

# 木本植物的原生质体培养

王善平 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所)

## 一、概 况

植物原生质体是被质膜所包围的裸露细胞,它具有再生细胞壁和持续分裂的能力<sup>[1]</sup>,这使得原生质体成为植物基因工程及植物细胞生物学研究的一个重要的实验系统。自1960年Cocking用酶法分离番茄幼苗根的原生质体获得成功,至今为止,由原生质体培养已可诱导分裂并形成细胞团或愈伤组织的植物种类已达170多种<sup>[2]</sup>,其中可再生植株的已有100多种。

近十多年来,木本植物原生质体的分离、培养及融合的研究已涉及到30个属左右。在被子植物中,继Vardi等<sup>[3-5]</sup>从柑桔珠心愈伤组织的原生质体得到了再生植株以后,近几年来已取得了较大的成功,相继从洋梨<sup>[6]</sup>、檀香<sup>[7]</sup>、杨树<sup>[8]</sup>等的原生质体得到了再生植株。但在裸子植物的原生质体培养方面仅取得了有限的进展。表1概括了木本植物原生质体培养的进展。

## 二、材料选择

一般说来,在进行原生质体培养选择材料时,需考虑两个问题,即分离原生质体的产量及其在培养中的分裂和分化能力。由于木本植物的成熟组织通常发生木质化或表皮角质化,使原生质体的游离较为困难,现在常用于游离木本植物原生质体的材料有叶片、子叶、愈伤组织及悬浮培养细胞。从现有的资料来看,由这四种材料都可以游离出大量原生质体,但其分化能力仅从叶片、愈伤组织和悬浮培养细胞

得到的原生质体中得到证实。

子叶用作分离原生质体的材料,其优点是产量较高,如David等<sup>[9]</sup>从南欧海松的子叶游离得到大量活力高的原生质体,并经培养得到愈伤组织,但未能分化出苗。

在木本植物的原生质体培养研究中,用于分离原生质体的通常是无菌苗的叶片,而不用暖房里的材料,因为暖房中的木本植物叶片一旦达到充分伸展程度时,就较难游离出原生质体<sup>[10]</sup>,而无菌苗可以通过大量扩增获得较多的幼嫩叶片,并常年获得合适的实验材料以得到大量的原生质体。

无菌苗除了比野外的植物材料具有稳定的生理状况外,由前者叶片游离出的原生质体的产量和活力也比后者的要高。Smith等<sup>[11]</sup>比较了白桦和杜鹃的无菌苗和暖房植株叶片的原生质体游离情况,发现产量要相差60倍左右,且暖房材料得到的原生质体其细胞内含物的分布高度极化,细胞器(主要是叶绿体)集中分布在原生质体的一个区域,而用幼嫩无菌苗叶片游离出的原生质体其叶绿体分布较均匀。

愈伤组织和悬浮培养细胞是目前木本植物原生质体研究中使用最广泛的材料。它们的优点是生理状态较稳定,试验重复性好,材料来源丰富,原生质体产量高,并易诱导分裂。另外,还可以借鉴组织培养的经验,对原生质体的分化潜力作出初步的估价。

无论是愈伤组织还是悬浮培养细胞,都需要较多次的继代培养后才能达到适合游离原生质体的状态,这时的细胞生长较旺盛,细胞壁的组成较简单,适合于游离且有利于以后的细

表 1 木本植物原生质体培养的进展

植物名称	材料来源	结果	文献
裸子植物			
1. 欧洲云杉( <i>Picea excelsa</i> )		细胞分裂	Stremen 等, 1981
2. 扭叶松( <i>Pinus contorta</i> )	悬浮细胞	细胞分裂	Hakman 等, 1983
3. 南欧海松( <i>Pinus pinaster</i> )	子 叶	愈伤组织	David 等, 1979
4. 花旗松( <i>Pseudotsuga menziesii</i> )	子 叶	细胞团	Kirby, 1979
被子植物			
5. 胶桤木( <i>Alnus glutinosa</i> )	叶 片	愈伤组织	Huhtinen 等, 1982
6. 灰桤木( <i>Alnus incana</i> )	叶 片	细胞团	Huhtinen 等, 1982
7. 白桦( <i>Betula platyphylla</i> )	叶 片	细胞分裂	Smith 等, 1983
8. 葡蟠( <i>Broussonetia kazinoki</i> )	叶 片	植株再生	Oka 等, 1985
9. 咖啡( <i>Coffea sp.</i> )	叶 片	细胞团	Orozco, 1983
10. 欧洲山毛榉( <i>Fagus sylvatica</i> )		细胞分裂	Ahuja, 1984
11. 枸杞( <i>Lycium chinense</i> )	愈伤组织	愈伤组织	孙勇如等, 1982
12. 杨树 <i>Populus alba</i> L. x( <i>P. grandidentata</i> Michx.)	叶 片	植株再生	Russell, 1986
13. 美洲山杨( <i>Populus tremula</i> )	叶 片	细胞团	Ahuja, 1983
14. 颤杨( <i>Populus tremuloides</i> )		细胞团	Ahuja, 1984
15. 杜鹃( <i>Rhododendron sp.</i> )	叶 片	细胞分裂	Smith, 1983
16. 檀香( <i>Santalum album</i> )	悬浮细胞	植株再生	Rao 等, 1985
17. 欧洲花楸( <i>Sorbus aucuparia</i> )	芽 尖	愈伤组织	Jorgensen, 1984
18. 榆树( <i>Ulmus 'Homestead'</i> )	愈伤组织	愈伤组织	Sticklen 等, 1985
19. 榆树( <i>Ulmus 'Pioneer'</i> )	愈伤组织	植株再生	Sticklen 等, 1986
果树			
20. 猕猴桃( <i>Actinidia chinensis</i> Planch. var. <i>chinensis</i> C. F. Liang)	愈伤组织	植株再生	蔡起贵, 1986
21. 酸橙( <i>Citrus aurantium</i> )	珠心愈伤组织	植株再生	Vardi 等, 1982
22. 柠檬( <i>Citrus limon</i> )	珠心愈伤组织	植株再生	Vardi 等, 1982
23. 葡萄柚( <i>Citrus paradisi</i> )	珠心愈伤组织	植株再生	Vardi 等, 1982
24. 柑桔( <i>Citrus reticulata</i> )	珠心愈伤组织	植株再生	Vardi 等, 1982
25. 甜橙( <i>Citrus sinensis</i> )	珠心愈伤组织	植株再生	Vardi 等, 1982
26. 苹果( <i>Malus pumila</i> )	愈伤组织	愈伤组织	Niizeki 等, 1983
27. 指桔( <i>Microcitrus sp.</i> )	悬浮细胞	植株再生	Wang 等, 1986
28. 洋梨( <i>Pirus communis</i> )	叶 片	植株再生	Ochatt 等, 1985
29. 欧洲甜樱桃 <i>Pruhus avium</i> x( <i>P. pseudocerasus</i> )	叶片及悬浮细胞	植株再生	Ochatt 等, 1987
30. 杏( <i>Prunus dulcis</i> cv. Nonpareli)	悬浮细胞	细胞团	Wu 等, 1985
31. 葡萄( <i>Vitis vinifera'</i> Kunyu')	愈伤组织	细胞团	张鉴铭, 1986

胞分裂。如孙勇如等<sup>[12]</sup>在枸杞的工作中发现, 从幼叶和茎诱导得到的愈伤组织, 每 7 天继代一次, 经过两个月以上的继代后用作游离原生质体的材料, 能够游离出大量活力高的原生质体。Sticklen 等<sup>[13]</sup>指出, 愈伤组织的继代周期及用作游离原生质体的愈伤组织的年龄可明显影响原生质体的产量及随后的生长情况。

使用愈伤组织和悬浮培养细胞来游离原生质体, 存在的问题是经过多次的继代培养, 有可能使培养材料形态发生的潜力下降, 但这个

问题可望通过选择合适的愈伤组织或用不同的起始材料发生愈伤组织而加以克服。由于木本植物通常难以终年得到大量的幼嫩叶片, 因此通过诱导建立具有分化能力的愈伤组织或悬浮培养细胞系来游离原生质体, 在木本植物原生质体培养工作中有较大的应用意义。

### 三、用于原生质体分离的酶制剂

由于木本植物的细胞壁组分与草本植物的有所不同, 因此, 在降解细胞壁时所使用的酶

液也有所不同,在游离木本植物叶片原生质体时常用一些活力特别高的酶,如 Pectolyase Y-23,这是一种很有效的果胶酶,能消化一些难以游离原生质体的组织;Onozuka RS是一种活性很高的纤维素酶,Dorion(1981)<sup>[14]</sup>试验了各种酶来游离榆树的叶片后,发现必须使用 Onozuka RS 和 Pectolyase Y-23,才能得到大量的原生质体。

另外,De Filippis等<sup>[16]</sup>在研究葡萄(*Vitis vinifera* L)的叶片原生质体分离过程中,采用三种从不同真菌提取的纤维素酶的组合后,发现分离得到的完整的原生质体大大超过了用其中任意两种酶的混合酶液所得到的,前者的产量是后者的 $10^5$ 倍,这说明这三种纤维素酶有一种协同作用,也暗示了从不同真菌提取的纤维素酶可能以不同的方式作用在植物细胞壁的不同位置上。

除了要选用合适的酶来处理木本植物组织以外,Butt<sup>[16]</sup>发现在游离木本植物叶片原生质体时,切成细条的叶组织中会释放出一些可溶性物质如羟肉桂酸、香豆素等,它们能对细胞壁结构进行修饰,从而阻止酶的进一步降解作用。Butt试验了欧洲白桦(*Betula pendula*)、胶桤木(*Alnus glutinosa*)等一系列木本植物叶片原生质体的分离情况,结果表明,要得到大量原生质体,必须在加入酶液前,对切成条的叶组织进行较彻底的洗涤,以洗去释放出的羟肉桂酸、香豆素等抑制物质。

一般在游离原生质体的酶液中还要加些无机盐,有时还要加入一些高分子化合物,以增加原生质体的稳定性。如游离洋梨叶片原生质体的酶液中即加入原生质体培养基的无机盐组分;游离榆树愈伤组织的酶液中加了CPW溶液、无机盐成分及葡聚糖硫酸钾。

游离原生质体时,还必须维持酶溶液有一定的渗透压,因此在酶液中和培养液中必须加入一定浓度的渗透剂,如甘露醇、山梨醇、蔗糖等。在木本植物中,渗透压比草本植物中用得要高一点,一般在 $0.5-0.7\text{ mol/L}$ 。

#### 四、原生质体培养

##### 1. 培养基的选择

虽然近三年来,已成功地由几种木本植物的原生质体培养得到了再生植株,但在木本植物原生质体的培养基方面仍缺乏系统的研究。在实验中,主要依靠组织和细胞培养工作积累的经验,并针对材料等实际情况进行修改。如Orozco在选用A-43培养基进行咖啡叶片原生质体培养时,由于该培养基中钾的含量较高,不利于培养,通过实验去除KCl或用 $800\text{ mg/l}$ 的 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 代替KCl,取得了较好的效果。

为诱导培养的原生质体分裂,一般而言,需外源生长素和细胞分裂素,但这与所用的材料有很大的关系。例如,由甜橙珠心组织形成的愈伤组织分离的原生质体不仅无需外加生长素,而且在很低浓度下也会引起原生质体的死亡。至于培养基中采用的激素种类、浓度与配比,从几种成功地再生植株的原生质体培养基来看,叶片来源的原生质体培养基中,大多用NAA和BA的组合,如樱桃、洋梨、葡蟠和杨树的培养基。而愈伤组织或悬浮培养细胞来源的原生质体培养基中,除了有细胞分裂素以外,一般要加入2,4-D,如檀香和榆树的原生质体培养基。

一般说来,木本植物的原生质体培养基较多地采用营养成分较齐全的培养基,这些培养基中通常含有各种有机添加物:酵母浸出汁、水解酪蛋白、麦芽提取物和椰子汁等。

木本植物原生质体培养基中的无机盐浓度和草本植物原生质体培养基中所采用的原则上基本相同,适当地提高 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 的含量而降低 $\text{NO}_3^-$ 的含量,有助于提高原生质体膜的稳定性并可促进细胞分裂<sup>[17]</sup>。另外,在某些植物的原生质体培养工作中发现,高浓度的 $\text{NH}_4^+$ 对于原生质体培养初期可能是有害的,Ochatt等在培养洋梨叶片原生质体时,在培养基中去掉了 $\text{NH}_4^+$ ,改用氨基酸作为氮源,获得了成功。

不少研究者发现在某些情况下,有机氮化物对于原生质体的分裂可起较大的促进作用。如在胶桤木的原生质体培养中,鸟氨酸和丁胺能促进细胞分裂和细胞团的形成<sup>[18]</sup>;一定浓度的谷氨酸促进花旗松原生质体的细胞团形成<sup>[19]</sup>;精氨酸和一些多胺则能够有效地诱导杏原生质体的分裂<sup>[20]</sup>。这些物质对细胞分裂的诱导作用,可能一方面对于稳定原生质体膜起了很大作用,另一方面原因是参与了某些代谢途径而促进细胞分裂。

培养基中渗透剂种类和浓度,要视具体情况而定,一般培养基中渗透压比酶液中的稍低。

## 2. 培养条件

木本植物原生质体的培养方式一般采用液体浅层培养,但也有根据不同情况采用其它方式的,如樱桃悬浮培养细胞的原生质体在培养时,需采用琼脂糖固化的固体培养基<sup>[21]</sup>。

木本植物原生质体的接种密度一般为 $5 \times 10^4$ — $5 \times 10^5$ 个/ml,这种密度的要求是细胞间相互关系的一种反映,有些细胞代谢产物对细胞的生长有利,而有些则是有害的。

木本植物原生质体培养时温度一般采用25℃左右,在培养初期都在黑暗条件下或用散射光。在细胞团形成后,尤其是在诱导器官发生时,则要加强光照,几种成功地诱导植株再生的植物,在诱导器官分化时,都用2000 lux以上的强光。

木本植物的原生质体曾经被认为是难以培养成功的一类,但近几年来,已经成功地将几种木本植物原生质体培养成再生植株,这为改良树木品种提供了一种新的技术。随着我们对木本植物生理生化过程了解的逐步深入及对原生质体培养条件的系统研究,相信在不久的将来,就会有更多的木本植物原生质体培养能够获得成功。我们可以期望通过利用原生质体进行细胞融合及用改建的Ti质粒转化植物细胞以导入外源基因等,将大大促进生物技术在本木植物改良上的应用,加速培育出一些具有优良遗传性状的林木和果树品种。

## 摘 要

木本植物的原生质体培养对于将生物技术应用于树木品种改良的研究具有重要意义,但难度较大。本文概述了近年来木本植物原生质体培养的进展,并针对木本植物原生质体培养过程中的问题进行了较详细的讨论。

## 参 考 文 献

- [1] Vasil, I. K. and V. Vasil, 1980, *Int. Rev. Cytol., Suppl.* 11B, 1—20.
- [2] 许智宏, 1986, 植物生理生化进展, 4: 15—31.
- [3] Vardi, A., P. Spiegel-Roy, G. Ben-Hayyim and E. Galun, 1982, *In: the same book as ref. 4*: 619—620.
- [4] Vardi, A., P. Spiegel-Roy and E. Galun, 1975, *Plant Sci. Lett.* 4: 231—236.
- [5] Vardi, A. and P. Spiegel-Roy, 1982, *Theor. Appl. Genet.* 62: 171—176.
- [6] Ochatt, S. J. and O. H. Caso, 1985, *J. Plant Physiol.*, 122: 243—249.
- [7] Rao, P. S. et al., 1985, *Protoplasma*, 124: 80—86.
- [8] Russell, J. A. and B. H. McCown, 1986, *Plant Science*, 46: 133—142.
- [9] David, A. and H. David, 1979, *Z. Pflanzenphysiol.* 94: 173—177.
- [10] Orozco, F. J., 1983, 6th International Protoplast Symposium, *Experientia Suppl.* 52—53.
- [11] Smith, M. A. L. and B. H. McCown, 1983, *Plant Sci. Lett.*, 28: 149—156.
- [12] 孙勇如、李文彬等, 1982, 植物学报, 24(5): 477—479.
- [13] Sticklen, M. B. et al., 1986, *Plant Science*, 47: 29—34.
- [14] Dorion, N. et al., 1983, 6th International Protoplast Symposium, *Experientia Suppl.*, 8—9.
- [15] De Filippis, L. F. and H. Ziegler, 1985, *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 180: 645—653.
- [16] Butt, A. D., 1985, *Plant Science*, 42: 55—59.
- [17] 李文彬、陈正华, 1982, 木本植物组织培养及其应用, 高等教育出版社, 110—140.
- [18] Huhtinen, O. and J. Honkanen, 1982, *Plant Sci. Lett.*, 28: 3—9.

- [19] Kirby, E. G., 1980, *Plant cell cultures: Results and Perspectives*, North-Holland Biochemical Press. 289—293.
- [20] Wu, S. C. and A. H. Kuniyuki, 1985, *Plant Science*, 41 : 55—60.
- [21] Ochatt, S. J., E. C. Cocking and J. B. Power, 1987, *Plant Science*, 50 : 139—143.

## 肿瘤细胞表面复合糖类的变化及其意义\*

周柔丽

(北京医科大学细胞生物学教研室)

细胞表面的复合糖类构成细胞外被 (cell coat) 或称糖萼 (glycocalyx)。主要包括糖蛋白、糖脂及蛋白聚糖。它们不仅在细胞的社会行为中具有重要意义, 而且对细胞的增殖、分化、代谢及功能具有调控作用。在细胞增殖的不同时相、细胞分化的不同阶段、细胞功能的不同状态、甚至在体外培养时细胞处于悬浮及附壁的不同情况下, 其表面成分均有所不同。细胞恶性变后表面发生显著改变, 并与其恶性特征相关。例如, 恶性转化细胞及肿瘤细胞的生长失控、移行增强、浸润转移、可在软琼脂中生长以及易在凝集素作用下聚集等特性, 均与细胞表面的复合糖成分在性质或数量上的异常有关。迄今所发现的肿瘤相关抗原大多为细胞表面糖蛋白或糖脂。某些致癌物或抑癌物常必须或只需与细胞表面成分作用即可产生生物效应。可见肿瘤细胞表面在癌细胞生物学中占有重要地位。复合糖则是细胞表面的重要成分。

### 一、恶性细胞表面糖脂及糖蛋白的改变

目前认为恶性细胞在化学成分上所发生的改变是量变或时、空的改变, 而非独特的质变。在细胞表面发生的事件可导致甚或控制细胞质及细胞核内的一系列的或多方面的反应。

(一) 肿瘤细胞表面抗原 肿瘤细胞表面抗原不仅对于认识肿瘤, 而且在临床诊断及治疗上都有重要意义。

1. 唾液酸化路易斯 (Lewis) a (sialo-Le<sup>a</sup>) 抗原<sup>[1]</sup>

Le<sup>a</sup> 是一种血型抗原 (见附表)。在胃肠道癌

表 肿瘤细胞表面某些抗原及其抗原决定簇

抗原	糖结构
Le <sup>a</sup>	Gal β 1→3 GlcNAc... 4 ↑ Fuca 1
sialo-Le <sup>a</sup>	NeuNAcα 2→3Galβ 1→3GlcNAc... 4 ↑ Fuca 1
Le <sup>x</sup>	Galβ 1→4 GlcNAc... 3 ↑ Fuca 1
Sialo-Le <sup>x</sup>	NeuNAcα 2→3Galβ 1→4 GlcNAc... 3 ↑ Fuca 1
GM <sub>2</sub>	NeuNAcα 2→3Galβ 1→4Glcβ→Cer
GD <sub>3</sub>	NeuNAcα 2→8NeuNAcα 2→3Galβ 1→4Glcβ 1→Cer
T 抗原	Galβ 1→3 GalNAc 21→
T-Tn 抗原	GalNAc 1→

Le, Lewis, Gal, 半乳糖; Glc, 葡萄糖, GalNAc, 乙酰氨基半乳糖, GlcNAc, 乙酰氨基葡萄糖, NeuNAc, N-乙酰神经氨酸 (唾液酸), Cer, N-酰鞘氨醇, sialo, 唾液酸化

\* 本文在 1987 年细胞膜与肿瘤学术讨论会上宣读。