

植物体细胞杂交参考资料

第一集

科学出版社

植物体细胞杂交参考资料

第一集

中国科学院植物研究所细胞组译

科学出版社

1974

内 容 简 介

本参考资料选译了二十七篇有关植物体细胞杂交的文章。内容包括制备、提纯纤维素酶和获得原生质体的方法,由烟草、胡萝卜、矮牵牛等植物的单个原生质体发育成完整植株,诱导种间原生质体的融合和由烟草种间杂交的原生质体成功地培育成杂种植株等。此外还包括一些基本理论的研究。这些资料反映了国外近年来有关植物体细胞杂交工作的进展情况。可供植物学科研人员、植物育种工作者和高等院校师生参考。

植物体细胞杂交参考资料

第一集

中国科学院植物研究所细胞组译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1974年8月第一版 开本:787×1092 1/16

1974年8月第一次印刷 印张:6 3/4 图版:19

印数:0001—6,050 字数:154,000

统一书号:13031·217

本社书号:367·13—10

定价: 1.50 元

目 录

分离植物原生质体和液泡的一种方法·····	E. C. Cocking (1)
燕麦(<i>Avena</i>)胚芽鞘的原生质体·····	A. W. Ruesink, K. V. Thimann (3)
分离的番茄果实原生质体细胞壁的再生·····	····· E. Pojnar, J. H. M. Willison, E. C. Cocking (11)
用纤维素酶和果胶酶混合液分离大量叶片原生质体的一个简单方法·····	····· J. B. Power, E. C. Cocking (18)
用纯化的商品纤维素酶从液体培养的植物细胞中产生原生质体·····	····· R. U. Schenk, A. C. Hildebrandt (19)
从龙葵(<i>Solanum nigrum</i> L.) 胎座细胞分离出原生质体 ·····	····· B. Raj, J. M. Jr. Herr (23)
分离的植物原生质体的融合 ·····	J. B. Power, S. E. Cammins, E. C. Cocking (29)
从大豆原生质体新形成细胞的分裂·····	K. N. Kao, W. A. Keller, R. A. Miller (33)
分离的烟草叶肉原生质体中细胞壁的再生和细胞分裂 ···	T. Nagata, I. Takebe (35)
<i>Torenia baillonii</i> 和蓝猪耳(<i>Torenia fournieri</i>) 花瓣原生质体的种内及种间的 融合·····	I. Potrykus (40)
从烟草分离的叶肉原生质体再生成完整的植株·····	····· I. Takebe, G. Labib, G. Melchers (42)
植物原生质体的融合·····	J. B. Power, E. C. Cocking (45)
从离体培养的单倍体原生质体获得植株·····	J. P. Nitsch, K. Ohyama (57)
从大豆和 <i>Haplopappus gracilis</i> 原生质体再生细胞的分裂·····	····· K. N. Kao, O. L. Gamborg, R. A. Miller, W. A. Keller (60)
培养的玉米, 旋花属(<i>Convolvulus</i>) 和洋葱原生质体的“出芽”及细胞核分裂··	····· S. B. Bawa, J. G. Torrey (62)
在琼脂培养基上平板培养分离的烟草叶肉原生质体·····	T. Nagata, I. Takebe (67)
胡萝卜悬浮培养细胞的原生质体的细胞分裂和植株发育·····	····· H. J. Grambow, K. N. Kao, R. A. Miller, O. L. Gamborg (72)
从矮牵牛的单个原生质体形成愈伤组织·····	I. Potrykus, J. Durand (76)
制备植物原生质体的一个较简单的方法 ·····	L. Schilde-Rentschler (78)

分离的高等植物原生质体对细菌的摄取	M. R. Davey, E. C. Cocking (80)
从谷物叶片分离原生质体	P. K. Evans, A. G. Keates, E. C. Cocking (82)
✓ 超性的种间植物杂交	P. S. Carlson, H. H. Smith, R. D. Dearing (85)
从花粉四分体分离原生质体	S. S. Bhojwani, E. C. Cocking (89)
从胡萝卜分离的原生质体所发生的胚状体	T. Kameya, H. Uchimiya (91)
无机盐对芸苔属 (<i>Brassica</i>) 根和叶片原生质体融合的影响	 T. Kameya, N. Takahashi (93)
在分离的烟草叶肉原生质体中质膜的精细结构	 J. Burgess, J. W. Watts, E. N. Fleming, J. M. King (95)
从矮牵牛的原生质体生长植株	J. Durand, I. Potrykus, G. Donn (100)

分离植物原生质体和液泡的一种方法

E. C. Cocking

随着用酶分解细胞壁分离出细菌^[1]和真菌的原生质体^[2,3], 推测用纤维素酶处理也可能从植物细胞获得原生质体。为了进行研究选择了番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. Sutton's 'Best of All') 幼苗的根尖, 并采用了从 *Myrothecium verrucaria*^[4] (加拿大国家研究委员会 D. R. Whitaker 博士热心供给的) 获得的真菌纤维素酶。

生长在无菌条件下的番茄幼苗的 0.5 厘米长的根尖在 27°C 用 5% 的 *Myrothecium* 纤维素酶处理, 而纤维素酶是溶在含有 0.6M 蔗糖作为渗透平衡剂的 0.02M 的磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 中。封在盖玻片下的根尖的显微镜观察表明, 用纤维素酶处理 2 小时后形成许多圆形原生质体。可以鉴别出两种类型的原生质体。一种是没有液泡化的 (图版 I 图 1), 可以看出是从根尖的没有液泡化的分生组织区的细胞形成的。另一类型的原生质体是具有一个或更多液泡的 (图版 I 图 2), 而是从根冠约 1 毫米的地方液泡化了的细胞形成的。在释放以前可以看见这些液泡化了的原生质体仍然留在部分被消化了的细胞壁以内, 而显然由于高渗缓冲的蔗糖而发生的细胞质壁分离有助于完整无损的液泡化原生质体迅速分离。

这些液泡化了的原生质体在 0.3M 蔗糖 (0.02M 磷酸盐缓冲液, pH6.0) 中至少在 27°C 6 小时内是稳定的。但是, 当悬浮在 0.1M 蔗糖 (0.02M 磷酸盐缓冲液, pH6.0) 时, 很快的分解作用随即发生了, 质膜破裂而伴随着无损而膨胀的液泡和原生质内含物一块释放出来。在图版 I 图 3 中表示被液泡膜包围着并粘附着原生质物质的一堆典型的这样分离出来的液泡。值得注意的是, 原生质体不是从根尖具根毛的较分化区的细胞形成的。从这一区的细胞不能分离出原生质体可能与细胞壁的不同状态^[5] 和联系着相邻细胞原生质体的胞间连丝的存在^[6] 有关。

表示在图版 I 图 2 的液泡化结构显然是象根据 Brenner 等^[7] 的标准所规定的原生质体, 因为它们是从处于细胞壁内和能够从细胞壁质壁分离开来的那部分细胞形成的结构。表示在图版 I 图 1 的未液泡化结构, 根据同样标准来确定这些结构事实上是原生质体是较困难的, 因为它们是从分生组织细胞形成的, 在这些细胞中的细胞壁和原生质体极其密切地相连^[5] 而不容易质壁分离^[8]。尽管如此, 在纤维素酶处理的根尖中, 以及在纤维素酶处理而用乙二胺四醋酸^[9] 作用后, 从根尖分离的单个未液泡化的细胞中, 都能观察到在没有达到最后的圆形以前, 这些未液泡化细胞的细胞壁被消化的各种时期。

参 考 文 献

- [1] Weibull, C., *Ann. Rev. Microbiol.*, 12, 1 (1958).
- [2] Eddy, A. A. and D. H. Williamson, *Nature*, 179, 1252 (1957).
- [3] Bachmann, B. H. and D. M. Bonner, *J. Bact.*, 78, 550 (1959).
- [4] Whitaker, D. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 43, 253 (1953).

- [5] Preston, R. D., *The Molecular Architecture of Plant Cell Walls* (Chapman and Hall, London, 1952).
- [6] Meeuse, A. D. J., *Bot. Rev.*, **7**, 249 (1941).
- [7] Brenner, S., Dark, F. A., Gerhardt, P., Jeynes, M. H., Kandler, O., Kellenburger, E., Klieneberger-Nobel, E., McQuillen, K., Rubio-Huertos, M., Salton, M. J. R., Strange, R. E., Tomesik, J. and C. Weibull, *Nature*, **181**, 1713 (1958).
- [8] Benner-Clark, T. A., in *Plant Physiology*, edit. by Steward, F. C., **2** (Academic Press, 1959).
- [9] Cocking, E. C., *Biochem. J.* (in the press).

(译自 *Nature*, **187**: 962, 1960)

燕麦 (*Avena*) 胚芽鞘的原生质体

A. W. Ruesink, K. V. Thimann

摘 要

去了表皮的燕麦胚芽鞘在浓的 *Myrothecium* 纤维素酶中, 产生具有活力的细胞质流动的圆形原生质体。每一细胞一般产生一个这样的原生质体。当降低外面的渗透力或当放在去垢剂或核糖核酸酶时原生质体破裂。但是, 它们对于单独或结合的解酞酶和解脂酶是稳定的, 而因此一个关键性的结构成分可能是 RNA。它们表示对 IAA 没有可见的反应。

从高等植物的组织中去掉细胞壁所产生的生活原生质体对于进攻许多长期的问题, 象水分平衡、壁的形成、离子传递和膜的结构等提供很好的实验材料。直到最近, 这样的制备品只能用撕开强烈质壁分离的组织 (一般从洋葱^[1,2]) 的这种辛苦的、低产的程序, 或从自然失去细胞壁的成熟果实的大而退化的细胞^[3,4]才能得到。Cocking (1960)^[5] 成功地用 *Myrothecium verrucaria* 纤维素酶消化番茄根组织来完成原生质体的制备。1962 他曾报道, 这些原生质体在 10^{-7} 毫克/升的吲哚乙酸 (IAA)^[6] 中迅速地破裂。本文描述了用同样消化技术, 从燕麦胚芽鞘中制备原生质体, 燕麦胚芽鞘是一种对 IAA 的量的反应已广泛地研究过并了解得较透彻的一种组织。这些胚芽鞘原生质体好象是在极好的生理状态, 而曾观察到它们在去垢剂和各种水解酶中的行为, 可以看见哪些大分子对于原生质体的完整是主要的。它们对 IAA 的反应也作了一些初步观察。

酶 的 制 备

由于发现商品来源的纤维素酶对于溶解天然的植物纤维素是太弱了, 以下的制备是从 Whitaker 等修改的^[7]。从 Mass., Natick, Quartermaster 实验室获得的 *Myrothecium verrucaria* 460 的培养是生长在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上^[8]直至随着很好的菌丝生长而产生了孢子, 一般约 8 天。加消毒蒸馏水, 菌丝破裂, 而内含物倒入 500 毫升含有 0.5 克葡萄糖和 5 克纤维素 (瑞典 Grycksbo, Grycksbo Pappersbruk, Munktell's 纤维素粉) 的 Whitaker 盐培养基中^[9]。在 22°C 强烈往返摇动 14 天, 结果在培养基中发生将近最高量的纤维素酶。过滤以后, 将溶液放在 43°C 下减压蒸发两小时到 40 毫升。蒸发不会引起纤维素酶活性的消失, 如在羧甲基纤维素中用粘性的变化所测定的 (表 1)。纤维素酶用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在 2°C 沉淀, 出来的 35—70% 饱和的部分重新溶解在 1—2 毫升的蒸馏水中 (得到完全溶液所需要的最小量), 而在 2°C 用 1.3×11 厘米 Sephadex G-25 柱去盐, 用 0.1% NaCl 保持离子强度和防止粘合。具活性的纤维素酶迅速通过柱中的前流 (front running) 褐色色素带, 离子和某些色素被保留下。一般收集 3 个 1 毫升部分; 这些部分通过反复冰冻和融

化,然后冰冻起来并保持活性达6个月之久。表1表明,这种洗出液实际上达到了全部的最初活性。

表1 从真菌滤液分离的纤维素酶活性*

	特殊活性 (单位/毫升)	总 活 性
480 毫升滤液	79	38,000
40 毫升浓缩液	1,000	40,000
(NH ₄) ₂ SO ₄ 分部的部分		
0—35%		2,000
35—70%	20,000	30,000
上清液		3,000
Sephadex 洗出液 3 毫升的最活跃的 1.0 毫升	13,000	13,000

* 单位是任意的并根据粘度测定法的试验。

程 序

燕麦 *Avena sativa*, var. "Victory" 的去壳种子浸泡两小时,播种在湿的擦脸纸上,并暴露在红光下24小时。然后把它们放在具间歇暗淡红光的25℃黑暗中直至胚芽鞘25毫米长——约种后70小时。为了增进纤维素酶的渗透,在暗淡的红光下用珠宝商的精致镊子从每个胚芽鞘的基部到尖端撕下4—6完整条以去掉表皮细胞。然后从剩下的组织切5毫米顶端下的切片并去掉初生叶。把这样的两个切片切成1平方毫米的块并放在如上制备的50微升酶溶液和50微升的1.0M甘露糖醇所组成的酶-甘露糖醇混合液中。在大多数情况下不加缓冲剂,虽然当要求缓冲时,在pH6.5的0.025M NaH₂PO₄是合适的。在暗中25℃放1小时后,轻轻搅动管子以增进消化。这个操作和所有以后的操作都是在暗淡的绿光下完成的。消化作用是在1—2小时后以加2毫升0.5M甘露糖醇结束。使原生质体下沉10分钟后,吸去顶上约1.0毫升的溶液并用同样方法再一次洗原生质体。

为了决定某一细胞释放出单个的原生质体及在胚芽鞘切片中所有不同大小的细胞都产生原生质体,把4个去皮的切片分成二份而将每一个的一半在0.5M甘露糖醇中质壁分离,另一半用于如上述的制备原生质体。测定了180个原生质体的直径并以假定原生质体是完全球形的计算了体积。同时,测定了其他一半的表皮下层的114个细胞质壁分离了的内含物的长度和直径以及用假定细胞是两端微圆的圆柱来计算它们的体积。也测定了每一细胞壁的长度,因此所包括的细胞的渗透势就能够用Plasmometric方法来计算^[10]。

为了决定生存者,用10微升吸移管转移50—400个原生质体到平底的回玻片上,回玻片的制备是压4层厚的2厘米石蜡环在温热的显微镜载玻片上。应用硅滑润油的薄环到载玻片上正好在石蜡环之内以防止液体被石蜡下毛细管作用所吸出。加细胞并盖上盖玻片以后,在相差下(150×)系统地扫描整个凹陷以决定好的原生质体的数目,记录那些显示球形和光滑表面的。用一块绿色干涉滤光片在显微镜的灯上。决定最初的数目以后,小心地加10微升试验溶液到载玻片上,并在一定间隔时间计算原生质体数目直至两小时。除以上的记录外,在一些实验中对于细胞质有组织的流动在放大300倍中检查了25—50个有代表性的原生质体。如愿意的话,可降低溶液的渗透势,加10微升的0.2M甘露糖醇到载玻片上的溶液中以产生最后0.4M浓度。

确定了以下的酶对于原生质体生存的影响：胰蛋白酶——Worthington, 亲液的, 无盐的, 结晶的; pronase——Calbiochem, B 级; 麦芽脂肪酶——Worthington; 胰脂肪酶——Worthington PLII; 细菌磷酸脂肪酶 C——Worthington PHL-C; 白菜磷酸脂肪酶 D——Koch-Light 实验室; 胰核糖核酸酶-A——Sigma, 5 x 再结晶的, 1-A型。

原生质体的形成

圆柱形胚芽鞘细胞无例外地产生圆形而不坚固的原生质体(图版 II A 图 1)。所有原生质体都含有被细胞质围绕的一个大的液泡或许多小的液泡, 细胞质看来是十分粘滞的, 具有少许明显的布朗运动。在生活的原生质体中, 有力的胞质环流一般是明显的, 或作为细胞质片围绕着一个大的中央液泡流动或作为狭的细胞质流通过较小的液泡间的间隔滑动。大的质体是普通的, 而线粒体大小的密相颗粒是普遍存在的。有一些标本含有少许裸露的液泡形成体, 由于它们缺少密相细胞质而容易区分开。图 2 表明在 0.5M 甘露糖醇中质壁分离的细胞和分离出来的原生质体的细胞质体积的相应分布。注意原生质体是从体积有大幅度变化的细胞中产生的, 并注意数目上的相关性对于较大体积来说是很好。这种相关性和视力观察很相符合, 即在每一个质壁分离的胚芽鞘细胞中的细胞质几乎总看见是一单个的质团, 可期望它产生一单个的原生质体。过多数目的很小原生质体大概是偶然观察到的从一个很小的圆体(一般不包括在原生质体的计数内)爆破的原生质体重新组成的结果, 有时具有液泡和明显正常的胞质环流。不象细菌, 所用的胚芽鞘的年龄实质上表明没有细胞分裂^[11]。

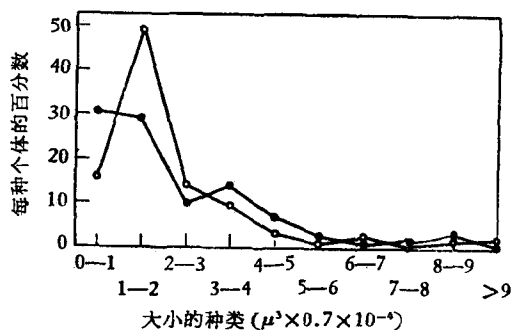


图 2 具有特殊体积的细胞内含物个体数目的比较。空圈, 在 0.5M 甘露糖醇中质壁分离的完整的细胞; 实圈, 同样 4 个切片的另一半的原生质体。

在 0.5M 甘露糖醇质壁分离的细胞中, 发现原生质体的体积对细胞的体积的比例是 0.92。在完整的胚芽鞘细胞中平均渗透势是 0.46M 或约 11 大气压。

原生质体对处理的反应

原生质体暴露在一般渗透维持剂(osmoticum)中的 0.02M NaOH 或 HCl 中, 在 15 分钟内引起 50% 破裂。降低渗透浓度到 0.25M 甘露糖醇, 5 分钟内引起 80% 破裂。当在一载玻片上将 1 份 0.5M 尿素或甘油溶液和等量的在 0.5M 甘露糖醇中的原生质体相混合, 一小时后生存的原生质体的百分数降低到 50%, 指出这些溶解物迅速的进入; 用葡萄糖, 下降就只有 5—10%。蔗糖可以满意地稳定原生质体, 但是不方便, 因为它的较大密度引起了原生质体的漂浮。

表 2 表示, 随着暴露到许多水解酶中所观察到的生活的原生质体和细胞质的流动。在水解酶中消化一小时, 生存者只稍稍降低; 流动的降低可能由于它们通过质膜透入而没

表2 生存的原生质体和暴露在各种酶中一小时后的胞质环流

实 验 数	处 理	生 存 %	流 动 %
1	0.05% 麦芽脂肪酶	96	92
1	0.05% 磷酸脂肪酶D	86	94
1	对照 pH7.5	82	93
2	0.1% 胰脂肪酶	86	75
2	对照 pH7.5	97	74
3	0.05% 磷酸脂肪酶C	90	58
2	对照 pH7.5	83	50
2*	0.5% 胰蛋白酶	72	50
2*	对照	92	98
2	0.1% Pronase	74	62
2	对照 pH7.5	87	90
4	0.1% 胰蛋白酶和0.1% 磷酸脂肪酶C	94	56
4	对照 pH7.5	85	72
2	0.07% 胰蛋白酶, 0.07% 麦芽脂肪酶, 和 0.07% 磷酸脂肪酶D	67	43
2	对照 pH7.5	67	72
1	0.03% 核糖核酸酶	60	44
1	对照(未缓冲的在 pH7.0)	87	64
3	0.03% 核糖核酸酶和 0.1% 胰蛋白酶	78	40
2	对照 pH7.5	88	67
2	0.03% 核糖核酸酶, 0.1% 胰脂肪酶, 和 0.1% 磷酸脂肪酶C	71	40
2	对照 pH7.5	87	58

* 1个具 pH7.5 的缓冲剂, 1个没有。在指出混合物的地方, 胰蛋白酶是最后加的。

有质膜的降解。奇怪的是, 任何脂肪酶或磷酸脂肪酶对膜没有发动显著的侵袭。考虑到酶的活性可能是被渗透剂所降低, 胰蛋白酶和麦芽脂肪酶的活性曾用 Willstätter^[12] 方法试验过。发现有 0.5M 甘露糖醇存在时, 胰蛋白酶的活性降低到只有 17% 而脂肪酶的活性则降低到 30%。这些降低并不足以说明这些酶的无效, 而必须推断, 膜的完整性并不取决于所在的蛋白质或类脂化合物。

和酶成对比, 阴离子去垢剂, 牛磺胆酸, 和阳离子去垢剂, 正十六烷基三甲基溴化

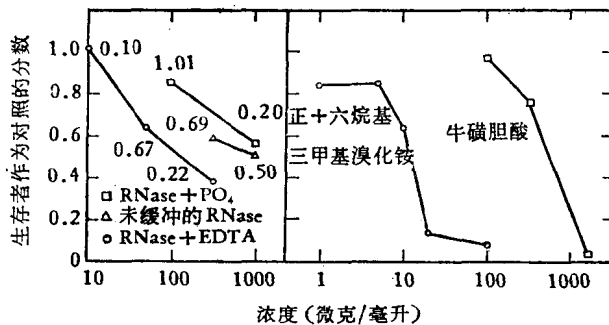


图3 左: 在核糖核酸酶中一小时后生存的原生质体作为在对照中一小时生存的 (80—100%) 分数来表示, 单独以及和 0.025M 磷酸盐 pH6.2 或 10⁻⁴M EDTA pH6.5 一块。分数接近的点指示在核糖核酸酶中显示流动的稳定的原生质体和对照中显示流动的原生质体的比例。右: 在阳离子和阴离子去垢剂中, 都在 0.025M 磷酸盐中 pH7.5, 生存的同样代表。

铵 (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) 使原生质体迅速瓦解。阳离子化合物的效力超过阴离子化合物的 30 倍 (图 3)。碱性蛋白质细胞色素 C 和精蛋白硫酸盐也是有效的。在相应浓度 200 和 100 毫克/升产生 50% 破裂的原生质体。

核糖核酸酶 (RNase) 是在一小时中把大部分原生质体溶解的唯一的一种酶。分解 50% 原生质体所需的浓度, 有 EDTA 存在时是 0.01%。如在表 2 所表明的,

核糖核酸酶对于其他水解酶并没有开辟消化的基地。

为了找出激素对于原生质体生存的影响进行了许多试验。图 4 顶上的两条线表示在缓冲和未缓冲的各种浓度的 IAA 中培育 30 分钟的结果。IAA 没有明显的结果。然后用 0.5M 蔗糖作为渗透维持剂来制备的原生质体作消化和激素的培育。在这里大多数原生质体漂浮在表面上而处理和计数是较困难的；有一些因破裂和沉没而失去了。象在图 4 最下面一条线所看见的，在 IAA 的任何浓度中 30 分钟后所出现的生存者没有变化。培育只 10 分钟后生存者根本上是相同的，这指出损失是由于处理问题。

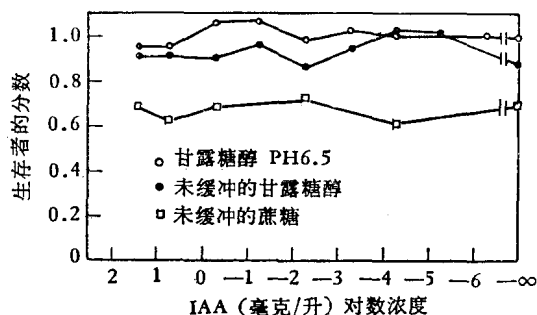


图 4 加 IAA 后停留 30 分钟原生质体最初数目的分数。在 pH6.5, 4 个试验的平均误差是 6%, 在没有缓冲的甘露糖醇中两个试验的平均误差是 3%, 而在蔗糖中 3 个试验是 12%。

为了决定 IAA 在更强烈的情况下是否会影响生存, 培育原生质体在 0.5M 甘露糖醇的 IAA 中 50 分钟而然后加 0.2M 甘露糖醇以降低最后浓度到 0.4M。表 3 表明, 虽然最后生存者在不同实验中有变化, 在每一激素浓度和在对照中原生质体的生存者之间没有不同。

表 3 在 0.5M 甘露糖醇的 IAA 中暴露 50 分钟后对渗透力的抗性*

IAA 浓度(微克/升)	IAA 处理后生存%	对 照 生 存 %
50,000	43	40
25,000	47	43
5,000	32	37
500	51	51
50	68	66
25	61	52
5	53	45
0.5	46	52
0.05	46	56
0.005	59	60
全 部 平 均	50.6	50.2

* 资料表明, 在 0.4M 甘露糖醇中接着处理 10 分钟后完整原生质体的百分数。

讨 论

在纤维素酶的制备中曾注意到, 酶的低活性是和它们来自那种有机体的纤维素-消化活性有关。这种酶的制备是无例外的, 而除非保持在最高浓度, 它不会充分活跃使在 2—3 小时以内去掉壁。曾注意到在消化期间, 虽所有组织被软化, 内层细胞却保留足够的细胞壁以包含其细胞内含物; 原生质体主要来自薄壁组织的外层细胞。分级的方法大概去掉许多近来所描述的从 *Myrothecium verrucaria* 滤液中来的水解因素, 这些因素对棉花是很活跃的而对羧甲基纤维素^[13]是不活跃的。另一方面, 制备品包含有在真菌滤液

中所存在的许多蛋白质,其中一些除纤维素酶外可能是多糖酶而因此在水解时可能沉淀下来。但是对丙烯酰胺凝胶在 pH9.4 的电泳表明,主要量的蛋白质是在单一的带中,可能就是纤维素酶。

在从 60—100% 原生质体中有组织的细胞质流动的存在是一个标记,即它们是处在良好的生理状态中。不流动的中有一些只有清楚的液泡;另一些没有液泡,而可能是由于液泡膜破裂导向细胞内含物解体的结果。第三类是完全充满了高度折射的质体,使能看见的较小颗粒的流动反而不能够察觉了。Cocking 曾报道“细胞质运动”,这可能是其原生质体中的胞质环流,但大多数早期的作者在其稳定溶液中用了高离子浓度而不能报道这种现象因而对他们自己的材料的生活力加以怀疑。

植物细胞的质膜一般推测为由蛋白质和类脂化合物成分所组成的一个双分子层。除非这样的成分的脆弱的地方由于冲击而几何学地分开,否则人们就会想到是蛋白酶和脂肪酶水解了膜并引起细胞溶解。胰蛋白酶分裂了碱性氨基酸如赖氨酸和精氨酸的羧基的肽键或酯键;所观察到的对胰蛋白酶冲击的抗性表明,这样的普通键在原生质体包膜的表面上不存在。燕麦原生质体对胰蛋白酶和脂肪酶消化的抗性是和所报道的酵母原生质体的抗性一样^[14]。不同的是发现一般比高等植物原生质体稳定得多的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) 的原生质体却迅速地地被这些酶所溶解了^[15]。这些发现指出,围绕着细菌细胞的和高等植物细胞的膜之间的基本结构的差异。

另一种解释可能是,纤维素壁没有完全去掉。为了以下的理由,考虑这是最不可能的:(1) 一些纤维素酶在全部时间持续地存在着而原生质体的行为并没有明显地随着时间而改变;(2) 原生质体是圆的,没有任何有角的物质,当在载玻片上遇到小的流动时,是很容易变形的;(3) 破裂时没有留下坚硬的壳;(4) 原生质体在去垢剂和核糖核酸酶中确迅速瓦解。此外,原生质体暴露在果胶酶中(Rohm and Haas Pectinol Concentrate 42E and or 41P) 或新鲜浓的 *Myrothecium* 纤维素酶中一小时,没有引起显著的破裂。

因为这些原生质体在低浓度的去垢剂中解体,它们的外膜的完整性必须依靠非共价键,即依靠氢键和范德瓦耳斯力。阳离子去垢剂在浓度 $3.3 \times 10^{-5} M$ 一小时内产生 50% 的破裂而阴离子去垢剂则需要 $1.1 \times 10^{-3} M$ 。这种 33 倍的差异说明,去垢剂使阴离子的一半解体,这和对细菌原生质体所报导的结果一样^[16]。

这里所报导的在核糖核酸酶中的解体是完全没有料到的。在 EDTA 中提高敏感性可能反映重金属干扰的消除,而核糖核酸酶作用于其他系统早先曾报导过^[17]。

虽然所要求的核糖核酸酶的浓度颇高,有理由可以联想到 RNA 直接参与维持膜的完整性。不幸的是,说明在质膜中有功能的 RNA 的存在的一些较早的证据都可以归之于核糖核酸酶的透入细胞中。细胞在 1 毫克/毫升的核糖核酸酶中只一小时后就观察到离子吸收和呼吸作用的变化,而因此可能由于核糖核酸酶已经透入细胞^[18]。核糖核酸酶在 40 分钟内透入到大麦和洋葱的根细胞中^[19],而它在洋葱和百合的根中 2 小时内诱导了有丝分裂的反常^[20]。在紫萍(*Spirodela*) 和玉米叶中,它有力地抑制花青素的形成,这是一个几乎可以确定不是在质膜中的作用^[17]。伊乐藻(*Elodea*) 叶随着核糖核酸酶的处理在钙传递中有一个变化,但这种影响的地点是不清楚的^[21]。但是 Tanada 表明,在绿豆根中 100 微克/毫升核糖核酸酶在 10 分钟内对离子吸收可以产生影响^[22]。在核糖核酸酶中作 20 分钟处理的细胞说明,显示出甲苯胺蓝及一些位于接近细胞表面的染料,其染色降

低。不幸的是, 甲苯胺蓝染细胞壁很强^[23]而因此不是在细胞膜中 RNA 的一种可靠的指示剂。可能更重要的是, Masuda^[24] 注意到, 核糖核酸酶改变了燕麦胚芽鞘的质壁分离型, 从凹的变到凸的, 这指出细胞质对细胞壁的结合降低了。用空胞形成的两种方法和 RNA 测定的 3 个类型表明巨大芽胞杆菌 M 系的膜中含有 1—2% RNA^[25]。用另一不同的方法形成空胞, 同样细菌的 KM 系, 用台黑酚测定, 获得含有 11% RNA 的膜^[26]。但是, 甚至它们有高 RNA 含量, 这些膜在核糖核酸酶中是稳定的而却被麦芽脂肪酶所分解。本资料可能指出, 在高等植物中即便只有小量 RNA 存在, 作为膜的结构成分它的功能对于膜的完整性说来比蛋白质或磷脂有更大的重要性。核糖核酸酶的效能的另一种解释可能是, 它作为一个碱基起作用, 和阳离子的去垢剂的作用很相似。曾报道过核糖核酸酶的等电点在 pH9.6, 但溶液的 pH 自然是调整到约 6.5。支持这样观点的是, 观察到两种碱性蛋白质也引起破裂; 反对的是胰蛋白酶的钝性, 它的等电点是 10.5。如果这种解释证明是对的, 它将指示在膜中有许多临界的阴离子结构。它也将会指出, 其他所报导的核糖核酸酶的效能, 象以上所援引的, 可能有同样的基础。另一方面, 因大分子种类的明显破裂可能总是由于作为污染的小分子的存在, 特别是如果这些污染是活跃地累积的。进一步谨慎的工作对于解决这个问题将是需要的。

Cocking 曾报导根原生质体对于 IAA^[6] 的反应, 但在本工作中没有发现这样的反应。几种考虑的事实指出, IAA 进入这些原生质体, 而细胞一般提高了生长是对激素的反应。好久以前就报导过去皮的组织容易吸取激素^[27]。在本实验中把去皮的胚芽鞘切片放在 0.1M 葡萄糖加或不加 5 毫克/升的 IAA 中; 在激素中的组织在 9 小时长度增长 25%, 在没有激素的葡萄糖中组织只增长 13%。在甘油中的破裂指出, 不荷电的甘油分子容易穿入原生质体的膜; 在这些原生质体中的环流被 0.05M 钙所抑制指出, 一个荷电的离子能够穿入。由于燕麦胚芽鞘原生质体是来自通常用来检验激素的组织, 我们得出结论, 所报导的在根细胞中^[6]破裂的反应并不是直接与激素对生长的效能有关。

参 考 文 献

- [1] Levitt, J., Scarth, G. W. and R. D. Gibbs, *Protoplasma*, **26**, 237 (1936).
- [2] Vreugdenhil, D., *Acta Bot. Neérl.*, **6**, 472 (1957).
- [3] Küster, E., *Protoplasma*, **3**, 223 (1927).
- [4] Törnävä, S. R., *Protoplasma*, **32**, 329 (1939).
- [5] Cocking, E. C., *Nature*, **187**, 962 (1960).
- [6] Ibid., **193**, 998 (1962).
- [7] Whitaker, D. R., Hanson K. R. and P. K. Datta, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 671 (1963).
- [8] Gruen, H. E., *Plant Physiol.*, **34**, 158 (1969).
- [9] Whitaker, D. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 253 (1953).
- [10] Ray, P. M. and A. W. Ruesink, *J. Gen. Physiol.*, **47**, 83 (1963).
- [11] Avery, G. S. Jr. and P. R. Burkholder, *Bull. Torrey Bot. Club*, **63**, 1 (1936).
- [12] Sumner, J. B. and G. F. Somers, in *Laboratory Experiments in Biological Chemistry* (New York: Academic Press, 1944, pp. 134, 147).
- [13] Selby, K. and C. C. Maitland, *Biochem. J.*, **94**, 578 (1965).
- [14] de Kloet, S. R., G. J. W. van Dam, and V. V. Koningsberger, *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 683 (1962).
- [15] Landman, O. E. and S. Spiegelman, *these Proceedings*, **41**, 698 (1955).
- [16] Gilby, A. R. and A. Y. Few, *Nature*, **179**, 422 (1957).
- [17] Radner, B. S. and K. V. Thimann, *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 92 (1963).
- [18] Hanson, J. B., *Plant Physiol.*, **35**, 372 (1960).

- [19] Jensen, W. A. and A. D. McLaren, *Exptl. Cell Res.*, **19**, 414 (1960).
 - [20] Kaufmann, B. P. and N. K. Das, *these Proceedings*, **40**, 1052 (1954).
 - [21] Lansing, A. I. and T. B. Rosenthal, *J. Cell Comp. Physiol.*, **40**, 337 (1952).
 - [22] Tanada, T., *Plant Physiol.*, **31**, 251 (1956).
 - [23] O'Brien, T. P., Feder, N. and M. E. McCully, *Protoplasma*, **59**, 368 (1964).
 - [24] Masuda, Y., *Physiol. Plantarum*, **12**, 324 (1959).
 - [25] Weibull, C. and L. Bergström, *Biochem. Biophys. Acta*, **30**, 340 (1958).
 - [26] Vennes, J. W. and P. Gerhardt, *Science*, **124**, 535 (1956).
 - [27] Thimann, K. V. and C. L. Schneider, *Am. J. Bot.*, **25**, 627 (1938).
- (译自 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**: 56, 1965)

分离的番茄果实原生质体细胞壁的再生

E. Pojnar, J. H. M. Willison, E. C. Cocking

摘 要

用光学显微镜检和超薄切片的电子显微镜检以及表面复制表明,分离的番茄果实室组织的原生质体当保持在适宜的培养基中时再生一新的细胞壁。

前 言

最近对分离的果实原生质体的研究表明,在培养中这些原生质体的继续生存好象决定于它们的细胞状结构的恢复。本研究结果对于培养在适宜培养基中原生质体周围细胞壁的再生提供了直接的显微观察证据。在细胞壁再生中的早期是容易察觉的。可以获得的同步再生使能够推论细胞壁合成所发生的实验性的结果。然而要强调的是,在没有分析的或放射自显影的前体类型的情况下,实验仍可以进行。采用光学和电子显微镜超薄切片和复制的方法仍然能合理地表达其特性,而用冰冻蚀刻法可以更充分地说明在细胞壁进行再生时在质膜表面上的反应,可以预料在进行复制研究中的许多困难,特别是在原生质体变干时在表面上出现的显著内褶皱,将会被克服。

材 料 和 方 法

制备洗过的原生质体

番茄植株生长在和以前所描述的(Davies and Cocking, 1965)同样条件下。从番茄果实室组织中分离出原生质体,分离是用改良的 Gregory 和 Cocking (1965)的方法。在原生质体的产量和稳定性方面发现有显著的季节变化。事实就是这样,即使全年果实中有激素。在 Nottingham,从 11 月中直到 12 月中,并从 4 月中到 5 月中观察到原生质体的产量和稳定性都是不良的。这种影响大概主要是由于发生在秋天和春天的生理上的改变并可能和在这些季节果实的生长速度的变化有关。如果从浇水以后不久的植株上摘下果实也观察到所获得的产量不好。

5 星期大小的果实室组织块用 20% (W/V) Pectinol R. 10 (Rhom and Haas Co. Ltd.) (或在微孔滤器过滤的 20% 的蔗糖中或在培养基 A、B 或 C 中)在室温下培育 1½ 小时以后,使混合物通过不锈钢纱过滤以去掉细胞残渣。含有悬浮原生质体的滤出液放置 5 分钟使任何小的残渣沉下去,把漂浮起来并集中在表面的原生质体转移到试管中。把

约 1.5 毫升的原生质体浓悬浮液倒在试管的底部,并轻轻地将蔗糖溶液或培养基倒满试管。半小时后把漂浮在表面的原生质体作为浓的悬浮液(约 1.5 毫升)转移到另一相同的试管中并重复这种程序。这些原生质体可以看作是洗过两次的原生质体。这种稀释了果胶酶 100 倍或更多的洗涤程序可以稀释从果实室的汁液或 Pectinol R. 10 来的任何混杂的酶并保证原生质体是悬浮在已知成分的培养基中。

原生质体的培养

对于原生质体的培养采用了 Conway 单位 (Conway, 1957)。在这些单位中对原生质体可以很容易进行显微镜观察;用涂了凡士林的玻璃盖封闭可以阻止蒸发,虽然不封盖对于几天的培养可有充足的空气容量。Conway 单位保存在室温的散射光下。培养物保存在无菌条件下(阅 Davies and Cocking, 1967)。通过微孔过滤消毒的培养基以下的组成成分:

培养基 A: 在 100 毫升改良 White 培养基 (Lamport, 1964) 中加 9.8 克蔗糖, 0.13 克 CaCl_2 , 0.13 克 KCl 和 4.0 克甘露糖醇但不加 2, 4-D 或椰乳。

培养基 B: 在 100 毫升改良 White 培养基中加 9.0 克蔗糖, 2.5 克 Ficoll (Pharmacia Uppsala, Sweden) 和 5.0 克甘露糖醇象用于培养基 A 一样, 但加 10% (V/V) 椰乳。

培养基 C: 这种培养基和培养基 B 一样, 但不加椰乳。

在 Conway 单位中不同培养基表面上漂浮的原生质体和再生的原生质体采用亮视野照明进行显微照相。故意不用相差, 因这会在圆形原生质体周围引进一种晕轮效应, 因此使表面的真实外貌有一些不清楚。冰冻的再生原生质体随着就融化, 这可以作为显示任何坚固细胞壁形成的一种方法。再生原生质体的冰冻是容易作到的, 这只要把具内含物的 Conway 单位移到 -20°C 让其深冻即可。

电子显微镜中的超薄切片研究

将培养不同时间以后的原生质体在戊二醛内固定, 用钨酸作后固定, 并在 methacrylate-styrene 混合物 (70:50, V:V) 中按 Mohr 和 Cocking (1967) 的程序封埋, 但在脱水期间 (在 70% 乙醇中有 1% 醋酸双氧钨在 25°C 处理 15 小时) 用醋酸双氧钨处理较长的时间。在 Porter Blum MK₂ 超薄切片机上, 用玻璃刀切成金黄色切片, 并在有强韧的 formvar 膜, 喷了碳的 Athene 483 型铜网上装片。切片用柠檬酸铅作后染色 (Reynolds, 1963)。除图 7 (见图版 V) 是大量早期电子显微镜照相中的一张, 在分离的原生质体的精细结构工作计划开始期间在 Leeds, Manton 教授处用西门子电子显微镜照的外, 所有电子显微镜照相都是用具 50 微米物镜孔径的 A. E. I., EM6B 在 60KV 照的。注意到新分离的原生质体, 和保存在 20% 蔗糖中的原生质体容易密集在胶囊的封埋介质底部, 培养的原生质体, 将在以后显示再生细胞壁的原生质体, 是较为易浮的而不能很好地沉下来。

对原生质体和再生原生质体表面复制的电子显微镜检程序

在复制的研究中用了四类原生质体。就是: 浮在 20% 蔗糖表面后立即取出分离的