

李文安

(中国科学院上海植物生理研究所)

六十年代初英国植物生理学家 Cocking 首先用酶解方法降解细胞壁, 获得了蕃茄根尖细胞的原生质体。由于酶解方法能获得遗传性状和生理性状较一致的原生质体群体, 为从植物细胞获得大量原生质体开辟了新的途径, 并已为国内外科研工作者广泛采用。现用酶解法获得原生质体的植物种类已达几十种, 国内外用原生质体培养成植株的已有十多种(表1,2)。

植物原生质体由于没有正常的细胞壁, 可用于相互融合, 进行细胞杂交, 也有利于进行

细胞器的移植与大分子物质的引入。有些植物原生质体具有再生成完整植株的能力; 采用现有的培养方法, 效率较高, 材料来源一致, 有利于进行各种试验研究。由于以上优点, 近二十年来, 对原生质体的分离培养、融合, 细胞壁的形成等进行了广泛的研究, 并被认为是细胞生物学、植物生理学、遗传学、分子生物学等学科领域中进行基础研究的好材料^[1-5]。现将有关植物原生质体分离和培养的基本技术及近年来的进展简要介绍如下:

表 1 植物原生质体培养成再生植株的条件比较(国外)

作 者	年份	植物种类	分离原生质体的组织	供体最适年龄	培养方法	植株再生途径	发 表 杂 志
Nagata 等	1971	烟 草	叶 肉	60—90天苗龄	平 板	愈伤组织→苗	<i>Planta</i> 99:12
Grambow	1972	胡 萝 卜	培 养 细 胞	2—3 个月	悬 滴	胚状体→苗	<i>Planta</i> 103:348
Durand	1973	矮 牵 牛	叶 肉	播后二三月至开花	液 培	愈伤组织→苗	<i>Z. Pflanzenphysiol.</i> 69:26
Bui-Dang-Ha, D.	1973	石 刁 柏	叶状枝嫩茎	40—60 天	液 培	愈伤组织→苗	<i>Protoplasma</i> 78:215
Kartha 等	1974	芸 苔	叶 肉	一个月苗龄	悬 滴	愈伤组织→苗	<i>Plant Sci. Lett.</i> 3:265
Poirier	1974	金 鱼 草	叶 肉	7 周苗龄	浅 层	胚状体→苗	<i>J. Exp. Bot</i> 25:(8)
Gosch	1975	颠 茄	培 养 细 胞	液体培养3—4天后取用	液 培	胚状体→苗	<i>Protoplasma</i> 86:425
Schieder	1975	曼 陀 罗	叶 肉	单倍体、双倍体植株叶片	液 体	愈伤组织→苗	<i>Z. Pflanznphysiol.</i> 76:462
Dorion	1975	石 龙 芮	叶 肉	幼叶弱光1500 lux17℃下培养	浅 层	愈伤组织→苗	<i>Plant Sci. Lett.</i> 5:325~331
Shapard	1977	马 铃 薯	叶 肉	去病毒株叶片, 9—13厘米	双 层	愈伤组织→苗	<i>Plant Physiol.</i> 60:313~316
Zapata	1977	番 茄	叶 肉	5—7周苗龄上部3—5叶	平 板	愈伤组织→芽	<i>Plant Sci. Lett.</i> 8:119~124

(续表)

作 者	年份	植物种类	分离原生质体的组织	供体最适年龄	培养方法	植株再生途径	发 表 杂 志
Reinhard nehls	1978	龙 葵	叶 肉	无菌幼苗叶	浅层和固培	愈伤组织→苗	<i>Plant Sci. Lett.</i> 12(2) 183—187
Grum Paul 等	1978	<i>S. Phureja</i> × <i>S. Chacoe- nse</i>	叶 肉	试前暗处理	浅层、固体	同 上	<i>Am. J. Bot</i> 65(5)538- 543
Hess	1979	囊龙石花	叶 肉	幼 叶	浅 层	同 上	<i>B.P.P.</i> 174:411
Le Thi- xuan	1980	拟南芥菜	培 养 细 胞	液培传代后 第 3 天取用	浅 层	同 上	<i>Z.Pflanzenphysiol.</i> 96 (1)
Shahia 等	1980	木 薯	叶 肉	7—8 厘米 叶长	平 板	愈伤组织→芽	<i>Plant Sci. lett.</i> 17:459
Kao. K. N.	1980	苜 蓿	叶 肉	幼 叶	浅 层	胚状体→苗	<i>Z.Pflanzenphysiol.</i> 91 (2)

表 2 植物原生质体培养条件比较(国内)

作 者	年份	植物种类	原生质体来源	供体最适年龄	培养方法	再生状况	发 表 杂 志
植 生 所	1976	烟 草	叶 肉	60—90天苗龄	平 板	愈伤组织→株	生物化学与生物物理 学报8(4)
蔡起贵	1977	烟 草	培 养 细 胞	3 个月左右	浅 层	"	中国科学 (4)
吴石君	1977	胡 萝 卜	培 养 细 胞	三周的愈伤 组织	液培 2—5 天 后再固体培养	"	遗传学报4(4)
李文彬	1978	矮 牵 牛	叶 肉	2—3个月苗龄	浅层、平板	"	遗传学报5(1)
孙勇如等	1979	烟 草	叶 肉	全展叶或无 菌培养幼苗叶	浅 层	"	遗传学报6(4)
李文安	1979	黄花烟草	叶 肉	60天以上苗龄	平 板	愈伤组织→ 开花株	植生学报 4
王光远	1980	黄花烟草	叶 肉	60天以上苗龄	平 板	愈伤组织→苗	植生学报6(2)
周 萍	1980	烟 草	叶 肉	2—3个月苗龄	浅 层	"	上海师大学报
吴跃武	1981	小叶旱烟	培 养 细 胞	一年以上	平 板	"	实验生物学报 14(1)
黄瑞心	1981	烟 草	叶 肉	60天苗龄以上	悬 滴	"	" "
北京植物所	1975	水 稻	花 药 细 胞	70—100 天	浅 层	数十个细胞团	中国科学 (6)
兰州大学	1977	黑 麦	叶 肉	5—6 天苗龄	悬 滴	多细胞团	遗传学报 4(3)
蔡起贵	1978	水 稻	培 养 细 胞	70—100 天	平 板	愈伤组织	植物学报 4(3)
陈柔如	1979	洋 葱	鳞 叶 包 片	叶长3—5厘米	浅 层	多细胞团	1979年山西生物学会
吴跃武	1979	甘 薯	培 养 细 胞	半年以上	平 板	愈伤组织	植物学报 (4)
颜秋生	1980	大 麦	幼 苗 叶	4—6 天苗令	平 板	细胞分裂	科学通报 (5)

一、原生质体的分离:

分离原生质体的材料可采用叶、茎、根、果实、花等组织和器官。最常用的是叶肉细胞,但不是任何一片叶子,任何种植物的叶片均能分离获得原生质体。自然条件下植物生长的条件较难掌握,植物的生理状态又难一致,往往同一种植物的同类叶片,有时会产生大量的原生质体,有时却是破碎得无法应用。因此稳定培养材料的条件,使其生理状态一致,常常成为分离叶片组织的关键。这可利用温室、人工气候室(箱)在人工控制条件下培养植物来解决。

植物的生理状态常受植株年龄、发育时期、栽培条件(温度、湿度、光照强度和长度)以及灌水、施肥等因素的影响。不同植物材料对上述条件的反应又各不相同,都应予以注意。以光照为例:有的植物如小麦幼苗在弱光下(500—1000Lux)培养者易去皮,并易获得完整的原生质体,而马铃薯则需要强光。温度一般控制在20—25℃,最好将夜温控制得更低些。湿度保持在60—80%。植物生长过程中适当地追肥有利于原生质体的分离^[6]。

1. 材料预处理与原生质体的分离

为了取得理想原生质体,常将材料取回后进行预处理再分离原生质体。采用的方法虽各有不同,但其目的均为达到获得大量而有活力的原生质体。如豌豆叶片(温室生长5—7周)分离原生质体前移放在黑暗中30小时,等到叶片使用前放入生长箱,在23—25℃、湿度45—48%、光照12小时(200—400Lux)条件下培养24小时,这种处理有利于原生质体分离^[7]。Deka等^[8]在分离水稻原生质体前,将水稻淹水数日,有利于增加原生质体数量。Takebe等于试验前一天对植物(烟草)限制水分,使叶片失水萎蔫。我们实验室则于分离原生质体前将叶片置于日光或灯光下2—3小时使叶片萎蔫,有利于撕除下表皮也有利于原生质体分离。Günter Donn^[9]在法国野豌豆(*Vicia narbonensis*)叶片分离原生质

体之前,撕去下表皮后,将叶片浸在0.45M甘露醇和5mM CaCl₂·5mM KNO₃溶液中浸泡2小时,使其质壁分离,然后再在琼脂培养基上(内加有生长调节物质)培养7—8天,再分离原生质体。虽然获得率较不预培养者为少,但由于这些细胞已经处于分生状态,能持续分裂成愈伤组织,而新鲜叶片的原生质体不能分裂,只能形成很薄的壁,解决了原生质体在培养中细胞分裂的问题。Edward^[10]在黄杉子叶分离原生质体之前,将2—4周幼苗的子叶消毒放在加有15μM 6BA和不同浓度的NAA(500, 50, 5nM)的培养基上预培养,不同时间取样分离原生质体,发现子叶预培养8—14天使原生质体产量明显增加。子叶在加有高浓度NAA(500nM)的培养基上8天,原生质体产量比对照(未预培养)增加2—5倍。从15μM 6BA和500nM NAA预培养明显的刺激子叶的生长,并得到高产的原生质体,可以看出生长速率和原生质体产量之间存在着相关,因此推想加有6BA和NAA的培养基经8天的培养改变了细胞壁的化学性质,所以更易酶解。

以上的例子说明预处理有利于原生质体分离,也有利于培养的原生质体的分裂。

除直接从植物组织获得原生质体外,用组织培养方法使叶片等外植体脱分化形成愈伤组织,又经多次继代培养形成细胞系。这种在控制条件下进行培养的方法,可以获得生理状态上较为一致的细胞群体,也是预处理的方法之一,且不受生长季节的影响。一般采用液体悬浮培养,细胞全部浸没在培养液中获得营养更为均匀。由于培养基成份、培养时间的长短会影响细胞生长和细胞壁的组成,因此培养细胞细胞壁的降解较一般嫩叶组织细胞壁困难。为了使培养细胞(包括固培和液培)比较容易分离出原生质体,一般采用短期连续继代培养方法,使细胞处在分裂旺盛时期。从国内的几篇报道中也可看出(表3)所有的培养细胞均经过2—3个月的继代培养,有利于原生质体的分离。此外,选用适当的培养基和适当比例的降

解酶也是必要的。

2. 原生质体的分离与细胞壁降解酶的种类

由于所用的植物种类、器官类型、生长的环境条件和生理状态的不同,细胞壁的组成和结构也不相同,因此所需酶的种类和数量均有不同。国际上最常用的是日本生产的纤维素酶和果胶酶(商品名为 Onozuka)。国内常用 EA₃-867 纤维素酶。从该酶的活力以及用它分离的原

生质体培养成再生植株的报道看来,EA₃-867 纤维素酶也是分离原生质体的优良酶制剂^[5]。

烟草、油菜、蚕豆、马铃薯等叶片,脱壁时需用纤维素酶和少量果胶酶。分离培养细胞和根尖细胞常用较多的果胶酶,如加速解离可采用粗制品纤维素酶 Driselase。由于花粉小孢子的壁除有纤维素外还有胼胝质,分离时需用蜗牛酶或胼胝质酶。有时在分离以上材料时常加用半纤维素酶(表 3)。

表 3 用培养细胞分离原生质体(国内)

植物名称	细胞来源	愈伤组织传代时间及次数	游 离 酶 种 类				
			果胶酶%	纤 酶 %	半纤酶%	葡聚糖硫酸钾%	甘 露 醇
水 稻	花药培养细胞	10—14 天/次 7—8 次	1.5	5.0	—	0.2	0.8 M
水 稻	"	8 天/次 20 个月	0.6	4.0	0.2	0.2	0.8 M
烟 草	单倍体株茎叶	14 天/次 5—6 次	0.8	0.5	0.5	0.2	0.8 M
甘 薯	茎 蔓	15—20 天/次 半年以上	—	2*	—	—	0.8 M
烟 草	茎	15—20 天/次 一年以上	—	2*	—	0.3	0.5 M

* 自制 EA₃-867 纤维素酶。

酶制剂的活力和纯度均影响原生质体的质量,一般采用过凝胶柱方法使酶液得到纯化。酶制剂中常含有核糖核酸酶等影响原生质体的活力。因此有人用降低保温的温度或者减少酶解时间以提高原生质体的活力。

3. 影响原生质体活力的其他因素

用酶解法降解细胞壁时,先用适当的高渗溶液使细胞处于初始质壁分离状态,有利于细胞壁分解。一般渗透压稳定剂和酶制剂一起混用,同时加上原生质膜稳定剂,如葡聚糖硫酸钾或氯化钙。常用的渗透压稳定剂有甘露醇、山梨醇、蔗糖和葡萄糖,也有用盐类,如 KCl、MgSO₄·7H₂O 等,但目前国内外由原生质体培养成再生植株的报道中未见有盐溶液作渗透压稳定剂者。从表 1 的 17 例中除油菜用甘露醇和山梨醇混合,木薯、马铃薯用蔗糖外大部分都用甘露醇。国内的报道中,烟草叶

片及培养细胞、胡萝卜根及培养细胞和矮牵牛叶片的原生质体培养成再生植株的例子中,也均采用甘露醇为渗透压稳定剂(表 2)。

二、原生质体的纯化与活力测定

原生质体纯化(净化),主要是除净酶液及酶解后溶液中原生质体之外的组织残渣(包括细胞器、碎片和未去壁的细胞)。由于酶液中常含有对原生质体有害的酶类(如核糖核酸酶、过氧化物酶);原生质体以外的物质也可能不利原生质体生长,故需一一除净。一般依据比重原理采用沉降法、漂浮法和界面法进行原生质体的纯化,其中以沉降法较为简便^[11-12]。原生质体经纯化后完整原生质体百分率增加,活力提高。

早在 1970 年 Nagata 等人发现荧光增白剂对植物细胞壁是一种特异的染料,可用以

鉴定细胞壁是否完全除净,或观察培养过程中细胞壁的再生过程。华东师大黄祥辉等^[13]首先将国产的荧光增白剂应用于染细胞壁的研究。植生所王辅德等^[14]人利用国产增白剂研究烟草、大麦、胡萝卜等原生质体细胞壁再生情况,发现不同植物原生质体再生壁的时间不同。

对原生质体活力的测定已有不少报道。例如以胞质环流判断细胞代谢旺盛^[15];有活力细胞不为 Evans 蓝所着色^[16];光合活力的测定和改变渗透压后观察原生质体大小的变化;测定氧呼吸等^[17]。Larkin 利用荧光素双醋酸脂(FDA)能出入完整的原生质膜,并在活的原生质体内脂酶作用下能分解成不能自由出入原生质膜的荧光素的特点,以荧光素在有活力的细胞中积累为标志加以断定,方法甚为简便。

三、原生质体培养

原生质体培养是脱去细胞壁的裸露细胞,再重新长出细胞壁,在有壁的情况下细胞开始分裂,并持续分裂成细胞团,再诱导分化出芽和根直至形成完整植株。其培养方法可概括为两大类,即固体培养和液体培养。

固体培养即平板法

(1) 将浓度加倍的洋菜培养基溶化后待冷至 45℃与制备好的等量原生质体悬浮液共同倾入培养皿内,迅速而轻微的摇动使原生质体均匀分布在洋菜中。

(2) 原生质体在液体培养基中培养一段时间后,再转移到固体培养基,使其继续生长分裂。

液体培养法

(1) 悬滴法 将原生质体悬浮液滴入培养皿盖内,每滴量 5—10 微升^[18]、100—200 微升^[7],随着皿面的增大而增加滴数,每滴之间保持一定距离,为减缓悬滴的蒸发,培养皿中放入低于培养液浓度的液体,然后再将滴有原生质体的皿盖稳妥地翻转盖于培养皿上,封口培养。悬滴培养具有用材少、生长快、不易污

染的特点。它还有利于低密度培养和多滴排列法的试验。最近上海植生所采用悬滴法已将烟草叶肉原生质体培养成再生植株。

(2) 浅层液体培养 将制备好的原生质体悬浮于液体培养基,置于培养皿或三角瓶中,保持浅浅一层(一般 50 毫升三角瓶放入 3—5 毫升),培养初期经常摇动(2—3 次/日),避免原生质体沉积于皿底。

(3) 液体静置培养 与浅层法相同,但不摆动。

(4) 双层法 也是液体培养的一种,即将悬浮原生质体置于已固化的培养基上,方法程序与浅层法培养相同。

(5) 纤维支持法 在 3.5 厘米的培养皿中,铺上 0.5 毫米厚度的聚脂羊毛(纯 100%),加上 1 毫升的密度为 $5-50 \times 10^4$ /毫升原生质体悬浮液,使原生质体分散在多聚脂纤维中,此法有利于杉(乔木)子叶原生质体的培养和分裂,12 天后能观察到细胞团^[10]。

以上两类培养方法中,一般均为低光强(或漫射光下)进行培养,温度 25—28℃,注意保湿。

在影响原生质体培养的因素中,培养基也是很关键的。目前有许多植物可以获得大量原生质体,但培养过程中不见细胞分裂,或 1—2 次分裂后即停止不前。因此尚有许多植物原生质体未能培养成再生植株。故除常用的培养基外,对培养基外加成分进行了研究。Galston (1980)的研究表明多胺(丁二胺、戊二胺、亚精胺)在谷类原生质体培养中起着重要作用。通常禾谷类原生质体不但不能分裂,而且在几天内细胞老化或呈现病态,但加入 1—10 mM 多胺能稳定原生质体,阻碍叶绿体的降解并引起有丝分裂。证明多胺可阻止原生质体培养时 RNA 酶和蛋白酶增加,阻止叶绿体破坏。阻止或延缓因叶片离体后加速失去的 RNA、蛋白质和叶绿素。Donn^[9]研究证明培养基中加有白羽扇豆韧皮部提取液(即天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸的混合液),提高法国野豌豆原

生质体分裂率达20%。如果培养基中只加入天门冬酰胺,增加细胞分裂数的比例超过三种混合液,并发现丝氨酸(浓度2—1mM)对原生质体有毒害。可见加入一些多胺等有机物可促进细胞分裂,对一些难以培养成功的原生质体值得借鉴。

原生质体的培养进展较快,自1971年 Nagata 等人培养烟草叶肉原生质体成植株以来,已有17种高等植物原生质体培养成再生植株,从高等植物草本到低等植物地钱类均有。成功例子对乔木的原生质体培养亦有报道。但尚未见到主要作物如禾谷类、棉花等成功的例子。这些作物原生质体分裂率较低,须加强研究以争取早日突破。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦, 1980. 自然杂志, 1979 年鉴, 1. 54-72.
- [2] 钱迎倩, 1977. 植物学报, 9(4): 297-305.
- [3] 李文安, 1979. 植生通讯, 3: 50-57.
- [4] 上海植物生理研究所细胞生理室, 1973. 植物学报, 15(2): 285-307.
- [5] 植物生理所细胞杂交组, 1977. 遗传学报, 4(3): 233-247.
- [6] Watts, J. W. et al. 1974. *Ann Bot* 38: 667-671.
- [7] Constable, F. 1975. In "plast Tissue culture methods" Gamborg O. L. matter L. R (eds) OHawa Mational Rescarck Couneil of canda 11-12.
- [8] Deka, C. et al. 1976. *M. G. G.* 165(4): 239-242.
- [9] Donn, G. 1978. *Z. Pflanzenphysiol* 86: 65-67.
- [10] Edward. 1979. *Plant Sci Lett.* 14: 145-154.
- [11] Larkin, P. T. 1976. *Planta.* 128: 213-216.
- [12] Haghes, B. G. 1978. *B. P. P.* 172(1.2): 67-77.
- [13] 黄祥辉等, 1980. 植物生理学报, 6(2): 207-211.
- [14] 王辅德, 1981. 植生通讯, 1: 59-60.
- [15] Raj, B. J. M. Herr 1970. *Exptl Cell Res.* 64: 479-480.
- [16] Glimelius K. et al. 1974. *Physiol. Plant.* 30: 564-569.
- [17] Taiz, L. R. L. Jones 1971. *Planta.* 101: 95-100.
- [18] 黄瑞心等, 1980. 实验生物学报, 14(1): 15-21.
- [19] Galston, A. W. et al. 1980. 北京国际分子生物学会文摘.
- [13] Humphreys, R.E., et al. 1976. *J. Exp. Med.* 144: 98-112.
- [14] Bergholtz, B.O., et al. 1978. *Scand. J. Immunol.* 8: 63-73.
- [15] Quaranta, V., et al. 1980. *J. Immunol.* 125: 1421-1425.
- [16] McKinney, T.K., et al. 1980. *Exp. Hematol.* 8: 709-716.
- [17] Ng, A.K., Zhang, Y.H., et al. 1981. *Cell. Immunol.* (待发表)
- [18] Albrechtsen, D. 1977. *Scand. J. Immunol.* 6: 907-912.
- [19] Ko, H.S., et al. 1979. *J. Exp. Med.* 150: 246-255.
- [20] DeWolf, W.C., et al. 1979. *J. Immunol.* 122: 1780-1784.

(上接第 43 页)

- [6] 张友会等, 1981. 中华医学杂志(即将发表).
- [7] Hersh, E. M. and Harris, J.E. 1968. *J. Immunol.* 100: 1184-1194.
- [8] Cline, M.J. and Swett, V.C. 1968. *J. Exp. Med.* 128: 1309-1325.
- [9] Geha, R.S., et al. 1979. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 76: 4038-4041.
- [10] Breard, J., et al. 1979. *Cell. Immunol.* 45: 108-119.
- [11] Stouwe, V. 1977. *J. Exp. Med.* 146: 1809-1814.
- [12] Rosenthal, A.S., et al. 1976. in "Immunobiology of the Macrophage" (ed. D. S. Nelson), Academic Press, pp 131-160.