这时,在倒置显微镜下可以看到原生质体润泽光亮、边缘清晰.若酶解时间太短,细胞壁分解不充分,形状不规则,未能够成为真正意义上的原生质体,不能够用以进行原生质体融合的实验研究;然而,酶解时间过长则会加重对细胞膜的损伤,导致较早游离出的原生质体活力降低甚至破裂,且浪费时间^[9].

叶片组织原生质体的游离效果优于茎部组织,这和这两种器官的组织结构和细胞状况的差别有密切的关系.叶片上层栅栏组织细胞呈类长方形,排列整齐紧密,单位体积的细胞总数相对较多;叶肉细胞虽然排列不紧密,存在显著间隙,但却有利于水解酶对细胞壁的分解.吴海清等^[10]通过解剖学的试验发现叶肉细胞内各种盐类结晶较少,因此,可以推断在原生质体游离过程中由结晶造成的物理性的刺破原生质体的损失量也相对较少.茎部组织和叶片组织最显著的差别是含有相对更多数量的诸如导管和管胞细胞等的特化细胞或结构,不能够成为原生质体,因此,由茎部组织分离得到的原生质体的数量明显较少.

原生质体的游离效率和很多因素有关,其中,材料本身的性质和状态往往起到极其重要的作用.通常情况下,叶片是游离原生质体的首选材料;在兰科植物中,杨柏云等^[5]在以叶片为材料时取得了最高的分离效率,詹忠根等^[7]利用叶片游离原生质体并进行了成功的培养,得到了细胞团,而Hu等^[6]则采用花瓣组织为材料游离原生质体并以此作为试验系统开展了对兰花病毒的研究.这些结果说明,除了叶

片外,花瓣也是一种适合游离原生质体的材料.本研究采用了通常的酶液成分和浓度,在较短的时间内从金线莲的叶片和茎组织中分离得到了大量高质量的原生质体,为今后进行原生质体融合育种等研究提供了必要的前提条件和试验基础.

参考文献:

- [1] 陈卓,黄自强.金线莲及其提取物降血糖实验研究[J].福建医科大学学报,2000,34(4):152-154.
- [2] 胡珊梅,张启国,袁文杰,等.珍稀中草药金线莲的RAPD研究[J].中草药,2000,31(12):13-16.
- [3] 曾健,林竟成,黄坚航.金线莲的应用与开发[J].海峡药学,1996,8(4):82-83.
- [4] 蔡文燕,肖华山,范秀珍.金线莲研究进展(综述)[J].亚热带植物科学,2003,32(3):68-72.
- [5] 杨柏云,沈前华,徐敏等.蕙兰原生质体分离[J].江西农业学报,1996,8(2):108-113.
- [6] HU W W, WONG S M, LOH C S, et al. Synergism in replication of cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) RNA in orchid protoplasts [J]. Archives of Virology. 1998, 143(7): 1 265-1 275.
- [7] 詹忠根,徐程,张铭.铁皮石斛叶肉原生质体的分离与培养研究[J].浙江大学学报:理学版,2004,31(2):193-196.
- [8] FREARSON E M, POWER J B, COCKING E C. The isolation, culture, and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts[J]. Developmental Biology (San Diego), 1973, 33(1):130-137.
- [9] 何业华,胡芳名,谢碧霞,等.枣树原生质体分离条件的研究[J].中南林学院学报,1999,19(1):20-23.
- [10] 吴海清,龚祝南.金线莲和银线莲的比较解剖学研究[J].江苏农学院学报,1996,17(3):25-29.

【责任编辑 李晓卉】