

# 苘麻叶肉原生质体的分离和培养研究

徐 琴<sup>1</sup>, 王晓军<sup>1</sup>, 王 卉<sup>1,2</sup>, 刘 敏<sup>1</sup>, 郝秀英<sup>3</sup>

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 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, 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘 要:**以苘麻的叶片、种子为试材,对苘麻叶肉原生质体游离培养过程的影响因素进行了研究。结果表明:采用无菌苗幼叶作为原生质体分离起始材料效果较好;质壁分离 4 h,纤维素酶 0.5%+离析酶 0.3%组合酶解 12~14 h 可以获得产量和活力较高的原生质体。在有机成分较丰富的 DPD 培养基中,细胞生长较为旺盛。

**关键词:**苘麻;原生质体;游离

**中图分类号:**S 563.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0170-03

苘麻(*Abutilon avicennae*)又名青麻,在中国的种植和利用已有悠久历史,为韧皮纤维作物,茎皮产生一种长而强韧的纤维,可用来制麻绳、麻袋<sup>[1]</sup>。苘麻可以入药。全草味苦,性平,能解毒、祛风,治痢疾、中耳炎、耳鸣、耳聋、关节酸痛等。种子性味甜,无毒,能清热利湿、解毒、退翳,用于治疗赤白痢疾、淋病涩痛、痈肿目翳、瘰癧。根味苦、性平,有消炎、利尿、下乳等作用<sup>[2]</sup>。对苘麻叶肉原生质体的分离培养及其影响因素的作用的研究,可以为苘麻的遗传转化,体细胞融合和良种的筛选培育提供一条新的技术途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

苘麻的叶片、种子均来源于新疆农业科学院种植试验场。

### 1.2 试验方法

1.2.1 野外采集叶片的消毒 从野外采集的叶片先用自来水和洗洁精洗去表面灰尘,70%乙醇浸泡 30 s,放入 0.1%HgCl<sub>2</sub>溶液中消毒 3~4 min,15%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中浸泡 15 min,用无菌水冲洗 3~4 次,无菌滤纸吸干水分待用。

1.2.2 无菌苗幼叶的获得 苘麻种子先用 70%乙醇浸泡 30 s,放入 0.1%HgCl<sub>2</sub>溶液中消毒 6~8 min,在 15%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中浸泡 30 min 后,用无菌水冲洗 3~4 次,接种于含 MS 培养基中,25℃恒温培养,5~7 d 可以发芽,再培养 10 d 左右,剪取幼叶作为试验材料。

1.2.3 原生质体的分离纯化 将叶片去掉大的叶脉,切

碎,按照 1:10 比例加入质壁分离液(CPW 溶液加 13%的甘露醇,pH 5.6),质壁分离后按照同样比例转入酶解液(CPW 溶液加 10%的甘露醇,5 mmol/L MES 和不同浓度组合纤维素酶、离析酶见表 1,pH 5.6)中于摇床上轻摇(80 r/min)酶解(28℃黑暗条件下),酶解后用 400 目不锈钢细胞筛过滤酶解分离的原生质体;滤液 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入原生质体清洗液(CPW 溶液加 10%的甘露醇,pH 值为 5.8)离心清洗,弃上清液,重复清洗 2 次;最后用原生质体培养基离心清洗 2 次即可游离出原生质体<sup>[3]</sup>。CPW 溶液成分:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27.2 mg/L、KNO<sub>3</sub> 101 mg/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 246 mg/L、KI 10.16 mg/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025 mg/L、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 480 mg/L<sup>[3]</sup>。以上所有试剂及原生质体培养基、稀释培养基均经 0.22 μm 微孔滤膜抽滤灭菌,所有培养基 pH 均为 5.8<sup>[3]</sup>。

表 1 不同浓度的酶液组合

Table 1 Combination of different concentrations of enzyme solution

项目 Items	1	2	3	4	5	6
纤维素酶 Cellulase/%	0.5	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3
离析酶 Macerozyme/%	0.5	0.3	0.1	0.3	0.2	0.1

1.2.4 原生质体计数与培养 原生质体采用血球计数板计数原生质体产量,计算四角 4 个大格和中间 1 个大格的原生质体细胞总数,按公式计算出细胞浓度。细胞浓度(个/mL)=5 格内细胞总数×5×10<sup>4</sup>×稀释倍数,每样品重复 5 次,取平均值,根据稀释总体积计算出原生质体总产量(个/g)。原生质体活力用 0.1%酚藏花红进行检验<sup>[4]</sup>,每个样品重复 5 次,取平均值。原生质体活力=(未被染上红色的细胞数/细胞总数)×100%。用原生质体培养基按照 1×10<sup>5</sup>个/mL 密度悬浮稀释获得的原生质体,采用液体浅层方式静置恒温(28℃)培养。前 3 周暗培养,每隔 5~6 d 添加 1 次培养基,约加 0.3~0.5 mL,3 周后将培养物置于漫射光下进行培养<sup>[3]</sup>。

**第一作者简介:**徐琴(1978-),女,硕士,助理研究员,现主要从事植物培养等研究工作。

**基金项目:**中科院“西部行动计划高新技术”资助项目(KGCXZ-YW-509)。

**收稿日期:**2012-12-13

## 2 结果与分析

### 2.1 不同叶片材料对原生质体产量的影响

前期选材是影响原生质体产量的一个重要因素,该试验采用了3种不同的叶片材料来收集原生质体。无菌苗幼叶(表2中1号组)、野外采集植株顶端嫩叶(表2中2号组)和下端老叶(表3中3号组)。其中2号组与3号组因为均来自野外,所以都进行了灭菌处理。试验中质壁分离时间都为4 h,酶液采用纤维素酶0.5%+离析酶0.5%组合,酶解时间为8 h。由表2可以看出,1号组与2号组的产量都较高,但是1号组的细胞碎片较少,检测时背景较干净,而且1号组原生质体活力比2号组、3号组都高。2号组的细胞碎片较多,检测时背景杂乱,3号组试验效果最差,背景杂乱,产量不高,活力也很低。故1号组即无菌苗幼叶作为分离材料收集原生质体效果较好。

表2 不同叶片材料对原生质体产量的影响

Table 2 Effect of different leaves on yield and vitality of protoplast

项目 Items	1	2	3
产量 Protoplast yield/ $\times 10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$	2.04	1.96	0.67
原生质体活力 Protoplast vitality/%	70.5	62.3	40.3
细胞碎片 Fragment of cell	+	++	+++

注:细胞碎片的多少以“+”来表示。下同。

### 2.2 不同质壁分离时间对原生质体产量和活力的影响

质壁分离时间的长短会影响酶解效果。该试验采用了2、3、4、5、6 h 5种不同的时间处理,酶液组合依旧采用纤维素酶0.5%+离析酶0.5%组合,酶解时间为8 h。由表3可知,其中4 h的原生质体产量最高,而原生质体活力以3 h最高。随着时间的延长,5、6 h的原生质体产量下降,活力也大大下降,镜检时也可以看到很多破裂的细胞碎片。综合不同时长质壁分离后所获得的原生质体活力和产量的结果,质壁分离4 h为最佳时长。

表3 不同质壁分离时间对原生质体产量和活力的影响

Table 3 Effect of plasmolysis time on yield and vitality of protoplast

项目 Items	质壁分离时间/h				
	2	3	4	5	6
产量 Protoplast yield/ $\times 10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$	1.23	1.34	2.23	1.72	1.88
原生质体活力 Protoplast vitality/%	65.3	70.1	67.1	56.0	52.3

### 2.3 不同酶液组合以及不同酶液浓度对原生质体产量的影响

酶解步骤是收集原生质体的关键步骤,酶液的种类与组合都直接影响到所收的原生质体的产量以及所获得的原生质体活力的大小。用不同浓度组合的纤维素酶与离析酶处理试验材料(表1),一共进行了6个处理,酶解时间都为8 h。由表4可以看出,2号组原生质体产量最高,其次是4号组与5号组,1号组、3号组、6号组原生质体产量都较低。2号组、3号组、5号组、6号组获得的原生质体活力都比较高,3号组和6号组细胞碎片

少,1号组细胞碎片相比较其它是验组要多。综合试验结果,2号组原生质体产量高而且原生质体活力也较高,细胞碎片相对较少,2号组即纤维素酶0.5%+离析酶0.3%试验结果好于其它酶液组合。

表4 不同酶液组合以及不同酶液浓度对原生质体产量和活力的影响

Table 4 Effect of different enzyme solution combinations and concentrations on yield and vitality of protoplast

项目 Items	产量 Protoplast yield/ $\times 10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$	原生质体活力 Protoplast vitality/%	细胞碎片 Fragment of cell
1	2.10	68.6	++++
2	3.44	71.4	++
3	1.56	75.0	+
4	3.02	69.0	++
5	2.88	70.7	++
6	1.25	73.2	+

注:细胞碎片的多少以“+”来表示。

### 2.4 不同酶解时间对原生质体产量与活力的影响

酶解时间的长短也是影响原生质体产量的一个因素,采用筛选出的最佳酶液组合,即纤维素酶0.5%+离析酶0.3%组合对苘麻无菌苗幼叶分别进行4、8、10、12、14、16 h的酶解处理。由图1可以看出,在4~14 h内,随着酶解时间的增加,原生质体产量也相应提高,其中,酶解12 h的原生质体产量为 $3.80 \times 10^5$ 个/g,酶解14 h则达到 $4.15 \times 10^5$ 个/g。酶解时间超过14 h后,由于悬浮液中原生质体破裂加速,镜检时也可以发现原生质体细胞碎片明显增多,原生质体产量也相应下降。在图2中,前期4、8、10 h原生质体活力变化不大,12 h的原生质体活力达到最高值84.5%,14 h有一定的下降,为76.7%,14~16 h原生质体活力迅速下降。说明酶解时间最好不要超过14 h为宜,时间过长,对原生质体的产量及活力都有很大的影响。

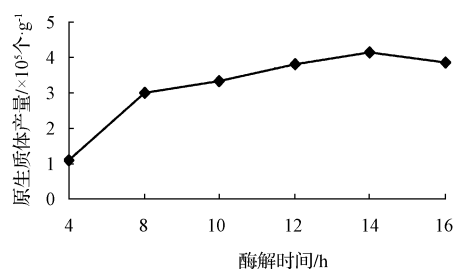


图1 不同酶解时间对原生质体产量的影响

Fig.1 Effect of different enzyme solution time on yield of protoplast

### 2.5 不同培养基对原生质体培养的影响

将所收集到的原生质体细胞调整密度稀释至 $0.92 \times 10^5$ 个/mL,添加激素6-BA 1.0+2,4-D 1.5<sup>[5]</sup>,用下面4种不同的培养基进行培养。每隔24 h对培养物镜检。由表5可以看出,DPD培养基较其它培养基,原生质体分裂较早,镜检时发现细胞生长也较为良好,而MS培养基效果最差。分析原因,这4种培养基的有机

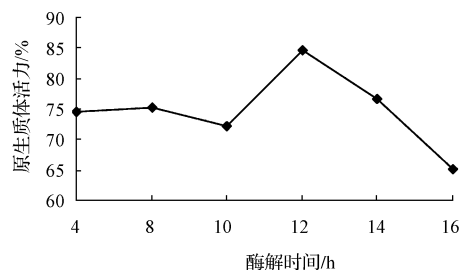


图2 不同酶解时间对原生质体活力的影响

Fig.2 Effect of different enzyme solution time on vitality of protoplast  
成分差别很大,DPD培养基的有机成分含量较其它培养基要丰富很多,所以细胞的长势要好于其它培养基,但是在添加培养基时,DPD培养基的污染率也明显高于其它培养基。

表5 不同培养基对原生质体培养的影响

Table 5 The effect of different culture medias on protoplasts

项目 Items	DPD	N6	NT	MS
细胞浓度 Cell concentration/个·mL <sup>-1</sup>	0.92×10 <sup>5</sup>	0.92×10 <sup>5</sup>	0.92×10 <sup>5</sup>	0.92×10 <sup>5</sup>
24 h后细胞浓度 Cell concentration after 24 hours/个·mL <sup>-1</sup>	1.14×10 <sup>5</sup>	0.98×10 <sup>5</sup>	0.96×10 <sup>5</sup>	0.94×10 <sup>5</sup>
第1次分裂时间 First division time/d	4	5.5	7	8

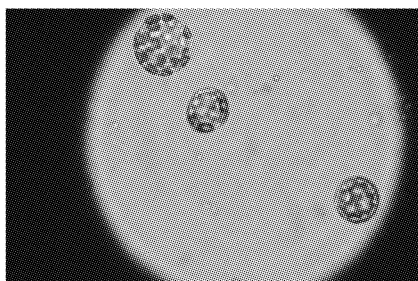


图3 分离得到的原生质体细胞

Fig.3 The protoplasts cells after isolation

### 3 讨论

在选取制备原生质体的材料上最好选用幼嫩、生长旺盛的部位。如桑树叶肉原生质体分离采用的是培养20 d的无菌苗叶片<sup>[6]</sup>。该试验选取了野外生长植株顶端的嫩叶和无菌苗的幼叶比较,无菌苗的幼叶效果较好,获得的原生质体活力较高,大小、状态也比较均一(图3),这与许多先前的报道基本一致<sup>[7-8]</sup>。

该试验最初采用70%乙醇+0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒的方法,试验材料污染严重,后用70%乙醇+0.1% HgCl<sub>2</sub>+15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,材料污染率大大降低。分析原因是该试验材料表面密被柔毛,而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸润性较强,且毒性比HgCl<sub>2</sub>弱,易洗净,所以采用70%乙醇+0.1% HgCl<sub>2</sub>+15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组合的消毒方法,不仅大大降低了试验材料的污染率,还减少了消毒过程中试验材料的损耗。

常用的叶肉细胞游离原生质体的方式是撕下叶表皮,将叶面朝下放入酶液进行酶解的方法。该试验所采用的叶片材料不易撕下叶表皮,尤其是无菌苗叶片以及植株顶端幼嫩叶片,因此使用了切碎材料的做法,以致后期收集到的原生质体细胞碎片较多,所以苘麻叶肉原生质体细胞的纯化方式还需改进和优化。

### 参考文献

- [1] 姜繁昌. 苘麻纺纱学[M]. 北京: 纺织工业出版社, 1989: 49-78.
- [2] 翁煜彬. 磨盘草的鉴别[J]. 广东药学, 2000(10): 120-121.
- [3] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 245-270.
- [4] 杨汉民. 细胞生物学实验[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 58-60.
- [5] 朱有光, 奚惕. 苘麻的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1987(6): 49.
- [6] Umate P, Rao K V, Kiranmayee K, et al. Plant regeneration of mulberry (*Morus indica*) from mesophyll-derived protoplasts[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2005, 82: 289-293.
- [7] Conde P, Santos C. An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill. protoplast isolation and culture in agarose droplets[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2006, 86: 359-366.
- [8] Meyer L, Serek M, Winkelmann T. Protoplast isolation and plant regeneration of different genotypes of *Petunia* and *Calibrachoa*[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009, 99: 27-34.

## Study on Isolation and Culture of the Mesophyll Protoplasts from *Abutilon avicennae*

XU Qin<sup>1</sup>, WANG Xiao-jun<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1,2</sup>, LIU Min<sup>1</sup>, HAO Xiu-ying<sup>1</sup>

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

**Abstract:** Taking the leaves and seeds of *Abutilon avicennae* as materials, the factors affecting the isolation mesophyll protoplasts from *Abutilon avicennae* were studied. The results showed that the best experiment materials were the leaves from the sterile seeding of *Abutilon avicennae*; if digested the leaves with combination of the enzyme solution 0.5% cellulase+0.3% macerozyme for 12~14 hours, more better protoplasts will be gotten. In the DPD liquid medium, the cells grew better.

**Key words:** *Abutilon avicennae*; protoplast; isolation