

文章编号:1674-7054(2010)03-0215-05

金钗石斛类原球茎原生质体的分离

刘运权^{1,2}, 张翠焕^{1,2}, 闻真珍^{1,2}, 黎扬辉³, 刘伟^{1,2}

(1. 广东省高等学校植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642; 3. 广州花卉研究中心, 广东 广州 510360)

摘 要: 以具有较多生长点的金钗石斛 PLBs 为材料, 研究通过酶解法获得原生质体的适宜条件。结果表明, 酶液配比为 $\varphi = 1\%$ 纤维素酶 (Cellulase Onozuka R10) + $\varphi = 0.4\%$ 果胶酶 (Macerozyme Onozuka R10) + $0.65 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, pH5.7; 黑暗条件下, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡酶解 6 h, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离 4 min, 获得的原生质体质量较好。经计数和伊凡蓝染色法检测, 用此法获得的金钗石斛 PLBs 原生质体鲜质量产量为 $(8.25 \pm 0.17) \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$, 活性为 $(90.24 \pm 1.84)\%$ 。蓝光 (470 ~ 75 nm) 激发活力检测发现较小的分生细胞具有较强的活力。

关键词: 金钗石斛; PLBs; 原生质体; 分离

中图分类号: Q 943.1; S 682.31

文献标志码: A

金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生附生草本植物。金钗石斛具极高的观赏和药用价值, 同时还是观赏春石斛育种中最常用的亲本之一^[1]。我国观赏石斛育种工作相对滞后^[2], 生产和销售的观赏石斛兰基本上都是驯养的野生石斛兰和进口品种, 因此, 当前应该加强对观赏石斛兰的育种研究工作, 提高其育种水平, 争取培育出观赏价值高、具有自主知识产权的新优品种。近年来, 人们不断地寻求新方法来改良花的色、香、数量等特定性状, 通过异源原生质体的融合, 能有效地克服传统有性杂交进行遗传物质交换 (基因重组) 的局限性, 有效地改良了品种的性状。在石斛属植物中, 已经报道了铁皮石斛 (*Den. officinale*)^[3]、霍山石斛 (*Den. huoshanense*)^[4]、秋石斛兰 (*Den. Sonia "Bom 17"*)^[5]、*Den. Madame Vihar*^[6] 等原生质体的分离。从以上文献可见, 在常规的原生质体分离技术基础上, 经一定改良后, 能够较为有效地获得原生质体。但原生质体的培养结果普遍较差, 最好的结果也仅仅是数次分裂后形成细胞团^[3,6], 且形成细胞团的比例也仅有 0.83% ^[3]。

材料的特性和生理状态, 对原生质体的分裂和再生能力有着至关重要的影响^[7], 目前多数报道的研究均是分离幼叶叶肉细胞原生质体, 这种从已经有一定分化程度的细胞中获得的原生质体, 其再生能力也许已明显地降低了, 从而影响了原生质体的分裂和再生过程。类原球茎体 (protocorm like bodys, PLBs) 是兰科 (Orchideae) 植物离体培养过程中产生的一种增殖较快且可以分化形成苗的扁圆形小球体^[8]。切片观察发现 PLBs 存在较多的生长点, 这表明 PLBs 是可获得较为大量的分生细胞原生质体的较好的材料。本研究通过以金钗石斛 PLBs 为材料, 以 $\varphi = 1\%$ 的纤维素酶与不同果胶酶浓度的组合、酶解时间、渗透压稳定剂浓度、离心速度、纯化方法、材料预处理方式、活力检测方法等为试验因子, 以游离细胞数量、细胞活力作为试验指标, 建立金钗石斛 PLBs 原生质体分离及纯化体系, 为今后原生质体的生理学、细胞学研究, 尤其是为细胞分裂并分化成苗的研究工作奠定理论基础。

收稿日期: 2010-09-06

基金项目: 广东省农业科技项目 (200844507); 广州市农业科技招标项目 (GK0401004)

作者简介: 刘运权 (1980-), 男, 广东韶关人, 广东省高等学校植物功能基因组与生物技术重点实验室助理实验师。

通信作者: 刘伟, 教授. E-mail: liuwe@scau.edu.cn, 联系电话: 020-38297712

1 材料与方法

1.1 材料 金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.) PLBs 为本实验室诱导增殖所得。培养基为 1/2 MS + 0.2 mg · L⁻¹ NAA + 9.4 g · L⁻¹ 卡拉胶 + 30 g · L⁻¹ 蔗糖 + 0.5 g · L⁻¹ 活性炭, pH5.8。

1.2 方法

1.2.1 PLBs 的培养 选取颗粒较小的、色泽翠绿且生长旺盛的金钗石斛 PLBs, 接种于培养基表面, 继代周期 25 d, 作为实验材料。

1.2.2 石蜡切片 将培养 25 d 的金钗石斛 PLBs 进行 FAA 固定, 以 $\varphi = 70\%$, $\varphi = 85\%$, $\varphi = 95\%$, $\varphi = 100\%$ 梯度乙醇进行脱水和复水处理, 渐进式浸蜡, 番红—固绿二重染色, 旋转切片机切片, 封片后观察并拍照。

1.2.3 原生质体的纯化、活性检测及大小测定 酶解液经 800 r · min⁻¹ 离心 3 ~ 5 min, 弃酶液, 用 CPW 溶液重新悬浮沉淀并重复 3 次, 最终定容到 1 mL。移至另 1 只装有不同浓度甘露醇溶液的离心管中, 使悬浮液处于甘露醇溶液上层, 800 r · min⁻¹ 离心 3 ~ 5 min, 吸取甘露醇溶液和悬浮液界面间的原生质体带。甘露醇浓度分别为 0.4、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7 mol · L⁻¹; 离心时间分别为 3、4、5 min。比较不同浓度的甘露醇及离心时间对原生质体产量及其活力的影响。

取 $\varphi = 0.06\%$ 的伊凡蓝 10 μL 和原生质体悬浮液 10 μL 轻轻地混匀, 于计数板上观察并统计未染上蓝色的原生质体数及原生质体总数, 重复 3 次。

用荧光显微镜, 蓝光(470 ~ 75 nm)激发, 观察并统计自发红色荧光的原生质体, 在可见光下统计原生质体总数, 重复 3 次。原生质体的直径用测微尺测量。

1.2.4 原生质体分离及其培养条件的优化 称取培养 25 d 翠绿的 PLBs 1.0 g, 在滤纸上用锋利的刀片把 PLBs 切至 2 ~ 3 mm 大小, 在 9 cm 培养皿中添加 10 mL 配制好的酶液和 1.0 g PLBs, 置于转速 60 r · min⁻¹ 的摇床上, 于室温(25 ± 2)℃ 下暗酶解, 酶解时间为 3、4、5、6、7 h。酶解 3 h 后开始取样观察, 此后每隔 1 h 取样观察。酶解后经 250 目和 350 目的细胞筛过滤, 于 800 r · min⁻¹ 离心 3 ~ 5 min, 用含有 0.6 mol · L⁻¹ 甘露醇的 CPW 溶液重新悬浮沉淀并洗涤 3 次, 定容到 1 mL, 镜检计数, 同时进行原生质体的活力检测, 重复 3 次。比较不同酶液配方(表 1)和不同酶解时间对 PLBs 原生质体产量、活力的影响, 以确定最佳酶配方及酶解时间。

表 1 酶液的组分

酶	%				
	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5
纤维素酶 (Cellulase Onozuka R10)	1	1	1	1	1
果胶酶 (Macerozyme Onozuka R10)	0.20	0.40	0.60	0.80	1

2 结果与分析

2.1 PLBs 的解剖特性及其对游离原生质体的影响 已培养 25 d 的金钗石斛 PLBs 的石蜡切片图(见图 1)显示, 类原球茎由大小不等的薄壁细胞构成, 生长点数量较多, 且分布在 PLBs 表层, 细胞小且胞质浓厚, 细胞核大, 保持着胚性。由这部分细胞获得的原生质体, 可能具有较好的分裂及再生能力。靠近中心的细胞进一步增大, 体积为最外层细胞的 3 ~ 5 倍, 细胞排列紧密。由于类原球茎靠外和靠内的细胞的大小差异大, 造成游离出的原生质体体积相差甚远(图 2), 原生质体直径为 13.3 ~ 71.82 μm, 其中直径为 13.3 ~ 26.6 μm 的占比为(23.31 ± 1.82)%; 直径为 26.7 ~ 53.2 μm 的占比为(61.44 ± 5.37)%; 直径为 53.3 ~ 71.82 μm 的占比为 15.25 ± 2.01%。直径为 53.2 ~ 71.82 μm 的原生质体的数量最少, 这也许与组织中大细胞的比例及其在游离的过程中更容易受到挤压破裂有关; 直径为 26.6 ~ 53.2 μm 的原生质体数量最多, 这与石蜡切片显示结果一致; 直径为 13.3 ~ 26.6 μm 的原生质体数量居中。活性检测表明体积较大的原生质体活性不如体积较小的, 这与较小细胞具有较强的胚性的推断一致。

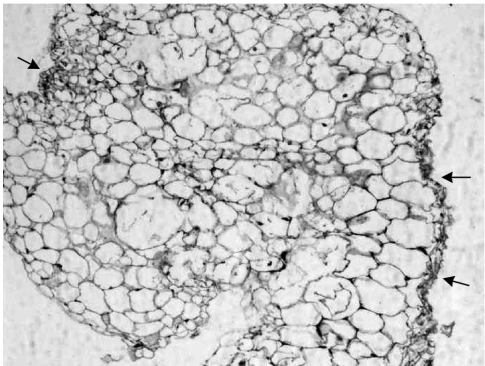


图1 PLBs 石蜡切片(10×)
箭头所指为生长点

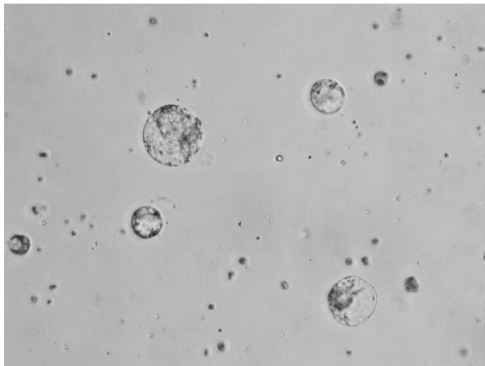


图2 游离的原生质体(40×)

2.2 纯化过程中甘露醇浓度和离心时间的影响 甘露醇浓度为 0.4 mol · L⁻¹ 时,原生质体产量较低,随着甘露醇浓度的升高,原生质体产量逐渐增加,当甘露醇浓度达到 0.65 mol · L⁻¹ 时原生质体产量达到最佳,之后开始下降;甘露醇浓度为 0.4 ~ 0.65 mol · L⁻¹ 对游离原生质体的活性不产生差异。3 min 离心产量较低,离心时间 4,5 min 在产量和活力方面均无明显差异(表 2)。

表2 不同甘露醇浓度对原生质体游离效果的影响

甘露醇浓度/(mol · L ⁻¹)	产量和活力	离心时间/min		
		3	4	5
0.4	鲜质量产量/(10 ⁵ 个 · g ⁻¹)	5.12 ± 0.10b	6.05 ± 0.18a	6.42 ± 0.11a
	活力/%	87.28 ± 1.79a	90.12 ± 1.20a	86.67 ± 0.88a
0.5	鲜质量产量/(10 ⁵ 个 · g ⁻¹)	6.13 ± 0.13b	7.15 ± 0.18a	7.38 ± 0.09a
	活力/%	92.21 ± 1.45a	92.59 ± 1.15a	90.13 ± 1.53a
0.55	鲜质量产量/(10 ⁵ 个 · g ⁻¹)	6.18 ± 0.08a	6.65 ± 0.13a	6.67 ± 0.06a
	活力/%	92.21 ± 0.88a	91.62 ± 1.45a	90.81 ± 1.51a
0.6	鲜质量产量/(10 ⁵ 个 · g ⁻¹)	4.00 ± 0.11b	5.43 ± 0.24a	5.03 ± 0.18a
	活力/%	90.96 ± 1.08a	90.17 ± 1.40a	90.01 ± 0.88a
0.65	鲜质量产量/(10 ⁵ 个 · g ⁻¹)	7.05 ± 0.16b	8.25 ± 0.17a	8.23 ± 0.15a
	活力/%	90.16 ± 1.29a	90.24 ± 1.84a	88.21 ± 1.21a
0.7	鲜质量产量/(10 ⁵ 个 · g ⁻¹)	6.35 ± 0.14b	7.60 ± 0.16 a	7.65 ± 0.15a
	活力/%	89.08 ± 1.08a	89.35 ± 0.16a	88.10 ± 1.15a

注:采用邓肯氏多重检验($P=0.05$),数值后不同字母之间表示差异显著,相同字母者表示差异不显著(表3同)

2.3 活性检测方法的比较 从图 3~5 可见,伊凡蓝染色法与荧光激发法在活力统计上无明显差异,而可见光加蓝光重叠法测得的活力偏低。由于荧光激发法中荧光强度与细胞活性成正相关性,依此理论比较不同类型原生质体活力的相对差异,发现多数原生质体的活性是与其大小成反比。

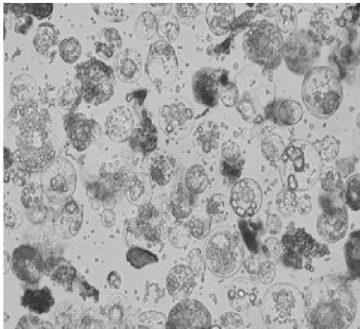


图3 伊凡蓝染色效果

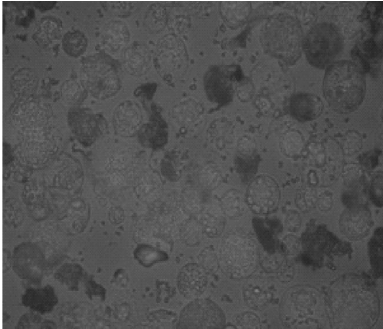


图4 对应的可见光加蓝光重叠效果

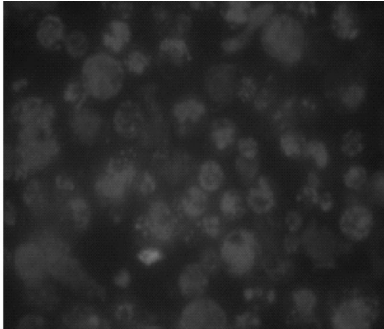


图5 对应蓝光激发法效果

2.4 不同纤维素酶和果胶酶浓度组合及酶解时间的影响 同一纤维素酶浓度下,果胶酶浓度对原生质体的产量的影响趋势不明显。从原生质体的活力来看,果胶酶较低浓度的酶配方有利于原生质体的存活,果胶酶浓度达到一定阈值后,随着果胶酶浓度的继续增加,原生质体存活率呈现显著下降的趋势(见表3)。酶解时间长短影响原生质体的得率,在所有配方中,在3~6 h内,原生质体的得率逐渐升高,超过6 h,原生质体的得率开始下降;对原生质体活力的影响也有类似的现象,但酶解时间在3~6 h内,酶解时间对活力无显著影响。

表3 不同酶配方及酶解时间对原生质体游离效果的影响

配方	产量和活力	酶解时间/h				
		3	4	5	6	7
1	鲜质量产量/(10 ⁵ 个·g ⁻¹)	2.38±0.23b	2.45±0.12b	2.83±0.23b	3.60±0.41a	1.73±0.15b
	活力/%	90.23±2.33a	91.10±6.89a	75.43±6.69b	89.25±1.73a	75.81±4.06b
2	鲜质量产量/(10 ⁵ 个·g ⁻¹)	1.13±0.09d	1.50±0.11d	2.85±0.07c	5.03±0.18a	3.90±0.15b
	活力/%	90.23±2.08a	91.11±4.18a	90.53±1.53a	90.01±0.88a	75.81±6.89b
3	鲜质量产量/(10 ⁵ 个·g ⁻¹)	1.73±0.25c	3.60±0.25b	4.43±0.20a	2.00±0.09c	3.88±0.09b
	活力/%	87.44±0.88a	85.85±1.20b	89.63±3.21a	80.33±1.53b	75.62±2.91c
4	鲜质量产量/(10 ⁵ 个·g ⁻¹)	2.08±0.13d	2.00±0.13d	2.85±0.07c	5.13±0.27a	3.65±0.12b
	活力/%	81.15±0.67a	76.68±0.88b	81.25±0.88a	84.37±1.45a	72.16±1.15b
5	鲜质量产量/(10 ⁵ 个·g ⁻¹)	1.73±0.08d	2.75±0.06c	2.35±0.17c	3.80±0.34b	5.95±0.18a
	活力/%	81.77±1.20b	75.94±0.88c	78.68±1.86c	75.18±2.33c	88.88±2.18a

3 讨 论

原生质体的产量和质量与分离材料的类型和生理状态密切相关^[7],同时还受植物材料原生质体分离和纯化过程中的各种因素的影响,如酶的浓度和组合,酶解时间等。

3.1 材料的选择 外植体的类型、生理状态等对原生质体的产量、活力和分裂能力有着极为重要的影响^[9]。尽管人们已经从多种石斛属植物中分离获得了原生质体,但分裂和再生问题始终没有很好的解决^[3,6,10]。一般认为原生质浓厚且快速分裂和生长的细胞是获得高活力原生质体的极佳材料。这类细胞对原生质体的复壁、分裂、愈伤组织形成以及植株再生均极为有利^[7]。以前的研究,几乎都是以幼嫩叶片为材料,游离原生质体,这些原生质体一般分裂数次后便停止分裂,至今尚未见到石斛属植物原生质体再生植株的报道,这可能与叶肉细胞已经有一定程度的分化而使其本身的分裂能力降低有关。以 PLBs 为材料,可以获得相对较多的分生组织细胞的原生质体,由于其具有较强的分裂能力,也许能改善石斛属植物原生质体难持续分裂和再生植株难形成的状况。

利用蓝光激发法检测原生质体活力时,明显看出细胞间的荧光强度存在很大的差异(图4,5),且多数原生质体的活性与其大小成反比。由 PLBs 石蜡切片发现(图1),PLBs 已经开始分化,但其分化程度较低,表面分布有较多的生长点;PLBs 细胞组成包括了生长点的分生细胞、内部已经分化的大型薄壁细胞及介于二者之间的过度类型细胞。较多的生长点有望能解决获取相对较多分生细胞原生质体的难题,这正是笔者选择 PLBs 做为游离原生质体材料的目的。

3.2 原生质体分离条件的选择 酶液浓度和酶解时间对分离效果影响较大。本研究与其他研究结果^[3-4,10]相比,产量居中,表明分离原生质体的条件基本适宜。

研究建立了金钗石斛 PLBs 原生质体分离的有效体系,为通过细胞工程手段创新种质,提供了一种新的原生质体来源。由于分离获得的原生质体的细胞组成较复杂,造成其活力及分裂能力等方面存在显著差异,要想获得相对一致且高活力的原生质体,还需做进一步的分离工作。

参考文献:

[1] LAVARACK B ,HARRIS W, STOCKER G. Dendrobium and its relatives[M]. Poriland: Timer Press. 2002:14.
[2] 王伟,黄为昌,金荷仙,等. 观赏石斛兰研究进展[J]. 安徽农业科学,2009, 37(2) :589 – 591.

[3] 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.

[4] 张传海,吴亭亭. 霍山石斛原生质体制备条件初探[J]. 皖西学院学报,2006,22(5):63 – 65.

[5] KHENTRY Y, PARADORNUVAT A, TANTIWIWAT S, et al. Protoplast isolation and culture of *Dendrobium Sonia* " Bom 17" [J]. Kasetsart Journal, Natural Sciences, 2006,40(2):361 – 369.

[6] BATO C, SAJISE J U, VALMAYOR H L. Effect of sugars on the viability, behavior and in vitro culture of isolated protoplasts from *Dendrobium Madame Vihar* callus[J]. Philippine-Agriculturist,1991,74(3):423 – 428.

[7] DUPUIS M. Plant donor tissue and isolation procedure effect on early formation of embryoids from protoplast of *Helianthus annuus* L[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1990,22:183 – 189.

[8] MOREL G M. Producing virus-free *Cymbidium* [J]. America Orchid society. Bulletin,1960,29:495 – 497.

[9] 王蔚林,张秀海,黄丛林,等. 原生质体技术与观赏植物育种[J]. 农业生物技术科学,2007,23(3):98 – 102.

[10] 罗丽华,严虹羽,王业华,等. 石斛兰叶片原生质体分离条件研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(12):6144 – 6146.

Isolation of the Protoplast from *Dendrobium Nobile* Lindl PLBs

LIU Yun-quan^{1,2},ZHANG Cui-huan^{1,2}, WEN Zhen-zhen^{1,2}, LI Yang-hui³, LIU Wei^{1,2}

(1. Key Lab Plant Funct Genom & Biotechnol, Educ Dept of Guangdong Prov, Guangzhou 510642, China;
2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
3. Guangzhou Flower Research Center, Guangzhou 510360, China)

Abstract: In order to obtain regeneration *Dendrobium nobile* Lindl through protoplast isolation and cultivation, protoplasts were isolated from PLBs of *Dendrobium nobile* Lindl. The effects of various factors (composition of enzymes, digestion time, concentrations of osmotic pressure stabilize (mannitol), centrifugation speed, purification methods, pretreatment of the material and the methods of vigor test) on the yield, viability and division of protoplasts were investigated. The results indicated that the optimum condition for protoplast isolation was established by using 1% cellulase R – 10 and 0.4% macerozyme R – 10 in 0.65 mol • L⁻¹ mannitol (pH5.7) solution for cell wall digestion; the mixture of PLBs and enzyme solution was incubated at (25 ± 2) °C in dark for 6h on a rotary shaker with an agitation speed of 60 rpm, with adoption of 50—100μm filters to remove undigested tissues and debris, and after centrifuged at 800 rpm for 4min, the maximum yield (8.25 ± 0.17) × 10⁵ per gram PLBs and the high viability (90.24 ± 1.84)% were obtained . These data suggested that the small meristem cells of PLBs were good source of intact protoplast.

Key words: *Dendrobium nobile* Lindl. ; PLBs; protoplast; isolation