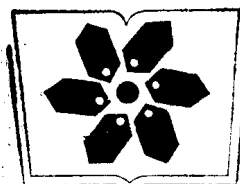


植物生理与 分子生物学

余叔文 主编

科学出版社



中国科学院科学出版基金资助项目

1744/17

植物生理与分子生物学

余叔文 主编

科学出版社

1992

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书是国内当今有成就的 40 余位植物生理学家,根据本人长期研究工作的经验,结合国外最新进展,撰写成综合评论和基础理论知识相融合的教材型的高水平论著。

书中包括细胞生理(结构、功能、培养、遗传变异),光合作用(光化学、能量转化、碳固定、生态、效率等),生物固氮,生长发育,植物激素,逆境生理,植物病理,物质运输等分支学科的内容。本书主要从分子水平上加以论述,如细胞运动的分子生物学、叶绿体的分子生物学、共生结瘤固氮的分子基础、植物冠瘿发生的分子生物学、植物与病原相互关系的分子生物学等。

本书可供植物生理及相关学科的科研人员及大专院校生物系、农林院校师生参考。

植物生理与分子生物学

余叔文 主编

责任编辑 梁淑文

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1992 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1992 年 9 月第一次印刷 印张:32 3/4

印数:1—2 400 字数:765 000

ISBN 7-03-002890-2/Q·384

定价:28.10 元

序

四年前,我们编写了一本《植物生理学专题讲座》,当时只收刊了23讲,未能覆盖植物生理学全部领域,例如生物固氮问题就未纳入,发展迅速的分子生物学方面讨论亦不多。由于知识的积累和更新,有一些内容已跟不上时代步伐,读者建议补充内容再版,基于此点,就以中国科学院上海植物生理研究所举办的“高级植物生理学”的教材为基础,又特约了十多篇专题,组成了此书。本书在内容上既反映植物生理学各分支学科的最新进展,又全面展现植物生理学日益扩展的全貌。

在《植物生理学专题讲座》导言中曾提到,在一百多年前已出版植物生理学教科书,随着时代的进步,内容逐步深入。现在的植物生理学除了在宏观方面向环境、生态等综合方面发展外,还与分子生物学、细胞生物学、微生物学和遗传学等交叉渗透,植物生理科学的研究已从植物整体和器官的活动进入到细胞与细胞器的组成与功能的研究。在30—40年代,生物化学与生物物理学的兴起,将一些生理代谢过程深入到分子水平,将细胞结构的研究推进到大分子的组成和性能的研究,但那时分子生物学还未成为一个体系或学科。就我个人所见,分子生物学成为一个学科或体系,是在本世纪60年代中期,当时曾出版了几本专著,如《基因的分子生物学》、《发育的分子生物学》、《噬菌体与分子生物学起源》等。主要工作是在遗传学方面,从孟德尔定律(1865,1900年重新发现)到基因学说(1926)、核酸分析(1965),把生物遗传机理问题推进到化学大分子水平,这是一个大突破。所以分子生物学这一“新”学科的产生和发展不过二三十年。在这方面最有贡献的如G. D. Watson, F. H. C. Crick, M. Delbrick, 他们先后因此获得诺贝尔奖金。分子生物学的兴起,立即波及到生物学各个学科,植物生理学自不例外,纷纷向微观靠近。正如F. Steward所说:“当今植物生理学受到最富有侵略性的分子生物学的冲击,但决不会被冲倒,因为一个分子不管有多么大,多么复杂,总不是活的吧。”实际上,植物生理学的范畴更广阔了,分析也更深入了,这是自然发展的趋势。从文献中可看出植物生理从分子水平上的研究的报告日益增多,以致有些期刊不得不增订、改名,如《植物生理学年评》在1985年改名为《植物生理与植物分子生物学年评》(Ann. Rev. of Plant Physiology and Plant Molecular Biology),原因就是植物生理的发展重点已有改变,论文、综述中的分子观点多了,本书的定名也正符合学科演进的变化。

本书在选题和内容上介于高级教科书与科研专题综述之间,有细胞生理(结构、功能、培养、遗传变异)12篇;光合作用(光化学、能量转化、碳固定、生态、效率等)8篇;生物固氮2篇;生长发育5篇;激素4篇;逆境生理、病理等7篇,以及物质运转3篇等。这些方面近年来都有较快的进展,对比1987年出版的《植物生理学专题讲座》,选题增加了一倍,内容、分析也更深更广,特别是在分子水平上的工作,例如细胞运动的分子生物学,叶绿体的分子生物学,共生结瘤固氮的分子基础,植物冠瘿发生的分子生物学,植物与病原相互关系的分子(生物学)基础等。此外,在实际应用方面本书也有涉及,现代栽培植物方法除了调节外界环境,控制水肥、病虫之外,开始进入改变植物的本质,即细胞工程,基因工程,有

目的的人工“制造”所需要的植物了。在介绍新技术方法方面也有论述,如基因克隆、分子杂交等,为实际运用打下理论基础。

本书的作者都是从事多年科研与教学工作、熟悉国内外科研动态的同志,写作中结合自身的实际经验、体会和观点、见解,对资料的精选和分析评述深入浅出,自有独到之处。全书各篇既有相互配合又有分工。另外,从所列的参考文献来看,许多是国内发表的研究成果,这也反映我国正在建立起自己的植物生理学。在《植物生理学专题讲座》的导言里,曾提到我国近代植物生理是从国外引入的,第一二代专业人员均系二三十年代在国外学习或工作过的,回国后建立试验室、教研组、研究机构并培植人才。50年代以后发展加快,虽经文化大革命的浩劫干扰,但也已康复,正继续发展。现在植物生理学各分支领域均有专门人才,结合国内条件自力更生地进行研究,有些工作已有扎实的基础,并进入国际学科发展的前沿。从本书的内容上也可窥豹一斑。

有人推论,21世纪将是生物学的时代,科学的中心将转移到中国。这一推论有一定道理,即以植物生理学而论,以中国的自然条件、人才智力、社会环境,都表明是有远大的发展前程的,并将对我国的科学发展和经济建设起一定的作用。同时,植物生理学科本身也将有一个跃进,这是令人振奋的。

殷宏章

1991年4月

目 录

序	殷宏章	(i)
I 植物原生质体培养及细胞杂交	夏镇澳	(1)
II 花药和花粉培养	卫志明	(12)
III 高等植物培养细胞的变异	何卓培	(23)
IV 植物细胞分化及试管植物	李文安	(37)
V 植物冠瘿发生的分子生物学	白永延 唐 惕	(53)
VI 植物细胞的遗传转化和基因工程	许智宏 刘春明	(63)
VII 高等植物细胞壁的结构和功能的分子生物学基础	颜季琼 张孝琪	(84)
VIII 高等植物细胞膜的传递系统	焦新之	(99)
IX 离子运转的调节	倪晋山	(113)
X 植物细胞内信使及其功能	郝鲁宁 余叔文	(123)
XI 高等植物基因表达的调控	洪孟民	(141)
XII 细胞运动的分子生物学	阎隆飞 马永泽 刘 雄	(147)
XIII 叶绿体的分子生物学	吴相钰 吴光耀	(164)
XIV 叶绿体的电子传递	叶济宇	(177)
XV 叶绿体的光合磷酸化	王国强	(191)
XVI 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的结构、功能及组装	李立人	(202)
XVII 光合碳代谢中酶活性的调节机理	施教耐	(215)
XVIII 光合机构对环境的响应与适应	沈允钢 许大全	(225)
XIX 植物光合作用的效率	邱国雄	(236)
XX 固氮酶学和固氮生化	陈 因	(244)
XXI 共生结瘤固氮的分子基础	宋鸿遇	(260)
XXII 光敏色素的作用及其分子基础	童 哲	(270)
XXIII 植物繁殖器官分化发育的分子基础	唐锡华	(287)
XXIV 植物开花生理	王隆华	(300)
XXV 种子的发育	朱治平	(310)
XXVI 果实的成熟及其调节	刘 愚	(322)
XXVII 衰老器官细胞内含物的转移及其激素调控	蔡 可	(333)
XXVIII 细胞分裂素的作用机理	赵毓桔	(340)
XXIX 乙烯的生物合成	刘 愚	(355)
XXX 植物激素受体	张德颐 陈 瑞	(366)
XXXI 植物间的生化相互作用——相生相克现象	余叔文 孙文浩	(376)
XXXII 植物对温度逆境的适应	王洪春	(395)

XXXIII	植物对渗透和淹水胁迫的适应机理	汤章城(404)
XXXIV	植物抗病的物质代谢基础	薛应龙 欧阳光察(417)
XXXV	植物与病原相互关系的分子基础	王 钧(431)
XXXVI	植物的辐射敏感性	顾瑞琦(452)
XXXVII	重力植物生理学	刘承宪(463)
XXXVIII	植物细胞间的物质运转	张伟成(473)
XXXIX	高等植物中的韧皮部运输	王新鼎(486)
XL	高等植物的命脉——维管束之谜	娄成后(500)
	编后记	余叔文(514)

I 植物原生质体培养及细胞杂交

夏 镇 澳

目 次

1 植物原生质体特性	3.2 茄科细胞杂种
2 原生质体培养	3.3 禾本科细胞杂种
2.1 禾本科植物的原生质体培养	3.4 豆科植物细胞杂种
2.2 经济植物的原生质体培养	3.5 十字花科细胞杂种
3 原生质体融合和细胞杂交	3.6 诱导融合和细胞杂种筛选技术的改进
3.1 细胞杂种的例证	

30 多年来在细胞生物学和生物工程中原生质体研究是比较活跃的领域之一。由于它涉及了生物学的许多基本问题,在实际应用上有较大潜力,因此引起多方面的注意^[1,3,5,6]。原生质体研究所涉及的对象有细菌、真菌、低等植物和高等植物。近年来,高等植物的原生质体研究取得不少进展,其中原生质体培养有重要突破,细胞杂交研究正在深入扩展,在原生质体特性方面也积累了较多资料。现作一简要介绍。

1 植物原生质体特性

原生质体 (protoplast) 一词始用于 Hanstein (1988), 是指“通过质壁分离, 能够与细胞壁分开的那部分物质组成的一个原生质体”。换言之, 原生质体就是除去了全部细胞壁的细胞, 或是一个为质膜所包围的“裸露细胞”。从上世纪末到本世纪初, 这一研究领域的先驱者 (Klercker, 1892; Küster, 1909, 1910; Plowe, 1931; Michel, 1937) 用机械法分离原生质体, 但这种方法手续烦琐、得率小, 取材又局限于具有液胞化程度较大的细胞或长形细胞的组织如叶片、球茎的鳞片、果实表皮等。直至 1960 年 Cocking 成功地用酶法制备番茄根原生质体^[9], 才为深入研究打开了道路。现在已能从许多植物的各种组织以及培养细胞系制备出大量有活力的原生质体。由于原生质体无细胞壁, 便于利用现代细胞生物学和植物生理学、植物遗传学、植物病理学、病毒学和植物育种学等有关的各种技术方法进行观察、操作, 促使植物原生质体的研究迅速发展。

植物原生质体作为一种研究系统, 如同从细胞水平研究某些问题一样, 比在组织、器官或个体水平上进行有方便之处, 例如, 从栅栏组织或同步化程度较高的细胞系可以得到生长较均一的细胞群体, 而用酶法也可以从这些材料制备出相应的原生质体群体。其有利条件还有下述几点:

(1) 从众多植物分离的原生质体仍具有细胞全能性——在合适的离体培养条件下具有繁殖、分化、再生完整植株的能力。这从理论上或实际角度考虑都是十分重要和令人

感兴趣的。过去由于一些重要农作物如稻、麦、棉、大豆等,特别是禾本科植物的原生质体培养再生植株较困难,以致怀疑植物原生质体的全能性。从目前情况看,许多技术上的困难已可以克服了,今后还会在某些新植物材料的原生质体培养中遇到其他困难,但只要努力改进培养技术,终究会获得成功的。

(2) 分离的原生质体的研究虽然比整株及器官、组织的工作起步晚,资料也少,但有发展前途。它提供一个均一的细胞群体,在这个群体中每一个原生质体仍然保存着完整细胞所具有的细胞器之间的相互关系和除了细胞壁以外的全部功能。当然,这个均一性由于起始材料或细胞系本来的状态不同会有些差异。如叶肉原生质体群就常比愈伤组织和细胞悬浮系制备的原生质体群来得均匀。原生质体便于开展那些因细胞壁存在而难以进行研究的问题,例如原生质膜的表面特性、细胞壁再生、细胞器等摄取试验、离子的吸收与运转、细胞周期的分析,以及用保卫细胞原生质体研究气孔开关机理;用原生质体制备膜包小泡(membrane-coated vesicle)研究物质运输;用原生质体制备液泡研究物质贮存;用原生质体制备染色体研究其结构与功能;用不同类型叶肉细胞研究光合代谢和呼吸代谢等。原生质体也便于进行各种处理试验,如激素、诱变剂、抑制剂等药物较易进入细胞内部,可以用浓度或强度较低的理化作用因素来处理原生质体,它对处理的反应比完整细胞灵敏、迅速,且易测定。

(3) 用原生质体便于进行细胞操作或遗传操作,比细胞更有利于开展一些细胞水平和分子水平的研究。例如分离的原生质体有可融合性,能通过合适的诱导融合技术及培养筛选与鉴定,得到一些在自然界中原来没有的细胞杂种,甚至是超越了种间界限的杂种。用花粉母细胞原生质体和卵细胞进行诱导融合可以模拟受精。用体细胞原生质体融合研究体细胞遗传等等。原生质体也是植物基因工程研究的良好受体系统,通过导入特定的基因,已在烟草等植物中得到了转基因植株。

(4) 从原生质体还可建立不少衍生系统。通过适当的方法能从原生质体制备出亚原生质体(subprotoplast),例如微小原生质体(miniprotoplast)或核质体(nucleoplast),即有细胞核而带有少量细胞质的亚原生质体;胞质体(cytoplast)或微质体(microplast),即没有细胞核的亚原生质体。这些可以为研究核质关系及进行遗传重组提供多种起始材料,也有利于制备各种细胞器。

脱去壁的细胞究竟是什么样,曾引起不少人关注。用光学、相差、荧光显微镜和电子显微镜观察原生质体的形态,已积累了一些资料。分离的原生质体一般呈圆球形,它的内含物与起源材料相似。叶肉原生质体的中央部位往往是一个大液泡,叶绿体分布在薄层细胞质中,紧贴质膜,而培养细胞的原生质体具有许多分散的液泡、含有淀粉粒的白色体、少量原质体或内片层。有人报道,烟草叶肉原生质体的叶绿体上出现半结晶小体,推论是由于质壁分离、萎蔫脱水而形成的。刚分离的原生质体的叶绿体也常出现脂肪小滴,可能是脱壁而引起的生理效应。分离原生质体的内质网、线粒体常比起始细胞有所增加,而在原生质体培养时,叶绿体由于脱分化只起相当于淀粉体的功能^[7]。已证明黄瓜子叶原生质体和完整细胞的脂肪代谢、脂肪酸的合成、变性,以及酯化成半乳糖类脂的能力没有差异。在蚕豆、葱的含淀粉与不含淀粉粒的保卫细胞原生质体试验中,用脱落酸和壳梭孢素诱导的收缩和膨大反应与完整细胞相似。蓝光能诱导气孔张开,也能刺激葱等保卫细胞原生质体的膨大,显示了一致的效应。另一些作者得到不同的结果。例如用气相色谱分

析蚕豆叶肉原生质体的类脂和脂肪酸组分,由于分离和制备中使膜上某种类脂,特别是来自微体的磷脂胆碱与来自叶绿体的单半乳糖二酰基甘油降解成二乙酰甘油及游离脂肪酸的含量下降,而中性的类脂三乙酰甘油含量上升。用 $^{14}\text{CO}_2$ 饲喂叶片,再分离叶肉原生质体,类脂组分测定证明,脂肪酸的去饱和作用被抑制了^[16,35]。叶肉原生质体无疑是研究光合作用的好材料。在菠菜叶肉原生质体方面的资料较多,比较叶肉原生质体与叶组织,原生质体的光合强度和光呼吸与叶组织相似。通过比较 C_3 和 C_4 植物叶肉原生质体与维管束鞘细胞的光合作用,有助于研究光合碳代谢。原生质体也是研究温度变化如冰冻对质膜影响的良好系统^[4,10,12,26]。

2 原生质体培养

近年来原生质体的培养取得可喜的进展^[7]。从原生质体培养得到再生植株的例证逐年增加,从首次报道烟草叶肉原生质体经离体培养得到再生植株以来(Nagata 和 Takebe, 1971; Takebe 等, 1971),已有多种植物成功的例证,到 1981 年约有 60 个种,1983—1984 年上升到 80 个种左右,1987—1988 年约为 130 个种,1989 年约为 140 个种。

在重要农作物的原生质体培养方面,1985 年前虽已报道了数十种植物原生质体得到再生植株,但大部分属于双子叶植物的茄科(如烟草属、矮牵牛属、曼陀罗属等)、伞形科、十字花科、芸香科等。单子叶植物的禾本科,特别是禾谷类以及双子叶植物中重要农作物的原生质体培养工作却长期停滞不前,一度被认为是国际性难题。经过坚持不懈的努力,1985 年后有了突破性进展:水稻、小麦、大麦、玉米、高粱、谷子、小偃麦、甘蔗、棉花、栽培大豆、油菜及其相关的几个种的原生质体培养都已成功地获得了再生植株。经济植物的原生质体培养,已从一年生植物向木本植物扩展,中华猕猴桃、三叶半夏、川芎、欧当归、柑桔、樱桃、榆树、杨树、葡萄、毛白杨、悬铃木等都获得成功。低等植物如紫菜等的原生质体培养工作也在开展中。再生植株例证最多的茄科原生质体的研究已向深度发展。对基因型、外植体种类、培养基和培养条件及培养技术的选择与配合,开始进入程序化和系统化的研究。

2.1 禾本科植物的原生质体培养

禾谷类原生质体培养这个难题为什么能在近年内得到初步解决呢?主要是在多年植物细胞和组织培养试验中积累了较丰富的经验,理论上有所提高,值得提出的有如下所述。

基因型的选择:禾本科植物原生质体培养时,对基因型的选择过去有人认为重要,也有人认为不重要两种看法。现在理论上有可能找到一种适合于大多数(甚至全部)禾本科植物原生质体培养的有效程序。但比起茄科植物,特别是模式植物——烟草来,还有很大差距,例如在分化率、植株再生率、重复性等方面。即是同为烟草属的不同品种对离体培养的要求也会有差异。因此禾本科的不同基因型必然对培养基和培养条件会有不同的要求。如我们在水稻原生质体培养中用了 20 多种水稻品种通过组织培养进行筛选,目前已从 3 个粳稻品种(农虎 6 号、国香 1 号和上农香糯)建立良好的胚性细胞系用于制备原生

质体,经培养从体细胞发生途径获得再生植株。而籼稻的原生质体一般较粳稻难度大。王大元等(1989)用了12个水稻品种悬浮细胞的原生质体,只有4个品种得到了再生植株。Yamada等(1986)先诱发26个水稻品种愈伤组织,再形成悬浮细胞系,从中能用以制备原生质体的只有A-58MS胞质雄性不育系,又从它的30个细胞系中选出了具有浓密细胞质,又能快速生长的T₂细胞系,然后从它们的原生质体培养得到了再生植株。Jenes和Pank^[18]用44个水稻基因型继续代选择后,仅有20个基因型适宜于制备原生质体,而其中只有3个经培养得到再生植株。Lühr和Lörz^[20]从大麦4个品种诱发愈伤组织进而建立7个悬浮细胞系。结果表明,其中仅一个品种Dissa的一个悬浮细胞系D₂有形态发生能力,经原生质体培养得到白化苗^[20]。总之,植物的形态发生是一个复杂的问题,在目前注意基因型的选择,从多个品种中选材,首先使少数“困难植物”的原生质体能够培养再生植株,然后再逐步扩大例证,深入研究其规律,这是一条可行的途径。

从胚性细胞系制备原生质体:经过长期探索,80年代大量试验证明了体细胞胚胎发生不仅是禾本科植物组织和细胞培养,也是原生质体培养再生植株的主要途径。目前已知在禾本科植物原生质体培养中,先要从具有分化潜力大的外植体如未成熟胚、幼花序、幼叶或成熟胚来诱发愈伤组织,从中选出胚性细胞系,再用以制备原生质体经培养才能得到再生植株。用胚为外植体时,愈伤组织主要来源于盾片特定区域的周边细胞,用幼花序时大部分来自花的分生组织或维管束边缘的细胞,用幼叶时来自下表皮或近维管束的叶肉细胞。当培养基中有2,4-D定位点的少数细胞表现出胚性特征时,再转移到含有适当水平2,4-D的培养基中,胚性细胞便可继续分裂,经选择得到胚性愈伤组织,从而再建立胚性悬浮细胞系。在禾本科植物的离体培养中发现可以形成胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织,还观察到有第3种中间型^[28]。组成愈伤组织的细胞也有不同,例如在棒头草的愈伤组织还未表现出类型差异时,一块愈伤组织中同时含有三类细胞,随着愈伤组织在含有不同浓度的2,4-D的培养基中交替继代培养,各类细胞在适合自己增殖的条件下生长并形成不同类型的愈伤组织。根据已有资料,从禾本科植物的非胚性细胞系来制备原生质体然后进行培养,大部分结果只能获得没有形态发生能力的愈伤组织。只有用胚性细胞系制备原生质体并进行培养,才能通过体细胞胚胎发生途径得到再生植株。为此有两种方法:一是从胚性愈伤组织再建立胚性细胞悬浮系,再用以制备原生质体,这在目前大部分工作中采用;另一是直接利用胚性愈伤组织制备原生质体,例证较少。两种方法各有其优缺点,可按要求及条件选用。

改进培养基组分和培养技术:禾本科植物中常用的培养基大部分是以MS(Mura-shige和Skoog,1962),LS(Linsmaier和Skoog,1965),N₆(Chu等,1975),B₅(Gamborg等,1968),KM(Kao和Michayluk,1975),Du(Dudits等,1976)等为基础修改而来。许多试验证明原生质体培养基中2,4-D仍然是必需的。自开始培养到形成愈伤组织大多用2,4-D,也有用2,4-D与NAA、6-BA或ZT等相结合。而将愈伤组织转入分化培养基则需降低或除去2,4-D,同时适量增加6-BA、KT或ZT。培养基中氮源种类和浓度的调节也很重要,但这要根据开始培养基中氮源的情况而定。例如在水稻中开始用了较高的氨态氮以后则适当降低;也有作者认为硝态氮为氮源的培养基较易使原生质体培养物形成紧密的愈伤组织,并有利于下一步的分化。在原生质体培养基中有不少试验已用葡萄糖代替蔗糖或两者掺用,以维持渗透压,又有利于原生质体的生

长。原生质体在培养基中长到小细胞团前后,要注意调节培养基的渗透压,及时添加低渗的培养基,都是行之有效的方法。也有在原生质体培养基中添加一些脱落酸、对甲氧基苯甲酸(dicamba)、小牛血清、蜂王浆或活性炭等,可取得一定效果。至于原生质体培养方法除常用的固定平板、液体静置、先液体后固定、液体浅层、琼脂糖小块等方法外,看护培养引起人们的注意。例如在水稻中,有证明水稻看护细胞对于促进水稻原生质体生长和细胞分裂有作用;而对其他种如烟草、胡萝卜等看护细胞无作用或作用甚小。也有试验表明,不同的水稻品种以至同一品种的各个细胞系的看护作用也有所不同。

2.2 经济植物的原生质体培养

双子叶植物大多直接用叶肉、子叶、下胚轴、根等作为起始材料来制备原生质体,有的先诱发和选择胚性细胞系而后制备原生质体,所用培养基和培养方法也因植物种类和供试材料的不同而有所修改变更。棉花原生质体培养得到再生植株是近年来重要进展之一,1986年首次获得海岛棉原生质体再生植株,直至1989年才在有广泛栽培面积的陆地棉获得成功。方法就是用下胚轴诱导愈伤组织,经继代选择得到胚性细胞悬浮系,再用以制备原生质体。所用的培养基组分以K₃培养基为主,补充KM8P培养基的有机成分,培养方法是液体浅层、琼脂糖平板、琼脂糖小块或小滴等。有人观察到在培养基中附加适量ABA可以促进胚状体形成。豆科中野生大豆原生质体培养于1985—1986年就有报道,近年来在栽培大豆中也取得成功。用栽培大豆未成熟子叶原生质体培养在KP8液体培养基中,10天后逐步降低渗透压,形成愈伤组织后转入K₃固体培养基中以促进生长,可避免发生褐化,再通过调节激素组分促进形成紧密的颗粒状愈伤组织,最后转移到分化培养基上得到了再生植株。豆科中其他如赤豆、豇豆、苜蓿、牛角花、车轴草等也获得成功。近10年十字花科中的芸苔属一些重要油料作物和蔬菜的原生质体培养也取得了明显进展。由于通过选择制备原生质体的外植体以及改进培养基和培养技术(固体小块培养,附加活性炭及其他成分,促进原生质体早期分裂和快速生长,在细胞褐化前就将细胞团或愈伤组织转到新的培养基上),减轻了褐化,促使愈伤组织良好生长和分化。目前芸苔属已有20余例以原生质体培养得到了再生植株,其中作物有3个基本种(黑芥、甘蓝、白菜)和3个复合种(芥菜型油菜、甘蓝型油菜、埃塞俄比亚芥菜),除黑芥外,从其他五个种的原生质体培养都已得到了再生植株。此外还有芥蓝、芝麻菜等。经典的细胞和组织培养材料茄科中的烟草属是原生质体培养再生植株例证最多的,现在除了栽培品种,已有较多的野生种原生质体培养获得成功,这将为进一步开展深入研究提供良好的实验系统。经济植物中华猕猴桃的原生质体培养,采用分步诱导法克服了一般果树不易分化的障碍,得到了再生植株。

3 原生质体融合和细胞杂交

从本世纪末 Küster (1909) 的工作算起,植物原生质体融合和细胞杂交的研究已有80多年,前50年进展不大,近30年有显著进展,有关这方面的历史概况、细胞杂交的内涵、试验程序和重要结果可参阅文献^[6,13]。

3.1 细胞杂种的例证

细胞杂种例证近几年虽有增加,但新组合的增加速度减慢,自1970年首次进行较大规模的原生质体诱导融合和 Carlson (1972) 第一次得到烟草细胞杂种以来,到1981年约有40余个组合的细胞杂种见诸报道,1983年迅速增加到70余个组合,但自1984年以后增加不多,如1986,1988,1989年分别为80,90和100个左右,在成功的例证中仍然是以种内和种间的细胞杂种为主,也有一些属内和属间的细胞杂种。科间的细胞杂交工作正在开展,但速度甚慢,例如得到了烟草与胡萝卜、大豆与烟草等杂种愈伤组织,但未能得到杂种的再生植株。

3.2 茄科细胞杂种

新的组合中以茄科植物为多,而茄科中仍以烟草属为主,但向其他属扩展。例如从原生质体融合得到的细胞杂种,种间的有矮牵牛(+)紫花矮牵牛、番茄(+)秘鲁番茄、番茄(+)野生番茄等。属间的有烟草(+)马铃薯、野生茄(+)马铃薯等。在种内和种间细胞杂种及其后代也作了较深入的遗传分析,并着重探讨有关性状的转移^[11,20]。新的技术方法开始应用,通过电场融合得到普通烟草与白花丹烟草(*Nicotiana plumbagilifolia*)的异核体,再经条件培养得到再生植株,根据脂酯同工酶酶谱鉴定大部分植株具有双亲性状^[8]。也有人研究了这一组合的叶绿体重组。用荧光标记结合使用细胞分离器得到了普通烟草和海岛烟草(*Nicotiana nesophila*)的细胞杂种,对粉蓝烟草(*Nicotiana glauca*)和郎氏烟草(*Nicotiana langsdorffii*)的细胞杂种及其后代的rDNA基因组成成分进行了分析。用X射线使白花丹烟草 TBR₂ 突变体的细胞核失活与普通烟草 SR1-A15 白化苗原生质体融合,DNA分子杂交证明,具有 TBR₂ 质体的绿色植株是胞质杂种^[21]。用类似方法将野生种 *Solanum sisymbriifolium* 的抗性转入它与马铃薯或栽培茄的细胞杂种中,现正在观察后代的变异^[14]。

茄科属间的细胞杂交也有一些报道。用硝酸还原酶缺陷型及抗链霉素烟草原生质体和矮牵牛六个野生型原生质体进行诱导融合及培养,但在培养半年到一年时出现不亲和性,有五个系丢失了烟草的核染色体组,仅一个系得到以矮牵牛细胞核为主而具有烟草叶绿体的细胞杂种,说明此属间细胞杂种的遗传组分是不稳定的。用烟草和龙葵(*Solanum nigrum*)叶肉原生质体经诱导融合得到了再生植株,经过氧化物同工酶和苹果酸脱氢酶酶谱、染色体数、花器官形态差异以及烤烟情况和烟叶成分等测定比较,已鉴定出细胞杂种植株,从其后代经五代选育得到了大叶型新品系并有较好的抗病性^[2]。烟草和黄花烟草、烟草和粉蓝烟草的细胞杂种经过七代选育也得到一些新类型的烟草品系。其他如经原生质体融合得到了具有烟草细胞核和矮牵牛叶绿体的胞质杂种。白花丹烟草硝酸还原酶缺陷型原生质体和马铃薯原生质体经诱导融合后,发现细胞杂种中马铃薯染色体有部分丢失,试验还在进行中。

3.3 禾本科细胞杂种

禾本科中用美洲狼尾草 (*Pennisetum americanum*) 抗氨基乙基半胱氨酸 (AEC) 细胞系的原生质体, 经碘乙酸处理和羊草 (*Panicum maximum*) 胚性细胞系原生质体诱导融合, 然后在含有 AEC 的加富培养基上选择可能的杂种细胞系。再经二聚醇脱氢酶和磷酸葡萄糖酸脱氢酶电泳图谱比较, 得到具有双亲酶带及新酶带的杂种细胞系; 同时用 rDNA 探针测定, 在三个杂种细胞系中有一个系的线粒体 DNA 可能有重组的片段。用类似的方法, 又得到美洲狼尾草和甘蔗的杂种细胞系^[23, 30]。不少实验室正在开展重要禾谷类作物品种间和相关种属之间的细胞杂交研究, 有的已取得一定进展。例如胞质雄性不育是重要的农艺性状之一, 它是母性遗传的性状, 某些农作物有性杂种的子一代可以产生此性状, 在杂交水稻的选育中已有所应用。目前分子遗传学研究表明此性状是由线粒体 DNA 所决定。如用常规育种方法, 要多次回交才能将它由一个品种转入另一个品种, 且需要花费若干年时间。而利用原生质体

诱导融合经过一次诱导就可以得到细胞杂种或胞质杂种, 所以它是将胞质雄性不育性状转到某一品种的有效途径之一, 这在双子叶植物如烟草、矮牵牛和芸苔属中已有报道。近几年来由于水稻二个单倍体原生质体经诱导融合得到二倍体细胞杂种, 栽培稻和野生稻, 水稻和稻稗经电融合也已得到了细胞杂种, 很自然会注意到在水稻中应用原生质体融合研究胞质雄性不育问题 Kyoznka 等 (1989) 用籼稻品种钦苏拉-保罗 II (Chinsurah Bond II 即 CB II) 愈伤组织原生质体以及粳稻品种日本晴 (Nippon bare) 悬浮培养细胞原生质体为融合亲本, 目的是想将前者的胞质雄性不育性状转入后者。在诱导融合前, 先用碘乙酰胺 (IOA) 处理使日本晴的原生质失活; 用 X 射线

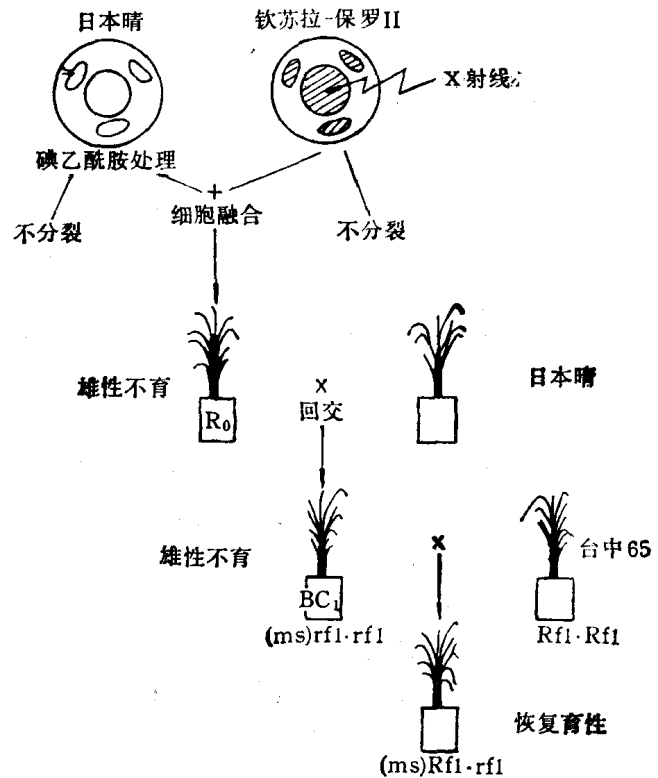


图1-1 不对称细胞融合及后代胞质雄性不育性状分析 (Kyoznka 等, 1989)
Rf1: 一个恢复育性的显性核基因

(70 krad) 使 CBII 的染色体丢失。这样双亲的原生质体在培养时都不能细胞分裂, 而经电融合后异核体由于互补可继续生长、分裂、再培养分化共得到 16 个再生植株。其中 15 株种子结实率为 16—78%, 有 1 株 (811-75-6) 是完全雄性不育。试验是期望得到具有日本晴细胞核和双亲细胞质的胞质杂种, 这样可以将 CBII 的胞质雄性不育性状从

籼稻转入到粳稻主要栽培品种日本晴中。经测定, 811-25-6 确是含有 CBII 特有的类似质粒 DNA (plasmide-like DNA), 而且完全雄性不育。这个性状在所有用日本晴回交一代 (BC_1) 都能稳定地遗传。每一个 BC_1 植株的花粉粒都和 811-75-6 一样有类似的雄性不育特性。不育的 BC_1 植株如用恢复系台中 65 (具有一个恢复育性的显性核基因 Rf1-Rf1) 授粉, 花粉 50% 为不育, 50% 为可育的回交一代杂种植株的结实率可接近 100%。从 81-75-6 的胞质雄性不育可用 Rf1 基因使配子体逆转为可育的事实表明 811-75-6 与 CBII 的细胞质是同源的。通过 DNA 印迹法及限制性内切酶片段图谱分析表明, 所得的胞质杂种中无线粒体 DNA 重组, 只是在线粒体 DNA 组分中出现类似质粒 DNA。由于它们存在正常胞质的许多水稻品种的线粒体中, 似乎这并不是胞质雄性不育性状的导因。虽然工作还需深入, 本结果证明了通过原生质体融合已经将胞质雄性不育性状从籼稻 CBII 转入粳稻日本晴, 而且在 BC_1 植株中其他的主要农艺性状均较稳定。这是禾谷类中用细胞融合方法首次转移胞质雄性不育性状的例证, 是很有意义的^[19]。

3.4 豆科植物细胞杂种

用栽培大豆白化苗下胚轴原生质体经荧光素双醋酸酯标记与野生大豆 (*Glycine canescens*) 叶肉原生质体经电融合, 融合体应有红与绿两种荧光。得到的异种融合率为 2—4%, 3—4 小时后经流式细胞光度计分离出异核体, 将它们用琼脂糖小滴进行培养并用野生大豆子叶原生质体作为看护细胞, 长成的细胞团转入固体培养基, 可获得快速生长的愈伤组织, 天冬氨酸氨基转移酶测定表明, 其中有两个细胞系出现附加带, 证明为杂种愈伤组织。杂种愈伤组织再在继代培养基中培养 6 个月分化出芽, 现正对这些芽进行细胞学和生化学特性分析^[16]。用白车轴草 (*Trifolium repens*) 叶肉或悬浮细胞的原生质体和其他豆科植物如野车轴草 (*Trifolium avense*)、驴喜豆 (*Onobrychis viciaefolia*) 或白脉根 (*Lotus corniculatus*) 的原生质体经聚乙二醇、高 pH 高 Ca 法或电场法诱导融合。融合体在液体或琼脂糖固体培养基中形成了细胞团。百脉根和牛角花 (*Lotus coimbrensis*) 的细胞杂种也得到了。此外, 还有一些组合经原生质体诱导融合得到愈伤组织, 其中有的经鉴定具有双亲的特性。如用苜蓿子叶原生质体与野生苜蓿 (*Medicago falcata*) 悬浮细胞原生质体经诱导融合, 将人工分离异核体转到苜蓿白化苗原生质体中看护培养, 5—6 个月后将绿色细胞群落转到固体培养基上, 经细胞学和同工酶酶谱分析证明是杂种愈伤组织。又用苜蓿白化苗和另一种野生苜蓿 (*Medicago borealis*) 经原生质体融合得到细胞群落, 14 天后异核体分裂并有叶绿素合成^[17]。苜蓿和树苜蓿 (*Medicago arborea*) 的原生质体经电场融合也得到细胞群落。栽培大豆与野生大豆的细胞杂交工作正进行中。

3.5 十字花科细胞杂种

用甘蓝下胚轴原生质体和 *Moricondria arvensis* 悬浮细胞质体经葡聚糖诱导融合, 在 B₂ 培养基中培养后得到愈伤组织和再生植株, 经形态、酸性磷酸酶和天门冬氨酸转氨酶同工酶酶谱鉴定, 8 个愈伤组织的 17 个再生植株为细胞杂种。又从 *Sinapsis turgida*

的双标记突变体(硝酸还原酶缺陷型和抗 5MT)原生质体与甘蓝或幽芥 (*Brassica nigra*) 叶肉原生质体诱导融合,经酸性磷酸酶和过氧化物同工酶酶谱、染色体数以及在以 NO_3^- 为氮源的培养基上生长情况等鉴定证明,有的再生植株是细胞杂种。上述突变体有可能在十字花科其他植物的细胞杂交中广泛应用^[33,34]。用两个与线粒体有关的油菜雄性不育系原生质体进行诱导融合得到胞质杂种。用春性油菜线粒体编码的雄性不育系与冬性油菜原生质体融合,可将前者的雄性不育性状转入后者。通过甘蓝与白菜型油菜的细胞杂交以重新合成甘蓝型油菜又多一例证。用碘乙酰胺处理使甘蓝下胚轴原生质体失活,再和 X 射线处理的白菜型油菜叶肉原生质体诱导融合,可以将白菜型油菜部分基因组转入甘蓝,得到不对称细胞杂种^[36]。用碘乙酰胺处理甘蓝型油菜原生质体经与 X 射线处理的萝卜雄性不育系原生质体经诱导融合,由于互补,所有无性系都有甘蓝型油菜的叶绿体,并在大部分无性系中有线粒体 DNA 重组情况^[22,32]。

3.6 诱导融合和细胞杂种筛选技术的改进

诱导融合技术上除了常用的高 pH 高 Ca 方法外,值得提出的是,电融合具有高效、方便等优点,已越来越多地被应用。例如,在马铃薯和野生种 (*Solanum phurejiae*) 的试验中先用荧光素双醋酸酯 (FDA) 对一个亲本原生质体染色、电融合后用显微操纵器挑出异核体,在各种饲喂系统中进行低密度培养,从 800 多个异核体中鉴定出十多个细胞杂种;DNA 分析有六倍体、八倍体等,并观察到野生种的染色体有丢失现象^[25,27]。用马铃薯抗氨基酸突变系的原生质体经电融合进行了细胞杂交,用电融合诱导木薯 (*Manihot*) 原生质体融合,证明融合体是有活力的。电融合在加入不同盐溶液时,茄子、小麦、大麦、甜菜、油菜、烟草等异核体的存活率要比化学诱导融合的大,例如含有 1mmol/L Ca^{2+} 诱导剂或用亚精胺预处理原生质体,可以增加诱导融合率,两者配合起来效果更显著,融合率提高 2—4 倍^[31]。用有液泡和无液泡的原生质体电融合筛选细胞杂种的工作和蕨类植物的电融合试验还在进行。目前已在培养单个原生质体的基础上设计了可控制的微室设备以进行电融合或微注射,并能用计算机程序操作^[29]。

在筛选细胞杂种的技术中,较广泛地利用理化因素处理亲本原生质体以不对称杂交筛选细胞杂种,例如上述的水稻胞质雄性不育细胞杂种、甘蓝与白菜型油菜的细胞杂种、甘蓝型油菜与萝卜的细胞杂种,还有一些茄科植物如番茄与龙葵的细胞杂种等都是成功的例子。其他如硝酸还原酶缺陷型、卡那霉素抗性细胞系等应用于细胞杂交已获得不少结果。诱导融合的亲本类型也在扩展。不同类型的原生质体和亚原生质体如核质体、胞质体等之间的诱导融合正在试验中。近年来,配子细胞与体细胞的原生质体融合 (gametosomatic fusion) 在烟草属、矮牵牛属都得到了可育的三倍体细胞杂种。

结 束 语

植物原生质体培养有不少重要成果,不少重要农作物原生质体培养相继成功,看来只要针对所用植物的种类及制备原生质体的材料,在合适的培养基和培养条件下,掌握主要的技术环节,因大部分植物原生质体都具有细胞全能性,经离体培养而得到再生植株。要

深入研究原生质体特性需更广泛地积累基础资料,扩大供试的原生质体种类,提高离体培养时的分化率和植株再生率,使培养过程系统化程序化。要注意微培养,要尽快地将原生质体培养与其他生物技术紧密结合。Potrokys (1990) 归纳了十多种将外源基因转入植物的方法和例证,他认为在禾谷类的遗传转化中只有直接将外源基因转入到原生质体中是成功的,这至少说明植物原生质体系统及其培养在基因工程研究中的重要性。相应之下,植物细胞杂交不如原来期望的进展快。在开始得到植物细胞杂种的几年中,不少人曾对它在实际应用的潜力估计过高,期望能在生产上起作用的速度估计过快,实践证明事情并非那么简单。通过原生质体融合和细胞杂交是可能育出新的植物,但还须与常规的选育技术相结合。杂交组合应由近缘向远缘推移,逐步克服不亲和性等障碍,善于应用不对称细胞杂种和胞质杂种,在诱导融合、杂种筛选和鉴定中,尽可能探索和运用新技术、新方法,例如电融合、互补筛选、流式细胞光度计、计算机系统以及在微培养的基础上开展微融合和其他显微操作等。同时注意利用原生质体的衍生系统如核质体、胞质体以及性细胞原生质体等。这些问题的深入研究将会促进植物原生质体培养和细胞杂交的迅速发展。

参 考 文 献

- [1] 许智宏,植物生理生化进展,1986(4):15.
- [2] 宛新杉等,实验生物学报1988,21(2):245.
- [3] 夏镇渎,实验生物学杂志,1983(3):1.
- [4] 夏镇渎,植物生理学通讯,1985(6):59.
- [5] 夏镇渎,植物生理生化进展,1987(5):36.
- [6] 夏镇渎,植物生理学专题讲座——纪念罗宗洛教授,科学出版社,1987, p.146
- [7] 夏镇渎,植物生理学通讯,1989(2):1.
- [8] Bates GW. *Planta*, 1985, 165: 217.
- [9] Cocking EC. *Nature*, 1960, 187: 962.
- [10] Davey MR, Kumar A. *Intern Rev. Cytol. supp.* 16 Academic Press Inc, 1983, p. 219.
- [11] Ferreira DI, Zelcer A. *Intern Rev Cytol*, 1989, 115: 1.
- [12] Fowke LC. *Plant protoplasts* (Fowke LC, Constabel F. eds), CRC Press Inc, 1985, p. 39.
- [13] Gleba YY, Sytnik KM. *Protoplast fusion, genetic engineering in higher plants*, Springer-Verlag, 1984, p. 1.
- [14] Gleddies S *et al.* *TAG*, 1986, 71: 613.
- [15] Glimour DM *et al.* *Abst. VIth Intern. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, 1986, p. 386.
- [16] Hammatt N *et al.* *Progress in plant protoplast research* (Puite KJ *et al* eds), Kluwer Acad Pub, 1988, p. 255.
- [17] Hartmann E, Hock K. *The physiological properties of plant protoplasts* (Pilet PE ed), Springer-Verlag 1985, p. 190.
- [18] Jenes B, Pauk J. *Plant Sci*, 1989, 63(2): 187.
- [19] Kyoizuka J *et al.* *Biotechnology*, 1989, 7: 1171.
- [20] Lühr R, Lörz H. *Planta*, 1988, 175: 71.
- [21] Menczel L *et al.* *TAG*, 1986, 205: 201.
- [22] Menczel L *et al.* *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 98.
- [23] Ozias-Akins P *et al.* *MGG*, 1986, 203: 365.
- [24] Peri A *et al.* *TAG*, 1990, 79: 632.
- [25] Pijnacker LP *et al.* *TAG*, 1986, 73: 878.
- [26] Pilet PE. *The physiological properties of plant protoplasts* (Pilet PE ed), Springer-Verlag, 1985, p. 1.
- [27] Puite KJ *et al.* *PCR*, 1986, 5: 262.
- [28] Redway FA *et al.* *TAG*, 1990, 79: 609.
- [29] Spangenberg G, Schweiger HG. *Europ J Cell Biol*, 1986, 41: 51.
- [30] Tabaeizadeh Z *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 5616.
- [31] Tempelaar MJ *et al.* *Plant Sci*, 1987, 48: 99.