

## 蕨麻愈伤组织原生质体制备条件的优化

刘欣<sup>1,2,3</sup>, 张金铭<sup>3</sup>, 张昭<sup>3</sup>, 白世俊<sup>1,2,3</sup>, 富贵<sup>1,2,3</sup>, 李军乔<sup>1,2,3\*</sup>

(1 青海民族大学 青藏高原蕨麻研究中心, 西宁 810007; 2. 青海省生物技术与分析测试重点实验室, 西宁 810007; 3 青海民族大学 生态环境与资源学院, 西宁 810007)

**摘要:**以青海“蕨麻4号”诱导培养的愈伤组织为材料, 采用4因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交实验, 研究酶类组合、酶解时间、甘露醇浓度及离心速度等主要因素对蕨麻原生质体分离的影响, 建立高效、稳定的蕨麻原生质体分离体系, 为进一步通过原生质体融合、基因工程等方法对蕨麻进行品种改良奠定基础。结果表明: 各因素对蕨麻原生质体产量的影响顺序为: 酶类组合>酶解时间>甘露醇浓度>离心速度; 青海“蕨麻4号”愈伤组织原生质体的最适酶解条件为: 2.0%纤维素酶+0.75%果胶酶, 40 r/min 振荡酶解 10 h, 甘露醇浓度为 0.5 mol/L, 离心转速为 1 000 r/min 时原生质体的产量达最大( $8.96 \times 10^5$  cells/g), 活力为 92.77%。

**关键词:** 蕨麻; 正交实验设计; 原生质体; 分离; 纯化

**中图分类号:** Q242; Q813.1      **文献标志码:** A

## Preparation and Optimization of Callus Protoplast of *Potentilla anserina*

LIU Xin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jinming<sup>3</sup>, ZHANG Zhao<sup>3</sup>, BAI Shijun<sup>1,2,3</sup>, FU Gui<sup>1,2,3</sup>, LI Junqiao<sup>1,2,3\*</sup>

(1 Tibetan Plateau Juema Research Centre, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; 2 Qinghai Provincial Biotechnology and Analytical Test Key Laboratory, Xining 810007, China; 3 College of Ecological Environment and Resources, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China)

**Abstract:** The present study aimed to establish an efficient and stable separation method of *Potentilla anserina* callus protoplast, which were induced from root tuber of Qinghai Juema No. 4. The design method of  $L_9(3^4)$  orthogonal experimental was adopted to optimize the combination conditions. The effects of some factors on the separation of *Potentilla anserina* callus protoplast were investigated, including enzyme combination, digestion time, mannitol concentration and centrifugal speeds. The results indicated that the sequential order of every factor for protoplast yield was enzyme combination, digestion time, mannitol concentration and centrifugal speeds. The optimal enzyme solution for protoplast isolation was 2.0% cellulase R-10 + 0.75% Pectinase Y-23 + 0.5 mol/L mannitol. The digestion was conducted on constant-temperature shaker with 40 r/min at 25 °C for 10h in dark and centrifugation with 1 000 r/min for 6 min for protoplast collection. The protoplast yield amounted to  $8.96 \times 10^5$  cells/g and the vitality was up to 92.77%.

**Key words:** *Potentilla anserina*; orthogonal test design; protoplast; purification

蕨麻是鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina* L.)的 变种, 属蔷薇科(Rosaceae)委陵菜属(*Potentil-*

收稿日期: 2017-03-24; 修改稿收到日期: 2017-07-14

基金项目: 科技部农业科技成果转化基金(2010GB2G00514); 国家自然科学基金(31660425, 30607026, 30660019); 青海省自然科学基金(2012-Z-907); 青海民族大学大学生创新创业训练计划(DCXM-2016-023)

作者简介: 刘欣(1994-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物资源开发与利用。E-mail: 1084893517@qq.com

\* 通信作者: 李军乔, 教授, 主要从事植物资源开发与利用方面的研究工作。E-mail: ljqlily2002@126.com

la)<sup>[1]</sup>,是一种典型的匍匐茎多年生草本植物。蕨麻块根富含淀粉、蛋白质、多糖、总黄酮、皂苷、鞣质等营养及活性成分,具抗缺氧、干扰病毒复制、抑制肿瘤细胞生长<sup>[2-7]</sup>等功效。蕨麻主要生长在海拔 2 200~4 800 m 的青藏高原地区<sup>[8]</sup>,是青藏高原的一种特有野生经济资源植物,分布广、资源多<sup>[1,9]</sup>,其块根具有较高的经济价值,在该地区进行蕨麻相关研究具有良好的地域优势。蕨麻仅在青藏高原等高寒地区地下块根会形成肉质膨大,因此,国外只限于对鹅绒委陵菜克隆习性的研究<sup>[10]</sup>。近几年,国内对蕨麻的研究也日渐增多,但仅限于对其分类、形态特征、草药的炮制方法、主要治愈的疾病描述及一些常规化学成分的研究<sup>[3-8]</sup>。目前国内仅有本课题组全面深入研究了蕨麻生物学特性、分子学特性、种质资源、优良品种选育等,制定通过了蕨麻国家商品标准和 7 个地方标准,申请专利 7 项,主编著作《青藏高原蕨麻》1 部,审定通过“青海蕨麻 1 号”、“青海蕨麻 2 号”、“青海蕨麻 3 号”等品种,筛选出 7 个优良品系,种植面积达 1 333.33 hm<sup>2</sup>。‘青海蕨麻 4 号’为课题组筛选出的一个品系,具有大小均匀、95%为圆球状、浅褐色、鞣质含量仅为 1%等优点,是目前课题组审定的 3 个品种及筛选的 7 个蕨麻品系中外形、品质、经济价值最高的,但产量较低,严重制约了蕨麻产业化的进程。在课题组前期的研究中发现,蕨麻主要利用营养器官繁殖,有性繁殖结实率低,种子落粒性强且在实验室条件下无法萌发,这使得通过传统育种方法得到蕨麻新品种的几率为零。基于原生质体的植物体细胞杂交技术则能克服上述困难,为‘青海蕨麻 4 号’的品质改良开辟一条新途径。

植物原生质体是脱去细胞壁,仅被质膜包被的裸露细胞。植物原生质体没有细胞壁的障碍,但仍具有生理活性及细胞全能性,因此常用于获得细胞无性系和选育突变体<sup>[11]</sup>。利用原生质体进行的植物原生质体融合技术可有效克服远缘杂交不亲和、双亲花期不遇等障碍的障碍,在进行作物改良、实现远缘重组、创造新型物种等方面有重要的应用前景<sup>[12-15]</sup>。

目前,野生蕨麻已不能满足市场的需求,蕨麻也实现了小范围的人工种植,但仍不能满足市场逐年增长的需求,国内关于利用蕨麻原生质体融合对蕨麻进行遗传改良、创造新型品种的研究未见报道,因此对蕨麻进行遗传改良、创造新型高产品种势在必行。因此,筛选一套高效、简便的原生质体制备及其活力检测方法对于今后蕨麻原生质体的融合、蕨麻

的遗传改良、丰富蕨麻人工种植的新品种,加快和促进蕨麻的基础和应用开发研究具有十分重要的意义。

本实验以‘青海蕨麻 4 号’愈伤组织进行原生质体分离和纯化实验,通过单因素结合正交实验优化了影响原生质体产量的酶类组合、酶解时间、甘露醇浓度、离心速度等 4 个因素的处理组合,并利用荧光素双醋酸酯(FDA)染色对制备得到的原生质体的活力进行检测,确定一套简便、准确的原生质体制备及其活力检测方法的方法,为今后利用原生质体进行蕨麻的遗传转化、体细胞杂交及蕨麻的遗传改良奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本实验用于原生质体分离的材料为‘青海蕨麻 4 号’块根诱导的愈伤组织,‘青海蕨麻 4 号’为本课题组筛选的蕨麻品系。9 月上旬至 10 月下旬为蕨麻的块根膨大期,10 月下旬至 11 月上旬,进入成熟期并开始采收。用于本实验的蕨麻块根于 2016 年 11 月 5 日采集于青海省湟源县种质资源圃,并置于 4℃冰箱冷藏待用,随机选择无损伤、无霉变、无虫害、健康的蕨麻块根进行初代培养和继代培养,选取质地疏松、结构紧密的淡绿色的胚性愈伤组织作为分离原生质体的酶解材料。主要试剂有纤维素酶(R-10, Yakult Honsha)、果胶酶(Y-23, Yakult Honsha)、二乙酸荧光素(FDA, Sigma)。

### 1.2 方法

**1.2.1 愈伤组织获得** 随机挑选‘青海蕨麻 4 号’块根,用手掰成两半,冲洗干净后,流水冲洗 2 h。在超净工作台上,用体积分数 70%酒精浸泡 15~30 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 2~3 min,无菌水冲洗 3~5 次,用无菌滤纸吸干块根表面的水分后接种于 MS 培养基(0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L 6-BA, 6.5 g/L 琼脂, pH 5.8),在黑暗条件下培养 48 h,转移至光照强度 2 000 lx、光周期为 16 h/8 h、培养温度为(25±2)℃、相对湿度 70%~80%条件下培养,经继代培养获得质地疏松、结构紧密的淡绿色的胚性愈伤组织待用。

**1.2.2 单因素实验** 根据已有文献报道<sup>[16-19]</sup>,影响原生质体产量及活力的主要影响因素有酶类组合、酶解时间、甘露醇浓度和离心速度等。本研究利用控制变量法分别考察酶类组合、酶解时间、甘露醇浓度和离心速度对原生质体产量及活力的影响。

1) 酶解液组合单因素实验 根据已有文献报道<sup>[20-23]</sup>, 消化酶对原生质体游离的影响较大, 因此本实验共设置 12 组不同浓度的纤维素酶 R-10 和果胶酶 Y-23 的酶解液组合, 以期获得最接近制备蕨麻原生质体的最佳酶解组合, 实验所采用的酶解液的处理设置见表 1。酶溶剂为 CPW 液<sup>[23]</sup> (27.2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 101 mg/L  $\text{KNO}_3$ , 1 117.5 mg/L  $\text{CaCl}_2$ , 246 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 mg/L KI, 0.025 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 含 20 mmol/L MES, 0.6 mol/L 甘露醇, pH 为 5.8。10 mL 酶解液于 55 °C 水浴锅中活化 10 min, 冷却到室温后, 加入 0.1% BSA, 经过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤灭菌, 灭菌完成后放置于 4 °C 下备用。将备好的每 1 g 鲜重材料加入 10 mL 酶解液, 于 40 r/min、25 °C 黑暗条件下酶解处理 8 h, 每组实验重复 3 次。酶解后将混合液依次用 200 和 400 目无菌滤网过滤除去未酶解完全的植物组织及细胞团。将滤液 800 r/min 离心 6 min, 除去上清酶液, 用 CPW 液悬浮, 800 r/min 离心 6 min, 重复 3 次, 收集原生质体并稀释到一定体积。

2) 酶解时间单因素实验 采用上述 12 组酶处理组合中原生质体产量最高的酶类组合, 在 40 r/min 摇床上, 分别进行 4、6、8、10 和 12 h 酶解处理。酶解完成后 800 r/min 离心 6 min, 除去上清酶液, 用 CPW 液悬浮, 重复离心 3 次。比较不同酶解时间对蕨麻原生质体产量及活力的影响, 确定最佳酶解时间。

3) 甘露醇浓度单因素实验 将愈伤组织分别放

表 1 酶解液组合

Table 1 Composition of enzyme solution for protoplast isolation

酶液编号 No. of enzymes	纤维素酶 Cellulase onozuka R-10/%	果胶酶 Pectinase Y-23/%
E1	1.0	0.25
E2	1.0	0.50
E3	1.0	0.75
E4	1.0	1.00
E5	2.0	0.25
E6	2.0	0.50
E7	2.0	0.75
E8	2.0	1.00
E9	3.0	0.25
E10	3.0	0.50
E11	3.0	0.75
E12	3.0	1.00

入甘露醇浓度为 0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mol/L 最佳酶液组合中震荡最佳酶解时间。酶解完成后测定原生质体产量和活力, 考察酶液渗透压对蕨麻原生质体产量和活力的影响。

4) 离心速度单因素实验 在上述实验选择的最佳酶液组合和最佳甘露醇浓度的酶解液中, 处理实验材料最佳酶解时间, 观察不同离心速度对蕨麻原生质体活力和产量的影响。将酶解液过滤后的滤液分别在 400、600、800、1 000 和 1 200 r/min 条件下离心 6 min, 除去上清酶液, 吸取原生质体, 用 CPW 液悬浮, 重复离心 3 次, 测定蕨麻原生质体产量和活力。

1.2.3 正交实验 结合单因素实验结果, 每个因素获取合理的 3 个水平, 进行 4 因素 3 水平正交设计  $L_9(3^4)$  实验。

1.2.4 原生质体产量测定 利用 0.1 mm XB-K-25 型血球计数板测定原生质体的密度和产量, 具体过程如下: 在显微镜下检查血球计数板的计数室是否清洁无污物, 若有, 用酒精棉轻轻擦拭, 然后用蒸馏水冲洗, 再用吸水纸吸干; 把盖玻片盖在计数室上; 将纯化后的原生质体溶液滴在盖玻片一侧边缘, 使之沿着盖玻片与计数板之间的缝隙渗入计数室, 直至充满计数室; 保持计数室水平, 放置于显微镜载物台上, 依次逐个计数中央大方格内 25 个中方格内的原生质体。以每克鲜重的原生质体数量表示原生质体产量, 按照计算公式计算出原生质体产量<sup>[24-25]</sup>:

1 mL 悬浮液中的原生质体数 = 1 个大方格悬浮液 (0.1 mm<sup>3</sup>) 中的细胞数  $\times 10^4$

原生质体产量 (cells/g) = 1 mL 悬浮液中的原生质体数  $\times$  原生质体悬浮液总体积 (mL) / 材料总质量 (g)

1.2.5 原生质体活力的测定 采用 0.01% 荧光素双醋酸酯 (FDA) 活体染色法检测原生质体的活力。先用丙酮将 FDA 配置成 5 mg/mL 储备液, 于 4 °C 条件下保存, 检测时其工作浓度为 0.01%, 即按照每 mL 原生质体 25  $\mu\text{L}$  FDA 进行染色, 保温 5 min 后在荧光显微镜下统计发黄绿色荧光的原生质体数和原生质体总数。随机选取 3 个视野取其平均值。原生质体的活力以一个视野中发黄绿色荧光的原生质体数占该视野中原生质体总数的比例来表示<sup>[26]</sup>。原生质体活力 = (发黄绿色荧光的原生质体数 / 原生质体总数)  $\times 100\%$

### 1.3 数据处理

用 SPSS 17.0 软件进行正交实验设计并对所有

数据进行分析,且用 LSD 法进行差异显著性检验;用 Origin 8.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

**2.1.1 酶解液组合单因素实验结果** 本实验以‘青海蕨麻 4 号’块根诱导培养的愈伤组织为材料,采用 40 r/min 摇床振荡分离 8 h,甘露醇浓度为 0.6 mol/L,800 r/min 离心纯化原生质体,比较不同浓度纤维素酶和果胶酶组合对原生质体的产量和活力的影响。结果(图 1)显示,随着纤维素酶浓度的升高,原生质体产量明显增多,E7 组原生质体产量显著高于其他酶解液组合,当纤维素酶浓度为 2.0% 和果胶酶浓度 0.75% 时,酶液组合 E7 原生质体产量和原生质体活力均达到最大值,分别为  $6.93 \times 10^5$  cells/g 和 94.50%。后随着纤维素酶浓度继续升高,原生质体产量和活力与 E7 比较均显著降低,可能高浓度的酶解液组合在处理细胞的同时,伤害

了一部分原生质体。因此确定正交优化实验中选用 E6、E7 和 E8 作为酶类组合的 3 个水平。

**2.1.2 酶解时间单因素实验结果** 本实验采用酶液组合 E7(纤维素酶浓度 2.0% + 果胶酶浓度 0.75%),甘露醇浓度为 0.6 mol/L,将实验材料分别酶解 4、6、8、10 和 12 h,离心速度为 800 r/min 纯化得到的原生质体,并检测原生质体产量和活力(图 2)。在酶解时间为 4~8 h 内,原生质体产量随着时间增加而显著增加。酶解 8 h 的原生质体产量和活力均较高,分别为  $7.41 \times 10^5$  cells/g 和 94.49%。继续增加酶解时间(10 和 12 h),原生质体产量开始下降,原生质体活力也显著下降。时间过短则原生质体产量较低,时间过长产量也较低,可能是由于酶解时间过长细胞被酶溶液破坏导致产量和活力下降,所以确定正交实验中酶解时间为 6、8 和 10 h。

**2.1.3 甘露醇浓度单因素实验结果** 本实验用酶类组合为 E7(纤维素酶浓度 2.0% + 果胶酶浓度 0.75%),酶解 8 h,甘露醇浓度为 0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mol/L。800 r/min 离心纯化得到的原生质体。结果(图 3)显示,当甘露醇浓度在 0.3 mol/L 时,原生质体产量显著低于其他处理,这是由于酶液渗透压低于原生质体的渗透压,造成原生质体胀破;当甘露醇浓度在 0.3~0.6 mol/L 范围内逐渐升高时,原生质体的产量、活力均显著升高;当甘露醇浓度为 0.6 mol/L 时,原生质体的产量及活力达到最大值,分别为  $8.31 \times 10^5$  cells/g 和 94.53%;继续升高甘露醇浓度至 0.7 mol/L,原生质体的产量、活力均呈下降趋势。由此确定正交实验中甘露醇浓度为 0.5、0.6 和 0.7 mol/L。

**2.1.4 离心速度单因素实验结果** 本实验用酶液组合为 E7(纤维素酶浓度 2.0% + 果胶酶浓度 0.75%),

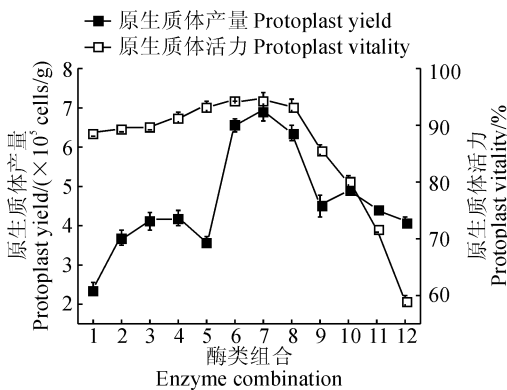


图 1 不同酶浓度和对比对原生质体产量和活力的影响

Fig. 1 Effects of combinations of cellulose and pectinase on yield and vitality of protoplasts

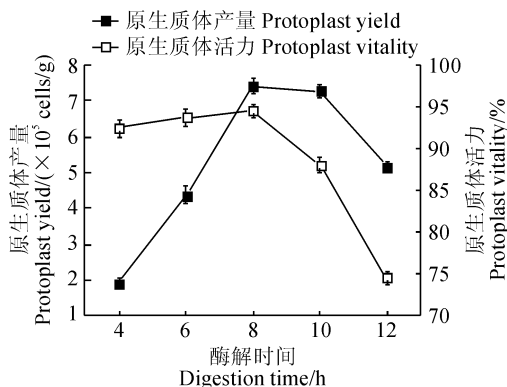


图 2 酶解时间对原生质体产量和活力的影响

Fig. 2 Effects of digestion time on yield and vitality of protoplasts

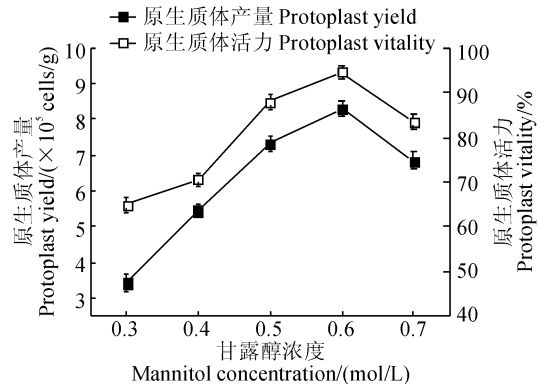


图 3 酶液中甘露醇浓度对原生质体产量和活力的影响

Fig. 3 Effects of different mannitol concentrations on yield and vitality of protoplasts

酶解 8 h,甘露醇浓度为 0.6 mol/L。酶解完成后分别在 400、600、800、1 000 和 1 200 r/min 条件下离心纯化得到的原生质体。结果(图 4)显示,原生质体产量随离心速度的增加先升高后降低;转速过低(400、600 和 800 r/min)收集到的原生质体产量较低,主要是因为低转速下原生质体难以沉降,镜检离心后的上清液发现上清液中仍有较多的原生质体;高转速下(1 200 r/min)收集到的原生质体产量也较低,可能是由于高转速易使原生质体破裂;在适宜的转速下(1 000 r/min)收集到的原生质体产量达到峰值,为  $8.21 \times 10^5$  cells/g;原生质体活力随离心速度的增加逐步降低,可能是由于高转速导致细胞破

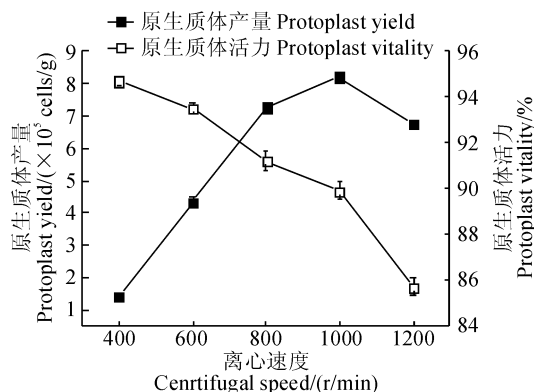


图 4 离心速度对原生质体产量和活力的影响

Fig. 4 Effects of different centrifugal speeds on yield and vitality of protoplasts

裂。所以确定正交实验中离心速度为 800、1 000 和 1 200 r/min。

## 2.2 正交实验

由 2.1 单因素实验结果对蕨麻原生质体产量和活力的影响情况,每个因素选取 3 个水平,按照  $L_9(3^4)$  进行正交实验,因素水平和正交实验设计安排及结果见表 2。

由表 2 可知,酶类组合的  $R$  值最大为 1.107,这说明酶类组合对蕨麻原生质体分离的影响最大;离心速度的  $R$  值最小为 0.440,表明其影响最小。各因素对蕨麻原生质体产量的影响顺序为:酶类组合 > 酶解时间 > 甘露醇浓度 > 离心速度。本实验中,第 6 组实验原生质体产量最高,为  $8.96 \times 10^5$  cells/g,此时原生质体活力为 92.77%(图 5),最接近最优组合,组合方式为 E7(纤维素酶浓度 2.0% + 果胶酶浓度 0.75%),酶解 10 h,甘露醇浓度为 0.5 mol/L,离心速度 1 000 r/min。

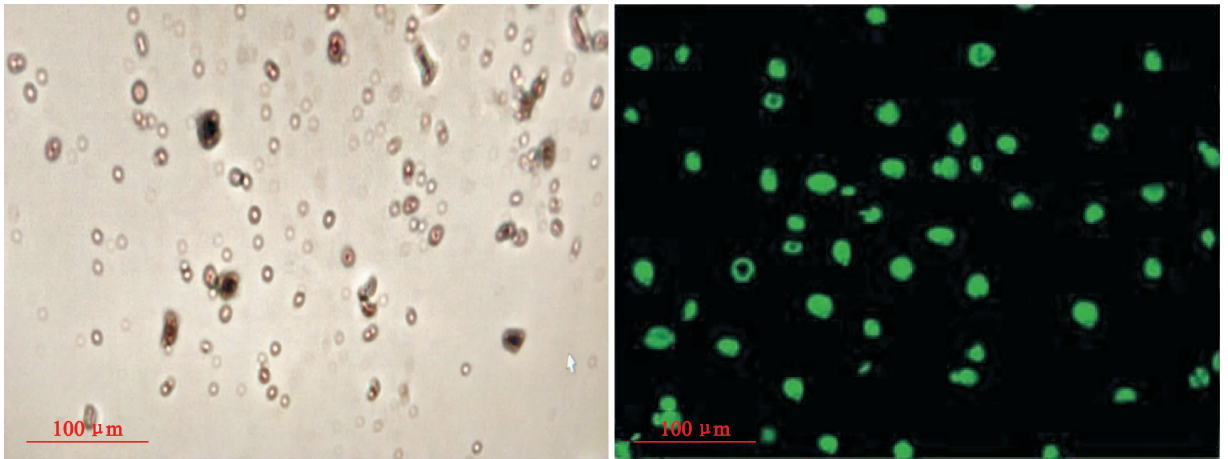
方差分析结果(表 3)表明,各因素中酶类组合的影响最大,这与表 2 中极差分析的结果一致。而且,酶类组合对原生质体产量有极显著影响,酶解时间对结果有显著影响,其他因素无显著影响。

为了验证此结果的准确性,在最佳条件下做了 3 次验证实验,原生质体产量的平均值为  $8.95 \times 10^5$  cells/g,原生质体活力为 92.79%,说明所选参数可行。

表 2 正交实验设计及其原生质产量和活力

Table 2 The orthogonal test design of protoplasts yield and vitality

实验号 Test number	酶类组合 Enzyme combination	酶解时间 Digestion time/h	甘露醇浓度 Mannitol concentration / (mol/L)	离心速度 Centrifugal speed/(r/min)	产量 Yield / ( $\times 10^5$ cells/g)	活力 Vitality/%
1	E6	6	0.5	800	6.85	92.60
2	E6	8	0.6	1 000	7.22	95.51
3	E6	10	0.7	1 200	7.45	94.24
4	E7	6	0.6	1 200	8.22	95.99
5	E7	8	0.7	800	7.66	95.58
6	E7	10	0.5	1 000	8.96	92.77
7	E8	6	0.7	1 000	7.24	93.39
8	E8	8	0.5	1 200	8.11	95.67
9	E8	10	0.6	800	7.95	94.87
$K_1$	7.173	7.437	7.973	7.487		
$K_2$	8.280	7.663	7.797	7.807		
$K_3$	7.767	8.120	7.450	7.927		
$R$	1.107	0.683	0.523	0.440		



A. 明场下的原生质体; B. 原生质体 FDA 活力检测结果

图 5 蕨麻愈伤组织原生质体活力检测

A. Protoplasts in bright field; B. The FDA staining results of protoplast

Fig. 5 Protoplast vitality

表 3 各因素方差分析结果

Table 3 Variance analysis of each factor

变异来源 Var.	自由度 d. f.	偏差平方和 SS	F
酶类组合 Enzyme combination	2	1.840	2.229**
酶解时间 Digestion time	2	0.727	0.881*
甘露醇浓度 Mannitol concentration	2	0.425	0.515
离心速度 Centrifugal speed	2	0.310	0.376

注: \* 和 \*\* 分别表示显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ) 差异

Note: \* and \*\* showed significant difference at 0.05 and 0.01

levels, respectively

### 3 讨论

蕨麻全草及块根均可入药,块根富含营养及活性成分,具有健胃补脾、生津止渴、益气补血的功能<sup>[26]</sup>,是备受广大消费者喜爱的纯天然绿色食品、药品和保健品,近年来蕨麻的需求逐年增长。但由于蕨麻主要生长于生态脆弱的青藏高原,采挖野生蕨麻会对当地环境造成破坏,生态难以恢复,‘青海蕨麻 4 号’以其突出的品质特点及市场接受度,产量亟待提高,亟需培育高产品种。因蕨麻主要利用营养器官繁殖,难以实施常规育种,原生质体因其具有细胞全能性,易于进行细胞融合、接受外源基因等优点,会为蕨麻的育种工作开辟一条蹊径。目前,关于蕨麻原生质体制备方法的研究未见报道。因此,关于蕨麻原生质体制备方法的研究不仅成为研究其细胞生理功能、建立再生体系的必要步骤,更是基因工

程、细胞工程及遗传改良的有效手段。

原生质体制备体系因不同植物而异,原生质体的分离效果与材料的选择、材料预处理条件、酶类组合、酶解时间、酶解液渗透压、原生质体分离纯化方法等因素密切相关。植物的各个器官都可作为分离原生质体的材料,如根、茎、叶、花、果实、种子及愈伤组织和悬浮细胞等,在具体实验操作中,常采用生长旺盛的植物幼嫩部分作为制备原生质体的理想材料,如幼叶、子叶、根、下胚轴的切段、疏松易碎的愈伤组织和悬浮培养细胞,处于对数生长早期的细胞最适。材料的生理状态及部位不同对于原生质体分离和培养的影响较大,分离得到的原生质体产量和活力也存在差异。如舒小娟等<sup>[22]</sup>分别以葡萄品种‘黑香蕉’的叶片和愈伤组织为材料分离原生质体,每克叶片游离原生质体  $4.09 \times 10^6$  个,活力为 83.12%,而每克愈伤组织原生质体产量为  $6.05 \times 10^6$  个,活力为 84.13%。

在原生质体游离过程中,消化酶的种类及浓度直接影响原生质体的产量,常用的消化酶有纤维素酶、果胶酶、离析酶、半纤维素酶、蜗牛酶和崩溃酶等,不同酶搭配使用原生质体分离效果较好。酶含量较低时无法酶解完全,产量较低,但活力不受影响,酶浓度过高时,酶液对细胞破坏较大,产量和活力均较低,镜检发现较多的细胞碎片。适宜的酶液组合下原生质体可以游离完全,活力也较高。李玉珠和师尚礼<sup>[23]</sup>分别以杂花苜蓿‘甘农 1 号’和紫花苜蓿‘甘农 4 号’、‘阿尔冈金’、‘清水’4 个苜蓿品种的愈伤组织为材料分离原生质体,‘甘农 1 号’、‘甘农 4 号’和‘清水’的最佳酶液组合为 2% 纤维素酶

+0.5%果胶酶+0.3%崩溃酶,‘阿尔冈金’的最佳酶液组合为2%纤维素酶+0.5%果胶酶+0.3%半纤维素酶+0.3%离析酶+0.3%崩溃酶,‘阿尔冈金’中较之前3个品种添加了半纤维素酶和离析酶,分离效果较好。

酶解时间是另一个获得高产量高活力的原生质体的重要影响因素。酶解时间过短则原生质体产量较低,时间过长产量也较低,可能是由于酶解时间过长细胞被酶溶液破坏导致产量和活力下降。不同植物对酶解时间的需求不同,这与实验材料的选择、酶的种类和浓度等其他实验因素都有关,因此,要根据具体情况探索最适宜材料的酶解时间。百合(*Lilium ledebourii* Bioss.)叶片原生质体游离时间为24 h<sup>[27]</sup>,而苦荞叶肉细胞原生质体分离需要4 h<sup>[21]</sup>,这可能与实验材料、酶解液的种类及浓度、温度等因素有关,应根据具体情况进行分析。

酶解时,为了保持原生质体的活力和膜稳定性,酶液的渗透压必须与原生质体的渗透压相近,当原生质体与外界酶解液不能保持等渗时游离出的原生质体就会涨破或者皱缩。因此,适宜的渗透压对于获得高活性的原生质体至关重要。用来调节酶液渗透压的渗透压调节剂通常有KCl、NaCl、MgSO<sub>4</sub>、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和山梨醇,或是混合使用。Yoo等<sup>[27]</sup>在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶肉原生质体分离时选用0.4 mol/L甘露醇调节渗透压,本研

究蕨麻愈伤组织原生质体制备采用0.5 mol/L甘露醇分离效果最佳,不同实验材料所需渗透压浓度不尽相同,这可能是由于不同植物细胞质浓度存在差异。

原生质的纯化也是获得高质量的原生质体的关键过程。酶解处理后的混合液中包含原生质体、细胞团和组织碎片等,须将杂质和酶液除去,才可以继续培养。常用的原生质体纯化方法有离心沉淀法、漂浮法和界面法。离心沉淀法应用原生质体的比重大于溶液的原理,离心后原生质体沉于底部,简便易操作,较为常用。三倍体‘银中杨’叶肉原生质体纯化的最佳方法为上浮法蔗糖等密度离心,蔗糖浓度为40%时原生质体产量最高<sup>[20]</sup>,本研究采用离心沉淀法纯化原生质体,离心转速为1 000 r/min时原生质体产量及活力均较高。

‘青海蕨麻4号’以其突出的品质特点被大众喜爱,但因产量较低而供不应求,蕨麻的常规育种工作在实验室无法开展,基于原生质体的植物体细胞杂交技术为‘青海蕨麻4号’的品种改良提供了一条新思路。本研究确定了一套简便、准确的原生质体制备及其活力检测方法,为研究其细胞生理功能、建立再生体系、细胞工程奠定基础。同时,分离出高质量的原生质体可为蕨麻的育种工作提供新的途径和遗传材料,具有重要意义。

## 参考文献:

[1] 李军乔. 青藏高原蕨麻[M]. 北京:科学出版社, 2011:1-35.

[2] 刘意,成亮,延在昊,等. 鹅绒委陵菜化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2015,46(8):1 251-1 258.  
LIU Y, CHENG L, YAN Z H, et al. Research progress on chemical constituents from *Potentilla anserina* and their pharmacological activities [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 46(8):1 251-1 258.

[3] 张文娟,王庆伟,刘琳娜,等. 藏药蕨麻的研究进展[J]. 中国药业, 2010, 19(19):1-3.  
ZHANG W J, WANG Q W, LIU L N, et al. Research advances on *Potentilla anserina* L. [J]. *Journals of China Pharmacology*, 2010, 19(19):1-3.

[4] QIN X J, LI L Z, LÜ Q, et al. Underlying mechanism of protection from hypoxic injury seen with n-butanol extract of *Potentilla anserina* L. in hippocampal neurons[J]. *Neural Regeneration Research*, 2012, 7(33):2 576-2 582.

[5] 陈修红,胡锦涛,苑 蓿,等. 蕨麻提取物体外抑菌与抗癌细胞活性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(24):12 000-12 002.

CHEN X H, HU J R, YUAN H, et al. Bacteriostasis in vitro and anticancer activity of *Potentilla anserina* L. extracts[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(24):12 000-12 002.

[6] 刘素君,李世元,宋九华,等. 鹅绒委陵菜多糖抗肿瘤作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(3):185-188.  
LIU S J, LI S Y, SONG J H, et al. Anticancer effects of polysaccharide from *Potentilla anserina* L. [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2011, 28(3):185-188.

[7] 罗慧英,黄亚红,朱丽娟,等. 藏药蕨麻对实验性酒精肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(10):1 107-1 110.  
LUO H Y, HUANG Y H, ZHU L J, et al. Protective effect of *Potentilla anserina* on ethanol-induced liver damage in mice [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2014, 19(10):1 107-1 110.

[8] 孙洁,吕加平,薄海波. 藏药蕨麻的营养成分分析及评价[J]. 食品科学, 2008, 29(2):411-414.  
SUN J, LÜ J P, BO H B. Analysis and evaluation of dietetic

- nutrimental of *Potentilla anserina* roots[J]. *Food Science*, 2008, **29**(2):411-414.
- [9] 李军乔. 青海省野生资源植物——鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina* L.)的应用研究[J]. 生物学杂志, 2003, **20**(5):34-36.  
LI J Q. The exploitation and utilization of wild resources foliage *Potentilla anserina* L. in Qinghai Province[J]. *Journal of Biology*, 2003, **20**(5):34-36.
- [10] ERIKSSON O. Reproduction and clonal growth in *Potentilla anserina* L. (Rosaceae): the relation between growth form and dry weight allocation [J]. *Oecologia*, 1985, **66** (3): 378-380.
- [11] PUIITE K J, DONS J J M, HUIZING H J, *et al.* Progress in plant protoplast research[M]. *Kluwer Academic Publishers*, 1988:1-8.
- [12] KORLACH J, ZOGLAUER K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of european larch (*Larix decidua* Mill.)[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, **15**(3):242-247.
- [13] KIELKOWSKA A, ADAMUS A. An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2012, **48** (2):265.
- [14] SINHA A, PDS C. Enhanced protoplast division by encapsulation in droplets: an advance towards somatic hybridisation in recalcitrant white lupin[J]. *Annals of Applied Biology*, 2005, **146**(4):441-448.
- [15] HAIN R, STABEL P, CZEMILOFSKY A P, *et al.* Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1985, **199**(2):161-168.
- [16] PRASAD V V, NAIK G R. Plant protoplast isolation—a practical approach[J]. *Biochemistry & Molecular Biology Education*, 2000, **28**(1):39-40.
- [17] CHEN S, TAO L, ZENG L, *et al.* A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, **7**(5):417-427.
- [18] WU F H, SHEN S C, LEE L Y, *et al.* Tape-arabidopsis, sandwich—a simpler arabidopsis, protoplast isolation method [J]. *Plant Methods*, 2009, **5**(1):16.
- [19] LUNG S C, YANAGISAWA M, CHUONG S D X. Protoplast isolation and transient gene expression in the single-cell  $C_4$  species, *Bienertia sinuspersici* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, **30**(4):473-484.
- [20] 宋少宇, 张俊琦, 王君. 三倍体‘银中杨’叶肉原生质体制备的优化[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(9):1 899-1 905.  
SONG S Y, ZHANG J Q, WANG J. Preparation and optimization of mesophyll protoplasts of *Populus alba* × *P. berolinensis* Yinzhong[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(9):1 899-1 905.
- [21] 张钟仁, 陈鹏. 苦荞叶肉细胞原生质体的分离纯化及瞬时转化[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(1):183-189.  
ZHANG Z R, CHEN P. Isolation, purification and transient expression of mesophyll protoplast in tartary buckwheat[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(1):183-189.
- [22] 舒小娟, 温腾建, 邢佳毅, 等. 葡萄原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(6):1 262-1 268.  
SHU X J, WEN T J, XING J Y, *et al.* Isolation of protoplast and establishment of transient expression system in grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(6):1 262-1 268.
- [23] 李玉珠, 师尚礼. 杂花和紫花苜蓿原生质体分离培养条件的筛选[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(1):184-192.  
LI Y Z, SHI S L. Selection for protoplast isolation and culture conditions of alfalfa[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, **34**(1):184-192.
- [24] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社, 2003: 25-30.
- [25] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. *Nature Protocols*, 2007, **2**(7):1 565-1 572.
- [26] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 毛继祖. 上海:上海科学技术出版社, 2012:221-230.
- [27] CHAMANI E, TAHAMI S K, ZARE N, *et al.* Effect of different cellulase and pectinase enzyme treatments on protoplast isolation and viability in *Lilium ledebourii* Bioss. [J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2012, **40**(2):123-128.

(编辑:宋亚珍)