

金钗石斛原生质体的制备与融合

徐德林^{1#} 储士润^{1,2#} 潘胤池¹ 郑明辉¹ 钱刚¹ 陈芳² 李林^{1*}

(¹遵义医学院医学细胞生物学教研室, 遵义 563000; ²江油市第二人民医院检验科, 绵阳 621701)

摘要 以金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)再生苗的幼嫩叶片为实验材料,以原生质体活力率为评价指标,用正交试验设计对原生质体制备过程中的纤维素酶浓度、果胶酶浓度、离析酶浓度和酶解时间四个关键因素进行最佳组合筛选,发现当纤维素酶为9.5 mg/mL、果胶酶为5.0 mg/mL、离析酶为6.0 mg/mL、酶解时间为3.0 h的组合条件下,制备的原生质体活力率最高,为94.42%。在此基础上,采用高钙高pH值结合PEG4000诱导法进行原生质体融合研究,以高活力的赤水和瑞丽金钗石斛原生质体为材料,以异核体融合率为评价指标,用响应面法优化设计对原生质体融合过程中的PEG浓度、CaCl₂浓度、pH和融合时间四个因素进行最佳组合筛选,发现当PEG4000浓度为38.41%、CaCl₂浓度为0.44 mol/L、pH为9.26、融合时间为28.87 min的组合条件下,异核体融合率达到最高,为0.924%。同时,响应面法分析还发现,PEG浓度和CaCl₂浓度之间、PEG浓度和pH之间、CaCl₂浓度和融合时间两个因素共同对异核体融合率有显著影响。此外,响应面分析还发现,当pH为9.26时,PEG浓度、CaCl₂浓度和融合时间的值在一定范围内变化并不会显著影响异核体融合率的值,数值均维持在0.94%左右。该研究完善了金钗石斛原生质体制备和融合的技术体系,为金钗石斛种质资源的保护、拓展和新品种选育提供了实验材料,为其他近缘物种的相关研究提供了实验参考。

关键词 金钗石斛;原生质体制备;原生质体融合;正交试验法;响应面法

Protocols of Protoplast Isolation and Cell Fusion in *Dendrobium nobile*

Xu Delin^{1#}, Chu Shirun^{1,2#}, Pan Yinchu¹, Zheng Minghui¹, Qian Gang¹, Chen Fang², Li Lin^{1*}

(¹Department of Cell Biology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; ²Department of Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Jiangyou City, Mianyang 621701, China)

Abstract To construct the protocols of protoplast isolation and cell fusion in *Dendrobium nobile*, the tender leaves of tissue cultured seedling were used as the material. The survival rate was applied for evaluating the quality of newly harvested protoplast, four significant factors of the cellulase concentration, pectinase concentration, macerozyme concentration and enzymolysis time were screened for their optimum levels during protoplast isolation through orthogonal experiment design. It found that the survival rate could reach the highest value of 94.42% with 9.5 mg/mL, 5.0 mg/mL, 6.0 mg/mL and 3.0 h, respectively. Then the PEG 4000 was applied for inducing the

收稿日期: 2016-04-19 接受日期: 2016-06-16

国家自然科学基金(批准号: 31560079)、贵州省教育厅2014年大学生创新创业训练计划项目(批准号: 201410661007)、贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(批准号: 黔科合ZY字[2013]3002号)、遵义医学院招标项目(批准号: F-551、F-611)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0851-28609552, E-mail: lilin@zmc.edu.cn

Received: April 19, 2016 Accepted: June 16, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31560079), College Students' Innovative Training Project of Guizhou Province in 2014 (Grant No.201410661007), the Modernization and Industrialization Project of TCM of Guizhou Province (Grant No.QKH-ZY[2013]3002) and the Bidding Projects of Zunyi Medical University (Grant No.F-611, F-551)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author: Tel: +86-851-28609552, E-mail: lilin@zmc.edu.cn

网络出版时间: 2016-08-31 16:13:26 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160831.1613.008.html>

cell fusion with the method of high pH and high calcium. The heterokaryon fusion rate was selected as the assessment criteria, the main four factors of the PEG concentration, CaCl_2 concentration, pH value and fusion time were screened for their optimum levels by using the experimental design of response surface method (RSM). Through this method, the fusion rate could reach the highest value of 0.924% with four factors of 38.41%, 0.44 mol/L, 9.26 and 28.87 min respectively. Meanwhile, the RSM detected that the synergistic effects reached to the significant level of 0.05 between the PEG concentration and the CaCl_2 concentration, PEG concentration and pH, CaCl_2 concentration and fusion time. Furthermore, RSM also identified that the heterokaryon fusion rate was maintained around 0.94% when the pH value was 9.26 and the PEG concentration, CaCl_2 concentration, fusion time were varied within narrow ranges. This study improved the protocols of protoplast isolation and cell fusion in *D. nobile*, which is meaningful for germplasms' protection and development, and it also supplied a solid bases in experimental material for breeding.

Keywords *Dendrobium nobile* Lindl.; protoplast isolation; cell fusion; orthogonal design method; response surface method

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)系兰科石斛属植物,是具有多种药理功能的名贵濒危中药材^[1]。现代药理研究表明,金钗石斛具有抗辐射、抗炎、抗肿瘤、免疫调节、减缓衰老、降低血压及扩张血管的作用^[2-3]。金钗石斛茎形似发簪,花色绚丽,具有很高的观赏价值^[4]。然而,由于生长和繁殖缓慢、野生资源的生存环境遭受破坏以及被人类长期掠夺式的过度采挖,金钗石斛已成为珍稀濒危的药用植物^[5]。如何保护和拓展金钗石斛野生资源,实现金钗石斛资源可持续利用和发展成为亟待解决的问题。目前,人们常用传统杂交^[6]、诱变育种^[7]、生物技术^[8]等途径拓展金钗石斛资源品质,但操作繁琐、品种变异程度低、品质和产量难以提升,使得金钗石斛的优良品种选育工作长期徘徊不前,资源拓展和开发利用也亟待提升。近年来,细胞培养和原生质体融合技术在植物育种、资源保护和开发研究中的运用日趋成熟,已成功在水稻^[9]、苜蓿^[10]以及肿节、尖刀唇和报春三种石斛^[11]中获得了良好的效果。这些研究为金钗石斛种质资源的保护拓展和育种改良提供了新的思路,然而目前尚无关于金钗石斛原生质体融合文献资料和选育出优良品种应用于生产实践的报道。

去掉细胞壁的植物细胞即为原生质体,其具有再生完整植株的能力,是进行细胞器分离、转基因和基因功能分析等研究的理想材料,也是细胞杂交方式培育新品种的必备材料^[12]。在中药材品种筛选和改良方面,原生质体制备、融合体系的建立是中药材品质改良目的得以实现的有效途径之一。已

有的研究和本课题组的前期实验结果表明,植物原生质体制备和融合大多都建立在酶解法制备原生质体、PEG诱导原生质体融合技术之上^[13-15],而酶的组成、酶解时间和渗透剂组成是影响酶解法制备原生质体的主要因素^[16],PEG浓度和融合时间是影响PEG诱导原生质体融合的主要因素^[17]。探明这些因素对原生质体制备和融合过程的影响,并鉴定这些因素间的协同作用对结果的影响程度,是系统建立起原生质体制备和融合技术体系的重要保证。然而,关于建立金钗石斛原生质体制备和融合技术体系的报道不多^[18],现有技术体系也还不够完善,制备的原生质体产量和活力以及融合率都有待提高。

本研究选用石斛碱和总氨基酸含量高(数据未公布)的贵州赤水金钗石斛品系与植株生长健壮和抗逆性强的云南瑞丽金钗石斛品系为研究材料,取其组培再生苗的幼嫩叶片制备原生质体,进一步开展原生质体融合的技术方法探索,并运用正交试验和响应面设计对这两个实验过程中的各因素水平进行优化和最佳组合筛选,以期建立起能制备出优质原生质体和获得高融合率的原生质体融合技术方法,为金钗石斛的资源保护和种质创新奠定实验基础,也为原生质体再生及转化、植物细胞反应器构建、细胞器分离和功能分析等后续研究提供实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验材料为贵州赤水和云南瑞丽金钗石斛种子非共生萌发的无菌苗的幼嫩叶片。

实验试剂2-(N-吗啡啉)乙磺酸[2-(N-morpholino) ethane sulphonic acid, MES]购自Solarbio公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自Amresco公司; 荧光素双醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA)和罗丹明B异硫氰酸盐(Rhodamine B isothiocyanate, RITC)购自Sigma公司; PEG购自Merck公司。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂的配制 酶液: 在一干净试管中先添加0.2 mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)1.0 mL、0.8 mol/L KCl 2.5 mL、0.8 mol/L甘露醇5 mL; 加入纤维素酶、果胶酶和离析酶成分后混匀溶解, 55 °C水浴10 min; 冷却后加入10 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)1.0 mL、0.25 mol/L CaCl₂ 400 μL和100 μL双蒸水, 用0.45 μm滤器将混合液过滤至无菌培养皿中, 备用。清洗液: 将1.10 g MES、5.94 g KCl、1.48 g CaCl₂、27.5 mg KH₂PO₄、101.0 mg KNO₃、50.00 g甘露醇加入双蒸水中充分溶解后定容至1 L, 调节pH至5.85~6.05, 在121 °C、0.1 MPa高温高压湿热灭菌20 min后备用。融合液: 融合液A为质量分数为0%~80%的PEG4000、0.2 mmol/L KH₂PO₄和0.1mol/L葡萄糖; 融合液B为含0~0.8 mol/L CaCl₂、pH为5.5~11.5的甘氨酸钠缓冲液。融合液A经121 °C、0.1 MPa高温高压湿热灭菌20 min, 融合液B经0.45 μm滤器过滤至无菌培养皿中, 备用。

1.2.2 原生质体的制备和融合 原生质体的制备: 将金钗石斛幼嫩叶片放置在黑暗环境下进行低温质壁分离的预处理^[19], 添加1.2.1配制的酶液, 采用酶解法制备金钗石斛原生质体, 滴加1.2.1配制的清洗液清洗纯化后计数并检测原生质体活力。原生质体活力率的测定: 用荧光素双醋酸酯(FDA)染色法进

行测定, FDA和有活力的原生质体作用后, 细胞在蓝光下发出黄绿色的荧光, 通过计数蓝光下被染成黄绿色的原生质体个数来计算活的原生质体数^[20]。原生质体的活力率=(被染色的原生质体数/原生质体总数)×100%。平行实验3次, 每次计数3遍, 取平均值。原生质体的融合: 将以上制备的高活力的两种原生质体浓度均定容至1×10⁶/mL。用FDA和罗丹明B异硫氰酸盐(RITC)分别染色和标记赤水及瑞丽金钗石斛的原生质体, 并以1:1体积比混合滴入直径60 mm的无菌培养皿中, 先用融合液A处理0~20 min再滴加融合液B, 经过0~20 min处理后用上述清洗液洗净原生质体, 统计异核体融合率。异核体融合率的测定: RITC和原生质体作用后, 在蓝光下细胞发出红色的荧光^[21], 而FDA为黄绿色, 通过计数被两种染色剂同时染色的融合原生质体数量来计算异核体原生质体融合率。异核体融合率=异核原生质体核数/总原生质体核数)×100%。平行实验3次, 每次计数3遍, 取平均值。以上实验步骤均在25 °C左右的无菌环境下操作。

1.2.3 影响原生质体制备和融合的单因素检测 在酶液中分别添加不同种类及不同浓度配比的酶, 以不同的酶解时间制备原生质体, 筛选出不同因素下原生质体活力率最高的最佳水平。实验各因素水平按表1所示, 均在温度20 °C、转速为50 r/min的恒温摇床上震荡酶解, 每个单因素的各水平下制备的原生质体分别取样, 采用FDA染色法计数活的原生质体数, 计算原生质体活力率。

在融合液中分别添加不同浓度的PEG和CaCl₂, 调节不同pH后进行原生质体融合, 筛选出不同因素下异核体融合率最高的最佳水平。实验各因素水平按表1所示, 均在25 °C左右无菌环境下融合, 每个单

表1 单因素实验中各因素的不同水平设计表

Table 1 The levels of different factors in single factor test

因素 Factor	水平 Level								
Cellulase (mg/mL)	0	1	3	5	7	9	11	13	15
Pectinase (mg/mL)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Macerozyme (mg/mL)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Enzymolysis time (h)	0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
PEG concentration (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
CaCl ₂ concentration (mol/L)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
pH	5.5	6.0	7.0	8.0	8.5	9.0	10.0	11.0	11.5
Fusion time (min)	0	5	10	15	20	25	30	35	40

表2 正交试验设计和响应面法设计因素与水平

Table 2 The values of factors in the experiments of orthogonal design and RSM

正交试验设计 Orthogonal design	纤维素酶 (mg/mL) Cellulase concentration (mg/mL)	果胶酶(mg/mL) Pectinase concentration (mg/mL)	离析酶 (mg/mL) Macerozyme concentration (mg/mL)	酶解时间(h) Enzymolysis time (h)	响应面 法设计 Response surface method	PEG浓度(% PEG concentration (%)	CaCl ₂ 浓 度(mol/L) CaCl ₂ concentration (%)	pH	融合时 间(min) Fusion time (min)
1	8.0	2.0	3.0	1.0	-1	30	0.4	8.5	25
2	9.5	3.5	4.5	3.0	0	40	0.5	9.5	30
3	11.0	5.0	6.0	5.0	1	50	0.6	10.5	35

因素的各水平下融合的原生质体分别取样, 采用双色荧光标记法计数异核体数, 计算异核体融合率。

根据前期实验结果, 原生质体制备实验各组单因素对照的值分别按纤维素酶8.0 mg/mL、果胶酶3.0 mg/mL、离析酶3.0 mg/mL、酶解时间3.0 h的因素取值进行实验, 均在温度25 °C、转速为50 r/min的恒温摇床上震荡酶解, 采用FDA染色法计数活的原生质体数, 计算原生质体活力率。原生质体融合实验各组单因素对照的值分别按PEG浓度为30%、CaCl₂浓度为0.25 mol/L、pH7、融合时间为20 min的因素取值进行实验, 均在25 °C左右无菌环境下融合, 采用双色荧光标记并计数异核体数, 计算异核体融合率。

1.2.4 正交试验和响应面设计及验证实验 根据1.2.3单因素实验的分析结果, 设计因素纤维素酶(Cel)浓度、果胶酶(Pec)浓度、离析酶(Mac)浓度、酶解时间(Time)的取值(表2), 开展四因素三水平的正交试验, 设置3个重复, 利用极差分析法分析实验结果。在得到高活力率的原生质体后, 根据预实验

及单因素实验结果, 开展原生质体融合技术方法的响应面优化试验设计: 设计因素包括PEG浓度(S₁)、CaCl₂浓度(S₂)、pH值(S₃)、融合时间(S₄)的取值(表2), 依据BOX-Behnken中心组合法, 利用软件Design-Expert 8.0.6进行四因素三水平29组的试验设计。通过该软件进行分析, 以原生质体活力率最大为标准, 进行金钗石斛原生质体制备条件最佳组合的寻优。

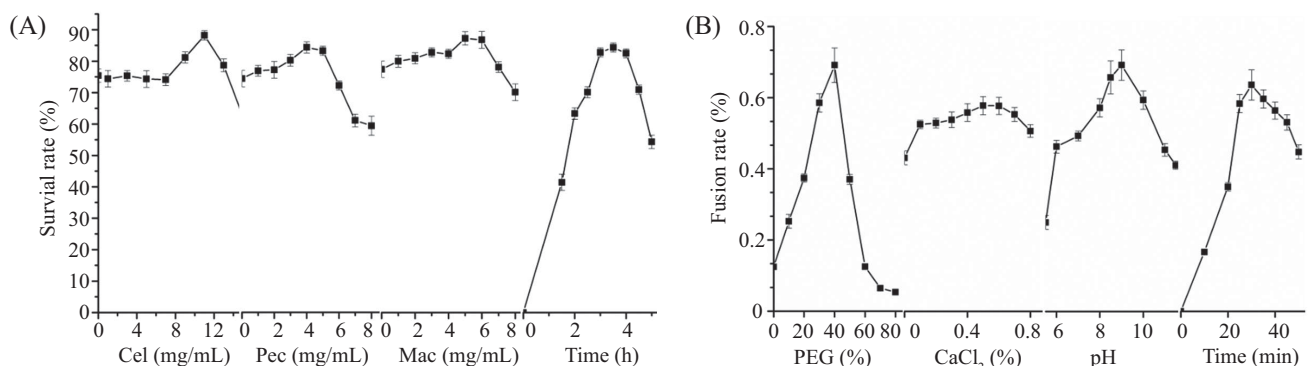
根据以上两种方法的分析结果, 对结果条件组合进行5次重复的平行实验, 验证分析方法和寻优结果的可靠性。

1.2.5 统计分析 用SPSS 19.0软件进行数据的统计分析, $P < 0.05$ 表明差异具有显著性。

2 结果

2.1 各单因素对原生质体制备的影响

对影响原生质体制备的四个主要因素进行单因素分析, 发现活力率均随各因素水平的增加均呈现先增长后降低的变化趋势(图1A)。其中, 当Cel为11 mg/mL、Pec为4 mg/mL、Mac为5 mg/mL、酶解



Cel为纤维素酶, Pec为果胶酶, Mac为离析酶, Time为酶解时间。

Cel refers to cellulase, Pec refers to pectinase, Mac refers to macerozyme, Time refers to enzymolysis time.

图1 单因素分析实验中各因素对原生质体活力率(A)和异核体融合率(B)的影响

Fig.1 The factors impact on the protoplast survival rate (A) and heterosynkaryon fusion rate (B) in the single factor test

时间3 h时, 各自的活力率达到最大值, 说明这些水平值是各因素制备原生质体的优势值。

对影响原生质体融合四个主要因素进行单因素分析, 发现异核体融合率均随各因素水平的增加均呈现先增长后降低的变化趋势(图1B)。其中, 当PEG浓度为40%、CaCl₂浓度为0.5 mol/L、pH9、融合时间30 min时, 各自的异核体融合率达到最大值, 说明这些水平值是各因素诱导原生质体融合的优势值。

2.2 原生质体制备的正交试验设计实验结果与分析

正交试验设计的实验结果表明, $k_{Cel_2} > k_{Cel_3} > k_{Cel_1}$, 即Cel₂为因素纤维素酶浓度的优水平(表3)。同理可以得出, 因素果胶酶浓度、离析酶浓度、酶解时间的优水平分别为Pec₃、Mac₃、Time₂。因而, 正交实验设计获得的制备原生质体最佳条件组合为: 纤维素酶浓度9.5 mg/mL、果胶酶浓度5.0 mg/mL、离析酶浓度6.0 mg/mL、酶解时间3.5 h, 各因素对原生质体活力率的影响大小依次为Cel、Time、Pec、Mac, 即这四个因素中, 纤维素酶浓度大小对原生质体的活力率影响最大, 离析酶的影响最小。

2.3 原生质体融合的响应面法实验结果与分析

根据响应面软件的实验设计得出的实验结果

见表4。将表4中数据使用Design-Expert 8.0.6软件进行二次多元回归拟合, 得到异核体融合率响应面模型的二次多项回归方程: $Y = -11.9509 + 0.0746S_1 - 1.3280S_2 + 1.7408S_3 + 0.2546S_4 + 0.0360S_1S_2 + 0.0034S_1S_3 + 0.0002S_1S_4 - 0.0608S_2S_3 + 0.1077S_2S_4 + 0.0004S_3S_4 - 1.6560S_1^2 - 2.9572S_2^2 - 0.0999S_3^2 - 0.0054S_4^2$ 。

对回归模型进行方差分析, 由表5可知, 模型达极显著水平($P < 0.0001$), 相关系数 $R^2 = 0.9650$, 说明该模型方程能够反映响应值, 且失拟项 $P = 0.1396 > 0.05$ 为不显著, 可以利用该模型方程对原生质体融合的条件进行预测分析和寻优。依据表5的 F 值: $F(S_1) = 5.94$ 、 $F(S_2) = 5.04$ 、 $F(S_3) = 28.74$ 、 $F(S_4) = 9.38$, 可知各因素对异核体融合率影响的大小依次为pH > 融合时间 > PEG浓度 > CaCl₂浓度, 且PEG浓度、CaCl₂浓度、pH、融合时间对金钗石斛原生质体的融合率影响都是显著的, 其中pH、融合时间达极显著性(P 值分别为0.0288、0.0414、0.0001、0.0084, 均小于0.05, 达到显著水平; 其中, 后两个 P 值小于0.01, 达到极显著水平)。此外, 通过表5分析结果可以发现, PEG浓度和CaCl₂浓度、PEG浓度和pH、CaCl₂浓度和融合时间几组因素间的协同作用对原生质体融合

表3 原生质体制备的正交试验设计实验方案及结果

Table 3 Orthogonal test scheme and the result in protoplast isolation

试验号 No.	纤维素酶水平 Cellulose level	果胶酶水平 Pectinase level	离析酶水平 Macerozyme level	酶解时间水平 Enzymolysis time level	活力率(%) Survival rate (%)
1	1	1	1	1	85.28
2	1	2	2	2	89.48
3	1	3	3	3	91.96
4	2	1	2	3	92.48
5	2	2	3	1	89.60
6	2	3	1	2	94.42
7	3	1	3	2	91.27
8	3	2	1	3	90.45
9	3	3	2	1	90.72
K ₁	266.72	269.72	270.15	265.60	
K ₂	276.50	269.53	272.68	275.17	
K ₃	271.44	277.10	272.83	274.89	
Survival rate (%)	k ₁	88.90	89.68	90.05	88.53
	k ₂	97.17	89.84	90.89	91.72
	k ₃	90.81	92.37	90.94	91.63
	Optimum level	Cel ₂	Pec ₃	Mac ₃	Time ₂
	R	8.07	2.69	0.89	3.19
	Ranking	Cel, Time, Pec, Mac			

表4 原生质体融合的响应面法实验设计方案和实验结果

Table 4 Response surface test and experimental results in protoplast fusion

试验次数 No.	PEG浓度水平(S ₁)(%) PEG concentration (S ₁) (%)	CaCl ₂ 浓度水平(S ₂)(mol/L) CaCl ₂ concentration (S ₂) (mol/L)	pH (S ₃)	融合时间(S ₄)(min) Fusion time (S ₄) (min)	实际值Y(%) Actual value Y (%)
1	40	0.6	9.5	25	0.733±0.054
2	40	0.5	8.5	35	0.732±0.074
3	50	0.5	9.5	35	0.556±0.044
4	40	0.5	9.5	30	0.897±0.094
5	40	0.4	9.5	35	0.637±0.064
6	50	0.6	9.5	30	0.726±0.064
7	50	0.4	9.5	30	0.695±0.070
8	30	0.5	10.5	30	0.585±0.072
9	40	0.4	9.5	25	0.859±0.078
10	40	0.5	9.5	30	0.924±0.108
11	40	0.6	8.5	30	0.803±0.080
12	30	0.5	9.5	25	0.678±0.074
13	40	0.5	10.5	25	0.622±0.046
14	40	0.5	9.5	30	0.893±0.092
15	50	0.5	9.5	25	0.595±0.084
16	40	0.5	9.5	30	0.920±0.107
17	50	0.5	10.5	30	0.603±0.040
18	40	0.4	8.5	30	0.847±0.086
19	30	0.5	9.5	35	0.594±0.074
20	40	0.6	9.5	35	0.727±0.040
21	30	0.6	9.5	30	0.671±0.046
22	40	0.5	8.5	25	0.718±0.064
23	30	0.4	9.5	30	0.785±0.076
24	40	0.4	10.5	30	0.764±0.084
25	40	0.5	9.5	30	0.897±0.094
26	30	0.5	8.5	30	0.739±0.070
27	50	0.5	8.5	30	0.626±0.066
28	40	0.5	10.5	35	0.643±0.054
29	40	0.6	10.5	30	0.696±0.076

也有显著影响(P 值分别为0.029 7、0.044 9、0.002 8,均小于0.05,达到显著水平)。

再依据二次回归的数学模型和表6的分析结果得到了金钗石斛原生质体制备的最佳组合条件: PEG4000浓度为38.41%、CaCl₂为0.44 mol/L、pH9.26、融合时间28.87 min,此时最大的异核体融合率模型预测值为0.462%。

当响应值 R_1 在0%~1.5%取值时,软件理论上推测出有六种方案可以使融合率达到最大值,且差异不显著(表6)。通过对方案的验证实验发现,得到的异核体融合率差异性不显著,都在0.94%左右,由此可知,影响异核体融合率的各单个因素水平在一定的范围内

组合后,都可以使异核体实际融合率达到最大值。

2.4 两种方法的验证实验结果与分析

对正交实验优化出的各因素的优水平,即最佳实验条件,进行五次平行实验的验证,发现原生质体的活力率平均值为92.67%,显著高于对照方案制备出来的原生质体90.05%的活力率平均值($P=0.015$ 6,图2B)。

对响应面法优化得到的原生质体融合最佳组合条件进行验证,得到的异核体融合率平均值为0.94%,与0.92%的预测值差异不显著,且对比用对照方案融合的异核金钗石斛原生质体融合率高,平均值为0.68%,有极显著差异($P=0.000$ 1)。结合以上结果,

表5 响应面法方差分析表
Table 5 ANOVA results of response surface test

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value
Model	0.340 000	14	0.024 000	27.44	< 0.000 1**
A-S ₁ PEG	0.005 250	1	0.005 250	5.94	0.028 8*
B-S ₂ CaCl ₂	0.004 462	1	0.004 462	5.04	0.041 4*
C-S ₃ pH	0.025 000	1	0.025 000	28.74	0.000 1**
D-S ₄ time	0.008 295	1	0.008 295	9.38	0.008 4**
AB	0.005 184	1	0.005 184	5.86	0.029 7*
AC	0.004 290	1	0.004 290	4.85	0.044 9*
AD	0.000 502	1	0.000 502	0.57	0.463 8
BC	0.000 148	1	0.000 148	0.17	0.689 1
BD	0.012 000	1	0.012 000	13.10	0.002 8**
CD	0.000 013	1	0.000 013	0.02	0.905 4
A ²	0.180 000	1	0.180 000	201.10	< 0.000 1**
B ²	0.005 672	1	0.005 672	6.41	0.023 9*
C ²	0.065 000	1	0.065 000	73.20	< 0.000 1**
D ²	0.120 000	1	0.120 000	135.36	< 0.000 1**
Residual	0.012 000	14	0.000 885		
Lack of fit	0.011 000	10	0.001 099	3.16	0.139 6
Pure error	0.001 392	4	0.000 348		
Cor total	0.350 000	28			
R ²	0.965 0				

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表6 响应面软件推测的实验方案、响应理论值及实际融合率

Table 6 The optimism values of each factor, theoretical response value and actual fusion rates inferred by the software

编号 No.	PEG浓度水平(S ₁)(%) PEG concentration (S ₁) (%)	CaCl ₂ 浓度水平(S ₂)(mol/L) CaCl ₂ concentration (S ₂) (mol/L)	pH (S ₃)	融合时间(S ₄)(min) Fusion time (S ₄) (min)	响应值R _i Response value I	实际融合率(%) Actual fusion rate (%)
1*	38.41	0.44	9.26	28.87	0.92 ^a	0.94±0.06 ^a
2	38.39	0.44	9.26	28.90	0.92 ^a	0.94±0.07 ^a
3	38.40	0.48	9.26	28.88	0.92 ^a	0.94±0.03 ^a
4	39.24	0.52	9.26	28.90	0.92 ^a	0.94±0.05 ^a
5	39.23	0.51	9.26	28.70	0.92 ^a	0.94±0.07 ^a
6	39.34	0.50	9.26	28.70	0.92 ^a	0.94±0.08 ^a

*代表响应面软件选择的最佳实验方案。相同小写字母表示差异不显著。

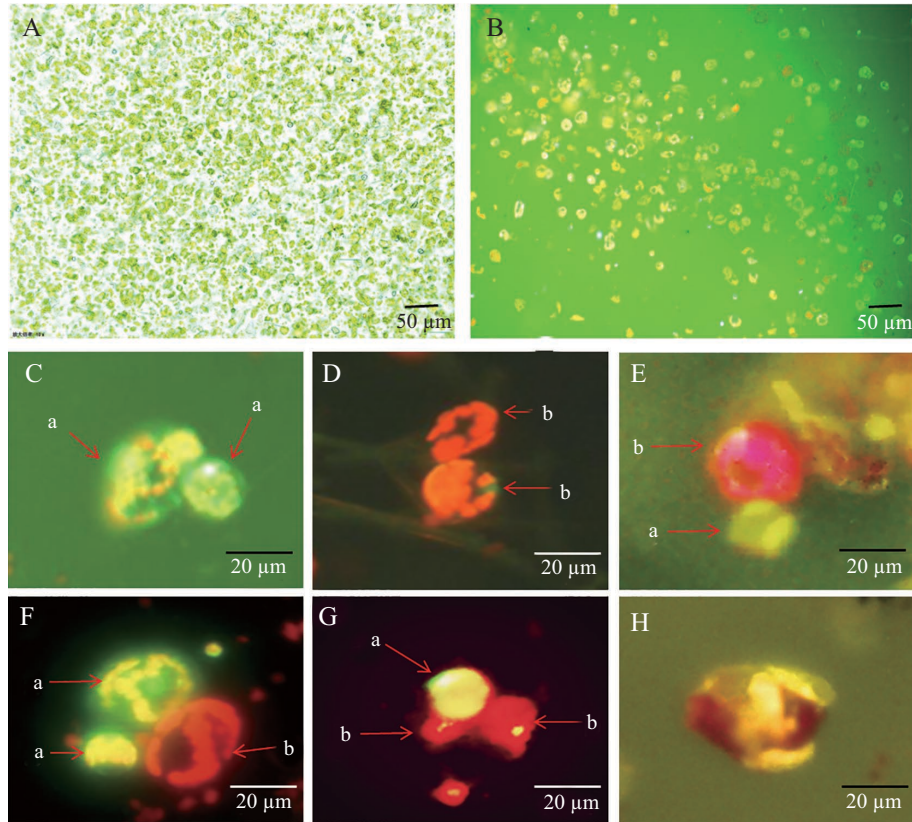
* shows the optimism values of each factor selected by the software. The same superscripts denoted no significant difference at 0.05 levels.

由图2可以看出, 响应面法优化获得的实验方案, 实验结果融合状态好(图2C~图2H), 方法有效、可行。

3 讨论

原生质体是细胞杂交、生物反应器构建、细胞器分离和基因功能分析等研究的物质基础, 也是植

物细胞工程技术应用于遗传育种的重要基础。原生质体融合技术体系的建立是准确获得满足人们需求的异核体细胞株系的重要支撑。通过科学的实验设计, 建立和完善原生质体的制备和融合体系, 制备出活力强、结构功能完整的金钗石斛原生质体, 融合得到具有两种优质品种遗传特性的细胞株, 对促进



A: 纯化后的原生质体; B: FDA染色的原生质体; C: FDA染色的两融合体; D: RITC染色的两融合体; E: FDA和RITC分别染色的双融合体; F: AAB三融合体; G: ABB三融合体; H: 多细胞融合体。a为贵州赤水金钗石斛原生质体, b为云南瑞丽金钗石斛原生质体。

A: the purified protoplasts; B: FDA-stained protoplasts; C: FDA-stained double fusion protoplast; D: RITC-stained double fusion protoplast; E: FDA-RITC-stained double fusion protoplast; F: the tri-nucleus protoplast fused by AAB; G: the tri-nucleus protoplast fused by ABB; H: coenocyte protoplast. a is protoplast of landrace Chishui and b is protoplast of landrace Ruili.

图2 原生质体染色和细胞融合

Fig.2 The protoplast stained by FDA and RITC during the processes of protoplast isolation and cell fusion

金钗石斛种质资源拓展和创新具有重要意义和应用价值, 最终将有助于金钗石斛研究的现代化和产业的可持续发展。本研究在单因素实验的基础上采用正交试验设计优化并得到了金钗石斛原生质体分离最佳条件组合, 即9.5 mg/mL纤维素酶、5.0 mg/mL果胶酶、6.0 mg/mL离析酶与3 h酶解时间, 并在此条件下制备得到了理想的高活力原生质体, 最高活力率达94.42%。并利用制备得到的高活力的两种产地金钗石斛原生质体为实验材料, 采用高钙高pH值结合PEG4000诱导两种原生质体融合, 利用单因素实验和响应面法筛选得到了异核体融合最佳条件组合, 即在38.41% PEG、0.44 mol/L CaCl₂、pH9.26、融合时间28.87 min条件下可以使异核体融合率达到较高水平。

在金钗石斛原生质体制备的研究中, 发现原生质体的活力率因纤维素酶浓度、果胶酶浓度、离析酶浓度和酶解时间四个因素的水平值不同, 受影响

程度也不尽相同(图1A)。纤维素酶浓度对原生质体活力率影响最大, 酶解时间、果胶酶浓度其次, 离析酶浓度影响最小, 可能归因于纤维素是植物细胞壁最主要的结构组成^[22]和生物功能^[23]成分, 纤维素酶对细胞壁上纤维素的酶解作用可促使细胞快速释放出具有高活力率的原生质体。实验结果发现, 酶解时间对原生质体活力率的影响和三种酶的影响情况不一样, 原生质体的活力率随着酶解时间的延长, 从0直线增长到最大值84.34%, 然后直线减小到54.35%。这可能是因为随着酶解时间的增加, 植物叶片开始释放出原生质体, 后随着时间的延长, 逐渐达到最佳酶解时间, 分离出的原生质体活力率达到最大值。然后随着时间的推移, 一方面酶对原生质体的伤害作用增大, 另一方面细胞代谢和酶解废物的增加, 会使酶解液中的有害物质浓度增加^[24], 加重了酶解时间对原生质体活力率的不利影响。本研究也同时证实, 不同种类及浓度配比的酶以及不同的

酶解时间对制备的原生质体活力有显著影响,而且添加酶的浓度过高或过低以及酶解时间过长都会造成原生质体的间接或直接的损伤和死亡,造成原生质体活力下降。由此可知,筛选出最佳的酶液组成及配比,是建立金钗石斛原生质体制备技术体系的关键因素之一。

本研究采用正交试验设计筛选影响原生质体制备的四个因素的最佳水平值,获得了最佳水平值组合,为最终建立金钗石斛原生质体制备的技术体系奠定实验基础和提供技术参考。如图2B所示,正交试验设计优化的原生质体制备条件所获得的原生质体不仅细胞碎片少、形态完整,而且原生质体活力高,能够作为原生质体融合实验的优质细胞材料。

清楚了解单因素对异核体融合率影响的有效范围,有利于在实验中快速寻找到各因素的最佳值。本研究发现,在原生质体融合研究的单因素实验中,各因素在一定范围内对原生质体的融合起促进作用,超过这个范围这种促进作用就会减弱直至转变为抑制原生质体的融合作用。实验结果表明,未添加PEG时,原生质体在高pH环境下以及高钙离子的作用下发生融合,有融合体形成,在添加PEG后,PEG加速了原生质体融合速度,接着PEG的浓度逐渐达到最佳值,异核体的融合率也达到最大值。随后PEG浓度超过最佳浓度,逐渐达到最大限度浓度,PEG对原生质体的毒害作用逐渐增强^[25],一方面造成了原生质体死亡,间接减小了异核体融合率,另一方面,PEG浓度过高致使原生质体很难接触到,降低了原生质体融合速度,直接减小了异核体融合率。当融合液未添加CaCl₂时,原生质体在PEG介导下发生了融合,添加一定浓度的CaCl₂后,CaCl₂促进原生质体融合的作用得到凸显,从而增加了异核体融合率,直到CaCl₂浓度达到最佳水平时,异核体的融合率也达到最大值。随后,CaCl₂浓度超过最佳浓度,逐渐达到最大限度浓度后,CaCl₂促进原生质体融合的作用逐渐消失直至影响并降低了原生质体融合,致使了异核体融合率的减小。因素pH和融合时间对异核体融合率的影响相似,异核体融合率都是因单因素水平达到最佳值而快速增大到最大值,后随着因素水平超过最佳值,融合率直线减小到一定的值。

本研究采用响应面法优化、筛选影响原生质体融合四个因素的最佳水平值,获得了最佳水平值组

合,为最终建立金钗石斛原生质体融合技术体系提供了基础数据及技术参考。如图3C~图3H所示,响应面法优化的金钗石斛原生质体融合条件所获得的异核体融合率高,且通过FDA-RITC双色荧光标记法的检测鉴定后,成功获得了贵州赤水和云南瑞丽金钗石斛异核细胞株(图3E)。本研究发现,pH、融合时间、PEG浓度、CaCl₂浓度对金钗石斛异核体融合率的影响程度依次减弱。清楚了解这些因素对异核体融合率的影响程度,可以最大限度、选择性地提高各因素对原生质体融合的功能,减短原生质体融合条件的筛选周期,降低原生质体融合成本,这对金钗石斛原生质体融合技术体系的构建具有指导性作用。

本文还发现,PEG浓度和CaCl₂浓度之间、PEG浓度和pH之间、CaCl₂浓度和融合时间两个因素共同对异核体融合率有显著的影响(表5)。这是因为,影响原生质体融合的作用不仅是单因素,还应考虑因素间交互作用的影响,这些因素间作用形式的存在对原生质体的融合过程起着至关重要的作用。本研究还发现,当pH为9.26,而PEG浓度、CaCl₂浓度、融合时间在一定范围值内时,得到的异核体融合率差异性不显著,都在0.94%左右(表6)。由以上结果,我们可以推测,影响原生质体融合的各因素不仅有最佳水平值和最佳条件组合,而且这些因素水平的取值还应为一个区间范围。

本研究在前人和本课题组研究的基础上,优化了原生质体制备方法,得到了纤维素酶浓度、果胶酶浓度、离析酶浓度和酶解时间四个因素的最佳条件组合,并成功获得了高活力的原生质体。在此基础上,继续优化并筛选得到了较高异核体融合率的原生质体融合方法以及PEG浓度、CaCl₂浓度、pH、融合时间最佳条件组合,并初步鉴定出两种基因型的异核体金钗石斛细胞株系。然而,对优化出来的最佳组合条件,要彻底解释其中每个因素和各因素之间的内在影响关系和机制以及对原生质体及异核体的培养和再生,还需进一步的探索研究。

参考文献 (References)

- 1 Paromik B, Suman K, Reemavareen D, Pramod T. Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene* 2014; 2: 489-504.
- 2 Zhao WM, Ye QH, Tan XJ, Jiang HL, Li XY, Chen KX, *et al.*

- Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. *J Nat Prod* 2001; 64(9): 1196-200.
- 3 Ling ZY, Fang YL. Chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium*. *China Mod Med* 2012; 19(5): 13-6.
 - 4 龚建英, 王华新, 龙定建, 陈宝玲, 陈尔, 苏莉花. 石斛观赏利用价值综合评价. *广东农业科学*(Gong Jianying, Wang Huaxin, Long Dingjian, Chen Baolin, Chen Er, Su Lihua. Comprehensive evaluation on ornamental and utilization value of *Dendrobium*. *Guangdong Agric Sci* 2015; 42(20): 19-25.
 - 5 Mohanty P, Nongkilling P, Das MC, Kumaria S, Tandon P. Short-term storage of alginate-encapsulated protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* Lindl.: An endangered medicinal orchid from North-east India. *Biotech* 2013; 3(3): 235-9.
 - 6 卓孝康, 陈燕琼, 李淑娴, 漆子钰, 彭东辉, 兰思仁. 金钗石斛♀×细茎石斛♂杂交F1代的离体快繁与试管开花(简报). *亚热带植物科学* (Zhuo Xiaokang, Chen Yanqiong, Li Shuxian, Qi Ziyu, Peng Donghui, Lan Siren. Rapid propagation of the hybrid seeds of *Den. nobile*♀×*Den. moniliforme*♂ and flowering in vitro. *Sub Plant Sci*) 2014; 43(4): 327-8.
 - 7 Vichiato MRDM, Vichiato M, Pasqual ML. Tetraploidy induction and identification in *Dendrobium nobile* Lindl. (*Orchidaceae*). *Rev Cien Agro* 2007; 38(4): 385-90.
 - 8 Lu JJ, Kang JY, Ye SR, Wang HZ. Isolation and characterization of novel EST-SSRs in the showy *Dendrobium*, *Dendrobium nobile*. (*Orchidaceae*). *Genet Mol Res* 2014; 13(1): 986-91.
 - 9 柳琳, 陈越, 钟巧芳, 余腾琼, 柯学, 程在全. 水稻原生质体制备条件的优化及其细胞壁变化的快速检测. *西北农业学报* (Liu Lin, Chen Yue, Zhong Qiaofang, Yu Tengqiong, Ke Xue, Cheng Zaiquan. Optimizing rice protoplast preparation conditions and rapidly detecting the changes of the protoplast cell wall. *Acta Agri Bor Sinica*) 2014; 23(9): 56-62.
 - 10 李玉珠, 师尚礼. 紫花苜蓿与百脉根原生质体培养及不对称体细胞杂交. *核农学报* (Li Yuzhu, Shi Shangli. Protoplasts culture and asymmetric somatic hybridization between *Medicago sativa* and *Lotus corniculatus*. *J Nucl Agri Sci*) 2015; 29(1): 40-8.
 - 11 李媛. 3种石斛再生体系研究(硕士论文). 北京林业大学(Li Yuan. Studies on regeneration system of 3 *Dendrobium* species. Beijing Forestry University), 2013.
 - 12 Tom E, Prabhu SL, Dieter D, Erik VB, Johan VH. Progress in plant protoplast research. *Planta* 2013; 238: 991-1003.
 - 13 Katarzyna Maćkowska, Jarosz A, Grzebelus E. Plant regeneration from leaf-derived protoplasts within the *Daucus* genus: Effect of different conditions in alginate embedding and phytosulfokine application. *Plant Cell Tiss Org* 2014; 117(2): 241-52.
 - 14 Mori D, Ogita S, Fujise K, Lnoue A, Sasamoto H. Protoplast co-culture bioassay for allelopathy in leguminous plants, *Leucaena leucocephala* and *Mucuna gigantea*, containing allelochemical amino acids, mimosine and L-DOPA. *J Plant Stud* 2015; 4(1): 1-11.
 - 15 彭小群, 唐然, 解新明. 禾本科植物原生质体分离研究进展. *中国农学通报* (Peng Xiaoqun, Tang Ran, Xie Xinming. Advances on the isolation of protoplast in gramineous plants. *Chin Agri Sci Bul*) 2015; 31(1): 252-7.
 - 16 Honjoh KI, Suga K, Shinohara F. Preparation of Protoplasts from *Chlorella vulgaris* K-73122 and Cell Wall Regeneration of Protoplasts from *C. vulgaris* K-73122 and C-27. *J Fac Agri Kyus Univ* 2003; 47(2): 257-66.
 - 17 Durieu P, Ochatt SJ. Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts. *J Exp Bot* 2000; 51(348): 1237-42.
 - 18 刘运权, 张翠焕, 闻真珍, 黎扬辉, 刘伟. 金钗石斛类原球茎原生质体的分离. *热带生物学报* (Liu Yunquan, Zhang Cuihuan, Wen Zhenzhen, Li Yanghui, Liu Wei. Isolation of the protoplast from *Dendrobium nobile* Lindl. PLBs. *J Trop Organ*) 2010; 1(3): 215-9.
 - 19 Volk GM, Caspersen AM. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha × piperita*. *Protoplasma* 2007; 231(3/4): 215-26.
 - 20 Xiao L, Koster KL. Desiccation tolerance of protoplasts isolated from pea embryos. *J Exp Bot* 2001; 52(364): 2105-14.
 - 21 Cassells AC, Gatenby AA. The use of lissamine rhodamine B conjugated antibody for the detection of tobacco mosaic virus antigen in tomato mesophyll protoplasts. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 1975; 30(9/10): 696-7.
 - 22 Hamann T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Fron Plant Sci* 2012; 3(4): 279-86.
 - 23 Hall M, Bansal P, Lee JH, Realf MJ, Bommaris AS. Cellulose crystallinity—a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *FEBS J* 2010; 277(6): 1571-82.
 - 24 Siqueira G, Milagres AM, Carvalho W, Koch G, Ferraz A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnol Biofuels* 2011; 4: 7.
 - 25 Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P. Effects of NaCl and osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. *Plant Cell Tiss Org* 2012; 108(2): 279-86.