DOI:10.3969/j.issn.1000-3142.2012.05.019

石牌广藿香原生质体的分离及培养研究

莫小路,曾庆钱,黄珊珊,陈瑜珍,严 振*

(广东省中药研究所,广州 510520)

摘 要:以石牌广藿香悬浮细胞为材料,对影响其原生质体分离和培养的酶浓度、作用时间、溶液渗透压和材料的生理状态等因素进行了研究。结果表明:以 0.5%的果胶酶、0.2%离析酶和 0.8%的纤维素酶组合处理继代培养 3~11 d 的悬浮细胞 8 h,渗透压调节剂为 9%甘露醇,原生质体产量达 1.65×10^6 protoplasts·mL^{-1} PCV,活力超过 86%。在原生质体的液体浅层培养中,细胞分裂频率为 13.5%。

关键词:石牌广藿香;原生质体分离;原生质体培养

中图分类号:Q943.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-3142(2012)05-0669-05

* The protoplasts isolation and culture of *Pogostemon cablin* cv. Shipaiensis

MO Xiao-Lu, ZENG Qing-Qian, HUANG Shan-Shan, CHEN Yu-Zhen, YAN Zhen*

(*Guangdong Research Institude of TCM*, Guangzhou, 510520, China)

Abstract: A protocol for protoplasts isolation and culture from the cell suspension of *Polgostemon cablin* cv. Shipaiensis were developed. The suspention cells grew 3—11 days after subculture was incubated in the enzyme solution consisting of 0.5% (w/v) pectolyase Y-23, 0.2% (w/v) macerozyme R-10 and 0.8% (w/v) cellulase R-10 in 9% (w/v) mannitol buffered with 0.1% MES and 0.02% $CaCl_2$, for 8 h, the yield was 1.65×10^6 protoplasts·mL^{-1} PCV (Packed Cell Voloume) and the viability was above 86%. In thin layer culture of protoplasts, observed division rate was 13.5%.

Key words: *Polgostemon cablin* cv. Shipaiensis; protoplast isolation; protoplast culture

广藿香(*Pogostemon cablin*)为唇形科刺蕊草属植物,原产于东南亚各国,现在我国南方各省都有栽培。中药广藿香为广藿香植物的干燥地上部分,是广东省的道地药材之一,具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑(广东中药志编委会,1994)并兼有抑菌抗病毒、抗螺旋体等功效(任守忠等,2006),是“藿香正气水”、“抗病毒口服液”等多种中成药的重要原料。

广藿香主要产于广东省的石牌、高要、湛江地区及海南省的万宁地区,因产地的自然环境条件、种植习惯、栽培管理、采收加工等的不同,其产品形态、气味、质量差异较大(李薇等,2002;罗集鹏等,2003),药材生产传统上认为产于广州石牌地区的广藿香(俗称“牌香”)品质最好(徐颂军等,2003;吴友根等,2010),然而由于城市发展耕地消失以及农艺性状不佳等原因,目前石牌广藿香已濒临灭绝,为保护这一种质资源,本项目组开展了广藿香原生质体分离培

* 收稿日期:2012-03-19 修回日期:2012-05-25

基金项目:广东省科技厅粤港关键领域重点突破项目(2009A030901011);广州市科技计划基础研究项目(2009J1-C201)[Supported by Guangdong Provincial Department of Scince and Technology: Key Technology Research and Development Program of Guangdong and Hongkong(2009A030901011); the Basic Research Project of Guangzhou Science and Technology Bureau(2009J1-C201)]

作者简介:莫小路(1967-),女(壮族),广西柳州人,博士,教授,从事生物技术与药用植物资源研究。

*通讯作者:严振,男,教授,从事中药资源研究,(E-mail)yanz@gdyzy.edu.cn。

养再生植株及体细胞融合方面的研究。原生质体培养是进行细胞杂交、转基因及植株再生的研究基础，在多种植物上已获得了成功（秦永华等，2006；肖望等，2008），而在广藿香原生质体培养方面，仅有 Kageyam 等（1995）从叶肉细胞分离到原生质体，经海藻酸钠包埋形成微球并采用看护培养，获得了再生植株，国内尚无相关研究报道。原生质体分离的产量和活力是后续培养成功的关键，而用于原生质体分离材料的生理状态、酶解条件、分离和纯化的方法等是影响原生质体产量和活力的主要因素（Grezes，1994；许智宏，1997），本文对石牌广藿香原生质体分离和培养影响因素的研究，为后续的体细胞融合及优质高产细胞系筛选提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

石牌广藿香悬浮细胞：由本所实验室保存培养的石牌广藿香无菌苗叶片（莫小路等，2008）在含 0.05 mg·L^{-1} 的 2，4-D 和 0.5 mg·L^{-1} KT 的 MS 培养基上诱导出愈伤组织，经 2 次继代培养后，转入含 0.05 mg·L^{-1} 的 2，4-D 和 1.0 mg·L^{-1} BA 的 MS 液体培养中，1 个月后建立的悬浮细胞培养体系，悬浮细胞每 20 d 继代 1 次，接种量为 2 g FW·50 mL^{-1}。果胶酶（Pectinase，Pectolyase Y-23）、离析酶（Macerozyme R-10）、纤维素酶（Cellulase R-10）、甘露醇（Mannitol），聚蔗糖（Ficoll）、植物凝胶（Phytagel）、MES 和 FDA（二乙酸荧光素）均购自广州威佳生物技术有限公司；主要仪器：低速摇床；Olympus 倒置显微镜，Leica 荧光显微镜及电子拍照系统。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的分离　取继代培养 5 d 的悬浮细胞用 60 目的不锈钢筛网过滤，除去大的细胞团，将滤过的悬浮细胞以 1 000 r·min^{-1} 离心 2 min，分别将沉淀的悬浮细胞与不同组合的酶液按细胞密实体积（Packed Cell Voloume，PCV）：酶液体积＝1：25 的比例混合后，于（26±1）℃，置低速摇床上以转速 50 r·min^{-1} 避光培养 10 h，从 4 h 开始，每隔 2 h 检查一次原生质体产量，确定原生质体分离的最佳酶液组合和酶解时间。酶液的组合见表 1，所有酶液均用含 9%甘露醇、0.1% MES，0.02% $CaCl_2$ 的溶液配制，pH5.7，过滤除菌。

确定酶解时间和酶浓度后，分别用含甘露醇 5%、7%、9%、11% 和 13% 的溶液配制酶溶液（pH5.7）进行酶解实验，考察渗透压调节剂甘露醇浓度对原生质体产量和活力的影响。按上述实验确定的最佳酶液组合、酶解时间和甘露醇的浓度对继代时间为 3、5、7、9、11、15、19 d 的悬浮细胞进行酶解，确定取得原生质体最高产量的继代时间。

表 1　用于石牌广藿香原生质体分离的酶组合

Table 1　Enzyme compositions used for protoplast isolation of *Pogostemon cablin* cv. Shipaiensis

酶液编号 No. of Enzyme solution	果胶酶 Pectolyase Y-23（%）	离析酶 Macerozyme R-10（%）	纤维素酶 Cellulase R-10（%）
1	0.10	0.2	0.8
2	0.25	0.2	0.8
3	0.50	0.2	0.8
4	1.00	0.2	0.8
5	0.5	0.2	1.0
6	0.5	0.2	1.5
7	0.5	0.2	2.5

1.2.2. 原生质体纯化　采用沉淀法对原生质体进行纯化。酶解结束后，依次用 200 目和 400 目不锈钢滤网过滤除未解离的细胞团，滤液以转速 500 r·min^{-1} 离心 5 min，沉淀用溶解酶的溶液洗涤 2 次，每次以转速 5 00 r·min^{-1} 离心 3 min。沉淀的原生质体用一定体积的原生质体培养液（附加 0.05 mg·L^{-1} 的 2，4-D 和 1.0 mg·L^{-1} BA 的 MS 液体培养基，含 7%甘露醇和 0.1%MES）悬浮，5 00 r·min^{-1} 离心 3 min，沉淀再次用原生质体培养液悬浮。

1.2.3 原生质体产量和活力测定　原生质体的数量以血球计数板统计，每个样品计数 3 次，取平均值，计算出每 1 mL 溶液中的原生质体的数量，按下式计算原生质体产量：原生质体产量（protoplasts·mL^{-1}PCV）＝每 1 mL 溶液中的原生质体数量（protoplasts·mL^{-1}）×所得原生质体悬液的总体积（mL）/分离原生质体所用材料的细胞密实体积（mL PCV）

原生质体活力测定：采用荧光显色法，将 0.01%的 FDA 溶液于一定浓度的原生质体溶液混合后，在荧光显微镜下观察发绿色荧光的细胞数量。按下式计算原生质体活力：原生质体活力＝有荧光的原生质体数量/总原生质体的数量×100%。

1.2.4 原生质体培养　原生质体培养采用下列两种方法：(1)液体浅层培养法。将纯化后的广藿香原生质体用原生质体培养液调整成 1×10^5～10×10^5

protoplasts · mL^{-1}的密度，于直径 6 cm 的培养皿内浅层培养；(2)固－液双层培养法。在直径 6 cm 的培养皿内倒入 3 mL 融化的含 0.5 mg · L^{-1} BA 的 MS 固体培养基(凝固剂为植物凝胶 Phytagel)，待冷凝后在上面加入 2 mL 原生质体溶液。

培养第 5 天时计算原生质体分裂频率，培养 20 d 时计算原生质体形成肉眼可见细胞团率。每个培养处理至少重复 3 次。

原生质体分裂频率＝分裂一次或以上的原生质体数/总的原生质体接种数×100%

细胞团率＝细胞团数(细胞数目 10 个以上的细胞团)/总的原生质体接种数×100%

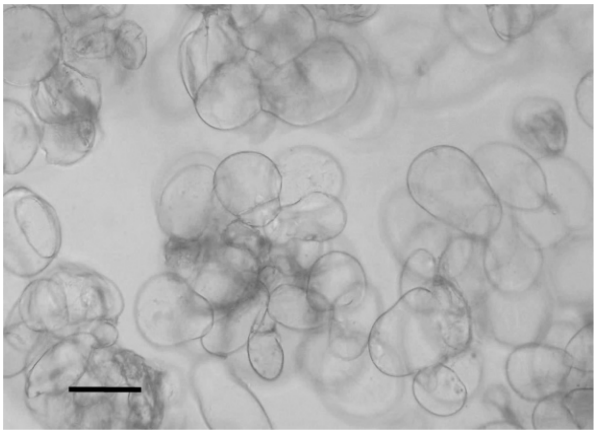

图 1　用于分离原生质体的悬浮细胞

Fig. 1　Suspend cells used for protoplasts isolation

Bar represents 50 μm. The same below.

2　结果与分析

2.1 酶液组成和酶解时间的影响

在植物原生质体分离中最常用的酶是果胶酶和纤维素酶，在广藿香悬浮细胞原生质体分离中，如果仅用果胶酶和纤维素酶，生成的原生质体往往不能从细胞团中游离出来(图 2)，添加低浓度的离析酶可以促进原生质体的解离(图 3)，因此，我们试验了不同浓度果胶酶 Y-23，离析酶 R-10 和纤维素酶 R-10 的酶液组合对广藿香悬浮细胞原生质体产量的影响。结果显示：在同一纤维素酶浓度下，原生质体的产量随着果胶酶浓度的增加而提高(图 4，酶液 1-4)；而在同一果胶酶浓度下，纤维素酶浓度的升高对原生质体产量没有提高，并且随着酶解时间的加长，原生质体产量还略有降低(图 4，酶液 5-7)。

在所试验的 7 个酶液组合中，3 号酶液作用 8 h 后，原生质体的产量最高，达到 1.65×10^6 protoplasts · mL^{-1} PCV。酶解时间超过 10 h，则因原生

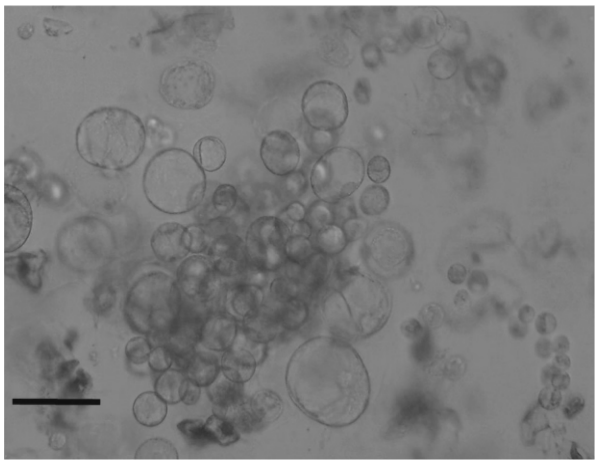

图 2　未游离的原生质体

Fig. 2　Aggregated protoplasts

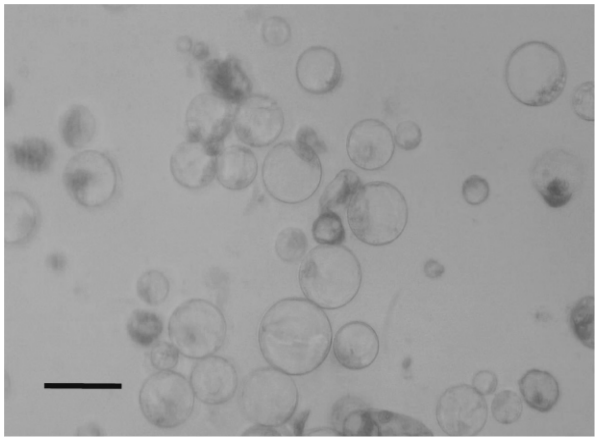

图 3　悬浮细胞解离的原生质体

Fig. 3　Protoplasts from the suspend cells

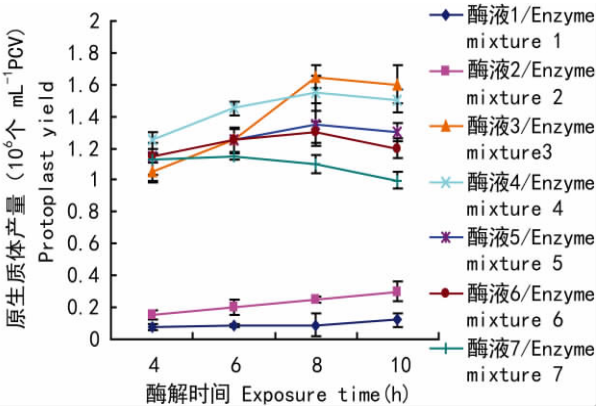

图 4　酶组合和酶解时间对原生质体分离的影响

Fig. 4　Effects of enzyme compositions and exposure time on the protoplast yield

质体破裂而使产量降低，因此，确定 3 号酶液组合（含果胶酶 0.5%，离析酶 0.2%和纤维素酶 0.8%）作用 8 h 是广藿香悬浮细胞原生质体分离的最佳条件，在以后的原生质体分离中都采用这个酶组合和酶解时间。

2.2 渗透压调节剂浓度的影响

采用 5%～13%的甘露醇附加 0.1% MES、0.02% Ca^{2+} 为渗透压调节剂，比较其对原生质体产量及活力的影响。表 2 结果表明，甘露醇的浓度过高或过低都对原生质体的产量和活力有影响。当甘露醇浓度为 11%时，原生质体的产量最高，达 1.70 $\times 10^6$ protoplasts. mL^{-1} PCV；而原生质体活力在甘露醇浓度为 9%时最大，达 86.4%（表 2）；低浓度的甘露醇虽然能获得一定产量的原生质体，但原生质体的活力很低，不利于后续的培养，综合考虑原生质体产量和活力，确定适合广藿香悬浮细胞原生质体分离的渗透压调节剂甘露醇的浓度为 9%。

表 2 甘露醇浓度对悬浮细胞原生质体产量和活力的影响

Table 2 Effects of Mannitol concentration on the yield and viability of protoplasts from the suspend cells

甘露醇浓度 Mannitol concerntration (%)	原生质体产量 Yield (10^6 protoplasts · mL^{-1} PCV)*	原生质体活力 Viability (%)
5	0.85±0.06	80.2±0.95
7	1.05±0.08	81.5±1.22
9	1.65±0.10	86.4±1.05
11	1.70±0.06	84.5±1.50
13	1.45±0.11	76.5±2.10

* Mean±SD of 3 replicates. The same below.

表 3 继代时间对原生质体产量和活力的影响

Table 3 Effects of growth time after subculture on the yield and viability of protoplasts from suspend cells

原生质体活力 Viability (%)	继代时间 (d) Growth time after subculture	原生质体产量 Yield (10^6 protoplasts · mL^{-1} PCV)*
85.5±1.05	3	1.2 ±0.09
86.5±1.13	5	1.65±0.15
85.0±1.42	7	1.60±0.16
84.0±1.11	9	1.25±0.10
82.5±0.85	11	1.0 ±0.11
75.5±2.15	15	0.5±0.05
62.5±1.92	19	0.08±0.02

2.3 继代培养时间对原生质体的影响

悬浮细胞继代培养的时间对原生质体产量的影响很大。在继代时间不超过 11 d 时，都能获得较高的原生质体产量，11 d 后，细胞活力有所下降，原生质体的产量和活力都降低（表 3），并且在解离的原生质体溶液中的细胞碎片很多。

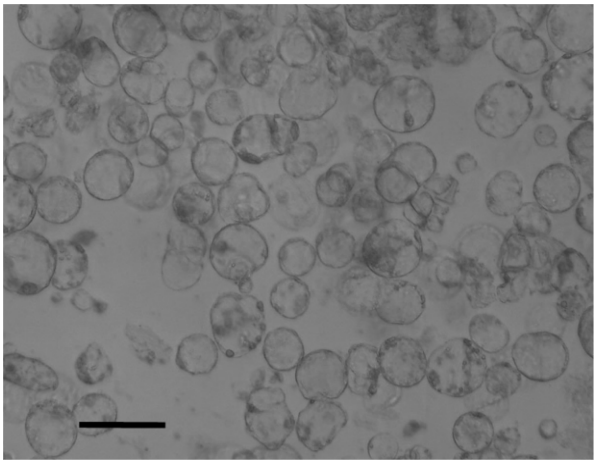

图 5 液体浅层培养 3 d 的原生质体

Fig. 5 Protoplasts in liquid layer culture after 3 days

Bar represents 100 μm

表 4 培养方法对原生质体分裂频率和细胞团形成率的影响

Table 4 Effects of culture methods and protoplasts' concentration on cell division and cell colony formation of cultured protoplasts

培养方法 Culture methods	原生质体密度 Concentration (10^5 protoplasts · mL^{-1})*	培养 5 d 时原生质体的分裂频率 Division rate (%)*	培养 20 d 时原生质体形成细胞团率 Cell colony formation rate (%)
液体浅层培养	10.5	13.5±0.08	0
固－液双层培养	1.5	0.3±0.07	0

* Mean±SD of 3 replicates

2.4 纯化方法对原生质体活力的影响

酶解结束后，经 400 目不锈钢滤网过滤，由悬浮细胞解离的原生质体即悬浮在酶溶液中。由于用悬浮细胞分离到的原生质体含的杂质不多，本试验采用简单的下沉法对分离的原生质体进行纯化，在此过程中，离心的转速对原生质体活力的影响很大，以转速 500 r · min^{-1} 离心 5 min，可以使大部分原生质体沉淀下来而杂质浮在上清液中，纯化后的原生质体活力达到 90%；而转速为 800 r · min^{-1} 离心 2 min，则原生质体很易破裂，沉淀下来的都是碎片杂质。

2.5 原生质体密度及培养方法对原生质体分裂频率的影响

本试验采用了液体浅层培养法和固－液双层培养法进行广藿香原生质体培养研究。培养 2～3 d 后，显微镜观察可见细胞体积增大，形态由圆开始拉

长，部分细胞进行第一次分裂（图 5）。在双层培养中，在固体培养基上层的原生质体密度为 1.5×10^5 protoplasts · mL^{-1}，培养 5 d 后观察到的分裂频率仅为 0.3%，而在液体浅层培养法中采用的细胞培养密度较大，约为 10^6 protoplasts · mL^{-1}，在液体浅层培养第 2～3 天时，可以看到细胞进行第一次分裂，分裂频率为 13.5%，但之后没有再看到第二、三次分裂。表 4 结果表明，原生质体密度是影响细胞分裂能力的重要因素。两种培养方法均未见到多次分裂形成的细胞团。

3　结论与讨论

本研究从广藿香悬浮细胞中分离到了高产量、高活力的原生质体，并且分离的原生质体杂质少、纯度高，表明了广藿香悬浮细胞是分离原生质体的较好材料。对影响广藿香原生质体产量和活力的多种因素的研究结果表明，最佳酶溶液组合为：果胶酶 0.5%、离析酶 0.2%和纤维素酶 0.8%，渗透压调节剂为 9%甘露醇；酶解最佳时间为 8 h；用于分离原生质体的悬浮细胞的继代生长时间也是影响产量和活力的重要因素之一，采用继代后 3～11 d 的悬浮细胞为材料，分离到的原生质体产量都能达到 10^6 protoplasts · mL^{-1} PCV，原生质体的活力达到 82%以上，可以满足原生质体进一步培养的要求。

在原生质体培养过程中，影响细胞的分裂及进一步分化形成再生植株的因素有很多，除了细胞生长所需的营养和生长调节剂，培养方法也有重要影响。在本研究中采用的两种培养方法均未能观察到细胞团的形成，与 Kageyam 等（1995）的研究中采用浅层培养的结果一样，因此，广藿香原生质体与培养环境的相互作用可能是影响其生长和分化的重要因素，下一步将探索原生质体固定化培养的方法，以提高分裂频率和细胞团形成率，最终获得再生植株。

参考文献：

广东中药志编委会. 1994. 广东中药志（第 1 卷）[M]. 广州：广东科技出版社：1 3216

任守忠，靳德军，张俊清，等. 2006. 广藿香药理作用研究进展[J]. 中国现代中药，**8**(8)：27－29

许智宏，卫志明. 1997. 植物原生质体培养与遗传操作[M]. 上海：上海科学出版社：11－19

Grezes J. 1994. Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*，**36**：91－97

Kageyam Y，Honda Y，Sugimura Y. 1995. Plant regeneration from patchouli protoplasts encapsulated in alginate beads[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*，**41**：65－70

Li W（李薇），Pan CM（潘超美），Xu L（徐良），*et al*. 2002. The observation and comparison of *Pogostemon cablin* from different habitats（不同产地广藿香特征的观察和比较）[J]. *J Chin Med Mat*（中药材），**25**(7)：463－465

Luo JP（罗集鹏），Lin YP（刘玉萍），Feng YF（冯毅凡），*et al*. 2003. Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition（广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响）[J]. *Acta Pharm Sin*（药学学报），**38**(4)：307－310

Mo XL（莫小路），Wang XG（汪小根），Qiu WF（邱蔚芬），*et al*. 2008. Plant regeneration and the quality analysis of *Polgostemon cablin* cv. Shipaiensis by plant tissue culture（组织培养法生产石牌广藿香及其质量分析）[J]. *Chin J Chin Mat Med*（中国中药杂志），**33**(7)：840－842

Qin YH（秦永华），Liu JY（刘进元）. 2006. Cotton tissue culture and plant regeneration（棉花组织培养与植株再生）[J]. *Mol Plant Breed*（分子植物育种），**4**(4)：583－592

Wu YG（吴友根），Wu LH（吴连花），He JC（何际禅）. 2010. Progress in research of the hereditary basis and biotechnology of *Pogostemon cablin*（广藿香遗传基础及生物技术研究进展）[J]. *J Trop Org*（热带生物学报），**1**(3)：288－292

Xiao W（肖望），Huang X（黄霞），Wei YR（魏岳荣），*et al*. 2008. Plant regeneration from protoplast of Musa AAB Silk 'Guoshanxiang'（'过山香'香蕉原生质体培养及植株再生）[J]. *Acta Hortic Sin*（园艺学报），**35**(6)：873－878

Xu SJ（徐颂军），Wang XF（王晓峰），Xu XH（徐祥浩），*et al*. 2003. The classification of cultivas of *Pogostemon cablin* cultivated in Guangdong Province of China（药用植物广藿香的品种分类探讨）[J]. *J S Chin Norm Univ*：*Nat Sci Edit*（华南师范大学学报·自然科学版），(1)：82－86