

尹红新,雷秀娟,宋娟,等.我国药用植物原生质体培养的研究进展[J].江苏农业科学,2015,43(3):243-245.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.079

我国药用植物原生质体培养的研究进展

尹红新,雷秀娟,宋娟,姚春林,王英平

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:对近年来药用植物原生质体的制备、培养、融合以及植株再生进行了综述,阐明了起始材料、酶解条件、培养方法对原生质体培养的影响,并对今后药用植物原生质体的重点研究方向作了讨论。

关键词:药用植物;原生质体;酶解条件;培养;研究进展

中图分类号:Q942 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0243-03

原生质体(protoplast)是指植物细胞中除去细胞壁后有生命活性的部分,除去细胞壁的原生质体能够直接摄入外源的细胞器、DNA、病毒、质粒等,是进行遗传转化研究的理想受体,对其进行细胞融合可获得杂种细胞^[1]。因此,植物原生质体在品种改良和生物学基础理论研究中有广泛的应用前景,备受国内外研究学者的关注。1892年,Klercker首次用机械法进行原生质体的分离研究,但是原生质体获得量少^[2]。1960年,Cocking采用酶解法从高等植物细胞中分离获得原生质体^[3]。随着纤维素酶和果胶酶的推行,植物原生质体培养逐渐成为一个热门话题^[4]。1971年,Takebe等首次从烟草叶片中分离出原生质体并获得再生植株,原生质体的培养进入一个新的阶段^[5]。在此基础上,药用植物原生质体的培养也有了一定的发展。目前,药用植物原生质体的培养已经扩展到夹竹桃科、五加科、紫草科、菊科、龙胆科、葫芦科、茄科、玄参科、天南星科等数十科。本文就近年来药用植物原生质体的制备、培养、融合以及植株再生进行综述,为今后药用植物原生质体培养的研究寻求切入点和突破点,提供新的

研究方法和有力的论证依据。

1 原生质体的分离

原生质体分离是进行原生质体培养的第1步,直接影响原生质体培养能否成功。其中,原始材料的生理状态,原生质体的分离、预处理方法以及游离纯化方法等都是影响原生质体分离的重要因素。原生质体的分离方法主要有机械法和酶解法2种。机械法存在产量低等缺陷,因此多采用酶解法进行原生质体的分离。

1.1 原始材料的选择

原始材料及其生理状态对原生质体的制备及其活力有很大的影响^[6]。生长旺盛、生命力强的组织和细胞是获得高活性原生质体的关键,并对原生质体的复壁、愈伤组织的形成以及植株再生有重要的影响。原生质体分离的原始材料有很多,只要选用的酶类型及用量合适,就可以在植物的任何部位获得游离的原生质体^[2]。据有关原生质体培养的报道,叶片是分离原生质体试验中常用的原始材料^[7]。张晓丽等以青天葵新鲜叶片为试验材料获得制备青天葵原生质体的理想条件与参数^[8]。愈伤组织和悬浮细胞生长迅速稳定,受环境条件影响比较小,更易获得大量高质量的原生质体。但是,长期培养的愈伤组织和悬浮细胞容易引起植株丧失再生能力,这就须要选择胚性状态的细胞团,这是再生植株所必需的^[9-10]。同时,基因型也会影响植物原生质体的培养,不同

收稿日期:2014-05-07

基金项目:吉林省青年科研基金(编号:20140520165JH)。

作者简介:尹红新(1988—),女,硕士研究生,研究方向为药用植物栽培学。E-mail:yinhongxin2008@126.com。

通信作者:王英平,男,博士,研究员,博士生导师。E-mail:yingpingw@126.com。

[4] Paterson R R. Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69 (7): 1469-1495.

[5] Qiao D L, Luo J G, Ke C L. Immunostimulatory activity of the polysaccharide from *Hyriopsis cumingii* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47: 657-680.

[6] 任健,张倩落,郑丽.人工虫草多糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].第四军医大学学报,2007,28(21):1967-1969.

[7] Schildkraut J J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence [J]. *Am J Psychiatry*, 1965, 12: 509-522.

[8] 李春如. 35种虫草及其无性型鉴定、活性筛选和细脚拟青霉提取物的抗抑郁作用及相关机制[D].合肥:安徽医科大学,2006.

[9] 马明,杨克强,郭启荣.改良CTAB法提取林木树种基因组DNA的研究[J].生物技术,2007,17(3):36-37.

[10] 王洪凯,张天宇,张猛.应用5.8S rDNA及ITS区序列分析链格孢种级分类[J].菌物系统,2001,20(2):168-173.

[11] 宁慧青.不同食用菌多糖含量的比较研究[J].山西化工,2007(3):44-45.

[12] 荆留萍,杜双田,金凌云,等.8种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(11):156-160.

[13] 刘作易,梁宗琦,刘爱英.冬虫草孢子囊孢子萌发及其无性型观察[J].贵州农业科学,2003,31(1):3-5.

[14] Kang J C, Liang Z Q, Liu A Y, et al. Molecular evidence of polymorphism in cordyceps based on 5.8S rDNA and ITS sequences [J]. *Mycosystema*, 2000, 19(4): 492-497.

[15] 张泽文,傅岚,陈作红.古尼虫草无性型的分子鉴别[J].菌物学报,2005,24(3):344-348.

基因型分离得到的原生质体产量和活力差别很大^[11],并且对原生质体的植株再生也有一定的影响^[12]。

1.2 原始材料的预处理

一些研究表明,材料的预处理对保持原生质体的完整性及提高原生质体产量有积极的作用。张晓丽等用 13% 甘露醇溶液预处理青天葵叶片 1 h,获得大量的原生质体^[8]。王鹏凯等以北美鹅掌楸的悬浮细胞和组培苗叶片为材料,用含有 0.1% 2-吗啉乙磺酸(MES)和 0.6 mol/L 甘露醇的 Cell Protoplast Wash (60M-CPW)溶液 25 ℃ 预处理 1 h,结果显示原生质体产量明显提高^[13]。于相丽等以洛阳红牡丹叶片为材料制备原生质体,在蔗糖浓度为 0.3 mol/L 的溶液中预处理 0.5 h 的效果最好^[14]。但是,并不是所有的原生质体分离都需要经过预处理,要根据不同的情况而定。

1.3 原生质体的分离方法

药用植物游离原生质体常用的酶有纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、离析酶等,不同植物材料选用哪种酶较好取决于所用细胞和组织的来源。不同种类酶的混合使用和精确的酶解温度和酶解时间的设置,可以得到较好的酶解效果^[15-16]。近年来,开发一种微生物型的纤维素酶和果胶酶用于原生质体分离逐渐成为讨论的焦点^[17]。

渗透压是影响原生质体游离的一个重要因素。渗透压过低,原生质体缺乏细胞壁的保护,往往会出现破裂的情况。有研究表明,微高的渗透压有利于原生质体维持稳定的形态^[18]。渗透压稳定剂是酶液的重要组成部分,应当引起足够的重视。药用植物原生质体分离环境中常用的渗透压稳定剂为甘露醇和山梨醇^[19-20],甘露醇由于在试验中的降解性小于山梨醇而被认为是目前最适合的渗透压稳定剂。

1.4 原生质体游离基纯化方法

原生质体游离后的提纯方法常用的有漂浮法和沉降界面法,其中沉降界面法使原生质体集中在两相界面,操作简单,但是容易造成原生质体损伤;漂浮法在重复漂浮洗涤纯化的过程中对原生质体的损伤较小,但是容易混进一些不需要的原液,影响漂浮纯化效果,这就须要严格控制离心力^[21]。

2 原生质体的培养

2.1 培养基

在药用植物原生质体的培养中,常用的培养基有改良的 MS、B5、KM8P、6,7-V、V-KM 等培养基^[22-25],培养基的 pH 值一般为 5.6~5.8。无机盐是构成培养基的主要成分,一般 Ca^{2+} 和 NH_4^+ 对原生质体培养效果影响较大,且较高浓度的 Ca^{2+} 有利于原生质体培养^[26]。马锋旺等在原生质体培养中发现,高浓度的 NH_4^+ 能抑制原生质体分裂^[27-28]。原生质体洗液(CPW)中盐离子的浓度和种类对原生质体细胞膜的稳定性也有一定的影响,试验中应注意^[29]。

一定水平的渗透压可以保持原生质体的正常形态,使原生质体的正常生理功能得以进行,培养基中的碳源和渗透剂在原生质体培养中有重要的作用。卫志明等研究发现,使用葡萄糖可以提高悬铃木叶肉原生质体的植板率^[30]。林顺权等在对枇杷原生质体的研究中发现,10% 葡萄糖 + 5% 山梨醇是所有试验处理中最合适的碳源兼渗透剂^[31]。

2.2 培养方法

原生质体常用的培养方法包括液体浅层培养、固-液双层培养、琼脂糖包埋及看护培养等方法,目前应用最广泛的是固-液双层培养。范小峰等以南蛇藤胚性愈伤组织为材料分离原生质体,采用液体浅层静置培养并取得了较好的原生质体培养效果^[32]。秦晓杰等在胚性愈伤组织诱导培养基中进行原生质体的悬滴培养、液体培养等不同培养方式的研究,结果表明看护培养是最佳培养方法^[22]。这些常用的原生质体培养方法同样适用于药用植物原生质体培养。

不同类型的药用植物应根据实际情况采用不同的培养方式,一些植物也可采用多种培养方式联合培养。其中,五加科、天南星科等较适合液体浅层和固-液双层的联合培养方式^[24,33],菊科、伞形科的植株较适合固体的培养方式^[2,34],茄科、玄参科植株较适合液体浅层培养方式^[35-36]。

3 原生质体的融合

由于植物原生质体没有细胞壁的限制,它为体细胞遗传研究和作物改良提供了许多方便^[37]。传统的有性杂交存在远缘杂交不亲和、双亲花期不遇、雌(雄)不育等难以克服的障碍,严重阻碍了杂交技术在植物育种中的应用。由于分离的原生质体无细胞壁,可以用物理或化学方法诱导融合。利用植物原生质体进行细胞融合和体细胞杂交,可以克服有性杂交遇到的障碍。

自 Carlson 等在 1972 年获得第 1 株烟草体细胞杂种植株以来^[38],原生质体融合技术在药用植物中已广泛应用。早期原生质体融合的方法主要有硝酸钠法、高浓度 Ca^{2+} 高 pH 值法、PEG(聚乙二醇)法、PEG-高浓度 Ca^{2+} 高 pH 值法、电融合法及聚集微束激光法等,目前广泛使用的是 PEG-高浓度 Ca^{2+} 高 pH 值法^[39-40]和电融合法^[41-42]。但是,PEG-高浓度 Ca^{2+} 高 pH 值法存在融合频率低的弱点。Chen 等用该方法进行原生质体融合,融合频率约 4.5%^[43]。近年来一些研究者发现,加入二甲基亚砜(DMSO)可以有效提高融合频率^[44]。电融合法操作简单、快速,融合同步性好,还可以避免化学药剂的毒害作用,被大家普遍接受。

4 原生质体的再生

在药用植物原生质体培养中,因为原生质体培养的稳定性和可重复性差且经验性很强,所以由原生质体获得愈伤组织的实例很多,但是成功获得原生质体再生植株的案例很少。目前,我国从药用植物的原生质体培养和花药培养中获得完整植株的物种有前胡、防风、决明子、党参、石刁柏、枸杞、毛叶曼陀罗等^[45]。原生质体再生植株的途径通常有 3 种:由细胞团形成愈伤组织,然后再分化成植株;直接形成胚状体,再发育成植株;由细胞团形成的愈伤组织先分化成胚状体,然后发育成植株^[1]。据目前一些研究结果来看,大多数植物再生植株以诱导器官发生途径较多,而五加科和伞形科植物的最佳途径是诱导体胚的发生^[2]。

5 结论

近年来,国内外广泛地开展了植物原生质体的研究工作,植物原生质体培养和融合取得了突破性进展,主要表现在通过原生质体获得再生植株的种类不断增加。其中,药用植物

已经从原来不能杂交的植物胡萝卜和人参、曼陀罗和颠茄、烟草和龙葵等获得杂种植株。

虽然药用植物原生质体培养和融合取得很大进展,但也存在一些缺陷,如再生植株遗传性状的稳定性差;杂种植株发生变异的规律尚不明确;缺乏完整的药用植物原生质体培养体系,技术体系基本借鉴于其他植物且相对落后。这些都是药用植物原生质体研究以后需要重点解决的问题。

参考文献:

- [1]刘庆昌,吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003:178.
- [2]林阅兵. 人参与胡萝卜原生质体培养再生植株的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [3]Cocking E C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles[J]. *Nature*,1960,87:927-929.
- [4]李凌明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002:190.
- [5]张红梅,王俊丽. 植物原生质体培养研究进展[J]. *生物技术*,2002,12(5):44-45.
- [6]金晓玲,何平. 木本植物原生质体培养与融合研究进展[J]. *浙江师范大学学报:自然科学版*,2003,26(1):54-59.
- [7]Vardi A, Spiegel-Roy P, Galun E. Plant regeneration from citrus protoplast: variability in methodological requirements among cultivars and species[J]. *Theor App Genet*,1982,62:171-176.
- [8]张晓丽,何瑞,童家赞,等. 药用植物青天葵叶片原生质体的制备与纯化[J]. *安徽农业科学*,2011,39(35):21644-21646.
- [9]沈前华,杨柏云,郭金平,等. 大花蕙兰原生质体分离的影响因素研究[J]. *江西农业学报*,1996,8(1):36-40.
- [10]孙勇如,李文彬,黄美娟,等. 枸杞的原生质体生成愈伤组织[J]. *植物学报*,1982,5(5):477-479.
- [11]Nyman M, Wallin A. Plant regeneration from rawberry (*Fragaria × ananassa*) mesophyll protoplasts[J]. *Plant Physiology*,1998,133:375-377.
- [12]Esmilda H P, Otto S. Plant regeneration from leaf protoplasts of apple[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,1993,34(1):71-76.
- [13]王鹏凯,吕伟光,胡雪怡,等. 北美鹅掌楸原生质体的分离与培养[J]. *西北植物学报*,2013,33(2):254-260.
- [14]于相丽,李勇慧,李业. 牡丹叶片原生质体分离条件的研究[J]. *河南农业科学*,2012,41(1):122-125.
- [15]赵小强,马晖玲,林栋,等. 草地早熟禾新格莱德胚性愈伤组织原生质体培养及植株再生的研究[J]. *草业学报*,2010,19(2):55-60.
- [16]蔡肖,康向阳. 小青杨叶肉原生质体分离条件的研究[J]. *中国农学通报*,2011,27(10):18-22.
- [17]Gummadi S N, Pandon T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review[J]. *Process Biochemistry*,2002,38(7):987-996.
- [18]郭艳萍. 玉米胚乳细胞原生质体的分离与流式纯化[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [19]俞超,杨潇,王忠华,等. 葡萄愈伤组织制备原生质体的影响因素研究[J]. *果树学报*,2013,3(3):433-436.
- [20]王昱,王义,王康宇,等. 灵芝原生质体的制备与再生研究[J]. *北方园艺*,2013(16):184-188.
- [21]蒙爱东. 生物技术在药用植物中的应用[J]. *广西医学*,2006,06(6):789-791.
- [22]秦晓杰,段华金,朱永平,等. 东方百合‘Sorbonne’原生质体培养初步研究[J]. *分子植物育种*,2013,5(5):600-604.
- [23]姜淑慧,管荣展,董海滨,等. 播娘蒿与甘蓝型油菜的原生质体融合与植株再生[J]. *中国油料作物学报*,2005,27(4):1-6.
- [24]李乐工. 人参原生质体培养再生愈伤组织[J]. *植物学报:英文版*,1989,31(10):815-816.
- [25]刘艳丽. 盾叶薯蓣愈伤组织诱导与原生质体培养[D]. 武汉:华中农业大学,2004.
- [26]赵大克,王敬乔,陈薇,等. 植物原生质体获得、培养条件及方法对其再生体系构建的影响[J]. *云南大学学报:自然科学版*,2008(增刊2):403-408.
- [27]马锋旺,李嘉瑞. 山桃原生质体培养再生愈伤组织[J]. *西北农业学报*,1999,8(3):73-76.
- [28]罗建平,贾敬芬,顾月华,等. 沙打旺胚性原生质体培养优化及高频再生植株[J]. *生物工程学报*,2000,16(1):17-21.
- [29]王丽华,陈建华,李昌珠,等. 光皮树花药愈伤组织的诱导[J]. *经济林研究*,2011,29(1):94-98.
- [30]卫志明,许智宏,许农,等. 悬铃木叶肉原生质体培养再生植株[J]. *植物学报:英文版*,1991,33(11):813-818,900.
- [31]林顺权,陈振光. 山梨醇对枇杷原生质体分离和培养的效应[J]. *福建农业大学学报*,1997,26(4):18-23.
- [32]范小峰,李东波,刘灵霞,等. 南蛇藤原生质体培养及植株再生[J]. *植物研究*,2011,03(3):300-305.
- [33]高利. 西洋参叶肉原生质体的游离与培养[J]. *安徽农业科学*,2007,35(23):7194-7195.
- [34]陈发棣,赵宏波,房伟民,等. 菊科植物原生质体研究进展[J]. *西北植物学报*,2005,25(9):1913-1920.
- [35]曹有龙,许兴,宋玉霞,等. 枸杞原生质体培养及高效成株体系的建立[J]. *植物学通报*,2001,18(5):605-614.
- [36]孙雪梅. 马铃薯原生质体培养研究进展[J]. *黑龙江农业科学*,2011,01(1):134-136.
- [37]朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003:150-167.
- [38]Kao F T, Puck T T. Induction and isolation of auxotrophic mutants in mammalian cells[J]. *Methods in Cell Biology*,1974,8(0):23-39.
- [39]Varotto S, Nenz E, Lucchin M, et al. Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2001,102(6/7):950-956.
- [40]杜雪竹,李再云. 甘蓝型油菜与菘蓝原生质体融合及植株再生体系的研究[J]. *湖北农业科学*,2012,51(11):2364-2368.
- [41]孙玉强. 棉花原生质体培养和原生质体对称融合研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005.
- [42]徐小勇. 柑橘原生质体融合及体细胞杂种核质遗传研究[D]. 武汉:华中农业大学,2006.
- [43]Chen L P, Zhang M F, Li C S, et al. Production of interspecific somatic hybrids between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*Brassica oleracea*) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*,2005,80(3):305-311.
- [44]孙慧慧,王力军,闫晓红,等. 植物原生质体融合培养技术及其应用[J]. *河南农业科学*,2010(7):118-122.
- [45]李杰,黄敏仁,王明麻,等. 植物原生质体培养和体细胞融合技术研究进展[J]. *仲恺农业技术学院学报*,2003,16(4):64-71.