



植物细胞培养和 细胞杂交资料集

科学出版社

内 容 简 介

本集选译了 31 篇有关植物细胞培养和细胞杂交的文章。内容包括原生质体分离培养及其植株再生；原生质体融合技术、杂种细胞的选择及其遗传生化特性；原生质体对外源 DNA 和细胞器的摄取；细胞培养中突变体的筛选；小孢子的单细胞培养及培养基的选择等。可供植物学科研人员、植物育种工作者及高等院校生物系师生参考。

植物细胞培养和细胞杂交资料集

中国科学院上海植物生理研究所细胞生理室 译

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

石家庄地区印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1979 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1979 年 7 月第一次印刷 印张：10 3/4

印数：0001—13,150 字数：245,000

统一书号：13031·990

本社书号：1395·13—10

定 价：1.15 元

译 者 的 话

自六十年代以来,由于在花药培养单倍体研究方面所取得的成功以及在植物原生质体培养和细胞杂交方面所取得的进展,大大促进了植物组织和细胞培养的研究,我国在这方面的研究工作也取得了可喜的成绩。在本资料集行将付印之际,一向热忱支持和推动我国细胞培养和细胞杂交研究工作的植物生理学家、中国植物生理学会理事长、中国科学院植物生理研究所所长罗宗洛教授不幸逝世,在此,我们全室同志对罗老的逝世谨表沉痛的悼念!

由于培养的植物细胞所表现出的全能性,目前国内外不少研究者试图利用分子生物学技术,结合细胞培养的各种方法,特别是原生质体培养和单倍体细胞的培养等,有计划地改变植物细胞的遗传特性,形成了一个崭新的研究领域,即细胞工程。无疑地,这必将吸引各方面越来越多的研究者的注意。

为了介绍植物细胞培养各方面的进展情况及问题,我们编译了《植物细胞培养和细胞杂交资料集》。本集共选译了31篇文章,其中原生质体分离培养及其植株再生方面8篇;原生质体融合技术、杂种细胞的选择及其遗传生化特性12篇;原生质体对外源DNA和细胞器的摄取2篇;细胞培养中突变体的筛选、DNA的修复、基因转化以及细胞遗传6篇;小孢子的单细胞培养1篇。考虑到目前在组织和细胞培养中培养基种类繁多,为了使有关的研究者了解选择培养基方面的一些基本原则及问题,选译了一篇推荐了五种可供选择应用的不同培养基配方的文章。最后,还选译了一篇介绍利用植物细胞培养生产天然产物(如药物,生物碱等)的文章,这也是近年来植物细胞培养中颇为引人注目的一个研究领域。

由于水平所限,难免还有不少错误,敬希读者指正。

中国科学院上海植物生理研究所细胞生理室

1978年1月

目 录

译者的话	(i)
植物原生质体的纯化和活力测定	P. J. Larkin (1)
黄瓜叶肉原生质体分离和培养方法的改进	R. H. A. Coutts, K. R. Wood (6)
用平板技术从水稻离体原生质体获得的愈伤组织的分化	P. G. Deka, S. K. Sen (10)
棉花愈伤组织原生质体的分离、培养和分裂	S. S. Bhojwani, J. B. Power, E. C. Cocking (15)
油菜叶肉原生质体愈伤组织的形成和植株再生	K. K. Kartha, M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg, F. Constabel (18)
从石刁柏原生质体的愈伤组织培养物再生植株	D. Bui Dang Ha, B. Norreel, A. Masset (22)
烟草(<i>Nicotiana sylvestris</i>)叶肉原生质体愈伤组织的诱导及植株再生	J. I. Nagy, P. Maliga (26)
马铃薯叶肉细胞原生质体的分离、增殖和植株再生	J. F. Shapard, R. E. Totten (28)
高 pH 和钙对烟草叶片原生质体融合的效应	W. A. Keller, G. Melchers (33)
植物原生质体属间高频率融合法	K. N. Kao, M. R. Michayluk (38)
用葡聚糖硫酸盐及明胶通过体细胞融合诱导杂种	T. Kameya (46)
植物原生质体融合和属间杂种细胞的生长	K. N. Kao, F. Constabel, M. R. Michayluk, O. L. Gamborg (52)
矮牵牛和爬山虎原生质体融合和选择培养的一些结果	J. B. Power, E. M. Frearson, C. Hayward, E. C. Cocking (61)
矮牵牛和拟矮牵牛的体细胞杂交	J. B. Power, E. M. Frearson, C. Hayward, D. George, P. K. Evans, S. F. Berry, E. C. Cocking (68)
大豆和粉蓝烟草体细胞杂种的染色体行为	K. N. Kao (72)
用原生质体融合进行植物体细胞杂交 I. 烟草光敏品种“单倍体”的抗光杂种的选择	G. Melchers, G. Labib (77)
烟草原生质体融合和超性杂交	Ю. Ю. Глеба, Р. Г. Бутенко, К. М. Ситник (87)
关于烟草突变体原生质体融合植株的若干特点	А. Б. Бургутин, Р. Г. Бутенко, Л. В. Фролова, Ю. Ю. Глеба (89)
利用同功酶区分烟草属愈伤组织中有性和体细胞杂种	L. R. Wetter, K. N. Kao (95)
大豆-烟草体细胞杂种细胞株的同功酶模式	L. R. Wetter (100)
外源遗传物质的摄取及其在植物原生质体内的表达	D. Hess (104)
离体原生质体对细胞器的摄取	I. Potrykus (109)
植物的基因转化	F. B. Holl, O. L. Gamborg, K. Ohyama, L. Pelcher (114)

植物遗传学,增加作物产量	P. R. Day (122)
从细胞培养领域展望农作物的改良.....	C. E. Green (130)
从烟草单倍体愈伤组织得到抗链霉素植株	P. Maliga, A. Sz. Breznovits, L. Márton (137)
植物培养细胞生化突变体的选择与特性	J. M. Widholm (139)
γ 射线照射培养野胡萝卜细胞的原生质体后 DNA 链断裂的修复	G. P. Howland, R. W. Hart, M. L. Yett (144)
单倍体细胞——小孢子的单细胞培养	C. Nitsch (148)
植物组织培养的培养基	O. L. Gamborg, T. Murashige, T. A. Thorpe, I. K. Vasil (153)
日本专利中关于植物培养细胞产生天然物质的资料	M. Misawa (160)

植物原生质体的纯化和活力测定

P. J. Larkin

摘 要

本文叙述了把细胞和亚细胞碎片分离掉,从而纯化植物原生质体的方法。此方法利用了含有 9.6% sodium metrizoate 和 5.6% 聚蔗糖的密度缓冲液。另外也报道了用荧光素双醋酸酯测定植物原生质体活力的方法。

引 言

目前,植物原生质体已用在植物学研究的许多方面,包括体细胞遗传、植物病理、光合作用、细胞壁生物合成和膜的生理等。如果制备的原生质体中不混杂微生物、亚细胞碎片(特别是叶绿体)、维管束成分、未解离的细胞和破碎的原生质体,那么对许多研究一定是很有利的。此外,还迫切需要一个可靠的技术去测定原生质体的活力。纯化原生质体的第一步是通过筛或布滤去大片的未分解的组织。

进一步的步骤包含:

(1) 漂浮在浓蔗糖溶液中(Gregory 和 Cocking, 1965; Power 和 Cocking, 1970; Evans 等, 1972; Grout 和 Coutts, 1974; Davey 等, 1974; Cocking 等, 1974)。

(2) 漂浮在聚蔗糖 Ficoll 溶液中(Schenk 和 Hildebrandt, 1971)。

(3) 反复离心和重新悬浮(Bui-Dang-Ha 和 Mackenzie, 1973; Kartha 等, 1974; Pelcher 等, 1974)。

(4) 反复沉淀(不离心)和重新悬浮(Bawa 和 Torrey, 1971; Eriksson, 1971; Kameya 和 Uchimiya, 1972)。

所有这些技术得出不一致的结果,并且只能达到部分纯化(Kanai 和 Edwards, 1973; Watts 等, 1974)。

Kanai 和 Edwards(1973)建立了一种密度缓冲液,当该密度缓冲液与 0.13 体积的粗制的原生质体悬浮液相混合,用 300 g 离心 6 分钟,缓冲液分为两个相。碎片和破碎的原生质体离开悬浮液而沉底,完整的原生质体集聚在表层。密度缓冲液含有 PEG(聚乙二醇分子量 6,000),葡聚糖(分子量 40,000),磷酸钠和山梨醇。此方法可以不管原生质体所需要的酸碱度(pH 8.0),也不管操作技术对葡聚糖变色的敏感性问题的,故是对以前方法的一个很大改进。

Böyum(1964, 1968)研究了不同密度的缓冲液,企图从血液制备得到纯淋巴细胞。缓冲液含有葡聚糖,聚蔗糖(Ficoll)或者甲基纤维素。当血液放在这些溶液的上层时,红血球

聚集并沉淀，淋巴细胞停留在分界面。其后又有若干种修改的淋巴细胞的两相制备技术(Thorsby 和 Bratlic, 1970; Ting 和 Morris, 1971; Du Bois 等, 1973; Brown 和 Greaves, 1974)。

一种商品的密度缓冲液称淋巴细胞用缓冲液(Lymphoprep®)(Nyegaard A/S, 奥斯陆, 挪威)是由 9.6%(W/V) Sodium metrizoate 和 5.6%(W/V) 聚蔗糖组成, 其比重为 1.077 ± 0.001 克/毫升。用这种产品纯化原生质体是本报道的主要部分。

原生质体研究的某些领域中, 已能够最终地长时期地测定原生质体的活力。然而, 要求有一个迅速的短时间的测定其健康的方法。文献记述了若干达到这一目的的方法:

- (1) 观察胞质环流作为有旺盛代谢的指标(Raj 和 Herr, 1971; Pelcher 等, 1974)。
- (2) 完整膜不染上 Evans 蓝染料(Glimelius 等, 1974; Kanai 和 Edwards, 1973)。
- (3) 用渗透压的改变测定原生质体大小的变化(Kanai 和 Edwards, 1973)。
- (4) 用氧电极测定氧呼吸, 以表明其呼吸代谢(Taiz 和 Jones, 1971)。
- (5) 光合的活力(Kanai 和 Edwards, 1973)。

胞质环流的观察很困难, 特别在叶肉原生质体外侧有一层叶绿体。用渗透压的改变测定原生质体大小的变化是很费力的, 而且只有少数原生质体可以被测定。这两种方法和不着色法仅适用在个别原生质体。氧的吸收和光合的活力仅能用于整个悬浮系统。

本报道用荧光素双醋酸酯(FDA)染色来判断原生质体活力。以前它已用在花粉(Heslop-Harrison 和 Heslop-Harrison, 1970), 培养的动物细胞(Rotman 和 Papermaster, 1966; Gercek 等, 1973 a, b), 人的淋巴细胞(Martel 等, 1974), 酵母细胞(Gercek 和 Gercek, 1973 a, b) 和悬浮培养的植物细胞(Widholm, 1972), 荧光素(是一种 FDA 经酶作用后的产品)在完整细胞里发出荧光, 集聚在膜的内部。

材 料 和 方 法

植物材料和原生质体的制备 所有的植物都生长在土壤/泥炭混合土中, 供给 NH_4^+ 和 NO_3^- 氮。除此之外, 线叶短毛菊 (*Brachycome lineaviloba*) ($n=4$) 生长在含少量水的砂质土中, 并利用在水中萌发 5 天的玉米幼苗。

以烟草、矮牵牛和草香豌豆(*Lathyrus sativus*) 开花前的叶片作材料, 充分展开的叶片剥去下表皮。成熟的短毛菊枝条(高 2 厘米)、玉米芽鞘、矮牵牛花瓣和郁金香的枝条, 用手术刀轻轻地切成小方块。

所有的组织在含有(毫克/升): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (250), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (159), KNO_3 (27.2), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.5), KI (0.16), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.025)9% 的甘露醇, pH 调到 5.9 的渗透剂中, 预先进行质壁分离 1—2 小时。

表 1 列出四种酶混合物的组成, 表 2 说明用于每一种细胞材料的酶溶液, 在不振荡情况下 25°C 连续保温 10—14 小时, 每次能游离成原生质体的组织列举在表 2 中。

生长的植株施用氮肥对烟草与矮牵牛产生原生质体是很重要的。另一些作者也有同样的看法(Watts 等, 1974; Shepard 和 Totten, 1975)。

原生质体纯化 通过粗布过滤后, 将 0.5—3.0 体积的粗制原生质体悬浮液置于 1 个体积的淋巴细胞缓冲液的顶层, 后者事先已盛于离心管中。50 × 200 g 离心到 10 分钟,

烟草叶肉原生质体的绿色带是在密度缓冲液(淋巴细胞用缓冲液)和酶液间的分界面上,所有6种类型的原生质体均有相似的行为。

沉底的原生质体重新悬浮,并在显微镜下检查。在叶肉原生质体情况下含有大的叶绿体,维管束成分和有壁细胞,在分界面的原生质体带中只能够发现极少量的碎片和有壁细胞。

原生质体悬浮在褐色的酶液或0.5%锥虫蓝(Trypan)染液中,用此方法可以鉴定两相中的极少量混合物。离心后在淋巴细胞缓冲液之上褐色或蓝色区域中含有原生质体。它完全保留在上层,并有明显的界限。

讨 论

用淋巴细胞缓冲液纯化植物原生质体是简易的方法并表现了特殊的效果。对所有原生质体领域的研究都可以成为一个有价值的技术。

用密度缓冲液纯化淋巴细胞依赖于淋巴细胞的缓冲液,由于聚蔗糖具有粘着红血球的活性,它能在分界面上使红血球集聚并沉淀下来,葡聚糖和甲基纤维素也有这种活性(Böyum, 1964, 1968),但用以纯化原生质体时还不清楚碎片和有壁细胞是否胶着或者是否通过密度缓冲液的作用,无须胶着它们就足以使之沉淀下来。

荧光素双脂酸酯本身对植物原生质体是活性染料,它适合研究单个原生质体,也适合研究原生质体群体。在后者情况下,可用来洗涤原生质体,重新悬浮原生质体,并用荧光比色计来计量。用此染料于淋巴细胞缓冲液纯化原生质方法,看来可获得高产量纯净的,并稍稍增加活力比率的原生质体。

FDA无荧光,无极性并可自由渗透出入完整的原生质膜。荧光素是FDA受脂酶分解后形成的有荧光的极性物质,不能自由渗透出入原生质膜,因此荧光素积累在有活力的细胞中,不积累在死细胞中,现在在继续研究FDA染色与原生质体植板率的相关程度。

[李文安译自 *Planta*, 128:213—216, 1976. 张德颐 校]

参 考 文 献

- [1] Bala Bawa. S., Torrey, J. G., *Bot. Gaz.* 132:240—245 1971.
- [2] Böyum. A., *Nature (lond.)* 21:793—794 1964.
- [3] Böyum. A. *Scand. J. Clin. Invest* 21. Suppl. 97:31—50 1968.
- [4] Brown. G., Greaves. M. F., *Scand. J. Immunol.* 3:161—172 1974.
- [5] Bui-Dang-Ha. D. Mackenzie. I. A. *Protoplasma* 78:215—221 1973.
- [6] Cercek. L., Cercek. B., *Biophysik* 9:105—108 1973a.
- [7] Cercek. L., Cercek. B., *Biophysik* 9:109—112 1973b.
- [8] Cercek. L., Cercek. B., Ockey. C. H., *Biophysik* 10:195—197 1973b.
- [9] Cocking E. C., Power, J. B., Evans, P. K., Safwat, F., Frearson. E. M., Hayward. C., Berry S. F., George D., *Plant Sci. Letters* 3:341—350 1974.
- [10] Davey. M. R., Bush, E., Power, J. B., *Plant Sci. Letters* 3:127—133 1974.
- [11] Du. Bois. M. J. G. J., Huismans. D. R., Schellekens. P. Th. A., Eijssvoogel. v. p., *Tissue Antigens* 3:402—409 1973.
- [12] Eriksson, T., *Coll. Int. C. N. R. S. No.* 193:297—302 1971.
- [13] Evans, P. K., Keates, A. G., Cocking. E. C., *Planta (Berl)* 104:178—181 1972.
- [14] Glimelius, K., Wallin, A., Eriksson. T., *Physiol. Plant.* 31:225—230 1974.

表 1 游离原生质体的酶溶液

酶	浓 度 (%)			
	A ¹⁾	B ¹⁾	C ¹⁾	D ¹⁾
纤维素酶(Onozuka P 1500)	3.0	2.0	1.0	2.5
纤维素酶(Calbiochem)	—	—	0.25	—
纤维素酶(Driselase)	—	0.5	0.5	0.25
半纤维素酶(Rhozyme)	—	0.25	—	0.1
高析酶(Macerozyme)	0.25	0.25	0.25	0.25

1) 溶液配成渗透剂, pH 调至 5.9。

表 2 细胞材料和酶溶液

种 类	组 织	酶 液
烟草(品种 White Burley)	叶	A
烟草(品种 Hicks)	叶	A
矮牵牛(品种 Confetti)	叶	A
	花 瓣	D
线叶短毛菊(n=4)	根	B
草香豌豆	叶	B
玉 米	芽 鞘	C
郁 金 香	幼 芽	D

随之用巴斯德吸管从分界面吸取原生质体。

活力测定: 荧光素双醋酸酯(FDA)贮存于 0°C 的丙酮溶液(2 毫克/升)中。它加到原生质体悬浮液使最后浓度为 0.01%。置于室温 5 分钟后, 用蔡氏荧光显微镜检查荧光。适宜的激发光滤片为 BG₁₂ 和栅状滤片 47(分别为 330—350 毫米和 >460 毫米)。

结 果

粗制的原生质体悬浮液样品与 FDA 一起保温。有荧光的原生质体为 50—98%。叶肉原生质体如果有黄/绿色荧光则是有活力的。如果不发荧光或发红色荧光(由于叶绿素), 这时黄绿荧光不占优势则认为没有活力。在许多制备样品中, 亚细胞碎片含量有很大的影响。

用淋巴细胞缓冲液纯化后与 FDA 一起保温, 碎片很少, 并常常增加有活力的原生质体百分率。在有一次试验中, 矮牵牛原生质体密度为 10⁶/毫升, 纯化前有活力细胞为 65%, 用淋巴细胞缓冲液纯化后原生质体回收率为 75%, 回收的和高度纯化的原生质体经判断是有活力的。Kanai 和 Edwards(1973)在他们两相纯化方法中回收率不超过 50%。

虽然, 延续 FDA 保温时间, 荧光会积累, 一旦洗去原生质体上过量的 FDA, 它们会缓慢地失去荧光。在完整膜上比死去的膜上失去荧光分子的比率少。这一点仍然是重要的(Cercek 等, 1973 b; Rotman 和 Papermaster, 1966)。荧光明显减少是在 15 分钟内。

- [15] Gregory, D. W., Cocking, E. C., *Cell Biol.* **24**:143—146 1965.
- [16] Grout, B. W. W., Coutts, R. H. A., *Plant Sci. Letters* **2**:397—403 1974.
- [17] Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., *Stain Technol.* **45**, 115—120 1970.
- [18] Kameya, T., Uchimiya, H., *Planta (Berl)* **103**, 356—360 1972.
- [19] Kanai, R., Edwards, G. E., *Plant Physiol.* **52**, 484—490 1973.
- [20] Kartha, K. K., Michayluk, M. R., Kao, K. N., Gamborg, A. L., Constabel, F., *Plant Sci. Letters* **3**: 265—271 1974.
- [21] Martel, J. L., Taramillo, S., Allen, F. H. Jr., Rubinstein, P., *Vox Sang (Basel)* **27**, 13—20 1974.
- [22] Pelcher, L. E., Gamborg, O. L., Kao, K. N., *Plant Sci. Letters* **3**: 107—111 1974.
- [23] Power, J. B., Cocking E. C., *J. Exp. Bot.* **21**: 64—70 1970.
- [24] Raj B., Herr, J. M., *Cell Res.* **64**: 479—480 1970.
- [25] Rotman, B., Papermaster, B. W., *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash)* **55**: 134—141 1966.
- [26] Shepard, J. F., Totten, R. E., *Plant Physiol.* **55**: 689—694 1975.
- [27] Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C., *Coll. Int. C. N. R. S. No.* **193**: 319—331 1971.
- [28] Taiz, L., Jones, R. L., *Planta (Berl)* **101**: 95—100 1971.
- [29] Thorsby, E., Bratlie, A., *Histocompat. Testing.* pp. 655—656, Copenhagen: Munksgaard 1970.
- [30] Ting, A., Morris, P. J., *Vox Sang (Basel)* **20**, 561—563 1971.
- [31] Watts, J. W., Motoyoshi., King, J. M., *Ann Bot.* **38**, 667—671 1974.
- [32] Widholm, J. M., *Stain Technol.* **47**, 189—194 1972.

黄瓜叶肉原生质体分离和培养方法的改进

R. H. A. Coutts K. R. Wood

摘 要

描述从二个黄瓜栽培品种(*Cucumis sativus*, L. W. Ashley 和 China)的子叶和第一叶分离大量、有活力原生质体的改进方法。概述利用多种商品酶制剂的短时间分离法(STM)和长时间分离法(LTM)。第一叶离体原生质体的液体培养和接着的固体培养,结果发生持续的细胞分裂和形成紧密的愈伤组织,后者被诱导形成了根。还未出现芽和完整植株的再生。

前 言

自 Cocking^[1]和 Takebe 等^[2]创造性的工作以来,植物原生质体产生和培养方法不断改进。现已有许多关于原生质体分离、愈伤组织形成和完整植株再生的报告(参阅综合文献[3]、[4])。然而,葫芦科组织培养的研究进展比较少,仅少数有愈伤组织形成、生长和器官发生^[5]。在本研究中,我们提出用几种方法和酶分离原生质体。它们最初在液体培养基中形成小细胞团^[6],然后在固体培养基上形成细胞团,细胞持续分裂产生紧密的愈伤组织,最后形成根。

材 料 和 方 法

在以前介绍的条件^[6,7]下培育黄瓜植株。如前法^[6]进行组织表面灭菌,浸在4% (V/V)“Chlorox”10分钟,加入几滴灭菌的“Teepol”清洁剂作为湿润剂。用10% (W/V)无菌甘露醇洗去表面灭菌剂,叶片放入新鲜甘露醇液内(叶柄亦浸入),片刻后撕皮或切成薄片。STM分离法用两个方法处理叶片,常用的表皮撕除法和修改的Beier和Bruening金刚砂擦伤叶片法^[8]。后一方法把消毒过的叶片,逐片用胶黏牢的驼毛刷刷叶面,用刀片将层叠的叶片切成薄片,再用于原生质体的分离^[9]。LTM分离法是按常用的表皮撕除法。所有组织在培养皿中,在25°C、弱光下预先质壁分离,STM法经1小时,LTM经2—3小时。预先质壁分离的材料取出后再放入消毒的酶溶液,利用的酶液列于表1。Driselase和Sigma果胶酶用sephadex 25^[3]脱盐纯化。LTM法,撕皮的或切割成小块组织放入培养皿内,用胶带密封放在25°C和暗中,在酶液内18小时;STM法,组织放在旋转摇床(40rpm)上,25°C下酶处理3小时。保温后原生质体释放出来,如前法^[6]离心、洗涤。洗涤液加有0.1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的10% (W/V)甘露醇溶液。然后,原生质体在100毫升三角瓶的10

毫升混有抗菌素^[7]的培养液中培养,密度为 $1-5 \times 10^5$ /毫升。如前法保温,培养基是减半浓度的 Harada (H) 的培养基,含有下列无机盐: KNO_3 、 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 、 $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,每升中依次含有525.5毫克、218.5毫克、159毫克、0.08毫克、48.6毫克和0.0075毫克,和全浓度的H培养基,它们均含10%(W/V)甘露醇。液体培养14—21天后,发育成细胞团。用常规技术^[2,3]将细胞团埋入0.6%(W/V)琼脂培养基中。原生质体平板密度为 $5 \times 10^4-1 \times 10^5$ /毫升。培养二周后,移出琼脂条并放到含有6%(W/V)甘露醇的新鲜H培养基上。2—3周后出现小的绿色细胞团后,再移到有3%(W/V)甘露醇的新鲜H培养基上。继续发育的愈伤组织再次移到减去甘露醇的全浓度H培养基或修改的MLS培养基上。MLS培养基含有烟酸0.5毫克/升、 B_6 0.5毫克/升、甘氨酸2.0毫克/升、L-谷氨酰胺140毫克/升、L-半胱氨酸10毫克/升、蔗糖40克/升、2,4-D1毫克/升、KT1毫克/升和灭菌的椰子汁10%。细菌污染经常发生,然而混合酶液内加入100微克/毫升氯霉素能达到排除污染。仅用第一叶片原生质体试验了琼脂固体长时期培养。

用2NHCl将混合酶液pH调至5.8,500g离心15分钟,微孔滤膜过滤灭菌。STM分离时省略MES[2-(N-吗啉代)乙烷-磺酸-钠盐]。R-10酶由日本东京Kinki Yakult manuf 公司生产。Driselase酶由日本东京协和发酵有限公司提供,果胶酶由美国圣路易斯化学公司提供。

结 果

原生质体分离 STM法:不论用撕除表皮还是用金刚砂擦伤/薄片法,从第一叶片和子叶均能成功地分离出原生质体。然而STM法可能更适合子叶组织,和LTM法分离的材料(图1)比较,STM法分离的第一叶原生质体外观上为较小的亚原生质体。STM法分离的子叶原生质体和LTM法的第一叶片原生质体形态上相似,只是略大些(40—60微米,30—50微米),这可能是由于质壁分离的作用。原生质体平均产量 6×10^5 细胞/子叶。

LTM法:对原来过夜分离的方法已作了修改;当大量叶片或子叶撕除表皮时,利用甘露醇液除去过量的表面消毒剂,使组织处于质壁分离状态。混合酶液几种组合能用第一叶片组织分离原生质体(表1)。不论何法制备的原生质体在形态上均无差别,产量变化在 $1-4 \times 10^6$ 原生质体/叶片左右。适合的年龄和质地的叶片材料(苗龄14—21天,充分伸展的叶片)产生有活力的原生质体,年幼的叶片产生大量的融合体^[12],而较老的材料除用纯化的酶制剂外,往往降低酶的消化作用。如已观察到的,MES^[13](表1)与简单盐类培养基一起使用时,有助于原生质体的稳定。

原生质体培养 STM法分离子叶原生质体:至今只有在Otsuki等^[15]的简单盐类培养基中观察到子叶原生质体,在该培养基中,原生质体表现特有的膨大、叶绿体 cys-trophy 和细胞质流动^[4,6]。然而这种简单培养基含有不能代谢的炭源或生长因素,因此不能期望发生分裂。

第一叶的原生质体无论用LTM或STM法以及采用任何一种混合酶液(见表1)分离,在最初的液体和接着的固体培养均表现出培养物特有的变化。如前所示,新制备的原生质体在形态上有一清晰的外貌。在减半的或完全浓度的培养基中3—4天(图2)均产

表 1 黄瓜第一叶及子叶原生质体游离的条件

叶 处 理		混合酶组成 % (W/V)	
		子 叶	第 一 叶 片
STM 法	金刚砂擦伤和切成薄片	1.5% Driselase (D) 0.5%果胶酶 (P)	2.0% (D) 0.5% (P)
	撕除表皮	—	2.0% (D) 0.5% (P)
LTM ¹⁾	撕除表皮	0.2%纯化的 Driselase(PD) 0.2%纯化的果胶酶 (PP)	0.7% (D) 0.7% (P)
			0.2% (PD) 0.2% (PP)
			0.7%纤维素酶, R-10 0.7%果胶酶, R-10

1) 酶制剂溶于简单盐类溶液中, 盐类组成:

KH₂PO₄ 27.2 毫克/升

KNO₃ 101.0 毫克/升

CaCl₂·2H₂O 148.0 毫克/升

KCl 0.16 毫克/升

CuSO₄·5H₂O 0.0025 毫克/升

MgSO₄·7H₂O 247.0 毫克/升

甘露醇为 10%, 葡聚糖硫酸钾 0.5% (W/V) (葡聚糖分子量为 560, S 含量为 17.3%, 日本, 东京, Meito Sangyo 有限公司), EMS 3mM。

STM 法酶制剂溶于 10%甘露醇液内。

生细胞分裂。在全浓度 H 培养基上 5—7 天, 或者在减半浓度 H 培养基上 4—5 天(图 3) 均出现细胞团, 在液体培养基中开始小愈伤组织的形成。液体培养 12—21 天后, 肉眼可见的分裂细胞组成团埋在全浓度 H 固体培养基中, 固体培养 8 天后大约 60% 的细胞团进入下一轮的分裂。以后每二周将含有细胞团琼脂条移到新鲜的 H 培养基上, 并降低渗透压的水平, 最后形成绿/白色细密的愈伤组织。这种愈伤组织移到 MLS 培养基上 6 周内形成根, 愈伤组织也可移到新鲜的 MLS 或无甘露醇的 H 培养基上进行继代培养。

讨 论

STM 或 LTM 方法都能成功地从两个黄瓜品种的子叶或第一叶片组织中分离原生质体, 用任何一种方法分离的第一叶片原生质体在培养中表现相似的行为。组织灭菌时, 甘露醇以及 LTM 法中用 MES 作缓冲剂均可提高原生质体的稳定性^[13]。一些工作者用不同组合的混合酶制剂^[3,4]分离原生质体, 类似的混合液用于黄瓜叶肉组织。抗菌素无论用在分离原生质体时, 还是用在液培养基中, 或者前后均用, 对细胞分裂和愈伤组织增生均无影响, 并可减少污染的机会。任何一个黄瓜品种第一叶原生质体形成的愈伤组织都能被诱导形成根, 但尚不能产生芽。

另一些工作者对原生质体产生的愈伤组织的器官发生感到困难^[16-20], 不排除向培养基中加入所需要的某种植物提取物而致器官发生的可能。因为有一篇报道用这种提取物^[5], 使黄瓜愈伤组织形成完整植株, 该提取物也用于菜豆愈伤组织^[21]的器官发生

试验。然而,细微的变动生长素水平可提供更多再生的可能性^[16],为此,现在进行的工作是为了在无病的黄瓜原生质体产生的愈伤组织和感染黄瓜的花叶病毒原生质体^[22]中均获得完整的器官发生,最后产生无病毒植物。

[李文安译自 *Plant Sci. Lett.*, 9, 45—51, 1977. 张德颐 校]

参 考 文 献

- [1] E. C. Cocking, 1960, *Nature*, 187:927.
- [2] I. Takabe, et al., 1971, *Naturwiss.*, 58:318.
- [3] O. L. Gamborg, et al., 1974, *Can. J. Genet. Cytol.*, 16:737.
- [4] E. C. Cocking, 1972, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23:29.
- [5] W. Maciejewska-Potapezykova, et al., 1972, *Acta Soc. Bot. Polon.*, 61:329.
- [6] R. H. A. Coutts and K. R. Wood, 1975, *Plant Sci. Lett.*, 4:189.
- [7] R. H. A. Coutts, et al., 1975, *Nucl. Acid Res.*, 2:1111.
- [8] H. Beier and G. Bruening, 1975, *Virology*, 64:272.
- [9] B. W. W. Grout and R. H. A. Coutts, 1974, *Plant Sci. Lett.*, 3:397.
- [10] H. Harada, 1973, *Z. Pflanzenphysiol.*, 69 (1):77.
- [11] E. M. Linsmaier and F. Skoog, 1965, *Physiol. Plant.*, 18:100.
- [12] R. H. A. Coutts, *Linn. Soc.* (in press).
- [13] K. W. Kao and M. R. Michayluk, 1975, *Planta*, 126:105.
- [14] L. E. Pelcher, et al., 1974, *Plant. Sci. Lett.*, 3:107.
- [15] Y. Otsuki, et al., 1972, *Virology*, 50:45.
- [16] C. R. Landgren, 1976, *Am. J. Bot.*, 63:473.
- [17] O. L. Gamborg, et al., 1975, *Plant Sci. Lett.*, 4:285.
- [18] S. Poirier-Hamon, et al., 1974, *J. Exp. Bot.*, 25:752.
- [19] Aliza Vardi, et al., 1975, *Plant Sci. Lett.*, 4:231.
- [20] M. D. Upadhyaya, 1975, *Potato Res.*, 18:438.
- [21] O. J. Crocorno, et al., 1976, *Z. Pflanzenphysiol.*, 785:456.
- [22] R. H. A. Coutts and K. R. Wood, *Arch. Virol.* (in press)

用平板技术从水稻离体原生质体 获得的愈伤组织的分化

P. C. Deka S. K. Sen

摘 要

用酶处理,包括先用2%果胶酶,再用3%纤维素酶(酶液均用0.45 M甘露醇液配制, pH 5.4)从水稻 (*Oryza sativa* L.)叶肉细胞和愈伤组织细胞分离出原生质体(用上述浓度的酶制剂混合液处理,叶肉细胞的有活力的原生质体产量为50—60%,愈伤组织的有活力的原生质体产量为60—70%)。我们的完全确定的培养基由三种已知培养基组合而成(表1)。培养条件为:培养皿中铺软琼脂;26°C。在这条件下原生质体在二十四小时后再生细胞壁。愈伤组织原生质体在培养四天后,叶肉原生质体培养五天后观察到第一次分裂。然后细胞分裂持续进行,培养四周后,在培养皿里出现肉眼可见的小的白色愈伤组织。植物材料类型(白色叶鞘)和细胞密度对细胞群落形成的效果来说是重要因素(植板率30%)。移到适宜培养基上,至今,健康根的形成是愈伤组织形态建成的反应。

前 言

自从 Cocking(1960)引入酶法分离植物原生质体的先驱工作以来,很快被认识到,为了研究许多问题,植物原生质体是非常有价值的试验材料,研究这些问题不适宜利用细胞或组织。原生质体可被用于种内或种间融合(Schenk 和 Hildebrandt,1968; Nickell 和 Torrey,1969; Keller, 和 Melchers,1973; Kao和 Michaylux, 1974),DNA 的转化(Ohyama 等,1972; Holl,1973; Hess 等,1973; Hoffmann 和 Hess,1973)和通过细胞器的移植(Potrykus 和 Hoffmann,1973; Potrykus, 1973; Bonnett 和 Eriksson,1974)去修饰细胞。然后,只有具有将原生质体发育成再生细胞,能使它们分裂,形成愈伤组织并最后诱导它们分化成开花植株的技术,才能从这些基因操作试验中获得有益的结果。仅从几种植物的叶肉和愈伤组织的原生质体形成了愈伤组织(Takebe 等,1971; Nagata 和 Takebe,1971; Nitsch 和 Ohyama,1971; Potrykus 和 Durand,1972; Constabel 等,1973; Pelcher 等,1974)。原生质体分离和培养所需要的条件,以及诱导分化和植株发育所需要的程序,对每个种或每个基因型来说均已明确,但可能有相当大的变化。迄今,完整植株再生局限于烟草(Takebe 等,1971; Nagata 和 Takebe,1971; Nitsch 和 Ohyama,1971)、矮牵牛(Durand 等,1973; Binding,1975)、石刁柏的叶状枝(Bui Dang Ha 和 Machenzie,1973)、胡萝卜(Grambow 等,1972; Gamborg 等,1973)和油菜(Kartha 等,1974)。本文报道关于水稻(*Oryza sativa* L.)叶肉组织和愈伤组织原生质体的分离和培养程序的成果。

材 料 和 方 法

叶肉原生质体的游离 为了游离叶肉原生质体,采用生长在室外的水稻柔软的白色的叶鞘。为了使细胞膨胀,收集材料前至少两天,田间或钵中的幼苗生长须充分灌水使细胞膨胀,这种膨胀细胞是为分离出较好的原生质体所不可缺少的。30天到50天苗龄为十分适合的材料来源。

叶鞘首先用70%酒精消毒2分钟,随即用7%次氯酸钙10分钟,最后用无菌蒸馏水充分洗涤。然后横切成薄片,并用无菌水洗涤。这薄片最初在真空条件下于0.45 M甘露醇 pH 5.4的2%果胶酶溶液中(1克组织20毫升酶液),保温10分钟,随后在正常压力下、30°C下保温1小时,并缓慢地经常摇动,然后这混合液通过100微米不锈钢网过滤,去掉未消化的叶片物质。解离的组织用低速离心(100×g)收集起来,并重新悬浮在含3%纤维素酶(Onozuka,日本生化公司)的0.45 M甘露醇, pH 5.4溶液中,在30°C下保温2小时,缓慢摇动。最后收集原生质体是通过低速离心(100×g 2分钟),用0.45 M甘露醇洗涤。

愈伤组织原生质体的游离 从水稻的茎获得的愈伤组织细胞被利用了,培养在0.5毫克/升2,4-D,0.5毫克/升IAA和0.1毫克/升激动素的SH培养基上,一年时间内每四周亚培养一次。为了消化细胞壁,将500克愈伤组织细胞用锋利的刀片切成很小的碎片,并保温在30°C下,在25毫升2%果胶酶,3%Onozuka R-SS纤维素酶和0.45 M甘露醇混合溶液中, pH 5.4,不时地轻轻摇动。保温4小时后,悬浮液通过不锈钢网(100微米)过滤,用低速离心机(100 g, 2分钟)收集原生质体并用0.45 M甘露醇洗涤三次。

酶混合液事先已经通过微孔滤膜(Millipore filter, 0.45微米)过滤消毒,所有程序都在无菌条件下进行。按Nagata和Takebe(1970)试验方法用0.1%荧光增白剂染色细胞(美国生化公司)以判断细胞壁是否完全去除。

原生质体培养 我们采用Takebe等人(1971)和Nagata和Takebe(1971)所发表的Berymann的技术(1960)进行原生质体培养。游离的原生质体用0.45 M甘露醇洗后,最后用无生长素的培养基(表1)洗涤。然后再悬浮在培养基里,细胞密度 $2.0-2.5 \times 10^4$ /毫升,此悬浮液经从容而迅速地与等容量保持45°C的已融化琼脂培养基混合(培养基中含0.8%琼脂见表1),以5毫升量倒入5厘米直径的玻璃培养皿内。培养皿用胶带封口并倒置于26°C下。叶肉原生质体放在连续光下(200勒克司)。而愈伤组织的原生质体放在黑暗中,每次试验至少有5个平板重复。

当愈伤组织大小达到约1.5—2毫米时(培养约8周),转移至含有0.5毫克/升2,4-D,0.5毫克/升IAA,0.25毫克/升NAA和0.1毫克/升KT的SH培养基上(Schenk和Hildebrandt 1972),于26°C交替用光照(500勒克司)和黑暗各12小时以诱导分化。

结 果

为了成功地分离叶肉原生质体,植株年龄、细胞膨胀度和植株所用部位的质地是考虑

中的最重要因素。我们从水稻叶片游离原生质体失败了。只有用30—50天株龄的植株上柔软带白色部份的叶鞘,对所采用的技术反应良好。在与纤维素酶混合消化45分钟后,开始产生叶肉原生质体,于2小时后大约50—60%的细胞形成原生质体。在从愈伤组织游离原生质体的情况下,只有新鲜组织对所用的酶混合液有反应,消化4小时后约60—70%细胞变成原生质体。叶绿体均匀遍布在游离的叶肉原生质体里的细胞质中,另一方面,在愈伤组织游离出的原生质体中能观察到粒状物和液泡。原生质流动表示原生质体处于活的状态。

原生质体培养24小时之后,发生细胞壁再生,此时已经看出原生质体形状从圆形到椭圆形的变化。叶肉原生质体的第一次分裂发生在培养5天之后,愈伤组织原生质体于培养4天后。这个观察被其他工作者早期的报道所确认(Nagata和Takebe 1970, Kartha等,1974),细胞壁的形成在细胞分裂之前。第二次分裂在第一次分裂后4天发生,此后培养15—20天细胞继续分裂形成细胞丛。渐渐地难以计算细胞团内的细胞数,叶肉原生质体的叶绿体变得少而且较不清楚。

表1 水稻原生质体培养基的组成

大量元素 (毫克/升) ¹⁾		微量元素 (毫克/升) ²⁾	
KNO ₃	950	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6
NH ₄ H ₂ PO ₄	300	KI	0.83
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
NaEDTA	20	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
有机组成 ³⁾		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.010
环己六醇(肌醇)	100		
维生素B ₁	0.5	蔗糖	10克/升
维生素B ₆	0.5	甘露醇	0.3 M
叶 酸	0.5	2,4-D	1.4毫克/升
烟 酸	5.0	pH(在蒸汽消毒前)	5.8
生物素	0.5		

1) 按照 Schenk 和 Hildebrandt(1972), 但 KNO₃ 减降到 950 毫克/升。

2) 按照 Nagata 和 Takebe(1971), 但其中 CoCl₂ 减低到 0.01。

3) 按照 Ohyama 和 Nitsch(1972 b)。

培养四周后,从单个原生质体形成的细胞团生长成小的带白色的肉眼可见的细胞群落。培养8周后,大多数细胞群落的大小达到1.5—2.0毫米,此时,可准备转移到SH分化培养基上(Schenk和Hildebrandt,1972)。

我们试验里,培养五周后没有出现新的可统计的细胞群落。根据Nagata和Takebe(1971)描述的方法测定当时的植板率。平均植板率达30%。原生质体的平板低于一定密度时,不能形成细胞群落。虽然这种临界密度在不同试验中有所不同,它接近 1×10^4 /毫升的数值。

当愈伤组织转移到含有0.5毫克/升2,4-D,0.5毫克/升IAA,0.5毫克/升NAA和0.1毫克/升KT的SH培养基上时,细胞群落最初旺盛生长成愈伤组织团。两周后,一些愈伤组织分化出健康的根,但是,通过这些努力,在长时期培养后没有发生芽。