

农业科学集刊

ACTA AGRICULTURAE SINICA

第二集

农作物原生质体培养专辑

Special Issue on Protoplast Culture of Field Crop

华南农业大学
《农业科学集刊》编辑委员会 编

中国农业出版社

农业科学集刊

ACTA AGRICULTURAE SINICA

第二集

农作物原生质体培养专辑

Special Issue on Protoplast Culture of Field Crop

华 南 农 业 大 学 编
《农业科学集刊》编辑委员会

中 国 农 业 出 版 社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

农业科学集刊 第二集: 农作物原生质体培养专辑/华南农业大学和《农业科学集刊》编辑委员会编. —北京: 中国农业出版社, 1995. 5

ISBN 7-109-04010-0

I. 农…

II. 华…

III. ①农业科学 ②农作物-原生质体培养-文集

IV. ①S-55 ②S5-53

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路2号)

(邮政编码 100026)

出版人: 蔡盛林

责任编辑 郑剑玲

北京外文印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

1995年5月第1版 1995年5月北京第1次印刷

开本: 787毫米×1092毫米 1/16 印张: 12.25

字数: 274千字 印数: 1—1 500册

定价: 20.00元

《农业科学集刊》编辑委员会

主任委员：鲍文奎

委 员：庄巧生 石元春 邱式邦 鲍文奎 谢联辉

(以下按姓氏笔画为序)

王象坤	王国勋	王世耆	王恒祥	尤崇杓	卢浩然	吴兆苏
吴景锋	李炳坦	李悦堃	李永庆	陈伦寿	陈其煥	辛志勇
庞忠美	林 葆	张官政	胡国文	胡红梅	钱 平	莫惠栋
郭豫元	郭传甲	崔读昌	黄自然	黄佩民	盖钧镒	瞿志海

《农业科学集刊》(二) 农作物原生质体培养专辑编委会

主 编： 简玉瑜

副 主 编： 李悦堃 邓秀新 陈志贤 魏景芳

编 委： 胡道芬 杨世湖 杨跃生 杨剑波

余建明 赵桂兰 胡红梅 庞忠美

ACTA AGRICULTURAE SINICA No. 2 Special Issue on Protoplast Culture of Field Crop

Editor-in-Chief: Jian Yuyu

Associate Editors-in-Chief:

Li Yuekun Deng Xiuxin Chen Zhixian Wei Jingfang

Editorial Board:

Hu Daofen Yang Shihu Yang Yuesheng Yang Jianbo

She Jianming Zao Guilan Hu Hongmei Pang Zhongmei

序

华南农业大学遗传工程研究室主持的农业部“八五”重点科研项目“作物原生质体培养技术实用化”专题研究组，将几年来的研究工作结果及国内外研究动态，汇集成一本《农作物原生质体培养论文专集》，经与《农业科学集刊》编辑委员会的同志们协商，愿作为该集刊的一个专辑共同编辑出版，以便在国内外进行更广泛的学术交流和图书资料等部门的系统收集。我认为，这是一件很有意义的尝试。希望《农业科学集刊》这一部高级学术性系列出版物越编越好。

鲍文奎

1995年4月于北京

前 言

植物原生质体再生植株技术是利用原生质体进行细胞器移植、细胞融合和有价值的基因遗传转化,藉以改良作物种性的关键技术环节。近几年随着重要农作物原生质体再生技术的突破,对已成株的作物必需扩大基因型,选择生产上主栽品种或需要改良品种为起始材料,面向育种,提高植株再生率和技术重复性,缩短培养周期,为建立实用化高频再生体系,从而使原生质体技术达到实用化、系统化、程序化,朝着改良作物提供高效实验系统而努力。为此,农业部“八五”期间设立“作物原生质体培养技术实用化”专题研究。

本论文专集编撰目的是展示农业部“八五”重点项目“作物原生质体培养技术实用化研究”的进展。着重介绍近5年10种作物(水稻、小麦、大麦、甘蔗、玉米、棉花、柑桔、大豆、烟草、马铃薯)原生质体培养和植株再生技术关键和进展:如水稻原生质体已有30多个基因型获得再生植株,有4个实验室建立起较成熟体系;有的单位只用37天快速成株;有的采用有性—无性交替和选择或用脱水处理可使植株再分化率提高1.6—2.9倍或5—6倍;栽培稻和野生稻、籼粳亚种间融合获得杂种。小麦扩大5个基因型再生,已获可育植株。棉花已从6个基因型获得再生,已获部分可育株,有的还得到种子。大豆从4个基因型获得芽的分化。玉米从自交系“330”获再生植株。柑桔已建立了原生质体再生及融合体系,获得了9个种的原生质体再生植株,2个属间及5个种间体细胞杂种,3个杂种生长在田间,其中哈姆林甜橙与粗柠檬杂种已开花。烟草获得13个体细胞杂种,选育出2个高抗黑胫病、耐黄瓜花叶病和赤星病的香型烤烟新品系;另一个品质好、高抗黑胫病的雄性不育系,新品系已进入生产应用阶段。马铃薯已获得双单倍品系与南美二倍体栽培种的体细胞杂种。这些进展均为原生质体实用化打下坚实的基础。

此外,我们邀请国内知名专家撰写3篇综述:概述了原生质体培养理论和技术,我国农作物原生质体研究的重要进展,并对原生质体培养在育种上的应用前景作了展望。还邀请蔬菜和果树专家介绍了原生质体培养情况,指出这方面进步慢、开展研究的单位不多,应引起重视。

本论文专集的作者均是多年从事农作物原生质体研究者,并有较突出的青年专家。我们盼望通过本集的出版,总结近年成果以便推动该领域更深入的研究。

本集的组稿、撰稿和统编工作十分仓促,加之本人水平有限,难免有缺点、遗漏乃至错误,欢迎批评指正。在组织出版过程中,得到了《农业科学集刊》编委会的同志以及作者们全力支持,著名植物遗传学家中国科学院院士鲍文奎先生为本集写了序言,在此表示衷心的感谢。

简玉瑜

1995年4月于广州

目 录

植物原生质体培养理论、技术研究进展	夏镇澳 (1)
主要农作物原生质体研究的重要进展	卫志明 (7)
烟草原生质体融合选育新品种新进展 龚明良 卜锅章 丁昌敏 姚绍满 张历历 孙玉和	(13)
水稻原生质体培养技术体系的建立 颜秋生 张雪琴 滕 胜 黄纯农 严庆丰 王君晖	(20)
栽培稻与野生稻原生质体培养与融合	张 伟 简玉瑜 杨跃生 陈远玲 (27)
离体细胞的内源性诱变原理及其在水稻生物技术中的应用	杨世湖 (33)
脱水处理对水稻培养组织植株再生的高效调控作用	杨跃生 简玉瑜 (39)
水稻原生质体的高效培养	吴家道 杨剑波 向太和 吴李君 (47)
籼粳稻亚种间体细胞杂交植株再生的研究	向太和 杨剑波 吴家道 (55)
水稻原生质体再生植株及后代的性状表现 余建明 周邗扬 陆维忠 吴鹤鸣 李向辉 孙勇如	(64)
三个小麦品种的原生质体植株再生 李宏潮 张晓东 胡道芬 平林利郎 町井博明	(70)
小麦原生质体培养及可育植株再生 葛亚新 魏景芳 吕孟雨 崔东颖 王海波	(76)
“临障麦”原生质体培养和植株再生 魏景芳 葛亚新 包书丰 王海波 吕孟雨 崔东颖	(81)
大麦原生质体再生绿色植株	颜秋生 张雪琴 施建表 李浚明 (89)
玉米原生质体培养的研究	杨剑波 郑卫红 吴家道 郑乐娅 向太和 (94)
甘蔗原生质体的植株再生	廖兆周 陈明周 廖巧霞 颜秋生 张雪琴 (100)
从6个陆地棉品种的细胞悬浮系游离原生质体与培养获得植株再生 李淑君 岳建雄 焦改丽 陈志贤 余建明 吴敬音	(105)
陆地棉原生质体高频率分裂及植株再生	余建明 吴敬音 周邗扬 (109)
陆地棉和哈克尼西棉原生质体电融合条件研究 余建明 吴敬音 蔡小宁 朱卫民	(114)
陆地棉小孢子原生质体的游离与培养 岳建雄 李淑君 张慧军 陈志贤 王娇娟 胡绍安	(118)
大豆原生质体培养高频再生技术研究	赵桂兰 刘艳芝 周晓馥 徐宏伟 (124)
我国柑桔原生质体操作与育种研究进展 邓秀新 邓占鳌 叶新荣 甘 霖 章文才	(129)

柑桔同源及异源四倍体花粉育性研究

..... 邓秀新 Fred G. Gmitter Jr. Jude W. Grosser (138)

马铃薯原生质体培养及体细胞融合和杂交技术研究 戴朝曦 孙顺娣 李继红 (144)

植物原生质体培养中的粘连现象与其质膜电性

..... 杨剑波 李 莉 施 俊 吴家道 许智宏 卫志明 (152)

植物原生质体培养和融合在育种上应用 颜昌敬 张玉华 (156)

我国蔬菜原生质体培养研究 叶志彪 (163)

果树原生质体研究进展 史永忠 邓秀新 (172)

CONTENTS

Theoretical and Technical Advances in Plant Protoplast Culture	Xia Zhenao (1)
Advance in Major Crops Protoplasts Research	Wei Zhiming (7)
Recent Progress of Tobacco Breeding by Somatic Hybridization Gong Mingliang, Bu Guozhang, Ding Changmin, Yao Shaoman, Zhang Lili, Sun Yuhe (13)	
Establishment of a System of Culture Technique from Rice Protoplasts	
Yan Qiusheng, Zhang Xueqin, Teng sheng, Huang Chunrong, Yan Qingfeng, Wang Junhui (20)	
Protoplast Culture and Fusion in Cultivated Rice and Wild Rice Zhang Wei, Jian Yuyu, Yang Yuesheng, Chen Yuanling (27)	
Endogenous Mutational Theory of Plant Cell <i>in Vitro</i> and its Application to Rice Biotechnology	Yang Shihu (33)
Efficient Regulatory Effect of Dehydration Treatment on Plantlet Regeneration in Rice Tissue Cultures	Yang Yuesheng, Jian Yuyu (39)
The High Effective Technique of Protoplast Culture in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Wu Jiadao, Yang Jianbo, Xiang Taihe, Wu Lijun (47)	
Studies on Plant Regeneration of Somatic Hybridization Between Indica and Japonica Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Xiang Taihe, Yang Jianbo, Wu Jiadao (55)	
Characters of the Regenerated Plants and Their Progenies (R_2) from Rice Protoplasts She Jianming, Zhou Hanyang, Lu Weizhong, Wu Heming, Li Xianghui, Sun Yongru (64)	
Plant Regeneration from Protoplast Cultures of Three Cultivars of Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) Li Hongchao, Zheng Xiaodong, Hu Daofen, Toshio Hirabayash, Hiroaki Machii (70)	
Wheat Protoplast Culture and Fertile Plant Regeneration Ge Yaxin, Wei Jingfang, Lü Mengyu, Cui Dongying, Wang Haibo (76)	
Regeneration of Protoplasts to Plants in <i>Triticum aestivum</i> L. CV. Lingzhangmai Wei Jingfang, Ge Yaxin, Bao Shufeng, Wang Haibo, Lü Mengyu, Cui Dongying (81)	
Green Plant Regeneration from Protoplasts of Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Yan Qiusheng, Zhang Xueqin, Shi Jianbiao, Li Junming (89)	
Studies on Corn Protoplast Culture	
..... Yang Jianbo, Zheng Weihong, Wu Jiadao, Zheng Leya, Xiang Taihe (94)	
Plant Regeneration from Protoplasts of Sugarcane Liao Zhaozhou, Chen Mingzhou, Liao Qiaoxia, Yan Qiusheng, Zhang Xueqin (100)	
Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis from Suspension Cultures	

Derived Protoplasts of 6 Cotton Cultivars (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	
..... Li Shujun, Yue Jianxiong, Jiao Gaili, Chen Zhixian, She Jianming, Wu Jingyin	(105)
High Frequency of Plating Efficiency and Plant Regeneration from Protoplasts	
of Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	
..... She Jianming, Wu Jingyin, Zhou Hanyang	(109)
Study of Electrofusion Condition of Protoplasts Between <i>Gossypium hirsutum</i> L.	
and <i>G. Harknessii</i>	
..... She Jianming, Wu Jingyin, Cai Xiaoning, Zhu Weimin	(114)
Isolation and Culture of Protoplast of Microspore in Upland Cotton	
(<i>Gossypium Hirsutum</i> L.)	
..... Yue Jianxiong, Li Shujun, Zhang Huijun, Chen Zhixian, Wang Jiaojuan, Hu Shaoan	(118)
Study on Technique of High Frequency Regeneration of Protoplast Culture in Soybean	
..... Zao Guilan, Liu Yanzhi, Zhuo Xiaofu, Xu Hongwei	(124)
Protoplast Manipulation and Breeding in Citrus	
..... Deng Xiuxin, Deng Zhanao, Ye Xinrong, Gan Lin, Zhang Wencai	(129)
Pollen Fertility of Auto- and Allo-tetraploids of Citrus	
..... Deng Xiuxin, Fred. G. Gmitter Jr. Jude. W. Grosser	(138)
Studies on the Techniques of Protoplast Culture as well as Somatic Fusion and	
Hybridization in Potato	 Dai Chaoxi, Sun Shundi, Li Jihong (144)
Studies on Relationship Between the Aggregation of Plant Protoplasts in Culture and	
Their Surface Charge	
..... Yang Jianbo, Li Li, Shi Jun, Wu Jiadao, Xu Zhihong, Wei Zhimin	(152)
Applications of Protoplast Culture and Fusion in Crop Genetic Improvement	
..... Yan Changjing, Zhang Yuhua	(156)
Recent Advances in Protoplast Culture of Vegetable Crops in China	
..... Ye Zhibiao	(163)
Advances in Protoplast Research of Fruit Crops	 Shi Yongzhong, Deng Xiuxin (172)

植物原生质体培养理论、技术研究进展

夏 镇 澳

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 近几年植物原生质体培养研究进展较快。其趋势仍着重于农作物和经济植物;同时从一年生向多年生、从草本向木本、从高等植物向低等植物扩展。通过大量试验结果分析,已知影响原生质体培养得到再生植株的因素主要有三个环节:即基因型的选择,原生质体来源的选择与培养基、培养方法和培养条件的选择。这三个环节一旦环环相扣就可获得成功。近年来水稻叶肉原生质体培养已得到了再生植株,这是一个可喜的进展。此外,对植物原生质体培养所涉及到的生理问题如逆境反应、修复机理、脱分化、细胞分裂与形态发生等也取得一定结果,为进一步开展原生质体的理论研究提供了线索。对影响植物原生质体培养的外界条件如培养基组分、培养技术与方法等正在逐步改进。重要农作物原生质体培养的系统化或程序化研究引起多方面的重视。

关键词 原生质体;再生;逆境反应;细胞分裂

植物细胞具有坚固的细胞壁,是其特有的结构之一。细胞壁具有多种功能,对植物的生命活动以及对人类与自然界都有很大影响。但是由于它们的存在也曾给植物细胞生物学的研究带来一定困难与复杂性。早在18世纪就有科学工作者用机械法除去细胞壁以期得到裸露的植物细胞——原生质体(protoplast),但是进展甚慢;直到本世纪60年代酶法分离原生质体获得成功才促进了近代植物原生质体研究迅速发展,成为生物技术中重要的研究领域之一。目前已知植物原生质体及其衍生系统不仅是探索生命活动理论研究的良好体系之一,还可以通过对其进行各种细胞操作及遗传操作,从而改良农作物或经济植物的某些性状,在生产和应用上有巨大潜力。植物细胞离体培养时具有全能性,这是一个重要功能。经过科学工作者的努力试验,曾在多种植物,约2000余个例证中得到肯定,已无可怀疑。植物原生质体是人为地脱去细胞壁的细胞,脱壁对其生理特性引起了什么变化、对全能性的表达有些什么影响已成为植物原生质体研究的一个热点,有不少文献可以参阅^[1-4,20]。本文仅简要地介绍植物原生质体培养的一些近况和进展。

在植物原生质体培养研究的发展过程中有几个值得提出的成就:

- (1) Hanstein (1880) 首次起用原生质体(protoplast)一词。
- (2) Cocking (1960) 首次用酶法制备番茄根原生质体获得成功。
- (3) Takebe et al. (1971) 首次得到烟草叶肉原生质体培养的再生植株。
- (4) Fujimura et al. (1985) 第一例禾谷类作物——水稻原生质体培养再生植株。
- (5) Spangenberg et al. (1986) 甘蓝型油菜单个原生质体培养再生植株。

近十多年来植物原生质体培养取得了可喜的结果。据比较准确的统计,到1989年有分属于31个科、96个属的212种植物经原生质体培养得到了再生植株;而1993年已增加到分属于49个科、146个属的320多种植物。其趋势仍以农作物和经济植物为主,但从一年生向多年生、从草本向木本、从高等植物向低等植物扩展,如食用菌、藻类进展也较快。除了原生质体培养的理论与技术有所改进外,其它有关细胞、分子、遗传等学科的成就也与之交叉渗透并起了相互促进的作用。

经过多年来大量的试验分析,对于影响原生质体能否离体培养得到再生植株的众多因素一般可以归纳为三个环节:即基因型的选择,原生质体来源的选择与培养基、培养方法和培养条件的选择。这三个环节一旦环环相扣就可以获得成功。在各类植物的原生质体培养时对这三个环节的选择是有不同的。对比较容易培养的植物不同基因型的影响不大,例如烟草属有些不同的种或品种的原生质体在培养时对外植体或细胞系的来源、培养基的种类与组分、培养条件和方法等可以相似。而难以培养的所谓“困难植物”,例如禾本科的一些种或品种在这三个环节中的某些因素常有不同的要求,需要修改才能获得成功。

1 基因型的影响

近来,不同基因型对植物原生质体培养的影响已开始有些深入的工作。较早的试验曾经证明矮牵牛叶肉原生质体的不同生长发育时期是受不同基因所控制。通过番茄与秘鲁番茄有性杂交后对性状分离的遗传分析,证明其愈伤组织的再生能力是2个显性基因所决定的^[15]。Cheng和Veilleux(1991)对芙蓉(*Solanum phureja*)原生质体的培养能力也做过遗传分析,并证明从原生质体培养到形成愈伤组织是受2个独立位点的显性基因所调控^[6]。Dudits等(1991)用苜蓿(*Medicago sativa*)不同的基因型做了较深入的研究,认为有某个基因型在离体培养时难以形成体细胞胚。但是,如果将对激素调节有作用的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的rol B和rol C基因引入并表达,就可能促使其体细胞胚形成^[9]。虽然这些结果都是初步的,有关工作还刚刚开始,但已可以看出基因型对原生质体培养的研究已从组织和细胞水平的探索向分子水平深入。

2 原生质体的来源

制备原生质体的供体取用于植株的各类器官、组织、细胞或是由之建立的细胞无性系。同一个基因型的植株生长在不同的环境条件(光照长度、光强、光质、温度、湿度、营养、……等)中,它们的生理状态会有改变。即使是生长在相同的条件下用各种类型的外植体如叶片、胚轴、根尖等制备的原生质体,甚至是同一类型外植体所制备的原生质体,在离体培养时对各种培养基或培养条件的反应也会有不同。因此,供试植株最好生长在控制条件下,可以提高原生质体的细胞分裂率和再生能力。例如在田间种植的与在温室栽培的烟草或大豆等,即使是取用相同部位和叶龄相似的叶片来制备原生质体,它们在离体培养时生长也会有明显区别。因此,取用在控制条件下培养的外植体来制备原生质体再进行培养可以提高重复性。有人比较过向日葵幼叶、子叶或下胚轴原生质体的培养情况,结果只有下胚轴原生质体培养后得到了细胞团和形成体细胞胚,而前两种来源的原生质体甚至未能细胞分裂^[10]。也有报道从苜蓿品种Ardiana幼苗的根原生质体经培养可直接通过体细胞胚形成途径得到再生植株;如果用叶片或下胚轴诱导的细胞悬浮系原生质体则必须先形成愈

伤组织后再经诱导才能形成体细胞胚^[19]。至于禾本科植物,尤其是众所关注的禾谷类的原生质体培养难度就大得多;在80年代以前虽经多方面的大量试验但终未能成功。因此形成了两种看法。一部分科学工作者对于是否所有植物的细胞,特别是单子叶植物的叶肉原生质体仍具有细胞全能性产生了怀疑。另一种意见认为上述看法不当,失败的原因只是由于对有些植物原生质体所要求的培养条件和培养技术等不合适,还没有掌握,所以得不到再生植株。后来 Vasil 等(1980)改用胚性悬浮细胞原生质体在美洲狼尾草(*Pennisetum americanum*)获得成功, Fujimura 等(1985)首次得到水稻原生质体培养的再生植株。以后陆续在水稻(粳型、籼型,糯性、非糯性等)、小麦、大麦、玉米、高粱、谷子以及一些禾草类都得到了再生植株,例证有10多个品种和种。应当说后一种看法已可以认为是正确的。但是上述的禾谷类和禾草类成功的试验都是采用胚性悬浮细胞原生质体或采用胚性愈伤组织原生质体,因此还曾留下一个悬念。由于禾本科和禾谷类的叶肉原生质体培养长期未成功,它们是否有全能性仍没有被证实,更何况叶肉原生质体有制备方便、不需要长时间选择和先离体培养等优点。对此问题近年来终于初步得到解决,是一个可喜的进展。Gupta 等(1993)用6个水稻品种8天龄的无菌苗叶基或叶鞘原生质体进行液体/固体饲喂培养,已从4个品种得到了再生植株(详情可参阅有关文献)^[12]。这个工作的结果说明了过去有人认为禾本科叶肉原生质体丧失了全能性,并推想是由于细胞的DNA丢失或片段化引起了基因组改变而导致不能进行细胞分化的看法是根据不足的。水稻叶肉原生质体能有全能性表达的例证还为进一步开展其它禾本科植物的有关研究提供启示,十分值得注意。如果禾本科叶肉原生质体培养的水平可以赶上和超过模式植物,就有可能少用或不用胚性细胞系为制备原生质体的材料,能缩短整个培养时间,有助于减少体细胞克隆变异。除此之外,在有些植物经离体培养脱分化的或已分化的组织所制备的原生质体群体中除了二倍性等整倍数的细胞核外也可能有非整倍数的细胞核,这会增加培养的复杂性。

3 原生质体培养的生理问题

从细胞的角度来看,植物原生质体培养时涉及了几类问题,如逆境反应、修复机理、脱分化、细胞分裂与形态发生等。

3.1 逆境反应

这是细胞对外界刺激或诱导,如受伤、感染、高温、辐射等产生反应,涉及自御机理。由于细胞壁降解酶是一种逆境诱导剂,因此可以产生活化氧,引起脂类过氧化,减少细胞的流度同时伴随着胞质膜的泄漏^[13]。有的报道向日葵原生质体的再生能力与此类损伤成负相关^[5]。细胞对此类逆境反应一般会快速地产生涉及诱发不同代谢途径(例如苯基丙烷途径, phenyl-propanoid route)的酶系统,结果形成了植物抗毒素(phyto-alexins)和如木质素一类的结构多聚物。也有报道在原生质体分离时,编码泛性蛋白(ubiquitin protein)、类伸展素蛋白(extensin-like protein)、过氧化物酶,还有蛋白酶抑制物的基因立即活化^[7]。刚分离的烟草原生质体会产生二个几丁质酶、二个渗透蛋白(osmotin protein)和一个葡聚糖酶^[17]。有些逆境反应对原生质体制备是不利的,例如在甜菜原生质体制备时脂肪氧合酶(lipoxygenase)活性产生,形成类脂过氧化物(lipid peroxides),结果引起原生质膜的氧化损伤^[16]。而对马铃薯原生质体活力的损伤乃由于乙烯产生所致^[18]。由此可见,原生质体在分离过程中产生逆境反应的性质是决定它们以后在培养时全能性能否进一步表达的重要因

子之一, 需要深入研究。

3.2 修复机理

在原生质体分离时会丢失一些不同的细胞结构。最明显的是失去了细胞壁, 细胞壁是细胞形态和模式的一个重要因子, 没有了以后使原生质体中细胞骨架的组分、结构和方向会发生变化, 最常见的是引起细胞极性的改变^[21], 同时也会干扰质膜的蛋白质系统。质膜含有蛋白质复合体, 其作用是有机物的运输、离子进出细胞和识别各种外来的信号。由于用于脱壁的酶中多少杂有蛋白酶, 膜蛋白体可以是部分分布或全部分布, 因此分离的原生质体只有在重新合成这些蛋白质复合体后才能有功能。各类原生质体修复其质膜及其中蛋白质组分的能力、细胞壁和细胞骨架都对它们能否进一步发育有很大影响。

3.3 脱分化

分离的原生质体原来的细胞状态是会影响脱分化的进行。例如马铃薯组织的原生质体含有大量的淀粉体, 只有当这些淀粉体被代谢了以后才能见到细胞分裂, 这个时间约需 7 天才能完成^[14]。而烟草叶肉原生质体的叶绿体的脱分化过程则需要好几个细胞周期, 但与第一次细胞分裂的诱导并无必然联系。通常叶肉原生质体含有许多叶绿体。烟草叶肉原生质体分离后叶绿体显示出明显改变, 体积减小而晶体内含物与类囊体消失。这些原生质体的细胞质也改变了: 中央液泡消失、细胞体积增加、细胞成为富含细胞质, 其中有不少核蛋白体。细胞核在制备前后大多是浓缩的, 此时体积增大。开始培养时有不浓密的染色质出现, 原生质体脱分化成为类似分生组织状态的细胞。

3.4 细胞分裂

细胞骨架联系着细胞内各细胞器和其他胞质组分以及质膜。细胞壁与细胞骨架和细胞分裂、细胞分化密切相关。由于微管参与调节细胞形状及决定细胞分裂的平面与位置, 因此它在植物形态建成中起着重要作用。Fowke 等 (1990) 在云杉 (*Picea glauca*) 胚性原生质体培养中观察到微管的构成与细胞分裂有相关性, Dijak 和 Simmonds (1988) 从苜蓿叶肉原生质体直接形成体细胞胚的观察中也证明这一点^[8, 11]。形成一个完全新的细胞壁一般需要 2 天, 从哈甲豆 (*Vicia hajastana*) 快速生长的悬浮细胞制备的原生质体在 2 天内可有细胞分裂, 但在子细胞中遗传物质的分布有些很不规则 (Simmonds, 1991)。这些结果肯定了细胞壁在细胞分裂过程中的必要作用。一个原生质体能否进入细胞分裂也依赖处于细胞周期的什么时期, 如白花丹烟草的叶组织如果大多细胞处于 G_2 期, 则所制备的原生质体以后会有较高的细胞分裂能力 (Magnien 等, 1982)。棉花的子叶原生质体的 G_2 期与细胞壁形成及细胞分裂有高度正相关, 而如处于 G_1 期则会无此相关 (Firoozabady, 1986)。矮牵牛叶肉原生质体在制备后 18h 重新开始 RNA 合成, 其 RNA 浓度可增高到对诱导 DNA 复制和细胞分裂所必需的浓度 (Bergounioux 等, 1988)。由于细胞的异质性, 从一群原生质体可以经离体培养形成多种类型的愈伤组织, 如紧密、松散、颗粒状等各种形态。加上多种激素对比和调控, 不少植物的原生质体可以在经诱导形成不同类型的愈伤组织如胚性、非胚性或中间型以后, 通过体细胞胚或分化芽根途径完成细胞全能性表达。

3.5 其它因子

外界因子如各种培养基的组分与各种附加物、培养基的 pH、植板密度、培养方法、培养时的光照和温度等条件都影响原生质体培养和再生植株过程。这在许多研究结果和文献中都有介绍和综述可以参阅。采用任何一种原生质体培养技术的目的都在于:

- (1) 促使愈伤组织诱导率、分化率增加,使所培养的原生质体能有全能性表达。
- (2) 得到重复性好、植板率和再生植株能力高、生长良好的再生物。
- (3) 促使重要农作物和经济植物等的原生质体培养能够系统化或程序化以赶上模式植物。
- (4) 为其他生物工程研究提供良好受体系统、为理论深入提供素材。

4 结语

目前在植物原生质体培养技术的发展中应当注意研究的是:低密度和单个原生质体培养,原生质体衍生系统如微小原生质体、胞质体、核质体的利用,计算机系统、流式细胞光度计等技术的应用,各种附加剂影响的原因等。总之要掌握原生质体培养的三个环节,同时深入开展机理和扩大应用的研究。植物原生质体培养一定会取得更大成就。

参 考 文 献

- 1 夏镇澳.植物原生质体研究中的几个问题.细胞生物学杂志.1983,3:1—7
- 2 夏镇澳.农作物原生质体培养.农作物组织培养(颜昌敬主编).上海科学技术出版社,1991,35-48
- 3 夏镇澳.植物原生质体的理论研究.植物原生质体培养(孙勇如、安锡培主编).北京:科学出版社,1991,7—11
- 4 夏镇澳.原生质体在植物生理学研究中的应用.植物原生质体及其遗传操作(许智宏、卫志明主编).上海科学技术出版社,1995
- 5 Biedinger U Schnabl H. Ethane production as an indicator of the regeneration potential of electrically-fused sunflower protoplasts(*Helianthus annuus* L.). J. Plant Physiol. 1991,138(4):417—420
- 6 Cheng J, Veilleux R E. Genetic analysis of protoplast culturability in *Solanum phureja*. Plant Sci. 1991,75(2):257—265
- 7 Criqui M C et al. In search of genes involved in the re-entry of mesophyll cells into the cell cycle. Physiol. Plant. 1991,82(1):A35
- 8 Dijak M, Simmonds D H. Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. Plant Sci. 1988,58(2):183—191
- 9 Dudits D et al. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic Cells *in vitro*. J. Cell Sci. 1991,99(3):473—482
- 10 Dupuis J M et al. Plant donor tissue and isolation procedure effect on early formation of embryoids from protoplasts of *Helianthus annuus* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1990,22(3):183—190
- 11 Fowke, L C et al. Microtubule organization and cell division in embryogenic protoplast culture of white spruce(*Picea glauca*). Protoplasma. 1990,158(1—2):86—94
- 12 Gupta H S, Pattanayak A. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice(*Oryza sativa* L.). Biotechnology. 1993,11(1):90—94
- 13 Ishii S. Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolating process. Plant Physiology. 1988,88(1):26—29
- 14 Jones H et al. Isolation, culture, and regeneration of plants from potato protoplasts. Plant Cell Rep. 1989,8(5):307—311
- 15 Koornneef M et al. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. TAG. 1987,74(5):633—641
- 16 Krens F A et al. Transfer of cytoplasm from new Beta CMS sources to sugar beet by asymmetric fu-

- sion l. shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants. TAG. 1990,79(3):390—396
- 17 Meyers Y et al. Pathogenesis related proteins are expressed in tobacco mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* 1991,82(1):A37
 - 18 Perl A et al. Ethylene and *in vitro* culture of potato; suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Rep.* 1988,7(6):403—406
 - 19 Pezzotti M et al. Plant regeneration from mesophyll, root and cell suspension protoplasts of *Medicago sativa* cv. Ardiana. *Genet. Agr.* 1984,38:195—208
 - 20 Roest S, Gilissen L J W. Plant regeneration from protoplasts; a supplementary literature review. *Acta Bot. Neerl.* 1993,42(1):1—23
 - 21 Simmonds D H. Microtubules in cultured plant protoplasts. *Acta Bot. Neerl.* 1991,40(3):183—195

Theoretical and Technical Advances in Plant Protoplast Culture

Xiz Zhenao

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract There is a noticeable advance in plant protoplast culture in recent years. The attention of protoplast culture is still in crops and economic plants, but also shifted from herbaceous to woody plants, from higher to lower plants. After analysing the causes of success and failure in numerous experiments, three factors have already been considered to be necessary in the expression of totipotency of plant protoplasts; selection of suitable genotypes, selection of suitable medium to isolate the protoplasts and selection of suitable medium and technique to culture the protoplasts. These three factors are just like rings in chain which formed only at the time when the rings were linked together. One of the noticeable results in this field is the regeneration of plants from cultured mesophyll protoplasts of rice. Besides some physiological results involved in protoplast culture, such as stress response, repair mechanism and dedifferentiation, cell division and morphogenesis etc. are obtained. These offered a primary base to study the theoretical problems in plant protoplast culture. The culture media, culture techniques and methods of plant protoplasts had been improved. To schedulization or systematization of protoplast culture of important crops had been emphasized.

Key words Protoplasts; Regeneration; Stress response; Cell division

主要农作物原生质体研究的重要进展

卫志明

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 简短地回顾了我国主要农作物原生质体的早期工作,并记叙了在过去10年期间所取得的重要进展,包括水稻、小麦、玉米、大麦、高粱、谷子、甘蔗、棉花、大豆、花生、油菜等作物的原生质体获得再生植株,表明我国主要农作物的体细胞杂种和转基因植物方面的遗传操作有了迅速的进步。

关键词 原生质体培养; 植株再生; 体细胞杂交; 遗传转化

自从 Takebe 等(1971)^[55]首次利用烟草叶片分离原生质体,经培养获得再生植株以来,植物原生质体培养的研究在我国得到蓬勃发展,近几年尤其取得了更为突出的成绩。我国植物原生质体培养的研究,始于70年代中期,当时主要研究对象是茄科植物中的烟草、矮牵牛、龙葵和伞形花科植物中的胡萝卜。通过叶片分离原生质体,以H或MS作基本培养基,进行液体浅层培养,分别相继从普通烟草、黄花烟草、粉蓝烟草、花烟草、胶烟草、矮牵牛和龙葵的叶肉原生质体获得再生植株。胡萝卜分别从愈伤组织和肉质根分离原生质体,经培养获得再生植株。马铃薯、番茄、茄子虽属茄科植物,却是重要的蔬菜作物,其原生质体培养的研究在我国起步较晚,无论是涉及的再生品种,还是培养技术的成熟程度,迄今与国际上差距较大。如马铃薯,国外已有近70个再生品种,而我国至今只有2篇报道^[8,10],获得原生质体再生植株的仅有小叶子×多子白、乌盟601、68-62和克新4号4个品种。番茄和茄子各仅有1篇报道^[4,9],都是通过子叶分离原生质体,经培养再生植株。

禾本科植物的水稻,我国最早的报道是1975年从梗稻原生质体形成细胞团,1978年用同一材料进一步试验获得了愈伤组织^[31]。此后一个时期(6—7年间)进展较慢,虽然不少人开始用培养的细胞或组织分离原生质体培养,从水稻、小麦、大麦、高粱等也得到了愈伤组织,但仍然未能分化及再生植株,基本上呈停滞状态。80年代初,国际上 Vasil 实验室和 Cocking 实验室在禾草类(美洲狼尾草、紫狼尾草、大黍)通过未成熟胚和幼穗建立胚性细胞系,用以制备原生质体进行培养获得再生植株的成功,从这一重要突破受到启发和鼓舞,加速了禾谷类重要粮食作物原生质体培养的进程,由于注意了基因型的选择,胚性愈伤组织的诱导和胚性悬浮细胞系的建立、AA培养基^[56]的应用取得了研究工作的突破性进展。1985年日本藤村(T. Fujimura)等在国际上首次报道由梗稻原生质体再生出小植株^[41],随后法国、中国、英国、美国等国的科学家相继报道了水稻原生质体再生植株。至今,在国内外已有近30家实验室获得了成功。1986年我国有两个实验室同时报道从梗稻品