

植物体细胞杂交资料选译

上海市农业科学院作物研究所

一九七七年一月

目 录

一	用平板技术使来自分离的水稻原生质体的愈伤组织的分化	1
二	从水稻叶和愈伤组织分离原生质体	9
三	原生质体融合的植物体细胞杂交	16
	/ 单倍体光敏感烟草品种的光迟钝杂种的筛选	16
四	单倍体芸苔的原生质体再生作用和茎胚胎发生	35
五	甜橙的细胞培养：原生质体的分离、植板密度、突变效应和胚的再生	40
六	石龙芮的叶原生质体的分离、培养和再生成植株	46
七	茄科植物的体细胞杂交实验	51
八	基因间原生质体融合产物的细胞分裂	56
九	影响豌豆原生质体分离和愈伤组织形成的因素	63
十	花粉原生质体的分离和超微构造	71
十一	一个烟草种的叶原生质体的愈伤组织诱导和植株再生	75

用平板技术使来自分离的水稻原生质体的愈伤组织的分化

C. Deka 和 S.K. Sen

摘 要

用酶法分离出水稻 (*Oryza Sativa* C.) 的叶肉细胞和愈伤组织细胞的原生质体, 酶混合物由 2% 的果胶酶, 3% 纤维素酶, 0.45M 甘露糖醇组成, $pH = 5.4$ 。叶肉细胞活原生质体的产量为 50-60%, 愈伤组织细胞的活原生质体的产量为 60-70%。我们的培养基是三个已公认的培养基的组合。培养条件是: $26^{\circ}C$, 柔软的洋菜培养基植板在培养皿内, 培养 2.4 小时后, 再生了细胞壁。愈伤组织原生质体在培养 4 天后, 观察到第一次细胞分裂, 而叶肉细胞原生质体在培养 5 天后, 才观察到第一次分裂。此后, 细胞分裂继续进行, 培养 4 天后, 在培养皿中, 可见到小的白色愈伤组织。植物材料的类型 (白色叶鞘) 和细胞密度是细胞团形成效率 (30% 植板效率) 的重要因素。通过转移到适当的培养基中, 健壮的根形成至今仍是愈伤组织的形态反应。

前 言

自 Cocking (1960) 的首创工作以来, 他介绍了植物原生质体分离的酶学方法, 很快被人们所公认, 植物原生质体是进行许多问题 (不能用细胞和组织适当研讨的) 的非常重要的实验材料。通过种内或种间融合 (Schenk 和 Hildebrandt, 1968; Nickell 和 Torrey, 1969; Keller 和 Melchers, 1973; Kao 和 Michayluk, 1974)、DNA 转化 (Ohya 等, 1972a; Holl, 1973; Hess 等, 1973; Hoffmann 和 Hess, 1973) 和细胞器移植 (Potrykus 和 Hoffmann, 1973; Potrykus, 1973; Bonneft 和 Eriksson, 1974), 植物原生质体可用于细胞饰变。假若能发展从原生质体再生细胞, 它们开始分裂, 形成愈伤组织, 最后诱导它们分化成开花植物这一技术, 就能从这些遗传操作实验中实现效果良

好的结果。仅在少数几个种得到叶肉细胞和愈伤组织细胞的原生质体的愈伤组织 (Takebe等, 1971; Nagata和Takebe, 1971; Nitsch和Ohyama, 1971; Potrykus和Durand, 1972; Constabel等, 1973; Pelcher等; 1974)。为分离和培养原生质体所必需的条件, 和为诱导分化和植物发育所必需的操作程序可能变化很大, 因都是为每个种和多半为每个遗传型而建立的。至今, 完整植株的再生仅限于烟草属 (Takebe等, 1971; Nagata和Takebe, 1971; Nitsch和Ohyama, 1971) 矮牵牛属 (Duran等 1973; Binding, 1975)、Asparagus 叶状枝 (Bui-Dang-Ha和Mackenzie, 1973)、胡萝卜 (Grembow等, 1972; Gamborg等, 1973) 和芸苔 (Karthaus等, 1974)。本文报导了我们完成水稻叶肉和愈伤组织原生质体分离和培养的操作程序。

材 料 和 方 法

1. 叶肉细胞的原生质体分离。

为了叶肉细胞的原生质体分离, 取栽培在室外的水稻幼苗的苍白色叶鞘为材料。在水中生长的幼苗、细胞膨胀, 所以, 至少在大田或瓶体中取材料前两天, 停止灌水, 这对原生质体良好分离是必要的。作为材料来源, 发现30-50天幼苗最合适。

叶鞘先用70%酒精消毒3分钟, 用过氯酸钙消毒10分钟, 并用无菌蒸馏水洗涤。然后切成薄的横断小片, 并在无菌水中洗涤, 叶小片在真空中于0.45M甘露糖醇的2%果胶酶 (Serva) 溶液中培育10分钟。随后, 在20毫升 $PH 5.4$ 的酶混合液中, 于正常压力和 $30^{\circ}C$ 下培育1小时, 同时不时地轻轻摇动。混合液通过 100μ 不锈钢筛网过滤, 以除去未降解的叶材料。再悬浮在 $PH 5.4$ 、3% Onozuka SS' 纤维素酶 (全日生化药品公司) 的0.45M甘露糖醇, 并在 $30^{\circ}C$ 下, 培育2小时以上, 同时, 稍加摇动。最后, 用低速离心 ($100\times g$) 2分钟, 以0.45M甘露糖醇液收集和洗涤原生质体。

2. 愈伤组织原生质体分离。

从水稻茎得到的愈伤组织细胞, 大约一年中, 每4周继代培养在SH培养基上 (Schenk和Hildebrandt, 1972), 培养基中含

0.5毫克/升2,4-D, 0.5毫克/升IAA和0.1毫克/升激动素。用锐利的剃刀把500毫克愈伤组织细胞切成很小块,并在含2%果胶酶、3%纤维素酶(Onozuka SS)和0.45M甘露糖醇的25毫升酶混合物($pH=5.4$)中,于30°C下培育,不时地稍稍摇动。培育5小时后,悬浮液通过100 μ 不锈钢筛网过滤,用100 $\times g$ 低速离心2分钟,于0.45M甘露糖醇收集和洗涤原生质体3次。

酶混合液事先用微孔滤器(0.45M)过滤灭菌,全部操作过程都在无菌条件下进行,用0.1%荧光增白剂染色法检查细胞壁的完全除去,随后,采用Nagata-Takebe(1970)方法进行培养。

3. 原生质体培养。

我们按Takebe等(1971)和Nagata和Takebe(1971)发展的Bergmann技术(1960)培养原生质体。用0.45M甘露糖醇洗涤分离的原生质体后,最后用无生长激素的培养基洗涤之。然后再悬浮在培养基中,细胞密度为 $2.0\sim2.5\times10^4$ /毫升。用等体积的保持45°C的溶解洋葱培养基(0.8%洋葱在表1中的培养基),轻而迅速地混合悬浮液。5毫升混合物注入玻璃培养皿($\varnothing 5.0$ 毫米),用石蜡封口,上部朝上,放在26°C的培养器中培养。叶肉细胞的原生质体放在连续光照下,愈伤组织的原生质体放在黑暗下。每个实验,至少做5个重复植板。

当愈伤组织的大小达到1.5-2毫米时(约培养8周),便转移到含0.5毫克/升2,4-D, 0.5毫克/升IAA和0.25毫克/升NAA和0.1毫克/升激动素的SH培养基上(Schenk和Hildebrandt, 1972)诱导分化,在26°C和光(5000勒克斯)暗各12小时交替下培养。

表1 水稻原生质体的培养基成分

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
Na ₂ EDTA	20	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.010
有机组成			
内消旋肌醇	400	蔗糖	10克/升
盐酸硫胺素	0.5	甘露糖醇	0.3M
盐酸吡哆素	0.5	2,4-D	1.4毫克/升
叶 酸	0.5		
烟 酸	5.0		
生 物 素	0.5		
		高压消毒前把PH调到5.8	

结 果

发现植株年龄、细胞紧张度、和所用植物部位的性质是成功地分离水稻叶原生质体的最重要的因素。从水稻叶分离原生质体未成功，仅只有30-50天植株的柔嫩白色叶鞘，对我们所采用的技术有较好反应。用纤维素酶降解45分钟后，开始产生叶肉细胞原生质体，经过2小时后，约有50-60%的细胞游离出原生质体（图1a）。分离愈伤组织原生质体时，仅新鲜愈伤组织对所用酶混合物有反应，在降解4小时后约有60-70%细胞变成原生质体。分离的叶肉原生质体的细胞质均匀地分布在原生质体中。在愈伤组织原生质体的情况下，观察到颗粒和液泡。活原生质体有原生质流动。

培养原生质体24小时后，发生了细胞壁再生。这时，原生质体

的形状改变成卵圆形。叶肉原生质体培养5天(图1b)和愈伤组织原生质体培养4天(图1c)后,观察到第一次细胞分裂。这个结果确认了其他作者(Nagata和Takebe,1970;Kantha等1974)的早期报导。细胞壁的形成出现在细胞分裂之前,第一次分裂之后的第4天发生第二次分裂。在以后的15-20天培养中,成功的细胞分裂导致细胞团形成(图1d),逐渐造成细胞团中细胞数目的差异,且叶肉原生质体的叶绿体极少变成性质不同的状态。

培养4天后,从单个原生质体发源的细胞团长成小而活的白色细胞群。8周后,大多数细胞群达到1.5-2.0毫米大小(图1c),此时,准备转移到SH分化培养基(Schenk和Hildebrandt, 1972)。

在我们的实验中,培养5周后,已没有新的可统计的细胞群。按Nagata和Takebe(1971)讨论过的方法测定这时的植板效率,平均达5%。当原生质体植板密度低于一定密度之下时,便不能形成细胞群。各个实验的临界密度变动 1×10^4 /毫升左右。

当愈伤组织转移到SH培养基中,在这个培养基中含有0.5毫升/升2,4-D,0.5毫克/升IAA,0.25毫克/升NAA和0.1毫克/升激动素,细胞群活跃地生长,最初像愈伤组织块,约2周后,一些愈伤组织分化成健壮的根(图1f),但是,通过努力,即使培养更长时期没有长出苗。

讨 论

从禾谷类的叶(Evans等,1972)和愈伤组织(Motoyoshi, 1971;Wakasa,1973;Marretzki和Nickell,1973)分离原生质体,仅只有少数几个报导。Potrykus(1973)已经讨论过发展特殊种的有系统的培养基是困难的。因此,我们进行了改变已公认的培养基的适应性试验。在SH培养基(1972)上发生了第一次原生质体分裂。随后,我们能够用已公认的三种培养基(表1)的组合发展一种完全确定的培养基。发现它在我们的试验条件下最好。

愈伤组织原生质体的细胞分裂比叶肉细胞原生质体的细胞分裂较早。理由是所用愈伤组织处在离体条件中,因此,改组它本身到分裂

的时间短。正如 Nagata-Takebe (1971) 已经指出的那样，我们也观察到植板效率取决于接种和培养条件，还依赖细胞密度（也见 Enzmann Becker, 1973）。到目前为止，我们未能诱导形成地上部和再生成完整植物。虽然，借助 0.25 毫克/升 NAA 的帮助，完成形成健壮的根的诱导。

关于体细胞遗传研究中应用的植板技术，以前已由 Melchers 和 Bergmann 1958; Bergmann, 1960; Takebe 等, 1971; Melchers 和 Labib, 1970; Carlson, 1970; Nagata 和 Takebe, 1971; Carlson, 1975 等人讨论过。最近，借助融合方法，单倍体烟草原生质体已用于体细胞杂种的生产 (Melchers 和 Labib, 1974)。水稻是一种重要粮食作物，现在我们能诱导水稻原生质体的愈伤组织形成。

我们下一步进行水稻的体细胞遗传研究。但是，现在下一步必须赶紧进行地上部再生的研究。

附图片 5 幅 (略)

参 考 文 献

1. Bergmann, L.: J. gen. Physiol. 43: 841-851 (1960)
2. Binding, L.H.: Z. Pflanzenphysiol. 74:327 (1975)
3. Bui-Dang-Ha, D., Mackenzie, I.A.: Protoplasma, 78:215-221 (1973)
4. Carlson, P.S.: Science, 168:487-489 (1970)
5. Carlson, P.S.: Genetics, 79:353-358 (1975)
6. Cocking, E.C.: Nature (Lond), 187:927-929 (1960)
7. Constabel, F., Kirkpatrick, J.W., Gamborg O.L., Canada J. Bot., 51: 2105-2106 (1973)
8. Durand, J. Potrykus, I. Donn, G.: Z. Pflanzenphysiol. 69: 26 (1973)

9. Enzmann, Becker, G.: Z. Naturforsch, 28C:470-471 (1973)
10. Evan, P.K., Keats, A.G., Cocking, E.C.: Planta (Berl.) 184:178 (1972)
11. Gamberg, O.L., Kao, K.N., Miller, R.A., Fowke, L.C., Constabel F.: Coll. Internat. C.N.R.S. Nr. 212:155-173 (1973)
12. Grambow, J.H. Kao, K.N. Miller, R.A. Ganberg. O. L.: Planta (Berl.) 103:348-355 (1972)
13. Hess, D., Potrykus, L., Donn, G., Durand, J.R., Hoffmann, F.: Coll. Internat. C.N.R.S. Nr. 212:343-351 (1973)
14. Hoffmann, F., Hess, D., Z. Pflanzenphysiol. 69: 81-83 (1973)
15. Holl, F.B.: Coll. Internat. C.N.R.S. Nr. 212:509-516 (1973)
16. Kartha, K.K., Michayluk, M.R., Kao, K.N., Ganborg, O.L.: Plant Sci. Letter 3:265-271, (1974)
17. Keller, W., Mechers. G.: Z. Naturforsch. 28C:737-741(1973)
18. Matetzki, A., Nickell, L.G.: Coll. Internat. C.N.R.S. Nr. 212:51-63(1973)
19. Melchers, G. Bergmann. L.: Ber. dtsh. bot. Ges. 77:459-473 (1958/59)
20. Melchers, G., Labib. G.: Ber. dtsh. bot. Ges. 83:129-150 (1970)
21. Melchers, G., Labib. G.: Molec.gen. Genet. B6:277-294(1974)
22. Motoyoshi, F.: Exp.Cell Res.68:452-456(1971)
23. Nagata, T., Takebe, I.: Planta (Berl.) 92:301-308(1970)
24. Nagata, T., Takebe, I.: Planta (Berl.) 99:12-20 (1971)
25. Nickell, L.G., Torrey, J.G.: Science 166:1086-1089 (1969)
26. Nitsh. J.P., Ohyama, K.: C.R. Acad. Sci. (Paris) 273:801-803.

27. Ohyamann, K., Gamburg, O.L., Miller, R.A.: Canada J. Bot. 59:2077(1972a)
28. Ohyamann, K., Nitsch, J.P.: Plant cell Physiol. 13:229-236 (1972a)
29. Pelcher, L.E., Gamburg, O.L., Kao, K.N.: Plant Sci. Letter 3:107-111 (1974).
30. Potrylous, I.: Z. Pflanzenphysiol, 70:364-366 (1973)
31. Potrykus, I.: Proc. Int. Symp. Yeast Protoplasts. Salamanaca pp. 319-330 (1973)
32. Potrykus, I., Durand, J.: Nature (Lond) New Biol. 237: 286-287 (1972)
33. Potrykus, I., Hoffman, F.: Z. Pflanzenphysiol. 69:287-289 (1973)
34. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C.: Amer. J. Bot. 55: 731 (1969)
35. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C.: Canada J. Bot 59:199-204 (1972)
36. Takebe, I., Labib, G., Melchers, G.: Naturwissen-Schaften 58. 318-320 (1971)
37. Wakasa, K.: Jap. J. Genet. 48:279-289 (1973)

译自《Moler. Gen. Genet.》

145:239-243 (1976)

从水稻叶和愈伤组织分离原生质体

前田 英三 萩原 俊昭

自证实用酶溶液从高等植物叶肉和其他组织分离原生质体的可能性以来，植物原生质体已成为研究细胞壁再生，大分子物质吸收，细胞融合和杂交的一种有效的材料。最近，有从各种植物分离原生质体的报导，即小麦、玉米、黑麦、芸苔属(*Brassica*)、旋花属(*Convolvulus*)、还阳参属(*Crepis*)、矮牵牛属(*Petunia*)和欧龙牙草(*Liverwort*)，以及从各种组织，即单子叶植物的叶、愈伤组织、悬浮细胞、花粉四分体和小孢子母细胞，然而直到现在，除从水稻的根以外，我们还未看到水稻组织的原生质体分离的任何研究。

因此，我们研究了从水稻叶和愈伤组织分离原生质体的方法，文中讨论了水稻原生质体有效分离的适宜条件。

材 料 和 方 法

水稻(*Oryza sativa* L., 品种：爱知旭)种子在30°C水中浸2天，然后播在聚乙烯筛上，幼苗在30°C和连续光照下进行不加养料的培养。然后，以不同年龄、苗高4-5厘米的幼苗的叶和根作为试验材料，再用刀片将材料切成小于0.5mm³的小块，并在含有几种组合的酶培养基中培育。

用前文中讨论过的方法诱导的愈伤组织，在含M.S.无机营养，酪氨酸水解物和 10^{-5} M 2,4-D等的琼脂培养基上，经过几次继代培养，切取不同部位的愈伤组织作材料，并将它切成小于0.5mm³的小块。

从切好的材料中，取出2-3克鲜重样品，放入含有20毫升酶溶液的100毫升锥形瓶中，在35°C下于往返式振荡器(每分钟100次)上进行培育。酶溶液的成分和处理时间如表-1所示。在多数实验中，我们使用混合的酶溶液，而且未连续处理。有些实验未列在表中，纤维素酶以R-10代替Onozuka P-1500。

表-1 酶溶液 ($pH=5.5$), 培养时间和所用材料的年龄对水稻原生质体分离的影响

所用条件	叶		根		愈伤组织	
	试 验	适 当	试 验	适 当	试 验	适 当
果胶酶 (%)	0.5-2.5	0.5	0.5-2.5	1.5	0.5-4.0	1.0
纤维素酶 (%)	1.0-7.0	5.0	3.0-10.0	5.0	1.0-9.0	5.0
葡聚糖硫酸盐 (%)	0.5-2.0	0.5	0.5-2.0	1.0	0.5-1.0	0.5
甘露醇 (M)	0.4-1.0	0.7	0.2-0.8	0.6	0.1-0.7	0.5
培养时间 (小时)	0.5-6.0	2.0	1.6-6.0	2.5	0.5-3.0	2.0
材料年龄 (天)	5-17	7	3-14	5	3-33	15-2.0

处理后, 通过四层尼龙筛过滤, 并在离心机上, 以每分钟 2000 转离心二分钟进行收集, 以制备原生质体, 用光学显微镜观察收集到的原生质体, 并测量其直径大小。

制备了超薄切片, 以观察原生质体的结构, 向经酶溶液处理 2 小时游离出的原生质体材料中加入戊二醛, 使最终浓度为 5%。在 5°C 下固定 3 小时后, 用 $pH=7.5$ 的 0.2M 磷酸盐缓冲溶液冲洗材料 3 次, 离心收集原生质体, 并嵌入 1% 的琼脂块中, 琼脂块在 5°C 下于 2% 四氧化镁的磷酸盐缓冲液中固定后, 放置一夜, 然后用一系列浓度的乙醇脱水。紧接乙醇脱水之后, 用氧化丙烯把它埋入环氧树脂, 小块埋在明胶包裹中, 用 MT, 超薄切片机切成 $0.25-0.5\mu\text{m}$ 切片, 收集后用甲苯胺蓝、品红——亚甲蓝 (图 9, 13-18 和 19) 或 PAS——甲苯胺蓝 (图 5-8, 10-12 和 19) 染色, 并在光学显微镜下进行检查。

结 果 和 讨 论

本试验研究了原生质体分离的适宜条件, 用各种处理所得的结果总结在表 1 中, 表中说明了酶与其他物质的适宜浓度。它揭示出, 在全部材料中采用约 5% 纤维素酶分解细胞壁是适当的, 根原生质体的

分离所要求的果胶酶浓度较叶子的高些。似乎果胶酶对分离根原生质体相当有效。即使仅用纤维素酶处理叶和愈伤组织，都得到大量原生质体。高浓度的果胶酶对所用的全部材料多半是有害的。0.5M的甘露醇对愈伤组织原生质体已经足够，但叶要求的浓度较高。葡聚糖硫酸盐未得到明显效果，但是用0.5-1.0%的葡聚糖硫酸盐没有坏处。

另外，所用材料的部位、幼苗和愈伤组织的年龄，对迅速而大量分离原生质体确实是重要的。似乎用叶鞘和年幼的叶片比用成熟叶片可得到更多的原生质体。15-20天的愈伤组织往往产生大量的原生质体。带淡黄色的新形成的部分比带黑色的已老化的部分必然释放出更多的原生质体。在这方面，有趣的是，胡萝卜根的不同区段得到的愈伤组织株系之间，有不同的原生质分离能力。在我们的实验条件下，播种17天以上的幼苗和继代培养76天以上的愈伤组织，几乎不产生原生质体。

培育的适宜时间大约2小时，延长时间会产生大量碎片，并招致细菌污染，因为没有完全无菌的环境。把材料切成小块，对分离成功是特别需要的，因为原生质体是从切割面上游离出来，切自远离根毛的组织，经酶处理，也偶而可从切割表面释放出原生质体。

图2和图4（略）表示了从水稻叶和愈伤组织酶释放的原生质体，是用离心机进行浓缩的。

图1表示原生质大小的分布频率，叶、根和愈伤组织中原生质体的直径分别测量了389、233和364个原生质体的直径，并计算了原生质体大小的百分数，图中清楚表明，愈伤组织和根的原生质体的大小比叶大。其大小的差异可认为是由于酶液渗透压不同之故，叶、根和愈伤组织分别采用适宜的0.7、0.6和0.7M甘露醇。

叶原生质体的平均直径约为 $10.3\mu\text{m}$ ，大小相当一致，7.5-12.5 μm 的原生质体在87%以上，但同时还看到少量的直径为2.5 μm 的原生质体，这样高的频率，看来是被分离原生质体的组织均匀性所引起的。表皮、维管束和厚壁组织细胞比叶肉细胞更抗酶处理（图10和11）。从叶中释放原生质体的大多数似乎是叶肉细胞，因为都有一些叶绿体存在（图5-7）。在图6中，能清楚地看到叶绿体的片层结构，没有明显叶绿体的原生质体，仅占12.8%图12

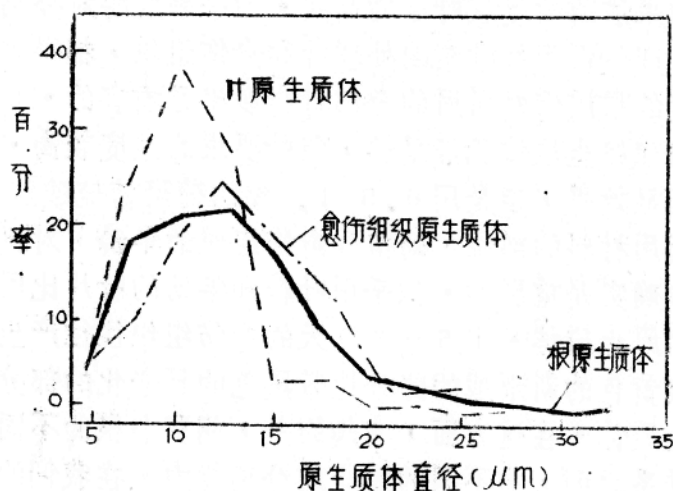


图1 来自水稻叶、根和愈伤组织的原生质体的大小

表示叶肉细胞壁还没有被酶降解，在这个图中，用高渗溶液把原生质层同细胞壁分开。可以认为，细胞壁中层已完全降解，因为原生质体包被不为PAS反应染色。

愈伤组织的原生质体变化更大，且平均直径比叶原生质体大（图1）。这种变化看来是试验材料的培养时间和部位造成的，看到特别巨型的原生质体，其直径达50-75μm，在图1中未做表示，图3表示巨型原生质体。在酶悬浮液中，常常看到在形状上无定形的崩解原生质体。但是尚不能确定，这是由于酶处理时的伤害结果，还是由于在处理前就是老化和死的细胞。

连续地观察了愈伤组织原生质体的核仁（图13、14、18和20）表示了不同状态的核，在有些核中，染色质积集（图13），而另一些则没有积集（图14）。在原生质体各种大小的颗粒分三种类型。大颗粒为类型1，在液泡中看到（图14），球状颗粒为类型2，在细胞质中呈散射状存在（图15）；小颗粒为类型3，位于核周围的细胞质中（图16），用电子显微镜检查了细胞质中细胞器的精细结构。

一个有趣的证据，从水稻叶和愈伤组织得到的原生质超薄切片揭

示出，常常看到多核原生质体。图 2、8、18、19 和 20 表示出多核原生质体，也可能是原生质体的自发融合所引起的，但未引起核分裂，因为在短时间的酶处理后，立即凝固。在愈伤组织原生质体中，可以认为，多核原生质体是从无菌培养诱导的多核细胞释放出来的。而叶原生质体多核原生质体的诱导作用很可能是由于融合过程，因为在水稻叶肉组织中仍未观察到多核细胞。图 19 表示不规则形状的核，其结构将作进一步说明。

根原生质体平均直径仅 $12.5\mu\text{m}$ ，相当小，但变化大（图 1），从近根顶端区分离出来的原生质体小，但从远离根顶端区分离出来的原生质体大。我们发现原生质体来自维管束系统周围的组织。在大多数情况下，根原生质体有良好发育的液泡，所以，沿原生质层看到细胞质薄层。

大多数原生质体在高渗溶液中破裂，然后其内容物流出到培养基中。因此，植物原生质体的大量产生首先要研究细胞器的完整状态，如核和叶绿体等。水稻原生质体在约 5°C 的冷却条件下，可保持生活状态 1 周以上。照理，有可能长期贮藏和收集原生质体。我们的水稻原生质体试验也证实，纤维素酶 R-10 的活性约为 P-1500 的 5 倍。进而，我们试验了各种花细胞的细胞壁酶促降解并成功地分离了荷兰石竹 (*Dianthus superbus*) 和杂交苍兰 (*Freesia hybrida*) 的花瓣原生质体，这种研究可为研究花色素提供一个有效的方法。

基于以上报导，可以说，作物遗传物质的转移或细胞器的移植，这样有吸引力的问题，在水稻上也成为可实现的。由于，以前早已有关于用几种类型原生质体摄取外源脱氧核糖核酸 (DNA) 和细菌核融合、植株再生和种间杂交方面的某些证据，并且植物原生质体也是研究除莠剂作用和 DNA 分离的有效工具。

本文证明从水稻幼苗和愈伤组织有把握地产生水稻原生质体的条件。下一步，我们要研究原生质发育成愈伤组织，最后长出水稻幼苗的条件。

研究了叶、根和愈伤组织在细胞壁降解酶溶液中分离出水稻原生质体。把切成小段的材料，放入含有离析酶、纤维素酶和甘露醇等混合溶液，在35°C下培养2小时，即可完成原生质体的分离。确定了分离叶、根和愈伤组织原生质体的酶和甘露醇的适当浓度。按原生质体的直径测定了它的大小，并得到了原生质体大小的分布频率。愈伤组织原生质体大，叶原生质体小。用光学显微镜观察超薄切片，研究了原生质体的结构，用图说明了核和核仁的性质，以及叶绿体的片层结构。从存在的多核原生质体计算了原生质体的自然融合。此外，成功地完成了荷兰石竹(*Dianthus supeburs*)和杂交苍兰(*Freesia hybrida*)花瓣原生质体的分离。

附图片20幅(略)

参 考 文 献

1. Bhojwani, S.S. etc., Nature New Biol. 239:29-30, 1972.
2. Boulware, M.S. etc., Physiol. Plant., 26:313-317 1972
3. Carlson, P.S. etc., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2292-2294, 1972.
4. Davey, M.R. etc., Nature 239:455-456, 1972.
5. Evans, P.K. etc., Planta 104:178-181, 1972.
6. Feder, N. etc., Amer. Jour. Bot. 55:123-142, 1968.
7. Giles, K.L., Plant and cell. Physiol. 13:207-210, 1972
8. Grambow, H.J. etc., Planta 103:348-355, 1972
9. Hess, D. etc., Naturwissenschaften 59:273-274, 1972
10. Holden, O.J. etc., Phytion (Argentina) 29:47-54, 1972.
11. Horine, P.K. etc., Plant physiol. 50:438-445, 1972

12. ITO, M., Bot. Mag. Tokyo 86:133-141, 1973.
13. Ivantsov, A. I. etc., Soviet Plant Physiol. 19:638-645, 1972.
14. Kameya, T. etc., Japan, J. Genetics 47:215-217, 1972.
15. Kameya, T. etc., Planta 103:356-360, 1972.
16. Kanai, R. etc., Naturwissenschaften 60:157-158, 1973.
17. Maeda, E., Pro. Crop Sci. Soc. Japan 34:139-147, 1965.
18. Maeda, E., Japan. J. Genetics 44:285-289, 1969
19. Maeda, E., Proc. Crop Sci. Soc. Japan 40:397-398, 1971
20. Maeda, E., Proc. Crop Sci. Soc. Japan 41:269-283, 1972.
21. Maeda, E., Proc. Crop Sci. Soc. Japan 42:442-453, 1973.
22. Miller, R.A. etc., Canada J. Genet. Cytol. 13:347-353, 1971
23. 中野 寛等, 生物科学 24:85-90 1972
24. Ohyama, Kan., Canada J. Bot. 50:2077-2080, 1972
25. Ohyama, Kan., etc., Plant Physiol. 50:319-321, 1972.
26. Ohyama, Kat. etc., Plant cell Physiol. 13:229-236, 1972.
27. Potrykus, I. etc., Nature New Biol. 237:286-287, 1972.
28. Schieder, O. etc., Zeit. Naturforsch. 27B:479-480, 1972.
29. Schilde-Rentschler, L., Zeit. Naturforsch., 27B:208-209, 1972.

译自《日本作物学会记事》

43(1): 68-76, 1974