

新疆雪莲胚性愈伤组织的诱导及原生质体分离

袁永娟^{1,2}, 王晓军¹, 郝秀英³, 赵民安¹, 朱金刚^{1,2}, 祁鑫星^{1,2}

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 新疆 830011; 2. 中国科学院 研究生院 北京 100039;

3. 新疆农业科学院 微生物应用研究所, 乌鲁木齐 新疆 830091)

摘要:以新疆雪莲无菌叶片为材料, 诱导其产生胚性愈伤组织, 再以胚性愈伤组织为分离原生质体的起始材料, 研究质壁分离时间、渗透压浓度、酶液组合、酶解时间等因素对其原生质体分离效果的影响。结果表明: 对诱导胚性愈伤组织有较好效果的培养基组合为: MS+2, 4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+葡萄糖 30 g/L; 原生质体分离最佳体系为: 含纤维素酶 2.5%、离析酶 0.2%、果胶酶 1%、MES 0.1%和甘露醇 10%的酶解液, 在温度(26±1)℃, pH 5.8 条件下酶解 14~16 h, 游离原生质体的产量和活性均较高。

关键词: 新疆雪莲; 胚性愈伤组织; 原生质体; 分离

中图分类号: S 567.23⁺9(245) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0125-04

新疆雪莲(*Saussurea involucreata* Kar. et Kir.)为菊科(Compositae)菜蓟族(Trib. Cynareae Less)凤毛菊属(*Saussurea* DC)的多年生草本药用植物^[1-2], 又名天山雪莲。在我国主要分布在西北部的高寒山地。它是中药、民族药中的珍稀药材, 含黄酮、生物碱、多糖等多种有效成分, 具有活血通经、散寒除湿、强筋壮阳等功效, 多用于风湿性关节炎、经血不调、阳痿、跌打损伤的治疗^[3-5]。新疆雪莲一般生长在极端环境下, 种子自然发芽率低, 生长周期长, 人工栽培困难。近几年在利益的驱使下, 大规模掠夺式的采挖使得野生雪莲数量急剧下降, 导致野生资源日益匮乏, 目前新疆雪莲已被列为国家三级保护植物。新疆雪莲组织培养再生植株的快繁体系建立^[6-7], 为原生质体分离、培养及融合提供基础。原生质体是研究细胞生理现象的理想材料, 也是遗传转化的理想受体^[8], 能够获得数量大、活力强的分离原生质体是对新疆雪莲种质资源进行创新的前提^[9]。现国内关于新疆雪莲原生质体的分离和培养尚未见报道。

该研究以新疆雪莲无菌叶片为试材, 诱导其产生胚性愈伤组织, 进而以胚性愈伤组织为起始材料进行原生质体分离和纯化, 研究预处理时间、酶液组合、酶解时

间、渗透压、酶解温度等不同因素对原生质体产量和活力的影响, 建立最佳的原生质体分离和纯化体系, 以便为后续的原生质体培养、遗传转化和体细胞杂交奠定良好的基础^[10]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

种子: 新疆雪莲的成熟种子取自新疆和静县; 纤维素酶 R-10、果胶酶 R-10、离析酶 R-10 为宝生物公司生产; 甘露醇为上海沪试公司生产; 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)为北京欣经科公司^[11]。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的培养 筛选出颗粒饱满的新疆雪莲种子, 用自来水冲洗 2 h 进行表面清洗, 然后在超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 50 s, 0.1% 的升汞灭菌 4 min, 15% 的过氧化氢灭菌 20 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 再浸泡 5 min, 用消毒滤纸吸干表面水分, 接种于无激素的 MS 基本培养基上, 培养条件为: 温度(23±1)℃, 光照强度 2 500~3 000 lx, 光照时间 16 h/d, 20 d 后萌发。

1.2.2 胚性愈伤组织的诱导 以萌发的无菌苗的子叶和真叶为外植体, 切成 1~2 cm 的片段, 接种于设计好的培养基(见表 1)中诱导愈伤组织, 基本培养基均为 MS, 培养期 25 d, 每个处理接种 30 个外植体, 20 d 后统计愈伤组织颜色、质地及出愈率。挑选黄绿色、颗粒状、质地松散生长旺盛的愈伤组织接种至 MS+NAA 1.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+2, 4-D 0.1 mg/L 培养基中继代培养。

1.2.3 原生质体分离和纯化 选取约 1 g 生长均一、颜色黄绿、质地松散、分散性高的胚性愈伤组织(见图 1), 切碎放入 20 mL CPW-13M(含 13%甘露醇)^[12] 溶液的三

第一作者简介: 袁永娟(1982-), 女, 在读硕士, 研究方向为生物有机化学。E-mail: tiantian-yuan@126.com。

通讯作者: 王晓军(1962-), 男, 研究员, 研究方向为植物资源利用。E-mail: wangxj@ms.xjb.ac.cn。

基金项目: 中国科学院西部行动高新技术资助项目(KGCX2-YW-509)。

收稿日期: 2009-12-11

角瓶中,置于 26℃摇床上,100 rpm,避光质壁分离 1~2 h。然后换入 10 mL 酶解液(参见表 2)并附加 5 mmol/L 2-(N-吗啡琳)乙磺酸(MES),温度(26±2)℃,50rpm,避光酶解 10~14 h,待酶完全溶解后,调节 pH 5.8 然后通过直径 0.22 mm 的微孔滤膜过滤灭菌。在黑暗,温度(26±1)℃,100 rpm,条件下酶解 10、12、14、16、18 h 后,将原生质体悬浮液经 500 目镍丝网过滤到小烧杯中,除去未完全酶解的细胞团或组织。将滤液 1 000 rpm 离心 10 min,取下层沉淀用 CPW-9M(含 9%甘露醇)溶液洗涤 2 次,将留下的原生质体悬浮于 2 mL CPW-9M 溶液中,将其缓缓加入 6 mL CPW-21S(含 21%蔗糖)中,再以 500 rpm 离心 5 min。这时,在 2 个液面中间出现一条绿色原生质体带,用吸管小心地吸出再用原生质体培养液清洗 1 次,即可获得纯化的新疆雪莲原生质体(图 2)。

表 1 新疆雪莲胚性愈伤组织诱导培养基的激素浓度组合

培养基编号	激素组合/mg·L ⁻¹			碳源	
	6 BA	2,4-D	NAA	葡萄糖/g·L ⁻¹	蔗糖/g·L ⁻¹
H ₁	0.1	0.1	—	30	—
H ₂	0.5	0.1	—	30	—
H ₃	1.0	0.1	—	—	30
H ₄	1.5	0.1	—	—	30
Y ₁	0.5	—	0.5	30	—
Y ₂	0.5	—	1.0	30	—
Y ₃	0.5	—	1.5	—	30
Y ₄	0.5	—	2.0	—	30
Z ₁	0.5	0.2	—	30	—
Z ₂	0.5	0.4	—	30	—
Z ₃	0.5	0.5	—	—	30
Z ₄	0.5	0.5	—	—	30

表 2 酶液组成及含量

酶液	纤维素酶/%	离析酶/%	果胶酶/%
ER ₁	1	0.1	2
ER ₂	1.5	0.1	2
ER ₃	2	0.2	1.5
ER ₄	2.5	0.2	1
ER ₅	3	0.5	1



图 1 新疆雪莲胚性愈伤组织

1.2.4 原生质体产量和活性的测定 血球计数板的每个最小的方格与植物原生质体的大小差不多,会有很多

原生质体被挤出视野,计数不准确。因此,采用侯岁稳等(1999)的方法进行原生质体简单计数。用移液枪吸取分离纯化后的原生质体悬浮液 8 μL,滴在载玻片上,加盖 18 mm×18 mm 的盖玻片,在 40×物镜下(视野面积 3.14×0.252=0.2 mm²)观察到 6 个不同视野原生质体的平均值是 20 个时,则其密度为[(1 000/8)×(18×18/0.20)]×20=4.05×10⁶个/mL。每个处理随机观察 10 个视野,取平均值,每个处理重复 3 次。原生质体活性检测采用 0.1%酚藏花红染色法,每个样品重复观测 3 次,按原生质体活性=(未被染上红色的原生质体数/观察的原生质体总数)×100%,计算原生质体活性,最后取平均值。

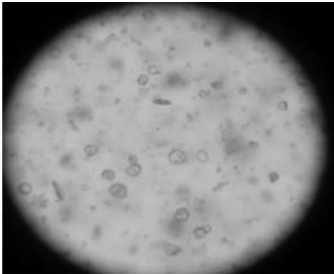


图 2 原生质体分离图片

2 结果与分析

2.1 激素组合对胚性愈伤组织诱导的影响

全部接种在 10~12 d 后,外植体两端均出现膨大、开裂,愈伤组织开始形成,3 周左右,有大量的愈伤组织产生。不同激素组合对外植体愈伤组织的形成影响不尽相同。从表 3 可知,2,4-D 在 0.1~1.0 mg/L 范围内均可诱导愈伤,且随着 2,4-D 浓度增大,愈伤诱导率也增大,但当 2,4-D 浓度大于 0.5 mg/L 时,外植体褐化程度随之增加,不利于愈伤组织继代;在相同 2,4-D 浓度条件下,随着 6-BA 浓度 0.1~1.5 mg/L 的增加,愈伤诱导率呈先增后减的趋势,过高浓度的 6-BA 会抑制 2,4-D 的作用,这与文献报道一致^[13];在相同 6-BA 浓度条件下,随着 NAA 浓度的增大,愈伤组织发生速度增快,单个外植体上出芽数降低,当 NAA 浓度 1.5 mg/L 时,愈伤组织形成的时间短,愈伤生长迅速,抑制了不定芽的产生,同时加入葡萄糖的培养基可以有效的防止褐化现象。综合考虑,选择 MS+2,4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L,以葡萄糖为碳源的培养基作为诱导胚性愈伤组织的最佳培养基。

2.2 质壁分离时间对原生质体分离效果的影响

质壁分离时间对原生质体的分离有较大的影响,不同处理时间对原生质体的产量影响不同。试验比较了 4

种质壁分离时间对新疆雪莲原生质体分离产量和细胞碎片多少的影响。

表 3 不同激素组合对胚性愈伤组织诱导影响(22 d)

培养基编号	出愈率/ %	愈伤组织生长情况		
		增殖量	颜色	质地
H ₁	92. 6	++++	淡绿色	松散、粘稠状
H ₂	98. 2	++++	黄绿色	紧实、颗粒状
H ₃	93	++++	黄绿色	紧实、块状
H ₄	85	+++	绿色	坚硬、部分褐化
Y ₁	65	+	淡绿色	有很多出芽点
Y ₂	68. 3	+	淡绿色	坚硬、有出芽点
Y ₃	85	++	黄绿色	紧实、颗粒状
Y ₄	75. 6	+++	黄绿色	紧实、块状
Z ₁	93. 5	++++	黄绿色	紧实、颗粒状
Z ₂	90. 3	+++	淡绿色	松散、粘稠状
Z ₃	87. 3	+++	淡绿色	松散、粘稠状
Z ₄	80. 2	+++	灰绿色	表面发白、水渍状

注 出愈率= 直径大于 0. 15 cm 的愈伤组织块数/ 接种块数× 100%。

表 4 质壁分离时间对原生质体分离的影响

质壁分离时间/h	原生质体产量/ 个· g ⁻¹	细胞碎片
CK	1. 32	+
1	1. 46	+
2	1. 67	+
3	1. 83	++
4	1. 53	++++

注 + 指很少; ++ 指较多; +++ 指很多; ++++ 指极多。

由表 4 可知, 4 个不同的预处理得到的原生质体产率均比对照多, 随着质壁分离时间的延长, 原生质体产量逐渐增加, 但是细胞碎片也逐渐增加, 也就是原生质体活力在下降, 质壁分离 3 h 时原生质体产量最高达 1. 83× 10⁶ 个/ g, 继续延长时间, 原生质体产量下降同时细胞碎片也增多, 因此从原生质体产量、细胞碎片的多少两方面因素综合考虑^[14], 新疆雪莲胚性愈伤组织适宜的质壁分离时间为 2 ~ 3 h。

2. 3 渗透压浓度对原生质体分离效果的影响

以甘露醇为渗透压调节剂, 比较了浓度范围 9% ~ 13% 不同渗透压的酶液^[15] 对胚性愈伤组织原生质体的解离效果。由表 5 可以看出, 在甘露醇浓度为 9% ~ 13% 范围内, 随着酶液渗透压的增大, 原生质体的产量呈逐渐上升趋势, 这是由于当溶液渗透压低于原生质体内部渗透压时, 部分原生质体因过分吸胀而破裂, 随着溶液渗透压的提高, 原生质体内外渗透压逐渐趋于平衡, 因吸胀而破裂的原生质体比例逐渐减小, 产量则稳步提高。可见在甘露醇浓度为 10% 时原生质体活力最高, 在此浓度获得的原生质体质量最好, 过高或过低的渗透压对原生质体均有损伤, 不利于后期的培养。因此, 采用 10% 的甘露醇 (CPW-10M) 作为渗透压稳定剂。

2. 4 酶液组成和浓度对原生质体产量和活力的影响

酶液的组成和浓度是影响原生质体分离的最大因素之一, 不同组合对原生质体产量和活力的影响明显不

同。由表 6 可知, 随着酶浓度的不断增加, 胚性愈伤组织原生质体的产量逐渐提高, 从原生质体的活力来看, 较低浓度的酶液组成有利于原生质体存活。酶浓度达到一定阈值后, 随着酶浓度增加, 原生质体存活率下降, 而且细胞碎片显著增多。因此从原生质体的产量、活力、细胞碎片的多少及酶的使用量等多方面综合考虑, 原生质体分离的最佳酶液组合为 ER4 即: 纤维素酶 2. 5%、离析酶 0. 2%、果胶酶 1%。

表 5 不同渗透压浓度对原生质体分离效果的影响

甘露醇浓度/ %	原生质体产量/ 个· g ⁻¹	原生质体活力/ %	原生质体形态
9	1. 36	73. 4	涨大
10	1. 75	82. 3	膨胀
11	1. 77	79. 1	膨胀
12	1. 79	75. 6	膨胀
13	1. 83	70. 2	收缩

表 6 酶液组成和浓度对原生质体分离效果的影响

酶液	原生质体产量/ 个· g ⁻¹	原生质体活力/ %	细胞碎片
ER ₁	1. 42	71. 6	+
ER ₂	1. 53	72. 1	+
ER ₃	1. 62	71. 3	++
ER ₄	1. 83	79. 2	++
ER ₅	1. 87	74. 2	+++

2. 5 酶解时间对原生质体分离效果的影响

由表 7 可知, 随着酶解时间的增加, 原生质体产量不断提高, 酶解 16 h 时, 原生质体产量最高, 这时胚性愈伤组织已趋于完全解离, 酶液呈绿色稠状。酶解时间继续增加至 18 h, 原生质体产量反而下降, 究其原因, 可能是由于长时间的酶解使一部分已解离的原生质体受损而破裂。从原生质体活力看, 酶解时间由 10 h 增加到 16 h, 原生质体活力逐渐降低, 酶解 14 h 和 16 h 原生质体活力没有显著差异, 酶解 18 h 细胞碎片明显增多, 原生质体活力也显著下降。所以为了获得大量的具有活力的原生质体, 酶解时间以 14 ~ 16 h 为宜。

表 7 酶解时间对原生质体分离的影响

酶解时间/h	原生质体产量/ 个· g ⁻¹	原生质体活力/ %	细胞碎片
10	1. 32	80. 3	+
12	1. 38	79. 2	+
14	1. 65	76. 5	++
16	1. 89	75. 8	++
18	1. 73	70. 3	++++

3 结论与讨论

原生质体研究成功始于 1971 年 Takebe 等首次报导烟草叶肉原生质体培养得到再生植株^[16], 由于同一植株获得的原生质体在遗传上是同质的, 可为细胞生物学、发育生物学、细胞生理学、细胞遗传学及其它一些生物学科提供良好的试验体系。原生质体能够克服性细

胞的不亲和障碍, 进行远缘的体细胞杂交; 原生质体可以直接摄取外源的 DNA、细胞器、病毒、质粒等, 是进行遗传转化研究的理想受体 因此植物原生质体在改变植物遗传性、改良作物品种的应用研究以及生物学的基础理论研究中有着广泛的用途^[7]。该试验仅选用了新疆雪莲无菌苗幼嫩叶片诱导产生的胚性愈伤组织为外植体分离原生质体, 旨在于为新疆雪莲的原生质体培养和体细胞杂交研究做铺垫。

该试验只进行了新疆雪莲幼嫩叶片诱导胚性愈伤组织及其原生质体分离, 其它材料, 例如, 新疆雪莲组培苗的嫩茎、根等均可以进行愈伤组织的诱导, 利用这些材料进行原生质体的分离是否有更好的效果还有待于进一步研究。另外降解高等植物细胞壁一般由纤维素酶、果胶酶、离析酶和半纤维素酶中的 1 种或者多种配合使用。纤维素酶具有较强的纤维素酶活性及一定的果胶酶的活性, 一般情况下它与一定量的果胶酶配合使用效果更佳, 离析酶能减少细胞碎片的产生, 试验表明, 新疆雪莲胚性愈伤组织在含有纤维素酶 2.5%、离析酶 0.2%、果胶酶 1% 的酶解液中进行酶解 14 ~ 16 h 后, 游离原生质体的产率和活性均较高, 且酶解液中渗透压稳定剂——甘露醇的浓度 10% (CPW-10M) 为宜。

参考文献

- [1] 李君山, 朱兆仪, 蔡少青. 新疆凤毛菊属雪莲花类药用植物资源的保护(上)[J]. 中国民族医药杂志, 1997, 3(1): 35-36.
- [2] 李君山, 蔡少青. 雪莲花类药材的化学和药理研究进展[J]. 中国药杂志, 1998, 33(8): 449.
- [3] 赵德修, 赵丽丽. 雪莲花的研究进展[J]. 中草药, 1996, 27(16): 372.

- [4] 何新, 李观海, 陈汉瑜. 新疆雪莲黄酮的抗炎镇痛作用及抗炎机理研究[J]. 西北药学杂志, 1990, 5(3): 17.
- [5] 卫生部药品生物制品检定所中国民族药志[M]. 第 1 卷. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 444.
- [6] 林侃, 王晓军, 赵明安. 等. 新疆天山雪莲体胚诱导与分化研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1351-1354.
- [7] 付晓春, 王晓军, 赵明安. 等. 新疆雪莲体外直接器官发生的快繁研究[J]. 干旱区研究, 2008.
- [8] 周维燕主编. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 163-180.
- [9] 许智宏, 卫志明. 植物原生质体培养与遗传操作[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 43-50.
- [10] 彭朝华. 原生质体的分离与纯化[M] // 孙勇如, 安锡培. 植物原生质体培养. 北京: 科学出版社, 1991: 52-57.
- [11] 奚元龄, 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1992: 62-85.
- [12] Frearson E M, Power J B, Coking E C. The isolation, culture and regeneration of Petunia leaf protoplasts[J]. Dev Biol, 1973, 33: 130-137.
- [13] Guo Y H, Zhang Z X. Establishment and plant regeneration of somatic embryogenic cell suspension cultures of the Zingiber officinale Rose[J]. Scientia horticulturae, 2005, 107: 90-96.
- [14] Ochatt S J. Protoplast Technology and Top-Fruit tree Breeding[J]. Acta Horti, 1990, 280: 215-226.
- [15] 严寒, 田志宏. 马蹄金子叶原生质体的分离技术[J]. 植物生理学通讯, 2005, 4(1): 73-76.
- [16] 马占强, 林良斌, 董娜. 等. 紫罗兰下胚轴原生质体分离条件的研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(2): 155-158.
- [17] Ishii S. Factors Influencing Protoplast Viability of Suspension Cultured Rice Cells During Isolation Process[J]. Plant Physiol, 1988(8): 6-29.

(该文作者还有牛力涛, 单位同第一作者。)

Studies on Embryogenic Callus Induction and Protoplast Isolation of *Saussurea involucrate* Kar et Kir.

YUAN Yong-xian^{1,2}, WANG Xiao-jun¹, HAO Xiu-ying³, ZHAO Min-an¹, ZHU Jin-gang^{1,2}, QI Xin-xing^{1,2}, LIU Li-tao^{1,2}

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences Wulumuqi Xinjiang 830011; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Wulumuqi, Xinjiang 830091)

Abstract: The leaves of *Saussurea involucrate* were used as experiment materials and were induced embryogenic callus, then using them to isolate protoplast. The influential factors of plasmolysis time, concentration of osmotic solution, enzyme combinations and digestion time on protoplast isolation from embryogenic callus were studied. It is suitable to indicate embryogenic calluses when the murashige and skoog medium which was MS+2, 4-D 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+glucose 30 g/L. When the embryogenic calluses were used to isolation, the optimal condition was enzyme solution of 2.5% Cellulase Onzuka R-10, 0.2% Mecerozyme R-10, 1.0% Pectinase, 0.1% MES and 10% Mannitol for digesting 14~16 h at pH 5.8 and the temperature of (26±1) °C.

Key words: *Saussurea involucrate* Kar et Kir.; embryogenic callus; protoplast; isolation