



全国高技术重点图书·生物技术领域

植物原生质体培养和 遗传操作

主编 许智宏 卫志明



上海科学技术出版社

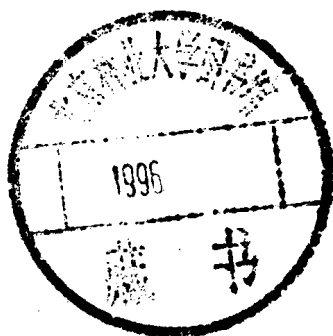


全国高技术重点图书·生物技术领域

植物原生质体培养和遗传操作

主编 许智宏 卫志明

1424/05



北林图 A00127165

上海科学技术出版社

448311

全国高技术重点图书·生物技术领域
植物原生质体培养和遗传操作 主编 许智宏 卫志明

上海科学技术出版社出版、发行 (上海瑞金二路 450 号)
新华书店上海发行所经销 望亭发电厂印刷厂印刷
开本 787×1092 1/16 印张 17.5 插页 8 字数 409,000
1997 年 11 月第 1 版 1997 年 11 月第 1 次印刷 印数 1—1,000

ISBN 7-5323-4314-6/Q·64

定价:38.00 元

《全国高技术重点图书》出版指导委员会

主 任 朱丽兰

副主任 刘 杲

卢鸣谷

总干事 罗见龙 梁祥丰

委 员 (以姓氏笔画为序)

王大中	王为珍	牛田佳	王守武
刘 仁	刘 杲	卢鸣谷	叶培大
朱丽兰	孙宝寅	师昌绪	任新民
杨牧之	杨嘉墀	陈芳允	陈能宽
张兆祺	张钰珍	张效祥	罗见龙
周炳琨	欧阳莲	赵忠贤	顾孝诚
谈德颜	龚 刚	梁祥丰	

《全国高技术重点图书·生物技术领域》编审委员会

主 任 顾孝诚

委 员 (以姓氏笔画为序)

陈受宜 邹承鲁 罗见龙 范云六
侯云德 曾建飞

主 编 许智宏 卫志明

本书编者 (以姓氏笔画为序)

卫志明 王光远 王素娟 邓秀新
田 波 史文忠 许智宏 杨文定
杨仲南 李学宝 李耿光 何亚文
张兰英 陈志贤 周 嫦 贾士荣
夏镇澳 黄健秋 程振东 薛红卫

序

自从60年代初酶法分离原生质体取得突破以来,有关原生质体的研究始终保持长盛不衰之势。究其原因,大概是由于原生质体具有三方面的优点:一是脱壁之后可以用于细胞融合;二是排除细胞壁的障碍有利于导入外源基因;三是能够通过离体培养再生完整植株。第一点是具壁细胞不可能做到的;第二点是比具壁细胞更优越的;第三点则是和具壁细胞相似而为动物细胞所不具备的。原生质体集以上三种优点于一身,的确是一种优越的遗传操作系统。所以原生质体技术的兴起,拓宽了植物遗传操作领域,使植物细胞工程与基因工程实现了新的跃进,这样说是不过分的。此外,原生质体在细胞形成与壁的功能、原生质膜特性、细胞器功能、外源基因瞬间表达、病毒与宿主关系等诸多基础研究领域也是一种重要的实验体系。

近年的原生质体研究大致包括以下几个方面的趋势:第一,操作技术(分离、融合、筛选、转化、培养)不断提高,趋于精密化、微量化、高效化与多样化。第二,重要作物原生质体再生植株不断取得成功,为原生质体技术应用于作物改良展示了广阔的前景。第三,由体细胞原生质体扩展到性细胞原生质体的操作与研究,从而催生出性细胞工程新领域。第四,在长期实践中,对原生质体作为实验系统的各种优点与弱点有了更为全面与深入的认识,可以说人类对原生质体的控制与利用已进入一个更为成熟的阶段。这些趋势和特点,在本书各章中均有具体而细微的描述。

本书全面反映了植物原生质体研究的基本知识和研究进展。本书共分两篇:第一篇“概论”以国际上的研究热点为纲,从理论上和方法上作分章专题阐述,而以第一章为总的导论。第二篇“各论”以研究的对象为纲,按植物分科或作物类型分章介绍各种植物的原生质体技术。书中既尽可能反映当前国际研究新成就,又力求概括我国研究者的贡献,显示出理论与应用兼顾的特色。我相信本书作为一部专著兼教学参考书将发挥其应有的作用。

中国科学院院士、武汉大学教授 杨弘远

1995年5月

目 录

第一篇 概 论

第一章 植物原生质体研究的历史和现状	2
一、植物原生质体研究的历史回顾	2
二、植物原生质体研究的进展	4
三、植物原生质体研究在我国的发展	6
第二章 植物原生质体的分离和培养	11
一、原生质体分离.....	11
二、原生质体培养.....	15
第三章 由原生质体再生植株	20
一、原生质体培养中的再生过程.....	20
二、通过器官形成途径再生植株.....	21
三、通过胚胎发生途径再生植株.....	24
四、原生质体再生植株的遗传特性.....	26
第四章 原生质体融合和细胞杂交	31
一、体细胞杂交.....	31
二、不对称细胞杂交.....	33
三、体细胞与性细胞杂交.....	36
四、微细胞杂交.....	37
第五章 植物性细胞原生质体的分离、培养和融合	42
一、原生质体分离.....	42
二、原生质体培养.....	46
三、原生质体融合.....	47

第六章 利用原生质体导入外源基因及其在基因工程中的应用	55
一、PEG 介导转化法	55
二、脂质体介导转化法	57
三、电击穿孔转化法	58
第七章 原生质体瞬间表达系统在基因表达研究中的应用	62
一、DNA 导入方法	62
二、报告基因	63
三、瞬间表达过程	64
四、原生质体瞬间表达在基因表达调控研究中的应用	65
第八章 原生质体在植物生理学研究中的应用	69
一、再生细胞壁	69
二、微管与细胞分裂	71
三、内吞作用和液泡	72
四、气孔生理	73
五、原生质体的全能性	74
第九章 原生质体在植物病毒分子生物学研究中的应用	77
一、原生质体中病毒增殖的研究方法	77
二、在植物病毒分子生物学研究中的应用	83

第二篇 作物各论

第十章 禾本科植物	92
一、禾谷类	92
二、甘蔗	100
三、牧草类	101
第十一章 豆科植物	105
一、子粒型豆科植物	105
二、豆科牧草	112
第十二章 十字花科植物	124
一、芸苔属植物	124
二、萝卜	133
三、拟南芥	134

四、其他十字花科植物	136
第十三章 茄科植物	142
一、烟草属	142
二、茄属	147
三、矮牵牛属	151
四、番茄属	154
第十四章 伞形科植物	167
一、胡萝卜	167
二、芹菜	170
三、芫荽	171
四、伞形科药用植物	171
第十五章 葫芦科植物	175
一、黄瓜	175
二、甜瓜	178
三、遗传转化	179
第十六章 菊科植物	186
一、向日葵	186
二、莴苣	188
三、菊花	190
四、茼蒿	191
五、金光菊属	192
六、其他菊科植物	193
第十七章 果树	197
一、柑橘	198
二、苹果	204
三、梨	206
四、猕猴桃	207
五、香蕉	208
六、木瓜	208
七、草莓	208
第十八章 林木	212
一、针叶树种	212
二、阔叶树种	217

第十九章 纤维作物	223
一、棉花	223
二、亚麻	226
第二十章 藻类	230
一、红藻类	231
二、褐藻类	237
三、绿藻类	239
四、微藻	240
附录 种子植物原生质体培养中再生植株的种类	247

第 一 篇

概 论

第一章

植物原生质体研究的历史和现状

· 许智宏 ·

植物细胞原生质体(protoplast)一词始于 Hanstein(1880),在植物学上它是指植物细胞通过质壁分离后可以和细胞壁分开的那部分细胞物质。早期研究中,它主要用机械的方法使细胞壁破口后得到。1960 年英国植物生理学家 Cocking 首次用纤维素酶分离原生质体获得成功,从而开创了用酶法分离原生质体的时期,从此使得在实验室条件下很容易获取大量的原生质体。去壁的原生质体实际上为一种仅为质膜所包围的裸露植物细胞。在过去的 30 多年中,它已广泛用于植物生物学的多种研究,并用之进行各种遗传操作。植物原生质体研究已成为植物细胞生物学、植物组织和细胞培养中的一个十分活跃的领域,而受到了众多的注意。

一、植物原生质体研究的历史回顾

(一) 植物原生质体的早期研究——机械法分离原生质体时期

从上世纪末以来的很长一段时期,人们对于用机械法从质壁分离的植物细胞分离原生质体进行了不少研究。植物细胞在高渗溶液中发生质壁分离时,最常见的情况即是细胞壁内的整个原生质体收缩、变圆,与细胞壁脱离。如果细胞形状较长(如很多丝状藻类细胞、不少高等植物的表皮细胞、培养细胞等),质壁分离也可以使原生质体分成为几个亚原生质体(subprotoplast)。在此情况中,只有其中一个含有细胞核。当这种质壁分离的细胞的细胞壁被切破时,就可能在不损伤其内的结构的情况下获得分离的原生质体。这种方法最早是在 1892 年由 Klercker^[1]用于从质壁分离的 *Stratiotes aloides* 细胞分离原生质体,这也成为以后由 Seifriz^[2]进行的与此有关的显微解剖方面的开创性工作的基础。这类研究随后为 Chambers 和 Hofler(1931)所扩展,他们将洋葱表皮组织的薄片浸在 1.0 mol/L 蔗糖溶液中,当原生质体收缩脱离壁时用快的刀片切开表皮细胞,获得了少量表皮细胞的原生质体。这种分离的原生质体的细胞质可以散开,但中央液泡的完整性仍得以保持^[3]。用类似的方法也可由甜菜组织分离原生质体^[4],先把小块甜菜组织置于一渗透压稍高的蔗糖溶液中 2 小时,再逐渐增加溶液中的蔗糖浓度到 1 mol/L 左右,以促使细胞质壁分离。随后从组织块上切下一薄片,移到浓度约为 0.5 mol/L 的蔗糖溶液中,此时未受损伤的原生质体因迅速膨大,而从细胞壁的切口处挤出。这种方法也成功地用于萝卜表皮组织^[5]和黄瓜的果肉组织^[6]。适于利用这种机械分离方法获得原生质体的组织必须能进行明显的质壁分离,原生质

许智宏,中国科学院上海植物生理研究所研究员,博士生导师,现任中国科学院副院长。

体和细胞壁可以较好地分开。早期的这些用机械方法得到的原生质体,主要用于各种植物细胞生理学的研究,在很多方面为人们提供了不少基础资料 and 知识,如分离的原生质体的扩张能力^[5]、真菌毒素对质膜的影响^[6,7]、生长素对质膜的影响^[8]、植物细胞的渗透特性^[9,10]等。有关这些早期工作,可参阅 Cocking 的评论^[11]。问题是使用这种机械分离的方法操作繁琐,所得原生质体的数量也很少,并限于能进行明显质壁分离的组织。这种方法不可能从分生组织及其他较幼嫩的组织分离原生质体,因而也就限制了这种方法的应用。用机械方法分离原生质体,与下面所介绍的酶解方法比较,优点可能在于这种方法对于原生质体结构及代谢的有害影响较小。在酶解方法中,特别是在早期使用的酶制品比较粗的情况下,由于商品酶中的杂质或所含的杂酶的影响,常可给原生质体造成一定的伤害。

(二) 酶法制备原生质体开创植物原生质体研究的迅速发展阶段

1960 年英国 Nottingham 大学植物学系 Cocking 首次用纤维素酶从番茄幼苗的根分离得到原生质体,从此开创了用酶法来分离植物原生质体的时期^[12]。当时 Cocking 试图发展出一种简捷的直接从植物组织分离单细胞的方法以用于生理生化和遗传学的研究。在此之前,自从 1919 年 Giaja^[13]用蜗牛 *Helix pomatia* 胃液消化酵母的细胞壁分离原生质体之后,很多研究者试图用酶法从细菌、藻类、真菌、苔藓和高等植物分离原生质体。Cocking 在他的博士后工作时使他有接触一些微生物学家,当时他们开始在用溶菌酶分离细菌原生质体,以及用蜗牛的肠胃消化液分离真菌原生质体。这使他认为用酶法分离植物原生质体是可能的。他用多种当时可以得到的商品纤维素酶制品,试验了分离原生质体的能力。选用番茄幼苗的根作材料,主要是考虑到幼苗容易培养,且幼根含有处于不同分化阶段的细胞,易于碰上适于某种特定酶可以作用的细胞阶段(因不同时期细胞的细胞壁组成会发生很大的变化),当然用幼根作材料时酶也较易渗入组织,但所试的酶均未能成功。就在那时 Cocking 了解到在加拿大渥太华工作的 Whitaker^[14]关于从 *Myrothecium verrucaria* 纯化纤维素酶的研究结果,Whitaker 为 Cocking 提供了几克酶的样品,在所有的尝试均失败后,Cocking 试验了这一酶制品的活力,结果出人意外地获得了成功。这一方法随后为 Cocking 实验室一系列的工作以及 Ruesink 和 Thimann^[15],Eriksson 和 Jonasson^[16],Schenk 和 Hildebrandt^[17]等人的研究所发展,他们从多种植物的组织,培养的愈伤组织或悬浮培养细胞获得了原生质体。1969 年在日本出现的由 *Trichoderma viride* 制备的商品纤维素酶 Onozuka P1500 用于分离原生质体的成功,以及随后的不断出现的一系列新的纤维素酶 Meicelase, Cellulase Onozuka R-10, Onozuka RS 等,以及多种半纤维素酶,果胶酶类(Macerozyme R-10, Pectolyase Y-23 等),使在实验室大量制备原生质体成为一种常规的技术(详见第二章),从而大大促进了原生质体的研究。利用酶法分离原生质体,与机械分离法比较,其优点在于:一是可以很容易地大量制备植物原生质体,通常由 1 克鲜重组织可以得到 $10^6 \sim 10^7$ 个原生质体,即使在原生质体纯化过程中,会丢失一部分,其数量也是用机械法所无法比拟的;其二是用酶法可以从多类植物组织,特别是没有明显液泡化的分生组织或其他幼嫩的组织分离原生质体,机械法对此却无能为力,而这类细胞对于研究植物细胞的代谢、生长分化又是十分重要的。

植物原生质体作为一种裸露的生活细胞,就没有细胞壁这一点来说与动物细胞相似。它作为生活的细胞,进行着植物细胞的多种基本生命活动,如合成代谢、呼吸作用、通过质膜进

行物质交换、叶肉细胞原生质体仍保持光合作用的活性等。这些特性决定了利用原生质体这一细胞系统可以研究多种细胞生理问题(详见第八章)。原生质体没有细胞壁,但在培养过程中又可以再生出细胞壁,所以原生质体也为研究细胞壁的形成提供了一个理想的系统。原生质体在培养中可进行细胞分裂,持续分裂的结果形成细胞团和愈伤组织,进而通过胚胎发生或器官形成途径而再生形成完整植株。因此,原生质体作为一个单细胞系统,同样也是研究细胞分裂及全能性的良好材料(详见第三章)。由于原生质体没有细胞壁,这就可以如同动物细胞一样进行细胞融合以获得体细胞杂种的试验,也可以诱导摄取外源 DNA,或用于进行细胞器或细胞核移植的试验(详见第四、六章)。利用酶法大量制备原生质体的成功以及在此基础上发展出多种有效的原生质体培养系统(见第二章),才使得系统地开展上述几方面的工作成为可能。结果是从 1960 年以后原生质体研究进入一个新的发展时期,这大致又可分为两个阶段。第一阶段为 1960~1970 年,在这一时期试验了多种纤维素酶和果胶酶在分离原生质体中的活力,以及多种酶制剂中的杂质对原生质体活力的影响,开始出现专门用于分离原生质体的酶制品,并进行了初步的培养试验。在这些研究的基础上,于 70 年代后,原生质体研究进入了一个发展十分迅速的阶段。1971 年首次由烟草原生质体再生植株^[18,19],证明了培养的原生质体的全能性。1972 年 Carlson 等人用烟草种间原生质体融合获得第一例体细胞杂种。这些结果极大地激发了研究者在原生质体培养及体细胞杂交方面的兴趣。利用根癌农杆菌感染由原生质体再生的细胞^[20],或将分离的 Ti 质粒 DNA 直接导入原生质体^[21,22],以及用农杆菌的球质体与植物原生质体融合将 T-DNA 转入植物细胞^[23],获得转化植物的成功,则促进了利用原生质体作为受体系统进行导入外源 DNA 的试验,加上利用原生质体进行摄取叶绿体、细胞核、根瘤菌、噬菌体的试验,使之成为利用原生质体进行遗传操作的一个重要方面。

植物原生质体研究的发展从历届国际原生质体会议的情况也可反映出来。在 1965~1972 年期间举行的最初三届国际原生质体会议,实际上是酵母原生质体会议,植物原生质体方面的工作不多。到 1975 年和 1979 年分别举行的第四、五届国际原生质体会议上,植物原生质体方面的内容明显地增加了。而最近的三届,即在 1983、1987 和 1991 年举行的第六~第八届国际原生质体会议,则基本上是植物原生质体的内容了。总之,从 60 年代初到现在的 30 多年中,由于在原生质体分离、培养、融合和转化等研究中所取得的迅速进展,已使植物原生质体研究成为植物组织和细胞培养中最为活跃的一个研究领域。

二、植物原生质体研究的进展

从 60 年代末期以来,随着多种适用于原生质体分离的商品酶的出现,从各类植物以及不同的器官、组织,培养细胞分离原生质体的技术均已成熟,原生质体培养技术也得到了不断的改进。现在常用的琼脂糖包埋培养(包括琼脂糖块周围加液体培养基的方法)、液体浅层培养、使用条件培养基或饲喂培养等技术,以及发展出来的一些专门适用于原生质体培养的培养基(KM_{8P}, V-KM, D2a 等)的广泛使用,均显著地改善了培养的效率。根据作者新近的统计,自从 1971 年报道从烟草原生质体再生植株以来^[18,19],至今已由分属 46 科的 160 多属 360 多种植物(包括亚种、变种)的原生质体成功地获得了再生植株(见第三章表 3-1 及本书附录)。特别是从 80 年代以来,在不少重要的农作物上取得了一系列突破性进展,禾谷类的

水稻、小麦、大麦、玉米、高粱、谷子、甘蔗,豆科植物中的大豆、花生、蚕豆、豌豆、赤豆、豇豆、刀豆和苜蓿、车轴草、百脉根等多种牧草,重要经济植物中的棉花、亚麻、甜菜、向日葵、咖啡等,以及猕猴桃、苹果、梨、龙眼、番木瓜、杨树、榆树、泡桐、桑树、悬铃木、欧洲云杉、白云杉等果树和林木的原生质体培养,均得到了再生植株(见附录),这为利用原生质体技术进行作物的遗传改良奠定了基础。

原生质体融合为克服远缘杂交时有性生殖上的障碍,产生新的类型的杂种提供了一种新的技术。利用细胞融合进行的体细胞杂交与有性杂交不同,因融合双方的细胞核和细胞质均参加了融合过程,所以体细胞杂交的结果除了可以获得细胞核杂种外,还可以获得胞质杂种和新的核质组合。原则上说,任何两种植物的原生质体均可诱导融合产生杂种细胞。在70年代初,首次由烟草原生质体培养成苗,随之由烟草种内原生质体融合获得首例体细胞杂种植物的成功,以后,不少研究者致力于发展多种原生质体的融合技术,其中PEG诱导融合技术和脉冲电激融合技术已得到广泛应用。各种杂种细胞的筛选技术的建立和发展,如利用荧光标记等物理特性挑选杂种,各种生化互补选择法等,提高了杂种选择的效率。所有这些技术上的改进使得获得的体细胞杂种数目不断增加。在1983年第六届国际原生质体会议(瑞士Basel)上,Harms报道获得体细胞杂种植物的种内组合有15个,种间组合38个,属间组合13个^[24]。而据贾敬芬^[25]最近的统计,1984~1993年间增加的体细胞杂种植物,种内组合有14个,种间62个,属间47个,并有2个种间组合的胞质杂种也分化成苗(烟草(+)大麦^[26],烟草(+)胡萝卜^[27,28])。这些结果表明,科间融合时虽然一般只能得到杂种愈伤组织,但获得再生植株也还是可能的。由于许多重要农作物原生质体培养的成功,使原生质体融合在过去10年内也更多地转向重要作物。在茄科植物中,除了烟草作为模式系统继续有不少工作外,在番茄、马铃薯、茄子等植物以及在十字花科、豆科、菊科、芸香科中也均取得了不少进展。特别是近年来在禾本科作物和牧草的体细胞杂交方面也取得了突破,如已获得了水稻和野生稻^[29]、水稻和稗草^[30]、高羊茅和多花黑麦草^[31]的体细胞杂种植物。从大量的研究发现,在有性远缘杂交中所存在的种间不亲和性,在体细胞杂交中也有所反映。同属种间的体细胞杂交,一般均可获得杂种植株,但育性因材料而异,有的可表现出不同程度的不育;同科异属种之间的体细胞杂交,虽然在不少情况中也可以获得杂种植物,但在遗传上通常表现出不育;而在科间融合时,多数情况中仅能得到杂种细胞团,如上所述仅有少数几例胞质杂种植物再生的报道。在体细胞杂种中,除了观察到染色体畸变,异源染色体片段的易位等现象外,最常见的是自发的染色体消除(Chromosome elimination)现象。这在远缘种间融合时更为明显,如由大豆和烟草原生质体融合得到的杂种愈伤组织的细胞,在培养过程中烟草的一部分染色体会丢失^[32]。体细胞杂种在大多数情况下虽不能直接用于育种,但这无疑使有性杂交不亲和的种间转移基因成为可能,从而为作物改良扩大了可利用的基因源。由于细胞融合的很多场合并不需要双方整个基因组的合并,而只需转移一个亲本的基因组的部分基因(包括核基因和胞质基因),为此已发展出若干诱导形成所谓“不对称杂种”的技术。最为常用的是通过辐射处理原生质体使一方的核失活,辐射后的原生质体作为细胞质基因组的供体,与正常的或经碘乙酸钠(IOA)处理的原生质体融合(IOA可使线粒体失活,并抑制细胞分裂),从而造成一方的核不参与融合,或仅其中一部分基因转移到对方的情况。现已发现,杂种所含供体一方核基因组的多少与辐射剂量成正相关^[33]。通过密度梯度离心技术,使原生质体在离心过程中成为无细胞核的胞质体(cytoplast),及具有完整核而只有一薄层细胞质

的小原生质体(miniprotoplast),也为通过原生质体融合获得新的胞质杂种提供了有效方法。这些方法已证明在转移细胞质基因,如胞质雄不育因子(CMS)、抗病基因、以及叶绿体编码的抗除草剂基因等方面是行之有效的。在原生质体融合形成的杂种中,线粒体DNA发生重组的现象十分常见,而叶绿体基因组重组则很少见,往往是最后只留下一方的叶绿体。Kushnir等^[34]发现由烟草(*Nicotiana tabacum*)的核基因组与颠茄(*Atropa belladonna*)的叶绿体组合成的胞质杂种是绿色、可育的,但反过来由颠茄的核与烟草的叶绿体组合成胞间杂种则是叶绿素缺失体,推测可能是核质不亲和所致。因此细胞融合所形成的多种新的胞质杂种类型也为研究核质关系提供了很好的实验系统。随着分子生物学技术和细胞器移植技术的发展,把带有编码特定酶或蛋白质的基因的经遗传修饰的或人工制成的细胞器或染色体导入原生质体,可望产生一类新的工程植物。

近年来,受原生质体研究的影响,植物性细胞的遗传操作受到越来越多的注意。随着花粉原生质体、精子和生殖细胞、胚囊及其组成细胞分离的成功^[35]以及单个原生质体培养的成功^[36],使人们可以尝试在离体条件下对这些细胞进行操作,重演两性细胞的结合过程。在这方面突破性的工作是Kranz等发展了雌、雄配子的融合技术,使玉米精卵融合率高达近80%。用玉米悬浮培养细胞作为饲喂细胞,经培养后分裂频率高达80%以上,并形成多细胞结构,通过胚胎发生过程而形成可育的植株^[37,38]。在他们的试验中还将外源DNA注入离体融合形成的合子之中,结果仍能保持很高的存活率和分裂频率。最近,用培养了5~19天的正在进行雄核发育的大麦小孢子作为饲喂细胞,培养由大麦和小麦的受精卵形成的原生质体,也发育成完整植株^[39,40]。一些研究者利用花粉四分体原生质体与体细胞原生质体融合,也获得了三倍体杂种植株^[41,42]。这方面的研究结果标志着植物实验生殖生物学已进入了一个新的时期,同时也预示着生殖细胞工程的出现必将为植物生物工程揭开新的一页^[35](见第五章)。

利用原生质体导入外源DNA获得转化植物在80年代成功以来,这一技术在多种植物上进行了试验,至今已由大豆、豇豆、莴苣(*Lactuca*)、柑橘、多种芸苔属植物、水稻(包括籼稻和粳稻)、高粱、玉米、小麦等作物获得了转基因植物。这一技术对于禾谷类作物及其他使用农杆菌转化技术仍有一定困难的植物尤为重要。利用原生质体导入外源DNA建立的瞬间表达系统也为研究基因表达的调控提供了一个很好的实验系统(详见第七章)。建立有效的叶绿体转化试验系统,是进行以提高光合作用效率为目标的叶绿体基因工程的前提。由于建立了一系列由叶绿体基因决定的抗菌素抗性突变体,由这类突变体的叶绿体DNA克隆相应的DNA片段,通过PEG法导入原生质体进行叶绿体的转化已获得成功,这为叶绿体基因工程提供了一种比较简便的方法^[43]。有关叶绿体转化的其他方法可见吴乃虎的综述^[44]。另外,植物病毒RNA或DNA被原生质体摄入后,可以在原生质体内增殖,并有很好的同步性,这也使植物原生质体在病毒的分子生物学研究中得到不少应用(详见第九章)。

三、植物原生质体研究在我国的发展

我国原生质体的研究始于70年代初期,中国科学院遗传研究所、植物研究所和上海植物生理研究所(下称中科院遗传所、植物所、上海植生所)首先在国内开辟原生质体的研究工作,不久兰州大学、山东大学、西北植物所、昆明植物所也加入此行。当时实验条件十分困难,

大多数实验室必须从制备纤维素酶开始做起。所幸的是上海植生所在纤维素酶研究中从绿色木霉(*Trichoderma*)中选育出的突变株 EA3-867,制成的酶制剂酶解细胞壁的效果与当时日本生产的 Onozuka R-10 纤维素酶基本相同,且不需另加果胶酶^[45]。开始阶段,几个单位的研究人员也期望能尽快在重要的农作物如禾谷类作物及豆科植物上获得进展,但终究因难度较大,进展缓慢而仍改用模式植物建立系统,使研究人员能够尽快掌握技术。不久中科院遗传所、植物所和上海植生所相继由烟草^[46,47]、胡萝卜^[48]、矮牵牛^[49]原生质体培养获再生植株。1973~1974年,中科院遗传所在几种豆科植物原生质体培养中得到了小细胞团,由小麦和蚕豆的原生质体融合体也形成了细胞团;1975年,中科院植物所从水稻花粉愈伤组织的原生质体培养获得愈伤组织。这些工作为随后我国原生质体研究的迅速发展建立了初步的基础和技术储备。在这一段时期内,他们还于1974年和1975年分别在北京和上海组织召开了第一、二届体细胞杂交工作交流会议,对于及时交流工作经验、研究难点,推动我国原生质体培养和体细胞杂交的研究起到了积极的作用。这一点大家至今仍记忆犹新。有关我国原生质体早期研究情况可参考罗士韦和许智宏^[50],袁萍和钱迎倩^[51]的综述。

70年代后期,我国原生质体的研究开始了迅速发展的时期。在欧美和日本的几个主要从事原生质体的实验室的一批骨干在80年代初先后回国,及时带回先进技术,使国内的研究如虎添翼,研究工作也更多地转向重要农作物。在禾谷类作物中,1986年中科院遗传所、上海植生所继法国、日本之后,在国内首先将粳型水稻原生质体培养成株;1987年,中科院植物所首先在国际上由玉米的胚性愈伤组织分离的原生质体再生成株;1990年上海植生所、兰州大学、河北农科院谷子所均成功地由谷子原生质体获得再生植株。中国水稻所在建立禾谷类作物的胚性悬浮培养以及提高培养中的植板率等方面做了不少工作,由多种栽培稻品种和美洲野生稻、大麦、甘蔗等禾谷类植物的原生质体培养获得了再生植株。在豆科植物方面,上海植生所在1988年首次由栽培大豆未成熟子叶的原生质体培养取得突破,由6个品种的原生质体获得再生植株,随后又先后在野生大豆(*Glycine soja*)、蚕豆、花生、豇豆等籽粒型豆科植物上获得成功,复旦大学遗传所也先后由赤豆和刀豆的原生质体再生植株,兰州大学、东北师大、吉林大豆所和中科院遗传所由多种豆科牧草的原生质体培养也取得不少进展。在纤维作物中,1989年山西农科院棉花所、江苏农科院农业遗传和生理学研究所在陆地棉的原生质体培养上获得成功,1995年湖南农业大学由苧麻原生质体也再生植株成功。在果树方面,华中农业大学在柑橘类果树的原生质体培养及体细胞杂交方面做了不少很好的研究,中科院植物所和浙江农业大学在猕猴桃、中国农科院果树所(兴城)在苹果、福建农科院在龙眼上均已获得原生质体再生植株(见第十七章)。在林木树种方面,继上海植生所1990年首次在毛白杨原生质体培养成株成功以后,与南京林业大学合作,又先后由泡桐、悬铃木、桑树的原生质体培养成苗。在此基础上,南京林业大学由小叶杨、美洲黑杨×小叶杨的也已获得再生植株(见第十八章)。除此之外,山东大学在多种伞形科药用植物及小麦的原生质体培养方面,中国农科院生物工程研究中心在葫芦科植物、芸苔属植物的原生质体培养方面,也都作了很多出色的研究工作(可参阅本书的有关各章及书末附录)。据作者统计,至今我国的研究人员已由约80种植物的原生质体培养成苗,其中有50多种是由我国首次获得成功的(见附录)。这充分显示了我国研究者在这方面所作出的重要贡献。在上述工作的基础上,我国研究者在原生质体融合方面也取得了不少成绩,如华中农业大学已获得柑橘的属间杂种,上海植生所得到了栽培大豆和野生大豆,以及烟草与龙葵的体细胞杂种。近年获得