

植物原生质体培养与融合(综述)

罗希明

(吉林省农业科学院大豆研究所)

原生质体作为一个研究体系已广泛地引起人们的注意。研究表明:首先,每个植物体细胞都含有该个体的全部遗传信息,而且在适宜的培养条件下,体细胞有再生与其亲本相似的个体全能性。这表明,体细胞可以象一粒种子那样再生繁殖。其次,研究的另一个优点是在同一时间内能得到大量遗传上同质的原生质体。这样,原生质体培养就为细胞生物学,发育生物学,细胞生理学,甚至病毒学建立了试验体系。第三,原生质体能超越性细胞的不亲和障碍,便于进行各种遗传操作和远缘种间体细胞杂交,并可摄取外源细胞核、细胞器、细菌、病毒、质粒及各种DNA大分子,经过遗传操作以后的原生质体于再生发育过程中能产生遗传重组及形成新的变异植株。因此,植物原生质体培养与融合的研究,已成为近代生物技术领域中的一个重要分支,已显示出它在开拓植物育种新途径以及在遗传工程研究上的巨大潜力。

近些年来,植物原生质体的研究发展很快。本文的目的是对植物原生质体培养与融合研究的内容及进展作一简要的介绍。

研究内容及进展

Cocking (1960)首次用水解酶抽提液从蕃茄根尖游离出原生质体。自此以来,许多人相继开始用酶法大量地游离各种植物的各个组织部位细胞的原生质体,并对原生质体进行各方面的研究。现在研究表明,用适当的酶处理几乎能有效地从任何种植物或任何类型的植物组织游离出原生质体。但是,直到1971年Takeble等人从烟草原生质体再生成完整植株时才证实其全能性。目前,从原生质体再生成植株的种类还不多,将近100种,其中我国就有20多种。特别是近些年来,已逐步增加了农作物的种类,进展很快。例如:水稻(M. Y. Coulibaly, 1986; 雷鸣等, 1986; Yamada, Y. 1986), 百脉根(P. S. Ahuja, 1983; 吕德松, 1986), 赤豆(葛扣麟等, 1987)等由原生质体再生植株。在应用方面,原生质体培养技术已显示出潜在的实用价值,如美国和英国均从马铃薯原生质体的再生植株中筛选出生长习性、块茎色泽和产量、成熟期、光周期反应和抗病不同的稳定无性系。

自1972年Carlson通过原生质体融合方法得到粉兰烟草和朗氏烟草的第一个种间体细胞杂种植株以来,目前通过原生质体融合获得种内,种间和属间体细胞杂种植株的组合50余种(其中我国有6种),例如Melchers等(1978)使蕃茄和马铃薯体细胞杂交而获得杂种植株,Sche和Robbelen(1982)通过甘兰和白菜原生质体融合获得人工合成种(甘兰型欧洲油菜)。植物原生质体还可作为遗传转化研究的理想受体系统,如英国有人通过Ti质粒将抗卡那霉素基因引入大豆原生质体中并已表达。

一、植物原生质体培养

所谓原生质体是指只除去细胞壁的植物细胞的部分(D. A. Evans)。原生质体是用机械方法首先分离得到的,但产量很低,只有极大的和高度液泡化的细胞才能用于分离,并且原生质体的产量是不一致的。自1960年Cocking创立酶法分离原生质体以来,已公认为是一种能释放大量一致的植物原生质体的好方法。

(一)原生质体游离

要适时地获得大量原生质体,而又能在培养中再生和分化,选择合适的植物种类和组织来源显得特别重要。不少人试用了植物各种不同部位的组织,如:根、幼茎、叶、花、果实、胚轴、子叶、幼胚、

冠瘿瘤、根瘤、愈伤组织及悬浮细胞系等，几乎植物体的各部分都可以分离出原生质体。然而各实验室常用的是由叶肉细胞和悬浮细胞，如：烟草、水稻等。

许多试验表明，材料的来源首先要考虑植物生长的年龄、环境条件、生理状态和营养条件等等，这对原生质体的产量、生活能力及再生和分化的潜力，都有着极为重要的作用。如豌豆需要在黑暗中30小时，然后在一定的培养条件下（25℃，光照200—400lx，湿度为45—48%）培养1天，即可游离。在整个原生质体游离和培养过程中，需要严格的无菌条件，合适的灭菌方法，各试验步骤才能正常进行。在酶法去壁的过程中，应根据实验材料选择合适的酶种类、浓度、处理时间及温度、振荡等条件，这应依材料而定。

原生质体直接释放到标准细胞培养基中会破裂，因此由植物细胞壁机械地维持着的压力用适当的渗透压代替之。细胞内外之间的渗透压必须平衡，所以在酶液中必须加入适合的渗透稳定剂。游离出的原生质体必须经过多次溶液冲洗消除酶液中有毒成分的毒害。原生质体的活力可作形态观察鉴定，也可用对DNA有定量专性作用的Hoechst 33258染料染色活体原生质体(Meadows, M. G. 等, 1981)能显示出活力。

（二）原生质体培养

新鲜的有活力的原生质体只有在适合其发育所需要的培养基条件下才能重新形成细胞壁，进行分裂，然后通过愈伤组织分化或胚状体形成植株。这一系列过程是在人工合成的培养基中完成的。这种培养基的成分主要是模仿细胞组织培养的基本要求制定的。但原生质体的生理功能和细胞有显著的差异，因此使用适合的原生质体培养基是成功的关键之一，常用的培养基有MS、E₆、D_{2a}、KM 8 P等，因物种及组织的不同需要作适当的选择和改良，如大豆原生质体培养基以KM 8 P为最适宜。

正确选择培养方法对原生质体再生和发育也有着重要的影响。常用的方法有：1. 液体浅层静止法。2. 固体平板法。3. 悬滴培养法等。原生质体的密度对它能否在进一步培养中再生分裂起一定的作用，常用的密度为 10^4 — 10^6 个/ml。原生质体在适当的条件下首先形成新壁，可用高渗液产生质壁分离的方法来证实新壁的存在。原生质体时常出现膨大（多为禾本科）和出芽（多为双子叶植物）的现象。一般说来原生质体在培养1—7天内开始第一次分裂，因物种不同而异，如大豆下胚轴原生质体在培养第二天出现第一次分裂，随后分裂很快发生，出现多细胞团。在迅速生长的时候，每周要加一次新液，同时逐步降低渗透压，愈伤组织的形成时常发生在起始培养基上培养一个月左右，有的愈伤组织的形成需要更长的时间。对于大多数植物来说，由细胞团到愈伤组织的培养过程中不需额外调整培养基的主要成分，可补加新鲜培养基和碳源。如豇豆等豆类原生质体形成细胞团时转移到除去甘露醇，含有0.06M蔗糖的D_{2a}固体培养基上形成较大的愈伤组织，同时将光照强度加到2000—3000lx。

（三）植株再生

从原生质体植株再生的多数报道来看，比较培养基成分和环境条件的详尽实验并不完善。因此，不可能把这些植物再生植株的一般程序一致化，使用的植株再生培养基也随物种的不同而改变，如胡萝卜愈伤组织在无激素的B₅，或MS培养基中通过胚胎发生，而Panicum细胞悬浮培养物在1—2 μM 2, 4-D的MS培养基上再生植株。因此，为了植株再生策划从原生质体恢复迅速生长的愈伤组织，并把其愈伤组织转移到种的特殊再生培养基上。形态器官的分化可通过两个途径：一种是愈伤组织诱导形态发生，这一途径在组织和细胞培养中已积累了很多经验，关键是选择合适的培养基，并调节生长素和分裂素的平衡，诱导芽和根要求不同的激素水平，应先诱导芽而后诱导根，有的植物可根芽同时发生，但应注意，有些植物（如烟草细胞）本身能合成相当量的内源激素和生长素，外加大量生长激素反而不利，而禾本科植物似乎也不需要大量多种生长激素。另一条途径是由原生质体再生细胞在培养中可直接诱导胚状体，由胚状体发育成完整植株，如胡萝卜原生质体培养(Camborg等)。

目前大多数原生质体的形态发生为第一种方式，或许本身就是由胚状体发育来的而没能注意到，然而对一些难以再生植株的植物种（如禾本科和豆科作物）采用诱导胚状体发育成植株的途径是可取的。有的植物如大豆、玉米等的某些组织部位原生质体产生了愈伤组织，但不能获得植株的再生。这可能更多地和组织不同发育阶段的细胞代谢特点以及再生能力随发育年龄而降低有关。

(四) 突变体的筛选

在植物原生质体培养再生植株的过程中,由于培养基成分(特别是激素的作用),原生质体的自体融合(包括遗传物质等量的和非等量的同类原生质体)或遗传物质丢失、离体条件下外界条件等因素的影响都可能产生遗传物质的改变。如果再生植株则导致新的植株类型出现,从这些不同的类型中可能选出生产上有利的性状。例如:在蕃茄原生质体培养再生植株的过程中产生出含糖量或维生素C量高的新型蕃茄。

二、植物原生质体融合

多年来,植物育种工作通常是种内不同品种之间通过有性杂交培育出新品种应用于生产。但是,种属或更远缘关系的植物种之间有性杂交普遍地受到限制。自从由植物体细胞分离的原生质体再生完整植株(1960年)以及通过原生质体融合进行体细胞杂交获得成功以来(1972年),使育种家,遗传学家能超越有性过程的局限性,扩大遗传重组范围,克服较远缘种间的不亲和性,对创造有更大突破性的新型作物的设想有了新的希望。因此,近些年来各国先后开展了植株体细胞杂交的研究工作,并且取得了令人鼓舞的进展。植物原生质体的分离与培养是体细胞杂交的基础,在这个基础上进行原生质体融合、杂种细胞筛选和杂种植株的鉴定等。

(一) 原生质体的选择

原生质体融合的成败与正确选择和分离原生质体有着极为密切的关系。1.首先要获得大量有活力,遗传上一致的原生质体。2.同时要考虑双亲之中至少有一方具有再生植株的能力。3.带有可供融合后识别异核体的性状。4.更重要的是在异核体发育中有能选择杂种的标记性状。开始,人们总是以为原生质体融合没有亲缘界限,目前看来并不完全如此,植物原生质体融合也有其局限性和存在的问题。

(二) 融 合

无壁的原生质体具有相互融合的能力,但是异源原生质体融合需要诱导才能实现,诱导融合技术直接影响细胞杂交研究的进行。1970年Power和Cocking等用钠离子为融合剂,第一次使玉米和燕麦的根尖原生质体融合在一起,但融合率只有0.1%。Carlson(1972)用 NaNO_3 溶液融合法,获得了第一个植物体细胞杂种植株。目前广泛应用的方法是高国楠(1977)提出的聚乙二醇和高Ca高PH的诱导融合法。Gleba等人(1979)用此法获得了烟草种间体细胞杂种植株。使大豆×粉兰烟草的原生质体融合率达10—35%。此外,还有一些以聚乙二醇法为主加以修改,如与二甲亚砜、刀豆球蛋白等相结合的方法。目前,应用电融合法正引起人们的注意。此法的好处是不像多聚化合物那样在融合后必将多余的诱导剂洗去,而可在无菌条件下转入培养,现已有将日本黄连与铁海棠原生质体用此法诱导融合得到杂种细胞并有几次分裂的报道(Yamada Y.1984)。

原生质体融合可能有几种不同类型的产物:1.双亲原生质体1对1融合产生具有双亲细胞核和细胞质的异核体。一般是双亲的亲缘关系较近的类型。2.同源原生质体融合的同核体,也称自体融合。3.一个亲本的细胞核和另一亲本细胞质形成的异核质体。此类多半是由无核的亚原生质体和另一种有核的原生质体融合而成,也可能是由于异核体在培养条件下排掉了另一方的核而造成的。异核质体也称异胞质体或共质体。4.以一个亲本的细胞核遗传物质为主,而转入了另一亲本的少量遗传物质,但细胞质是双亲的,如,胡萝卜×羊角芹的组合。后两种情况多为亲缘关系较远的组合。

(三) 原生质体融合后的筛选方法

原生质体融合以后,下步是如何把融合的双核杂种从混合的群体中筛选出来。目前筛选的方法很多,主要有以下几种:1.直观分离法。2.营养互补法。3.营养缺陷型互补法。4.白化突变体—野生型间互补法。5.抗药性互补法。6.杂种优势法。7.浮力密度法。8.伤痕互补法。这些方法,如直观分离法、浮力密度互补法等任何原生质体组合都可应用,而有的只能在特殊的组合中进行选择。

(四) 融合体的发育

在培养条件下, 异核体行为的研究表明, 异核体在培养过程中出现下述五种不同途径(郑国锷, 1983): 1. 核同步分裂→融合→双亲染色体亲和; 2. 核同步分裂→融合→染色体重组和丢失; 3. 两核之间产生新膜, 形成两个子细胞; 4. 核不融合, 核间也不产生新膜形成多核体; 5. 核不融合, 一个被排除形成共质体。在培养过程中还出现染色体桥、染色体粘连、环状染色体、断裂、多缢痕等现象(郑国锷, 1983)。丢失的染色体通常是来自一方, 有的部分丢失, 丢失的次序是随机的, 染色体排除的原因, 一般认为是基因的不亲和性。随着亲本间系统发育关系变远, 融合体的发育逐渐表现不亲和, 亲缘关系越远, 越难于产生杂种植株, 要克服这种不亲和性要在细胞学和分子生物学水平上寻找其发生机制。

在一般情况下, 培养基对哪一亲本原生质体更适合, 则该亲本原生质体的发育更快, 因此可调整分别适合双亲的培养基来控制各自的发育。

(五) 体细胞杂种植株的再生

目前, 绝大多数体细胞杂交产生的植株多属于烟草种内杂种, 少数属于曼陀罗种内杂种。它们在细胞学上表现为双二倍体或多倍体, 非整倍体, 这在有性杂交中也可实现, 但是通过有性杂交很难得到胞质杂种, 却用体细胞杂交法得到了(Galum, 1982), 这给由胞质控制的特性转移到另一亲本细胞提供了有用的方法。近缘种间的原生质体融合, 从许多报道来看都能形成异源杂种植株, 并能开花结实。在这些组合中, 除少数有性杂交稍难些以外, 都能获得有性杂种植株。由体细胞融合产生的杂种植株在细胞学上多为二倍体, 少数为非整倍体。属间体细胞杂种植株, 虽然这方面的例子不多, 但是近年来取得了不小的进展, 如前所述, 蕃茄与马铃薯原生质体融合得到了体细胞杂种。这说明用有性杂交法不能得到的组合, 通过原生质体融合可形成完整的杂种植株, 但一般不结实, 这些问题还有待进一步解决。更远缘的种间杂种细胞, 如粉兰烟草与大豆的原生质体融合试验(Kao, 1974) 虽然得到了大量的杂种细胞, 但目前还不能再生植株。这需解决许多问题和考虑新的方法, 例如通过回融可使性状稳定。

(六) 杂种植株的鉴定

再生植株以后, 必须鉴定杂种植株的真伪, 方法有: 从形态学上要检查叶和花的形态象亲本还是介于两亲本之间, 细胞学上看核是否相容, 染色体消失等情况; 遗传学上要分析后代的遗传性状与两亲本的关系。用同功酶分析查明杂交性, 体细胞杂种同功酶谱有不同于两亲本种的独特带型或用分子杂交法来确定真伪杂种。

三、外源遗传物质的引入

植物原生质体可作为遗传转化研究的理想受体系统, 可将远缘植物细胞的细胞器、染色体、细胞质基因、甚至DNA引入原生质体。有些人制备各种亚原生质体通过融合重组细胞, 如微小原生质体与完整原生质体融合、微小原生质体之间融合。L. Martt (1979) 首先报道用根癌农杆菌与烟草原生质体共培养获得转化细胞。据文献报道表明将裸露的DNA直接引入原生质体显然是不可能实现的。有报道说可将完整DNA引渡给原生质体, 此法是将DNA封藏在脂质体内把DNA保护起来, 随后再与原生质体融合, 如Matthews等(1981)成功地利用脂质体将PBR332质粒DNA引渡给胡萝卜原生质体, 利用荧光技术检验引渡到原生质体中的脂质体内含物。许多试验表明植物原生质体引入外源遗传物质的途径优于有性杂交、染色体工程和体细胞杂交等途径。

展 望

十多年来, 植物原生质体培养和融合的研究取得了很大的进展, 但也存在着许多问题。如体细胞杂种植株形成的能力随着亲缘关系的距离增加而减少, 杂种细胞染色体的不稳定程度也随亲缘关系变远而增加。与基因工程相比, 后者的目标具体, 针对性强, 从长远来看有广阔的发展前景, 但目前它在供

体, 载体和受体三个不可缺少的环节中尚不配套。另外, 与农作物经济性状有关的除已知某些抗病性可能为单基因控制外, 涉及产量的大都是多基因数量遗传, 目前难度较大。植物原生质体在培养、融合及筛选鉴定几个环节上已基本形成体系, 手续和要求条件不如基因工程复杂。另外, 在用以改变植物的细胞遗传特性, 提供研究某些性状的表达机会以及稳定性, 或是产生新基因组合的机会都比基因工程多。

目前, 原生质体无性系、种属间杂种、细胞质杂种和外源遗传物质引入已扩大到重要的农作物, 不久的将来这方面将会出现更多的突破性进展, 这不仅提供育种新材料, 而且有的可直接用于生产。同时, 对作物遗传育种、遗传学、细胞学和病毒学等应用基础研究以及实验生物学的发展都有着重要的意义, 将为1990年大规模开展遗传工程进行作物改良奠定基础。

参 考 文 献

- (1) 李向辉: 《植物原生质体培养》, 融合讲习班材料, 1984.
- (2) 许智宏: 《中国科学》(B辑), 1984, 11: 1012—1017.
- (3) 吕德扬: 《科学通报》, 1986, 10: 770—772.
- (4) 吕德扬: 《植物学报》, 1986, 28(5): 477—479.
- (5) 张谦: 《植物生理学通讯》, 1986, 5: 66—76.
- (6) 夏镇澳: 《植物生理学通讯》, 1985, 4: 13—18.
- (7) 商效民: 《细胞生物学杂志》, 1984, 6(1): 5—11.
- (8) 雷鸣等: 《科学通报》, 1986, 22: 1729—1731.
- (9) 千田贡: 《细胞》, 1980, 12(8): 12—17.
- (10) Collins C.B. Priorities in Biotechnology Research for International Development, 1982, 230—249.
- (11) Evans D.A., Bravo J.E., Handbook of Plant Cell Culture, 1983.
- (12) Evans D.A., Handbook of Plant cell culture, 1984, 1: 124—176.
- (13) Szabados L., Plant Cell Reports, 1986, 3: 174—177.
- (14) Yasuyuki Yamada, Plant cell Reports, 1986, 5: 85—88.

(上接第14页)

块, 菟丝子的危害面积占大豆面积的10%左右, 经防治后可增产2倍以上。

三、小 结

1979~1985年连续8年试验示范结果证明, 地乐胺能有效的防除大豆田杂草, 可以代替进口的氟乐灵, 每亩用量133.3~174克, 获得90%以上的除草效果, 对大豆安全, 对下茬作物玉米和小麦也安全, 增产增收, 成本低, 可以大面积应用。同时也证明, 地乐胺是目前防治大豆菟丝子高效、安全、使用方法简便、效果稳定的茎叶处理剂。适宜的浓度100倍液, 适宜的施药时期为6月下旬到7月上旬。一次施药控制大豆菟丝子的危害, 防治效果显著, 增产明显, 经济效益高, 能代替人工拔除, 应大面积推广应用。地乐胺这个国产除草剂新品种, 需要尽快大量投产, 以满足需要。