

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 蝴蝶兰原生质体提取方法的优化

乔永旭\*, 张永平, 王桂兰, 陈超, 王燕

唐山师范学院生命科学系, 河北唐山 063000

Optimization of the Method for Isolating Protoplast of *Phalaenopsis amabilis* Bl.

QIAO Yong-Xu\*, ZHANG Yong-Ping, WANG Gui-Lan, CHEN Chao, WANG Yan

Department of Life Sciences, Tangshan Teacher's College, Tangshan, Heibei 063000, China

摘要: 以蝴蝶兰自交品种 NO 的无菌苗叶片为试材, 采用单因素试验和正交试验, 比较不同酶的种类、酶液浓度、材料和酶液的比例、渗透压、酶解时间及纯化条件对原生质体产量和活性的影响, 并用荧光显微镜观察去壁情况。结果表明: 在同一种条件下 1 g 蝴蝶兰叶片加入 10 mL 酶解液中, 酶解液含 1.0% 纤维素酶 R-10, 1.0% 果胶酶, 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 甘露醇, 酶解 3 h, 有活力的原生质体产量最高, 其产量为 1.3×10<sup>5</sup> 个·g<sup>-1</sup>, 活性达 81.90%。

关键词: 蝴蝶兰; 原生质体; 分离; 提取

蝴蝶兰为兰科蝴蝶兰属植物, 是兰科植物中栽培最广泛, 最受欢迎的种类之一(秦凡和周吉源 2003)。因其花姿高雅, 花色美丽, 花期较长, 在众多的热带兰中有“洋兰皇后”的美称。目前关于蝴蝶兰组织培养的研究较多, 多采用组织培养来繁殖种苗, 进行工厂化生产(魏琪等 2006), 而关于原生质体的分离、纯化及培养的报道尚少(Chen 等 1991; Shrestha 等 2007)。目前蝴蝶兰存在种性退化等问题, 分离纯化蝴蝶兰原生质体可以在此基础上进行原生质体培养, 对蝴蝶兰品种改良和培育新品种有一定的意义(Shrestha 等 2007)。本文以蝴蝶兰自交品种‘NOII’无菌苗叶片为材料, 探索原生质体提取的最适宜条件, 以期获得高产量和高活力的原生质体, 为蝴蝶兰原生质体再生体系的建立作参考。

## 材料与方法

2006年10月在我院生命科学系组培室内取试管苗蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis* Bl.)自交品种‘NOII’(我院自育粉红色品种)幼嫩叶片 0.5~2 g, 切成 2 mm×1 mm 的块状, 然后放入 10 mL 纤维素酶解液中, 置于 25 °C 恒温摇床上以 20 r·min<sup>-1</sup> 振荡酶解, 提取原生质体。酶解液成分为: 一定含量的纤维素酶(cellulase Onzuka R-10)和果胶酶(pectinase T2445), 7 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.7 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3 mmol·L<sup>-1</sup> MES (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S), 0.3~0.5 mol·L<sup>-1</sup> 甘露醇,

pH 5.8。酶液经 0.22 μm 混合纤维素微孔滤膜过滤除菌及杂质。

原生质体纯化采用过滤-离心-漂浮法进行纯化(范春丽等 2005)。酶解结束后, 将原生质体连同酶液用 300 目的细胞筛网过滤离心, 以 500×g 离心 3 min, 以沉淀原生质体, 去掉上清液, 缓慢加入 0.5 mL 的细胞悬浮液(其组成为: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.16 mol·L<sup>-1</sup>, 0.1% MES、甘露醇 0.5 mol·L<sup>-1</sup>, pH 5.8), 悬浮沉淀, 轻轻混匀后分装入离心管中。向离心管底部缓慢注入 2 mL 15%~25% 的蔗糖溶液, 以 500×g 离心 5 min。用移液枪将漂浮于溶液界面间的原生质体带轻轻吸出。原生质体密度的测定采用血球计数板上计数法测定。

试验采用 0.1% 的中性红染料对原生质体染色检测其活性。细胞液泡被染成红色的是有活性的原生质体 [原生质体活性=(液泡被染成红色的原生质体数/观察的原生质体总数)×100%]。具体方法: 以 1:1 的比例向细胞悬浮液中加入中性红, 摇匀后底部的沉淀漂浮, 然后向离心管底部缓慢注入 2 mL 21% 蔗糖, 离心纯化。用移液枪小心地吸出漂浮于溶液界面间的原生质体, 置于血球计数板上计数, 镜检。每个处理计数时随机检查 20 个视野, 统计细胞不少于 100 个, 每个处理重复 3 次。

收稿 2008-07-23 修定 2008-09-18

资助 河北省科技厅生物工程项目(04547008D-2)。

\* E-mail: qiaoyx123@163.com; Tel: 0315-3306246

原生质体去壁后观察: 吸取原生质体悬浮液 0.1~0.2 mL 加等体积的 0.1% 荧光增白剂 (VBL 型荧光增白剂) 混匀, 10 min 后以手摇离心机离心, 吸去上清液, 用细胞悬浮液洗涤 3~4 次, 重新悬浮后, 吸一滴悬浮液置于载玻片上, 加盖玻片, 荧光显微镜 (BV 激发) 观察。

## 实验结果

### 1 原生质体提取方法的优化正交试验

选用  $L_9(3^4)$  正交设计实验 (表 1、2), 研究纤维素酶 R-10 浓度、果胶酶浓度、甘露醇浓度和酶解时间的四因素对蝴蝶兰原生质体提取效果的影响。

由表 2 可以看出,  $R_C > R_B > R_A > R_D$ , 即在试验中 C 因素 (甘露醇浓度) 对蝴蝶兰叶片原生质体产量和活力的影响最大, B 因素 (果胶酶浓度) 次之, A 因素

(纤维素酶 R-10 浓度) 的影响小于 B 因素, D 因素 (酶解时间) 的影响最小。比较各试验因子的总和或平均数可知, A 取  $A_2$ 、B 取  $B_3$ 、C 取  $C_2$  和 D 取  $D_2$  为好。所以蝴蝶兰叶片原生质体提取的优化组合为  $A_2B_3C_2D_2$ , 即纤维素酶 R-10 浓度为 1.0%, 果胶酶浓度为 1.0%, 甘露醇浓度为  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酶解时间为 3 h 时 (图 1-a), 获得有活力原生质体的产量最高。由于选出的处理组合不在正交试验中, 还需再进行一次试验, 以确定选出的处理组合是否最优。经试验证明, 该处理组合原生质体的产量为  $1.3 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$ , 原生质体的活力为 81.9%, 有活力的原生质体 (图 1-b) 产量为  $1.06 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$ 。所以该处理组合为提取蝴蝶兰原生质体的优化组合。

### 2 纯化条件对原生质体提取的影响

通过比较浓度范围由 15%~24% 的 4 种不同浓度的蔗糖悬浮对原生质体提取效果的影响 (表 3), 可

表 1 正交因素水平表

水平	因素			
	A (纤维素酶 R-10 浓度)/%	B (果胶酶浓度)/%	C (甘露醇浓度)/%	D (酶解时间)/h
1	0.8	0.6	0.3	2
2	1.0	0.8	0.5	3
3	1.2	1.0	0.7	4

表 2 蝴蝶兰原生质体提取正交试验结果的直观分析

处理	因素				原生质体产量 / $10^5 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW)	原生质体活力 / %	具活力原生质体产量 / $10^5 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW)
	A	B	C	D			
1	1 (0.8)	1 (0.6)	1 (0.3)	1 (2)	0.6	66.59	0.40
2	1 (0.8)	2 (0.8)	2 (0.5)	2 (3)	1.1	79.88	0.88
3	1 (0.8)	3 (1.0)	3 (0.7)	3 (4)	0.3	60.43	0.18
4	2 (1.0)	1 (0.6)	2 (0.5)	3 (4)	1.2	74.68	0.90
5	2 (1.0)	2 (0.8)	3 (0.7)	1 (2)	0.1	70.74	0.07
6	2 (1.0)	3 (1.0)	1 (0.3)	2 (3)	1.6	41.11	0.66
7	3 (1.2)	1 (0.6)	3 (0.7)	2 (3)	0.1	52.63	0.05
8	3 (1.2)	2 (0.8)	1 (0.3)	3 (4)	0.5	85.21	0.43
9	3 (1.2)	3 (1.0)	2 (0.5)	1 (2)	1.3	75.96	0.99
$T_1$	1.46	1.35	1.49	1.46			
$T_2$	1.63	1.38	2.77	1.59			
$T_3$	1.47	1.83	0.30	1.51			
$X_1$	0.49	0.45	0.50	0.49			
$X_2$	0.54	0.46	0.92	0.53			
$X_3$	0.49	0.61	0.10	0.50			
$R$	0.05	0.16	0.82	0.04			

$T$  表示每个因素各水平之和;  $X$  表示每个因素各水平的平均数;  $R$  表示每个因素各水平平均数的极差。

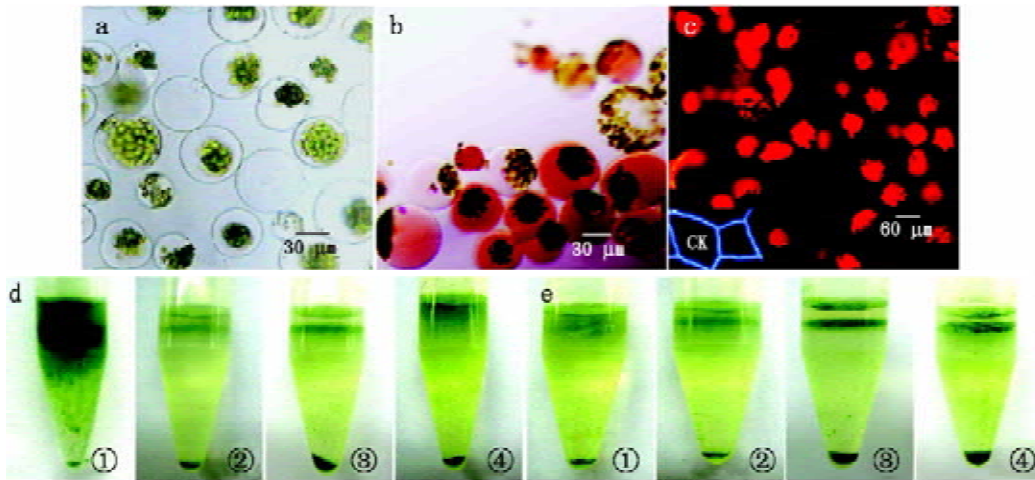


图1 蝴蝶兰原生质体的提取和活性

a: 酶解3 h所提取的原生质体( $\times 40$ ); b: 中性红染色的原生质体( $\times 40$ ); c: 原生质体去壁情况( $\times 20$ ); d: 不同浓度蔗糖悬浮得到的原生质体带(蔗糖浓度为 15%, 18%, 21%, 24%); e: 不同材料和酶液比例所得原生质体带(叶片克数为 0.5 g, 1.0 g, 1.5 g, 2.0 g)。

知用21%的蔗糖悬浮效果最好,离心后得到的原生质体条带清晰,颜色深(图1-d),原生质体产量最高;15%的蔗糖悬浮效果次之,离心后在溶液界面处形成一条颜色稍浅的绿色条带,条带呈絮状,下面沉淀杂质多(图1-d),原生质体产量较多;18%的蔗糖悬浮,离心后得到的条带不明显,颜色浅,下部杂质沉淀最少(图1-d);24%的蔗糖悬浮得到的原生质体条带颜色很浅,在整个上层的细胞悬浮液中都分布有原生质体(图1-d)。所以用漂浮法对蝴蝶兰原生质体进行纯化时,21%的蔗糖悬浮效果最好。

表3 不同蔗糖浓度对原生质体提取的影响

蔗糖浓度/%	原生质体产量/ $10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)
15	1.4
18	1.4
21	1.6
24	0.8

酶解液含1%纤维素酶R-10和1%果胶酶,甘露醇浓度为 $0.3\text{ mol}\cdot L^{-1}$ ,酶解时间为3 h。

### 3 材料和纤维素酶液的比例对原生质体提取的影响

比较不同材料和酶液比例对原生质体提取的影响(表4),可知不同比例所得原生质体的产量明显不同。当10 mL酶解液中加入0.5 g叶片时原生

质体产量为 $1\times 10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$ ,材料增加0.5 g,原生质体的产量增加到 $1.6\times 10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$ ,再增加0.5 g材料,原生质体的产量不变,材料增加到2 g时,原生质体的产量反而降低了。因此,提取蝴蝶兰叶片原生质体时,材料和酶液的比例为1:10时,提取效果最佳。

离心后得到的原生质体条带的情况如图1-e所示,加0.5 g材料的条带很细,颜色浅绿色(图1-e);加1 g材料的条带均匀(图1-e),比0.5 g的明显且颜色深;加1.5 g材料的条带絮状,部分聚集成团块,含原生质体较多,颜色深(图1-e);加2 g材料的条带絮状,下部有很多的细胞壁残渣和没有酶解完全的叶片组织(图1-e)。

表4 不同材料和酶液比例对原生质体提取的影响

材料重量/g	材料:酶液/g:mL	原生质体产量/ $10^5$ 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)
0.5	1:20	1.0
1.0	2:20	1.6
1.5	3:20	1.6
2.0	4:20	0.75

酶解液含1%纤维素酶R-10和1%果胶酶,甘露醇浓度为 $0.3\text{ mol}\cdot L^{-1}$ ,酶解时间为3 h,以21%的蔗糖悬浮。

### 4 原生质体去壁观察

在荧光显微镜下(BV激发),可以观察到原生质体质膜周缘没有蓝绿色荧光,质膜内的叶绿体发红色荧光,而具有细胞壁的细胞则有明显的蓝绿色荧

光(图 1-c)。说明所提取蝴蝶兰原生质体去壁率较高, 去壁较彻底; 也证明了所选取酶的浓度, 甘露醇浓度, 酶解时间较合理。

## 讨 论

材料苗龄和叶龄对原生质体的产量有很大影响(周蓉和陈小娟 1999)。分离原生质体, 一般选取细胞分裂旺盛的幼嫩组织作材料。同时酶浓度和酶解时间对原生质体的产量和活性也有较大影响, 尽可能应用低的酶浓度和尽可能短的酶解时间, 以获取大量有活性的原生质体。如果酶解时间长则导致较早游离出来的原生质体破裂。

据报道, 渗透压稳定剂一般是甘露醇、山梨醇、蔗糖、葡萄糖等(陈名红等 2005)。在降解细胞壁时, 渗透压稳定剂常和酶混合使用。本文中以甘露醇作为渗透压稳定剂后, 结果证明, 当甘露醇浓度在  $0.3\sim 0.7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内的  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 原生质体的产量最高;  $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时原生质体的产量降低;  $0.7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时原生质体的产量最低。而周春江等(2003)认为甘露醇浓度高于  $0.7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 原生质体产量和活性反而下降。这可能是由于材料不同或蝴蝶兰叶片原生质体提取过程中其他未知因素的影响导致, 具体原因还待进一步探索。另外, 提取植物原生质体时, 纤维素酶和果胶酶的种类和浓度对原生质体的产量也有很大影响(Durieu 和 Ochatt 2000)。降解高等植物细胞壁一般由纤维素

酶、果胶酶及半纤维素酶中的一种或者多种配合使用(严寒和田志宏 2005)。本文则采用纤维素酶和果胶酶配合使用提取原生质体, 取得了较高的原生质体产率。目前一般蝴蝶兰的繁殖以花梗芽的组织培养为主, 这种方法繁殖系数低, 速度慢, 限制了蝴蝶兰规模化生产的进度。而本文探索出的蝴蝶兰原生质体可以大量提取的方法, 为今后蝴蝶兰的大量生产建立了基础。

## 参考文献

- 陈名红, 熊力, 陈学军(2005). 烟草叶肉原生质体分离和纯化的研究. 云南民族大学学报, 14 (4): 326~329
- 范春丽, 陶澜, 林呐, 吴晓亮(2005). 甘蓝型黄籽油菜原生质体的游离和纯化. 中国农学通报, 21 (2): 43~44
- 秦凡, 周吉源(2003). 蝴蝶兰的组织培养研究. 生物学杂志, 20 (3): 19~21
- 严寒, 田志宏(2005). 马蹄金子叶原生质体的分离技术. 植物生理学通讯, 41 (1): 73~76
- 魏琪, 李凤兰, 胡国富, 胡宝忠(2006). 蝴蝶兰快速繁殖研究进展. 园艺学报, 33 (4): 915~920
- 周春江, 李卫东, 葛会波(2003). 草莓悬浮细胞原生质体培养再生愈伤组织. 果树学报, 20 (4): 319~320
- 周蓉, 陈小娟(1999). 花生叶片原生质体游离和培养因子的研究. 中国油料作物学报, 21 (1): 7~9
- Chen WH, Tsai WT, Wu CC, Hsieh RM (1991). Electrofusion and cell division of *Phalaenopsis* protoplasts. Taiwan Sugar, 38 (2): 14~18
- Durieu P, Ochatt SJ (2000). Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts. J Exp Bot, 51 (348): 1238~1239