

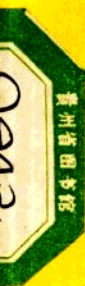
植物体细胞杂交

国外科技资料选译



上海市农业科学院科技情报研究室

一九七八、十二、



目 录

1. 植物无核原生质体和有核亚原生质体的制备和培养
.....Wallin A, Glimelius K.和Eriksson T. (1)
2. 聚胺、核糖核酸酶和燕麦叶原生质体的改善
.....Galsfon A.W. Alfman A.和Ravinder K.S. (4)
3. 从蕃茄叶分离出稳定的原生质体的方法
.....Cassells A.C.和Barlass M. (11)
4. 渗透应力对烟草叶原生质体的蛋白质和核酸
合成的影响
.....Premecz G. Ruzicka P. Olah T.和Farkard G.L. (17)
5. 大豆培养细胞和豌豆叶片的原生质体
融合产物的精细结构
.....Fowke L.C. Consfabel F.和Gamborg O.L. (21)
6. 植物原生质体的制备方法
.....日比忠明 (28)
7. 植物细胞和原生质体培养玻璃容器
.....Buffo O (36)

植物无核原生质体和有核亚原生质体的制备和培养

Wallin A, Glimelius K, 和 Eriksson T.

引 言

有性不亲和性载体通常妨碍高等植物遗传重组。为了获得重组细胞,越过这些载体的可能方法有:体细胞原生质体融合,细胞器移植,染色体或染色质转移。迄今,虽然用融合方法从同一科的种间重组已获得杂种植物,但从不同科的原生质体融合难以获得完整杂种植物,这可能是由于某些未知的不亲和载体。细胞器移植应是越过这种载体的一条途径。作为外来细胞的一小部分应比完整细胞更容易接受。细胞器移植的研究也能增进对完整细胞的细胞器之间相互关系的了解。把离体叶绿体(Potmkus 1973, Bonnett 和 Eriksson 1974, Davey 等 1976, Giles 1976)和核(Pofrykus 和 Hofmann 1973, Pofrykus 和 Lorz 1976)移植到高等植物细胞的方法已有过讨论。可是移植的细胞仅能在短时期内存活,且从未观察到细胞分裂。这可能是由于分离细胞器过程中的细胞器受损伤之故。替代游离细胞器的移植是亚原生质体的利用,这时,当进行移植时,细胞器受到质膜的保护。从前,从成熟的茄属果实(Binding 1966)和用原生质体的出芽(Binding 等 1976),果皮组织自溶细胞的质壁分离(Binding 1966),细胞破裂(Klerker 1892)等方法分离亚原生质体。Binding (1976) 和 Binding (1977) 报导过亚原生质体的融合。

我们讨论了用细胞松弛素B处理细胞悬浮培养物或叶细胞的原生质体获得有核或无核的亚原生质体的一种简易方法。在分离动物细胞中应用细胞松弛素B,得到核和细胞质,(Carter 1967, Poste 等 1971, Prescott 等 1972, Ege 等 1974)。在植物细胞(燕麦芽鞘)中,应用细胞松弛素B,当离心时,由于胞质骨架强度下降,导致核的置换(Thomas 等, 1977)

材 料 和 方 法

一、植物材料

采用来自 *Nicotiana Sylvestris* SPEG. et COM, *Daucus Carata* L 和 *Nicotiana Tabacum* L (Gafersleben) 细胞悬浮物的原生质体。也试用了 *Pisum Sativum* L. (C.V. TiMO) 的叶原生质体。

N. Tabacum 和 *D. Crafa* 的细胞悬浮物培养在含有 35ml 的改良 MS 培养基的 100ml 维

形并中 (Eriksson 1965), 烟草细胞按 Glimelius 方法 (1978) 进行培养。细胞培养都在 28°C 黑暗下进行旋转培养 (每分钟 60 转), 并用转到新鲜培养基上后 1—3 天的细胞分离原生质体。于每二或三天继代培养细胞。

二、原生质体分离

从 *Daucus Carota* 和 *N. sylvestris* 的悬浮细胞培养物分离原生质体的方法是: 将 5.0% 纤维素酶 (Driselase) 溶解在 0.4M 山梨醇溶液中, 把细胞悬浮物放在这个酶液中处理, 置于旋转振荡器 (60 转/分) 中, 于 28°C 下培育 1—2 小时, 便释放出原生质体, 原生质体通过尼龙网 (孔径 $50\mu\text{m}$) 过滤。按以前讨论的方法 (Glimelius 等 1978) 从烟草分离原生质体, 按 Von Arnold 和 Eriksson (1976) 讨论的方法从豌豆叶分离原生质体。

三、细胞松弛素 B 配制

称取 5 毫克细胞松弛素 B 溶解在 0.5 毫升二甲基氧化硫 (dimethylsulphoxide, DMSO) 中制成贮藏液。

四、在梯度离心下使原生质体去核

在 10ml 塑料离心管中, 先放 1ml 饱和蔗糖溶液, 再在上放一层 2ml 含有 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞松弛素 B 的 1.5M 山梨醇溶液。从酶液中直接取原生质体, 转移到补充 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞松弛素 B 原生质体生长培养基。除了 6-(3-甲基-2-丁烯基-1-氨基)-嘌呤增加到 $0.1\text{mg}/\text{l}$ 和加 $0.1\text{mg}/12.4-\text{D}$ 外, 原生质体生长培养基同用于 *Carota* 原生质体培养的培养基相同。把原生质体悬浮物小心地移到山梨醇/细胞松弛素 B 层, 然后, *N. sylvestris* 和 *pisum Sativum* 原生质体在 $20,000\times g$ 下和 *Daucus Carota*, *N. fabacum* 原生质体在 $40,000\times g$ 下离心 15 分钟, 并用 0.5% 和 0% DMSO 溶液作对照。按常规方法, 整个过程在 37°C 下进行。

所谓小原生质体是指被一些细胞质和质膜包围的核。这等于 Ege 等 (1974) 在动物细胞上所指的所谓小细胞。

在分开后, 在蔗糖层中发现有小原生质体带, 无核细胞仍在原生质体生长培养基的上带中小原生质体与 1ml 原生质体生长培养基混合。恢复到小原生质体悬浮物的正常渗透压, (约 $500\text{mos}/\text{ml}$) 然后小原生质体通过孔径 $15\mu\text{m}$ 尼龙网过滤, 在 $100\times g$ 下离心收集, 并再悬浮到新鲜原生质体生长培养基中。

五、小原生质体培养

小原生质体分开后, 放在原生质体生长培养基中洗几次, 然后, 取 1ml 放在 5.5Cm 培养皿中薄层培养, 培养条件是 28°C , 黑暗。N. Sylvestris (见前面) 和 N. fabacum (Glimelius 等, 1978) 的原生质体培养所用的原生质体生长培养基相同。

结 果 和 讨 论

在原生质体生长培养基中, 新分离的 N. Sylvestris 的原生质体具有连续胞质束的浓密细胞质, 并发生胞质流动 (图 1)。加一层 1.5M 山梨醇于 $20,000\times g$ 下离心后 (37°C), 约有 40% 原生质体保持完整 (表 1), 但是强烈地被拉长。离心后, 高密度的细胞器如细胞核, 发现转向离心管底部的原生质体部分。培养基中存在着 DMSO, 便形成了拉长

原生质体(图2、表1)。假若拉长原生质体再悬浮在原生质体生长培养基中,它们(特别是Carfa原生质体)中的多数又回恢成圆形。当离心后,大多数其他原生质体破裂了。

图1.在原生质体生长培养基中的新分离*N.sylvestris*原生质体

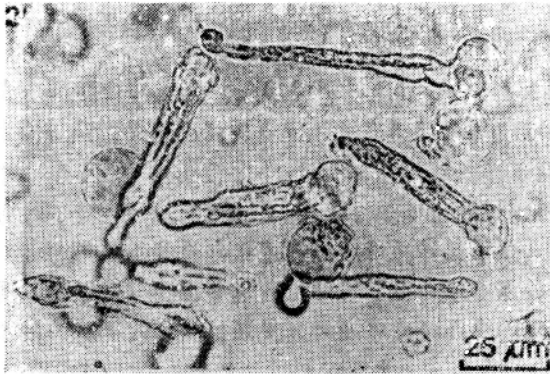
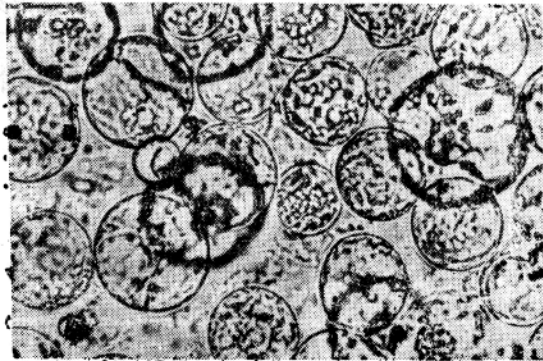


图2.*N.sylvestris*的拉长原生质体
原生质体先是浮在含0.5%DMSO的原生质体生长培养基中,並加一层含0.5%DMSO的1.5M甘露醇溶液,在37°C, 20000×g下离心。

表 1 用梯度离心使*N.Sylvestris*细胞培养物的原生质体去核后获得小原生质体的频率

处	理	小原生质体	拉长原生质体	死亡原生质体
无DMSO对照		1	36	63
有0.5%DMSO对照		3	57	40
CB※1μg/ml		6	38	56
10		35	6	59
20		48	6	46
50		80	2	38
100		51	1	48

※ CB=细胞松弛素B

如果原生质体暴露到细胞松弛素B中,当离心时,发现核处在原生质体突出的顶部膨大处,它与主要原生质体的连接,仅通过狭长的柄(图3)。在高速和高浓度细胞松弛素B下,大部分柄完全脱除形成小原生质体。当原生质体去核时,多数小原生质体变

成梨形并具有胞质尾(图4)。用原生质体生长培养基稀释后,这些梨形原生质体变成圆形。在 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞松弛素中,50%以上的*N.sylvestris*原生质体形成小原生质体(表1)。在原生质体生长培养基的上层,是带大液泡的无核原生质体,细胞质不流动(图5)。从烟草制备浓密而清晰的小原生质体和无核原生质体是可能的。在离心管中的小原生质体数目同无核原生质体的数目完全相符。



图3. 在 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ CB中处理过的*N.sylvestris*原生质体。



图4. *N.sylvestris*的小原生质体,在这儿含有部分原生质体的核脱离。原生质体是用含 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ CB处理的。

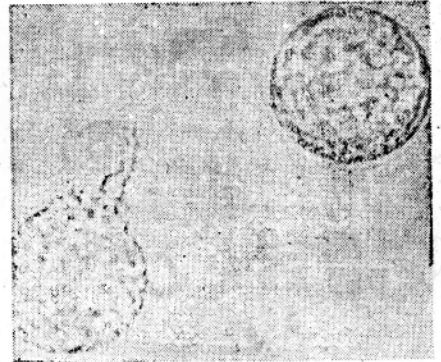


图5. *N.Sylvestris*的无核原生质体,处理同图4。

约 $20,000\times g$ 离心速度和 $35-37^{\circ}\text{C}$ 温度对*N.sylvestris*的原生质体的去核是适当的。在低速下,多数核处在原生质体的拉长部分中,并不泄出。去核程度也依赖于温度,小原生质体数目随温度上升到 $35-37^{\circ}\text{C}$ 而增多。

也从Carafa、烟草的细胞悬浮物和豌豆叶肉原生质体分离小原生质体和无核原生质体。发现去核的细胞松弛素B的浓度以 $10-50\mu\text{g}/\text{ml}$ 为宜。核泄出的频率随温度升到 $35-37^{\circ}\text{C}$ 而增高。从其他原生质体相比,如果从Carofa或烟草原生质体制备小原生质体, $40,000\times g$ 的高速离心速度是需要的。豌豆叶原生质体的小原生质体含有叶绿体和核。在多数情况下,从细胞悬浮物的原生质体产生小原生质体的频率比叶肉原生质体高。除了环境因素外,原生质体的生理条件对获得高产而有活力的小原生质体是重要的。

小原生质体培养在原生质体培养基中,注意到体积猛烈增大(在24小时扩大到20倍),这种增大的大多数是由于体积的迅速扩大。在几天后,从小原生(下转第10页)

聚胺、核糖核酸酶 和燕麦叶原生质体的改善

Galston A.W. Altman A和 Ravindar K.S.

引 言

几个植物种的叶原生体已成功地进行培养,最后产生完整植株^[1,2]。相反,从禾谷类叶游离的原生质体特别不稳定,具有较低的代谢活力,^[3,4]和仅有有限的细胞分裂能力^[5]。虽然,禾谷类原生质体不稳定性的原因不十分了解,但已经观察到离体禾谷类叶迅速衰老,並也产生较高的核酸酶的活性^[6]。

在一个早期报告中^[3],我们提供了这样的证据:田环己胺(Cycloheximide)或激动素处理离体燕麦叶,已知可阻止叶子中核酸酶和脲酶活性的增高^[6-8],产生比未处理叶有较低代谢活力的更稳定的原生质体。碱性氨基酸,精氨酸和赖氨酸也阻止伴随着离体燕麦叶衰老的分解代谢过程^[9,10]。这些氨基酸通过更迅速的脱羧和其他转变产生二胺、腐胺、尸胺和精脒^[11],已知主要影响核酸代谢^[11,12]。

给予禾谷类作物原生质体过程的清楚了解,和对防止或限制这些有害过程的技术发展,将帮助获得适于培养试验的禾谷类原生质体。这个报告讨论了在各种衰老阻止剂二胺的影响下,燕麦叶原生质体的形态和代谢稳定作用同核糖核酸酶内源水平的关系。

材 料 和 方 法

一、原生质体的分离

除非另有说明,在无菌条件下,从六天龄燕麦幼苗(*Avena Sativa* L. Var Aar Victory)叶制备原生质体。种子用50%lorox表面消毒10分钟后,无菌水洗3次,无菌播种在含Hoagland矿质盐的培养基中,于 $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$,16小时光周期,光强1200Lux下生长,取叶,除去下表皮,在含1mM磷酸缓冲液(PH=5.7)0.6M甘露醇的0.5% (W/V)乙级Cellulysin溶液中,于 $32^{\circ}\pm 10^{\circ}\text{C}$ 浸2小时,原生质体接受精氨酸或其他附加物处理。酶培养液也含有这些基质。积放出的原生质体,用 $50\times\text{g}$ 离心8—10分收集之,在0.6M甘露醇二附加物溶液洗两次,並再悬浮在0.6M甘露醇二附加物(PH=5.7)中,原生质体悬浮液的血球计数原生质体,並调到 1×10^6 个原生质体/毫升的最后原生质体密度,全部试验资料汇编在表1、2和图1中。

在某些其他实验中,原生质体游离之前,叶子用胺预处理,这些叶子不是无菌叶(图2和3的资料),培养液中加抗生素在图2中作了特别说明。

二、分离原生质体的处理

无论是对照或是处理实验中,皆取0.4ml原生质体(含 4×10^5 原生质体)放入有盖

的微型烧并,于Dubuoff代谢振荡培养器中培育,温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$,照光。无论是(a) 0.6M甘露醇(对照), (b)甘露醇中含胰核酸酶,或(c)解体的对照原生质体的甘露醇悬浮液,每个处理皆用 $40\mu\text{l}$;胰核糖核酸酶A的贮藏溶液用0.6M甘露醇稀释制的核糖核酸酶。悬浮物在全玻璃匀浆器中匀浆,内加0.5ml 0.6M甘露醇,使 1.4×10^6 原生质体机械解体,在 $12,000\times g$ 冷离心10分钟。悬浮部分无论是不稀释或用0.6M甘露醇按1:5稀释,都可用作实验。

在以后的实验中,整份对照或胺处理的原生质体与0.6M甘露醇和蒸馏水混合,以产生要求的最终渗透势。原生质体的最终浓度要保持一致($1\times 10^6/\text{ml}$),并在胺处理原生质体情况下,整个实验过程胺浓度保持在10mM。样品培养在有盖的微型烧并中, $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$,漫射光照。在表1中讨论了显微镜下检查的原生质体状态。

三、核糖核酸酶活力。

核糖核酶活力按Wyen等的方法测定^[13]。取一份原生质体悬浮液,培养不同时间,离心,把原生质体小球和悬浮物部分(含有培养基和一些解体原生质体成分)分别进行检视。原生质体小球在25mM Tris缓冲液(PH=7.5)中,于全玻璃匀浆器匀浆破碎之。 $12,000\times g$ 下冷离心,清亮的上浮部分用作检视。无论是悬浮物或原生质体的粗酶的头10ml,与0.4ml纯化的酵母RNA基质(含有15ml纯酵母RNA/16ml 62.5m醋酸缓冲液,PH=5.5)一起,在 37°C 下培育30分钟。当动态曲线的线性部分时,加2.5% (W/V) TCA和0.3% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 中止反应,反应罐在冷却下可过夜。在 $100\times g$ 下离心10分钟,于不溶性TCA物质成球后,收集上清悬浮物部分,并用水按1:2稀释,在260nm下读数,得到测定的资料。

四、尿核苷渗入

尿核苷的渗入研究是,将含有 5×10^6 个原生质体的0.5ml原生质体悬浮物,放在0.6M甘露醇和具有26.2ci/mM比活力的 $20\mu\text{l}$ $100\mu\text{ci}/\text{ml}$ [$5-^3\text{H}$]尿核苷中进行培养,经一定时期后,将正份样品移到滤纸图片上,并按以前方法^[4]测量渗入到不溶解于TCA的材料中的标记强度。用RNA酶的消化来测定尿核苷渗入到RNA中的特异性。含有标记的原生质体悬浮物的干滤纸图片,放在 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰RNA酶A的0.15NaCl和0.015M柠檬酸钠溶液中,于室温下培养3小时,用这种方法建立了约有90%标记核苷酸渗入到RNA中。用各种浓度的 $5-^3\text{H}$ 尿核苷实验揭示,在所有使用的试验条件下,可使尿核苷池达到饱和。

结 果

L-精氨酸对提高游离的原生质体的存活和保持其正常形态状况十分有效(表一)。当加10mM精氨酸到原生质体悬浮培养基中时,18小时后,原生质体的存活得到显著改善,完整原生质体在一个实验为34—100%,和另一个为74—98%。外加胰RNA酶降低了原生质体的存活率,同用机械解体原生质体的离心悬浮部分一样;在两种情况下,培养基中10mM精氨酸有明显的保护作用。原生质体遭受较低0.6—0.4M的甘露醇浓度的渗透压,便降低了原生质体的存活,使用了精氨酸可产生明显的保护作用,抗拒着原生

质体解体。渗透压低到0.2M甘露醇导致全部原生质体在18小时后完全解体，不管是用精氨酸处理或不处理都完全一样。精氨酸处理的原生质体不发生聚合或同基质粘附，和对照一样，且其叶绿体保持均匀分布。图一清楚地提供了几种原生质体的形态特征。因此在特定的条件下，精氨酸保护燕麦叶原生质体抵抗某种压力变化，包括机械破坏，衰老，渗透压冲击，高RNA酶水平和解体原生质体中的有害物质等。

表 1 10mM精氨酸对胰RNA酶和渗透压冲击造成原生质体解体的影响

培 养 基	存活原生质体 ¹ (%)		叶 绿 体 成 块 ²		原 生 质 体 聚 合 ³	
	对 照	精 氨 酸	对 照	精 氨 酸	对 照	精 氨 酸
对 照	74	98	2.0	0	20	1.
RNA酶 (100μg/ml)	71	65	0	0	1.0	1.0
RNA酶 (400μg/ml)	45	72	0	0	1.0	1.0
悬浮物 (1:5)	39	94	2.0	0	2.0	0.5
" (未稀释)	22	81	3.0	0	3.0	0.5
对 照	34	100	2.0	0	3.0	0
0.4M甘露醇	5	68	3.0	0.5	2.0	0
0.2M甘露醇 ⁴	0	0				

注：①基于经18小时后，用血球计数器计数的完整原生质体，计算的百分率是以实验开始时存在的完整原生质体为基础 ($1 \times 10^6/\text{ml}$)

②从相应数量原生质体估计在原生质体一边的叶绿体块数，它与正常均匀分布的不一样。结块级数按0 (未结块) 到3 (100%结块) 级计数。

③与培养基中正常分散的原生质体相比较，估计原生质体的相对聚合。分为0 (未聚合) 到3 (大量聚合) 级计数。

④原生质体全部解体的都未进行计数。

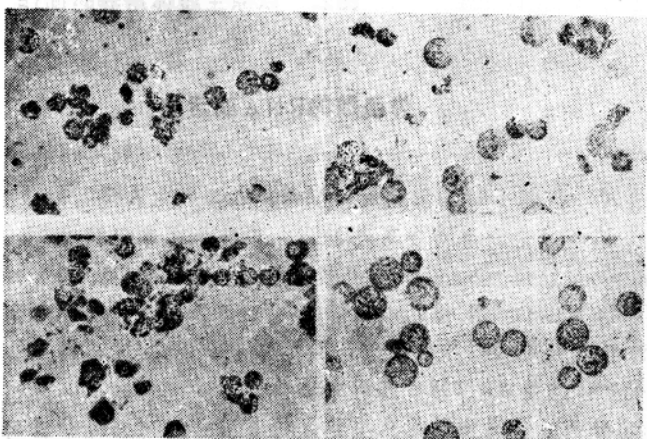


图1. 对照(CON)和L-精氨酸(ARG)处理的燕麦叶原生质体照相图×160, R—用400μg/ml胰RNA酶培养18小时后, S—用未稀释的解体原生质体是悬浮物离心后的上浮物部分, 培养18小时。

曾考虑过精氨酸和有关化合物在改良燕麦原生质体的存活和完整性的作用，且可能是由于影响水解酶，特别是RNA酶。表2的资料表明，当培养在0.6M甘露醇中时，原生质体悬浮物RNA酶活性增高，并且大部分酶活性释放到培养基中，在50×g下离心10分钟后，便出现在无细胞悬浮物部分。精氨酸和赖氨酸加到培养基中，大大地阻止了RNA酶活力的升高^[14]。

表 2 原生质体和离心的无细胞上浮物部分的RNA活性

试 验 部 分	0 小 时			3 小 时			18 小 时		
	绝 对	相 对	悬 浮 物 原 生 质 体	绝 对	相 对	悬 浮 物 原 生 质 体	绝 对	相 对	悬 浮 物 原 生 质 体
原生质体	0.38	1.0	0.32	0.596	1.6	1.24	1.146	3.0	1.53
悬浮物	0.12	1.0		0.741	6.1		1.756	14.4	

RNA酶增高的抑制作用最清楚地呈现在包括原生质体抽提之前叶子预处理试验中，这是把叶浸在有或无精氨酸、赖氨酸或有关化合物的缓冲溶液中。从新鲜的离体叶分离出的原生质体RNA酶活力较低。当在0.6M甘露醇中培养时，酶活性明显地升高，（图2，曲线B）。相反，从离体叶分离的原生质体，老叶经过在缓冲液中浸18小时，其活性相当于开始时的五倍，在0.6M甘露醇中培养其活性不再改变（图2曲线A）。原生质抽提之前，离体叶在50mM精氨酸中经过18小时，相反，产生具有较低RNA酶活性的原生质体，然后，在0.6M甘露醇（图2曲线C）或在甘和50mM精氨酸中（图2，曲线D）培养，原生质体保持稳定。因此，当原生质体衰老时，和分离原生质体的叶子衰老有关的条件出现时，原生质体RNA酶活性升高（表2和图2）。无论在那种情况下，把精氨酸加到离体叶的培养中，能阻止RNA酶活性升高。

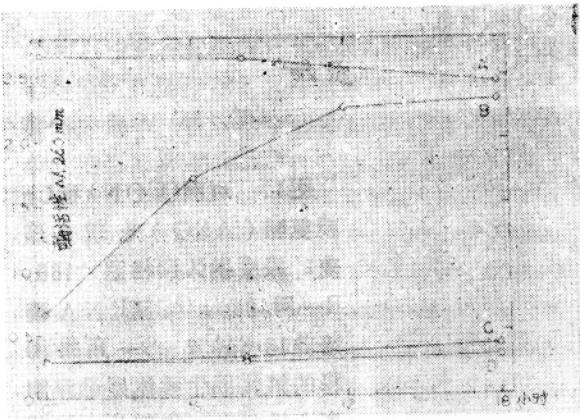


图2. 以原生质体培养时间作为函数的RNA酶活性。

- A: 在磷酸缓冲液中浸18小时的叶分离出的原生质体，接着培养在0.6M甘露醇中。
- B: 从离体新鲜叶分离的原生质体，并在0.6M甘露醇中培养。
- C: 在50mML-精氨酸浸18小时的叶分离出的原生质体，接着培养在0.6M甘露醇

中。

D: 在C中预处理的叶, 且原生质体培养在0.6M甘露醇+50mM L-精氨酸中。

在这个实验中, 采用无菌幼苗, 并保证抵抗细菌污染, 向原生质体悬浮液中加入10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素和100单位/ ml 青霉素 (Gibco)。

叶用精氨酸预处理对降低原生质体RNA酶活性的影响也反应在 ^3H 尿嘧啶核苷以高速渗入到RNA中。从图3清楚地表明, 培养在50mM精氨酸的叶分离出的原生质体比对照显示有较高的渗入初始水平。在原生质体培育18小时以上, 这种渗入活性仍继续增高 (曲线B), 而从浸在缓冲液中的叶分离出的原生质体, 仅显示较低的渗入活性, 随时间增加很小。

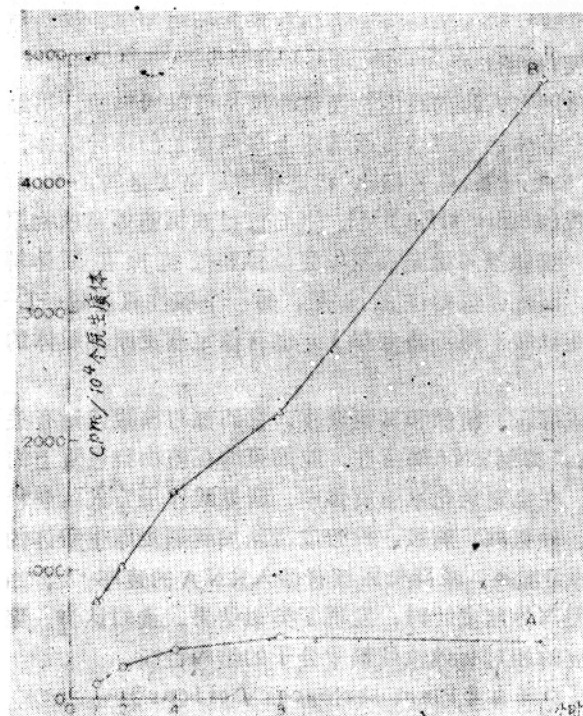


图3. 用50mM L-精氨酸预处理离体燕麦叶对 ^3H 尿核苷渗入到从这些叶制备的原生质体的RNA中的影响。

A: 浸在缓冲液中18小时的叶分离原生质体, 随后在0.6M甘露醇和5- ^3H 尿核苷中培养18小时。

B: 同A, 但从在50mM精氨酸浸过18小时的叶制备原生质体。

本实验采用无菌苗, 在培养基中加抗生素 (如图2)。

用10到50mM L-精氨酸产生的效应, 也被相似浓度的L-赖氨酸所引起, L-组氨酸作用较小, 由于精氨酸和L-赖氨酸中含有两个自由氨基基团。我们研究了同碱性氨基酸代谢上有关的聚胺, 如腐胺、死胺、精脒、精胺^[11]。头3个胺产生明显的保护效应, 而最后一个基本上无效。这证明在防止RNA酶增高上, 聚胺比双碱性氨基酸结构更重要, 并且聚胺的特定结构影响其活力。这是需要作进一步解释的。

讨 论

燕麦叶原生质体的形态不稳定性和恶化似乎同从叶肉细胞的原生质体分离后引起衰老变化的复杂性有关。这种系统的一个重要成员正是内源RNA酶,由于许多植物的损伤和衰老呈现RNA酶活性的提高^[9,15],特别是在燕麦叶上过去对燕麦叶原生质体的研究揭示出,内源RNA酶可引起质膜的解体^[16],虽然,后者并不全部归因于RNA的特异水解,但是,RNA酶有点像离子去垢剂的行为^[17]。假定由于完整原生质体渗漏和某些原生质体自发解体而发生内源核糖核酸酶释放到老原生质体的培养基中,加速了原生质体的变质,这是合乎逻辑的(表2)。这种解释也被用环己胺(Cycloheximide)和激动素预处理叶的事实所支持,已知它可防止引起衰老的RNA酶活力增高,^[15,18]出现更加抗自发解体^[3]。尽管如此,解体原生质体的释放成分仍包括其他因子恶化活的原生质体。确实和本研究的结果一样(表1和图1)。

用精氨酸抵抗自发的和诱导的解体原生质体的戏剧性稳定作用是可以预料的。用细菌的广泛研究,证明以下试剂能使原生质体稳定地抗拒渗透压上和热量上的诱导体,如精脒和其他聚胺,Ca⁺⁺、聚赖氨酸和链霉素。并且指出,稳定作用是由于这些正电荷试剂的离子束缚到质膜外表面的酸位置(acidic sites)^[19]。上面已提到钙能提高植物原生质体的活力^[17,20]。並有理由假定,精氨酸可稳定燕麦原生质体和抵抗原生质体解体,部分地是由于它的阳电荷的效应。因此,值得注意的是,另一个碱性氨基酸—L-赖氨酸(和效果较小的组氨酸)和某些聚胺(但不是全部),也有稳定燕麦原生质体的作用。

精氨酸作用的另一种方式是转变成腐胺、精脒和其他聚胺,它们都与核酸代谢有关^[11]。这些聚胺也可稳定RNA和DNA,抑制RNA酶活性,並同束缚在植物染色质上的聚合酶和其他系统起反应^[12,21—23]。在稳定老化原生质体中,精氨酸作用方式的解释也被我们的发现所支持,即把精氨酸、赖氨酸、腐胺、尸胺或精脒加到燕麦原生质体的培养基中能阻止引起衰老的RNA酶活力增高,並降低尿核苷渗入RNA的速率^[14]。当在释放原生质体前,用某些基质预处理离体燕麦叶时,发现了类似结果。我们认为:聚胺对原生质体有保护作用,其保护效应的相对有效性依赖于分子的结构特征。

颜昌敬译自《Plant science Leffens》

1978年11(1):69—79

(上接第4页)

质体和完整原生质体来源的细胞仍可以区分的。在4天后,有15%N.Tabacum的小原生质体分裂了,它同由正常原生质体组成的对照一样。

结论:用上述方法成功地从所试验的几种植物上制备出小原生质体和无核原生质体。然而,当处理时,必须注意不同植物对细胞松弛素B的浓度,离心速度和温度的要求不同。

颜昌敬译自《Z.f.pflanzenhyaiol》 87:333—340 1978

从蕃茄叶分离出稳定的原生质体的方法

Cassells A.C和BarlssM

引 言

在以前的研究中,指出环境引起蕃茄叶细胞壁的变化,在夏季生长植株的叶的果胶钙含量增高,它是作为原生质体分离的细胞降解酶的载体(Cassells和Barlss 1976),讨论植物培养条件,以致于能从夏季生长的植株或生长在遮荫条件下的植株分离叶原生质体,如同增加光强度一样,逐步增加细胞壁降解酶的浓度和加入柠檬酸三钠螯合剂是必要的。用混合的低浓度酶能全年从遮荫植株分离叶原生质体,即在冬季和春季接受十五小时光周期的植株。

全年从遮荫的植株分离出高产原生质体,要求以预备试验来决定每批植株的适当酶浓度。在夏季高光强下生长的植株,为了原生质体的释放,需要较高的酶浓度,这往往导致酶的毒性(Cassells和Barlss 1976)。所以,以荫处生长的植株为佳。然而,这些植株的原生质体,在分离时是100%活着,但不被病毒感染且在培养研究中很快失去活力。

观察感染病毒的植株的分离原生质体(Cassells和Herrick 1977),在这种条件下,妨碍植物生长,并且,从阳光充足下生长的植株分离原生质体,在培养中,比从未感染的荫处生长植株的原生质体活得更久。鉴于已知这些植株的钙含量增高(Zaitlin和Calfrin 1964, Cassells和Barlss 1976),叶中总钙研究分析证明,果胶钙和膜间钙,与分离原生质体的稳定性有关,因此,膜钙对膜的稳定作用的研究是重要的。

材 料 和 方 法

一、植株培养

蕃茄(*Lycopersicon esculentum* Mill Cv Craigella)栽在直径十二点七厘米的钵中,并内放泥炭和完全平衡肥料,全年都在玻璃房中。夏季用细棉布复盖,以降低约25%光强(中等遮荫植株,每天最大光强为 8MTm^{-1})和50%光强(重度遮荫植株,每天光强为 7.2MTm^{-1})。日长保持每天十五小时(用400瓦水银蒸汽灯泡补充光照,和最低温度为 15°C)。叶中钙含量随光照而变化,并依加入的氮形式而变化,仅以硝酸盐或硝酸盐加尿素的混合物作氮源。另外,每种氮处理的某些植株,用硝酸铵或硝酸钙补充之,它们分别降低或提高蕃茄中的总钙含量(CoCoic等1961)。每周每株以40ml 0.01N NH_4SO_4 或0.01N $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 淋洗二次,植株生长到10—12叶期,取长约7cm均匀一致的幼叶作为原生质体分离和钙分析用的样品。

二、酶

用作细胞壁分解的酶是: Serva果胶酶和Onozak R-10纤维素酶。

三、原生质体分离

叶片在5%次氯酸钠溶液中表面消毒二十五分钟，并用无菌水冲洗。此后步骤，病毒反应研究可用有菌操作，而培养研究全部进行无菌操作（Kassanis和Whit 1974）。

撕去表皮，浸在0.66M甘露醇中，于黑暗4°C下过夜。除去甘露醇，並以0.5% W/V Serva果胶酶和Onzuka R-10纤维素酶的0.66M溶液（PH=5.8）取代之，叶材料在黑暗25°C下轻摇二小时，以便使原生质体全部释放出来，並除去残渣，原生质体在10ml锥形离心管中静置。除去酶溶液，用0.66M甘露醇取代之並反复洗两次。

原生质体的活力测定，和以前讨论过的方法一样，（Cassells和Barlase 1976），基于用荧光素二乙酸（FAD）染色。其方法是：1mg FAD溶解在1ml丙酮中，取0.1ml这种溶液加到10ml 0.66M甘露醇中。溶液贮藏在黑暗中，每天新配制的一滴FAD甘露醇溶液加到在玻璃载玻片中的一滴原生质体悬浮溶液中，並慢慢地混合，並在25°C下培养五分钟。在荧光显微镜下检查，和Cassells和Gatenby（1975）讨论过的检查荧光标记抗体一样。活细胞吸收FAD转变成荧光衍生物（fluorescien）。

四、钙的分析

将叶或原生质膜材料灰化，用Willis（1966）方法测定钙，除了用释放剂的 SrCl_2 外，50g SrCl_2 溶解在100ml过氯酸並用水稀释到一升（Weston，未发表）。和上述方法一样，用分离的粗原生质体膜制剂，测定膜的方法是：原生质体在低渗溶液中破裂，在10000×g下离心十分钟，再悬浮在水中收集（每10ml 10^8 个原生质体），再离心，最后收集，用作钙的测定。

用铷红染色法测定果胶钙，和以前讨论过的一样（Cassells和Barlaee 1976）。取0.3g鲜叶，切成2mm小片，浸泡煮沸十分钟，抽提果胶和果胶酸。再用2% KCl溶液抽提二十分钟，以除去果胶酸，用铷红染色（Weintraub和Ragetti 1976），再在10ml 5% H_2SO_4 溶液中抽提五分钟，並在530nm读数，用同样处理未染色样品作对照。

五、原生质体培养

吸取1ml原生质体悬浮液（ 4×10^5 原生质体/ml在0.66M甘露醇中），放在直径5cm培养皿中，每个培养皿加1ml二倍浓度MS基本培养基，PH=7.0，含有0.66M甘露醇，4.6 μM 玉米素，有或缺生长素（见表四）和用45%的1.2%琼脂，慢慢地转动培养皿，使成薄层用蜡带封口，在25°C，8.6 Wm^{-2} ，每天十五小时光照下培养。为了观察细胞分裂，用显微镜进行检查。

六、原生质体的病毒感染

在100ml圆锥瓶中，加入0.1ml 0.66M甘露醇的原生质体悬浮液（ 10^6 /ml），50 μl TMV溶液（6mg/ml在50mM磷酸钠缓冲液中，PH7.0）和0.4ml 33.3mM PEG溶液（分子量为6000，PH=5.5），2ml 10mM磷酸钾缓冲液的0.66甘露醇溶液（PH=7.0）组成感染混合物。把它放在25°C黑暗下培育一小时。让原生质体静置：並除去悬浮物，代之以10ml无激素的Nagata和Takibe（1970）培养基。让原生质体再静置，並再悬浮在含4.6 μM 玉米素（PH=7.0）的5ml上述培养基中，在100ml圆锥瓶，于25°C，8.6 Wm^{-2} 光照十五小时下培养四十八小时。

病毒感染试验如下：用沉淀法收集原生质体，悬浮在0.6ml 10mM磷酸钠缓冲液中（PH=7.0）下冰冻。在溶解后，加3mg/ml C盐（Celife）到玻璃匀浆器底部的悬浮物中。在烟草（C V. Xanthi）叶上作试验，一半叶以原生质体匀浆抽提物处理，另一半以标准的病毒制剂处理。

用若丹明丽丝胺B—级合抗血清染色法测定感染原生质体的百分率。

结 果

一、处理对蕃茄叶的总钙、果胶钙和膜钙的影响

作为对照，未喂饲植株生长在硝酸盐和硝酸盐+尿素条件的典型试验，其结果如表一所示。在两种氮源下，中度遮荫植株的各种钙含量皆比全遮荫植株高。在两种光强下，硝酸盐植株的钙含量比硝酸盐+尿素的高些。除了生长在硝酸盐+尿素的中度遮荫植株的膜钙以外。

表 1 处理对与原生质体活力和细胞分裂有关的总钙、果胶钙和膜钙的影响

光 强	N 源	补 施	总 钙 % (叶干重)	膜 钙 % (膜干重)	果胶钙 (单位)	总释放 %	释放细 胞 %	释放原 生质体 %
重遮荫	硝 酸 盐	无	3.18	1.32	0.125	81	9	91
"	"	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.46	0.90	0.105	83	0	100
"	"	Ca(NO ₃) ₂	3.60	1.25	0.135	61	12	88
中遮荫	"	无	4.08	2.03	0.150	59	14	86
"	"	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.73	1.23	0.105	64	10	90
"	"	Ca(NO ₃) ₂	4.62	2.78	0.210	29	19	81
深遮荫	硝酸盐+尿素	无	1.88	0.74	0.075	90	0	100
"	"	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.82	0.27	0.09	66	0	100
"	"	Ca(NO ₃) ₂	3.31	1.06	0.115	59	11	89
中遮荫	"	无	2.44	2.98	0.09	65	15	85
"	"	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.91	0.77	0.11	61	6	94
"	"	Ca(NO ₃) ₂	4.46	2.04	0.14	60	7	93

补施硫酸铵，生长在硝酸盐或硝酸盐+尿素中的植株，受到中度或重度遮荫时，各种钙含量都比对照低。除了生长在硝酸盐+尿素中度遮荫和生长在硝酸盐的重度遮荫的膜钙含量以外，施用硝酸盐提高了植株中各种钙含量。

不同遮荫、氮营养和补施钙对总含钙量变化产生有希望的影响。变动范围为1.46—4.62%（干物质为基础），果胶钙为0.09—0.21单位范围内（根据RR染色，在530nm下，用分光光度计比色测定，见方法）总之，总钙与果胶钙呈正相关（ $r=+0.83$ ； $P=0.001$ ）与膜钙稍呈正相关（ $r=+0.62$ ； $P=0.05$ ）。果胶钙与膜钙也稍呈相关（ $r=+0.57$ ； $P=0.05$ ）。表二列示了这些结果。

(接表1)

逐 日 原 生 质 体 活 力						备 注
0	1	2	3	4	5	
100	10	10	0	0	0	重遮荫为
100	30	10	10	0	0	3.06—6.12
100	70	10	10	0	0	MTm ⁻² 日 ⁻¹
90	80	60	30	30	25	中遮荫为
100	70	20	0	0	0	4.6—9.18
90	80	70	50	50	50	m ⁻² 日 ⁻¹
100	20	10	0	0	0	
100	20	20	10	0	0	
100	50	10	10	0	0	
90	50	30	30	30	25	
90	70	30	0	0	0	
100	80	70	60	50	50	

表 2

表 1 资料的相关系数 (r)

资 料	总 钙	果 胶 钙	酸 钙	总 释 放	原生质体 释 放	原生质体 活 力
总 钙	—	—	—	—	—	—
果 胶 钙	+0.83	—	—	—	—	—
酸 钙	+0.62	+0.57	—	—	—	—
总 释 放	-0.64	-0.79	-0.50	—	—	—
原生质体释放	-0.68	-0.69	-0.81	+0.74	—	—
原生质体活力	+0.74	+0.69	+0.81	+0.64	+0.54	—

显著水平: $P=0.05$ $r=0.58$ $P=0.01$ $r=0.71$

$P=0.001$ $r=0.82$

在14—16叶时期,施钙植株出现紫斑,首先在叶的上表面可见到,这与原生质体的释放低相一致。在这个时期通常不能施钙。

生长分析表明,不同氮源,施钙和光强下,茎高,叶数和叶面积没有明显差别。不同处理单位鲜重的叶面积或水分含量上都无显著差异。

二、处理对蕃茄叶细胞原生质体释放的影响

表一列示原生质体和细胞的总释放及其占释放材料的百分比。硝酸盐+尿素比硝酸盐处理的释放较多,感染这些植株也相当困难。另外,两种处理的重遮荫有较高的原生质体释放。加施 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使有硝酸盐的全部处理的植株释放原生质体量增多,而加施钙使所有处理的植株释放原生质体量减少。施铵植株释放原生质体的百分比最高,

占细胞和原生质体总释放的90—100%。相反施钙植株的细胞释放比率高，占总释放的7—19%，未施钙为9—15%。

所有处理的原生质体和总释放呈正相关（表二），原生质体百分比和细胞百分比之间关系呈反比。进一步反映出，各种钙和原生质体释放的百分比之间呈负相关。

三、处理对分离原生质体活力的影响

用FAD染色法，测定了不同条件下生长的植株原生质体活力，表一列示了这些资料。分离和洗除酶后，这时原生质体活力为100—90%。

在重遮荫下，施硝酸盐，硝酸盐加尿素，或分别加施 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，其原生质体活力，在分离后迅速下降，而分别加施硝酸盐的植株，其原生质体活力在分离后第一天比前四种情况都高，但以后迅速下降。

从中遮荫植株分离的原生质体呈现三种状态：①从对照植株分离的原生质体，两种氮源下，刚分离原生质体活力为90%，第一天降到约75%，第二天（硝酸盐加尿素）和第三天（硝酸盐）降到30%，然后，直到第五天接近保持不变。②两种氮源下，原生质体活力随施 NH_4SO_4 而迅速下降，在第三天全部死亡。③两种氮源下，从施钙植株分离的原生质体活力降低慢，在3—4天仍有50%存活，一直保持的第五天。在第五天，原生质体活力与总钙（ $P=0.001$ ）、膜钙（ $P=0.01$ ）和果胶钙（ $P=0.05$ ）呈正相关，而活力与释放百分率呈负相关（ $P=0.05$ ）。

在重复试验中，叶总钙的绝对值随植物生长的光条件而变化。例如，表三所显示的资料。生长在硝酸盐加尿素条件下的五批植株，在所有情况下，总钙的增高与果胶钙，膜钙和原生质体活力的增高呈正相关，而与总释放和原生质体的百分率呈负相关。

晚春和初夏的光照条件（平均约 $12.6\text{MJm}^{-2}\text{日}^{-1}$ ，表三），对分离原生质体植株的生长是适宜的。如资料所示，在 $7.2\text{MJm}^{-2}\text{日}^{-1}$ 以下，原生质体活力下降，在 $13.0\text{MJm}^{-2}\text{日}^{-1}$ 以上，原生质体产量大大下降。企图在春季和冬季提供补充光照保持全年适当的光强水平未能成功。

表 3 光照条件和植株生长、叶中钙、细胞原生质体释放，原生质体活力之间的关系

光 照	总 钙 % (叶千重)	总释放 %	细胞释 放 %	原生质体 释 放 %	原 生 质 体 活 力					
					0	1	2	3	4	5
3.53	1.9	90	0	100	100	20	10	0	0	0
4.58	1.4	100	0	100	100	60	0	0	0	0
5.25	2.4	65	15	85	90	50	30	30	25	25
9.31	3.5	95	0	100	95	80	60	50	50	50
13.97	4.1	70	50	50	95	80	70	60	50	50

总之，十二个处理中有四个处理，在分离后第五天，原生质体仍活着。换言之，植物生长在中途遮荫，以硝酸盐或硝酸盐加尿素作氮源，並无论是补充硝酸钙或未补充，施钙植株的原生质体活力为对照的二倍（第五天时）。施钙植株的资料表明，从接受硝酸盐加尿素的原生质体释放，约为接受硝酸盐的两倍。因此，在下一步研究中，全部植