

下胚轴原生质体再生能力,大麦叶肉原生质体叶片去除下表皮后,在山梨醇 $0.5\text{M} + \text{CaCl}_2$ $1\text{mM} + \text{MES}$ 5mM $\text{pH}6.0$ 的溶液中真空渗入 2min ,再脱壁,原生质体培养效果好。海岸松幼苗的根经山梨醇 $0.7\text{M} +$ 半胱氨酸 30mM 处理 1hr ,原生质体得率提高3倍,芥菜子叶与胚轴原生质体,无菌苗经低温处理 2hr 可显著提高分裂频率。水稻叶肉原生质体材料经多效唑 $2.5\text{mg}/\text{l}$ 处理,提高原生质体得率与活力。情况提示,进行原生质体培养时,供体的品种、取材部位、年龄、育苗条件等都有显著影响,应该重视这些因素的筛选工作。

2 原生质体脱壁和脱壁过程中产生的问题

细胞脱壁过程中由于脱壁损伤和高渗介质会引起原生质体生理状况的改变。因此,从细胞开始脱壁至原生质体再生壁以前的阶段是原生质体极易受外界因素影响的时期,因而也是采取适当调控措施的有利时机。禾谷类叶肉原生质体培养 24hr 后往往大量自溶与脱壁过程中过氧化物酶及过氧化氢酶活性下降有关,需添加适当的保护剂来抑制这种影响。大麦小麦叶肉原生质体分离时添加抗坏血酸 2mM 可使原生质体得率、存活率显著提高。燕麦原生质体培养添加 $0.1-1.0\text{mM}$ 精胺可抑制RNase形成。酶液中离子协调配合问题也直接影响原生质体得率和存活率。萱草叶片原生质体脱壁时,供给 KCl $0.19\text{M} + \text{CaCl}_2$ 0.14M 存活率可达 73.53% ,而仅使用 KCl 0.39M 存活率为 2.87% 。*Digitalis obscura*叶肉原生质体培养添加钙 12mM 可使原生质体活力提高。此外,酶处理时会产生自由基,常采用谷胱甘肽作保护剂。翅豆悬浮培养细胞,酶液中添加2-巯基乙醇保护原生质体,抑制RNA酶的活性,也有添加葡聚糖硫酸钾增加原生质体稳定性。由于脱壁时 1hr 的高渗酶液就可使原生质体分裂失败,引起ABA上升,产生渗透胁迫蛋白。而原生质体难以分裂的原因之一是由高渗引起的ABA上升。因此,解决高渗引起的一系列生理变化是保持原生质体活力的重要方面。

3 植物原生质体分离和培养中的渗透胁迫问题和渗透值需求

3.1 高渗时的质膜透性和细胞骨架变化

高渗处理可导致胞质收缩,微丝结构的变化,从而影响到质膜稳定,对细胞骨架、微管结构产生干扰。烟草4天幼叶分离的原生质体,当甘露醇为 0.57M 和 0.30M 时,质膜表面电荷分别为 $+12\text{mM}$,和 $+26\text{mM}$,影响某些离子的进出。小麦根的质膜囊泡,当环境中供给蔗糖由 1100mM 降至 250mM ,磷的释放量由 20mM 增至 100mM 。胡萝卜圆片,提高外界甘露醇浓度,促进外界环境中 K^+ 内流。在蔗糖浓度与离子活性的关系实验中发现,添加5%蔗糖,会使 NaCl 、 CaCl_2 等离子活性下降。这些说明,环境中渗透值的高低不仅影响膜电位,而且还影响离子活性的关系。实验中发现,添加5%蔗糖会使 NaCl 、 CaCl_2 等离子活性下降。这些说明,环境中渗透值的高低不仅影响膜电位,而且还影响离子活性和离子的进出。

3.2 高渗时的氨基酸代谢和多胺状况

蕃茄细胞的悬浮培养物,在PEG 6000 25%时,会使脯氨酸库扩大300倍,使脯氨酸合成扩大10倍。玉米胚根愈伤组织,甘露醇达到 0.33M ,会使脯氨酸积累4.5倍。由此可见,高渗会影响氨基酸代谢,从而影响蛋白质合成。在高渗环境下会使腐胺亚精胺、ADC活性增加。燕麦叶肉细胞和原生质体,在山梨醇 $0.4-0.6\text{M}$ 下 6hr 会使腐胺含量增加60倍,ADC活性也相应升高。大麦叶片切段,在渗透胁迫条件下,腐胺积累3-4倍,而外源磷存在

下, 腐胺积累可增加7倍。高活力的原生质体应是腐胺/(精胺+亚精胺)比值相对较低。而高渗易使精胺、亚精胺合成抑制, 导致腐胺积累。因此, 在培养过程中应采用合适的渗透值和注意必要时的外源多胺供应。

3.3 高渗下的激素状况

高渗会导致ZAA、ABA、乙烯等激素状况的变化, 0.5M甘露醇处理燕麦芽鞘10min, 会影响ZAA与膜上受体的结合。苍耳叶片处于高渗环境会使内源ABA由细胞质进入质外体, 使胞内ABA下降, 但大麦叶片在高渗脱壁时引起的叶肉细胞内ABA的积累, 并不能在脱壁后的原生质体中降解。因此, 高渗下内源ABA的变化比较复杂, 但多数报告ABA在高渗下积累, 对离体玉米根, 供给PEG6000, 可使细胞内ABA水平提高4倍。苍耳叶肉细胞, 高pH值促使内源ABA外流。这提示我们在培养过程中如何通过改变环境条件来减少ABA的积累。高渗也会影响乙烯的产生。石竹花瓣, 糖的供应抑制乙烯合成酶活性从而使乙烯合成受阻, 但蕃茄果实原生质使用真空渗入法加入半乳糖400 $\mu\text{g/g.FW}$ 却能使乙烯产生。一般说来, 脱壁会引起乙烯增加。

3.4 高渗下的胁迫蛋白

一般认为, 高渗下会产生渗透胁迫蛋白, 如烟草叶肉原生质体的2-磷-核酮糖脱羧酶在高渗脱壁时会缺失2个亚单位, 同时产生一些新的渗透胁迫蛋白。但玉米幼苗中胚轴在PEG供应下, 仅引起蛋白质的变化, 而未发现有特殊类型的蛋白质。因而对于渗透胁迫是否会产生特异蛋白还有异议。

3.5 高渗下的酶活性变化

豌豆胚轴, 渗透剂为蔗糖或其它糖类时, 均使 α -淀粉酶活性下降25%—47%, 烟草叶肉原生质体, 当蔗糖从0.2M升至0.7M或甘露醇从0.4M升至0.7M, 均使RNA酶活性分别提高2.2倍和9.5倍。大麦叶片缺水, α -淀粉酶同乙酶谱由原来的1条变为2条带, 且活性加强。因此, 高渗会引起植物体内某些酶活性的改变。

3.6 介质渗透值和细胞的分裂、生长、分化

介质渗透值会影响细胞的分裂、生长和分化, 蚕豆幼苗PEG6000 20%处理, 细胞分裂指数始终比对照低50%以上, 而小麦胚16%的PEG处理却有利于提高细胞分裂指数。一般说来, 细胞分裂的最适渗透值不等于细胞生长的最适浓度, 如十蕊商陆, 在蔗糖浓度为234mM时分裂最旺盛。在58mM时, 生长最旺盛。通常渗透值高有利于分裂, 渗透值低有利于生长。水稻成熟胚的愈伤组织, 如果供给2%蔗糖, 分化能力维持100天, 如果供给2%蔗糖+3%山梨醇, 分化能力可维持1500天。可见, 渗透值对愈伤组织分化能力的维持作用极大, 豌豆幼叶愈伤组织以5%蔗糖浓度时细胞分裂好。因此, 我们在原生质体培养时要根据目标和材料选择合适的渗透值。

3.7 介质渗透值和胚胎发生

芥菜无菌苗的胚轴切段培养, 蔗糖浓度为2、3、4%时, 胚状体发生率分别为31%、9.1%和0, 小麦花药培养的胚状体发生, 分别用0.175M蔗糖、麦芽糖、蜜二糖时, 胚状体发生率为5.25%、24%和0.5%, 向日葵幼胚培养胚状体发生, 用12%的蔗糖, 体细胞胚发生, 再转入低浓度蔗糖时, 则胚状体成长并萌发。大麦花药培养产生的胚状体, 供给蜜二糖, 可获大量的胚状体, 并可获得绿苗。由此看来, 胚胎发生的启动、成长和萌发随糖的种

类、浓度及其变化而明显不同。

4 原生质体的若干生理状况

4.1 细胞壁的影响

细胞壁有很强的氧化还原能力。细胞壁上有很多过氧化物酶,可引起很强的氧化作用。原生质体由于细胞壁的丧失,致使某些有害物质不能降解,燕麦叶片原生质体,多胺氧化酶活性99%存在于细胞壁中,去除细胞壁,多胺氧化酶缺失,会影响正常的多胺代谢平衡。又如大白菜悬浮细胞与大白菜悬浮细胞的原生质体,用电击法外源导入,导入细胞的比例分别为19%、77%。若用抑制剂抑制原生质体的细胞壁再生,则也抑制原生质体的分裂。且由于细胞壁的丧失,原生质体易受损伤,因此,必须十分注意原生质体的介质环境。

4.2 透性

由于细胞壁的去,导致膜去极化,从而在离子吸收上产生差异。胡萝卜原生质体外源供给肌醇磷酸酯 $20\mu\text{m}$, 4min内可使 Ca^{2+} 减少17%,而10min后,又有 Ca^{2+} 的再吸收。胡萝卜悬浮培养细胞,脱壁后 K^{+} 的运输活性降低50%,烟草叶肉细胞去壁前后,对 Rb 吸收相差10倍。荧光显微技术也证实了细胞与原生质体对物质吸收的差异。胡萝卜细胞与原生质体,通过荧光吸收观察两者物质吸收情况发现,前者能进行内吞作用,后者作用很弱。因此,原生质体对大分子物质的透性可能反而不如细胞。电穿孔可促进原生质体对大分子的吸收也是旁证。因此,促进原生质体向环境中吸收可能提高原生质体再生频率。此外,细胞壁存在与否,还会引起某些细胞器发育上的变化,水稻叶肉细胞的原生质体与叶肉细胞相比,两者的叶绿体结构上就存在某些差别。

4.3 呼吸代谢与合成代谢

大麦幼苗分生组织的原生质体,ABA抑制线粒体吸收,而这种抑制与 Ca^{2+} 、CaM 存在有关。用 ^{14}C 标记观察发现叶肉原生质体合成蔗糖的速率与未脱壁组织是相同的。矢车菊的完整细胞与原生质体,用 ^{32}P 标记观察 RNA 合成,发现在脱壁后 24hr内两者合成的 Poly(A)-RNA量有区别的。这说明,原生质体与完整细胞在代谢上或多或少存在某些差异。

4.4 激素

原生质体和细胞对激素的吸收是不同的。油茶叶片原生质体与叶片切块相比,外源供给 ZAA 10mM,可促进质子外排,而叶片切块则否。大麦叶肉细胞在高渗脱壁后,内源 ABA 含量显著上升,作者指出,原生质体中 ABA 含量高是由于叶肉原生质体不能降解脱壁前叶肉细胞所合成的 ABA。因此,细胞和原生质体的内源激素存在状况及其作用是有区别的。

5 培养原生质体的细胞壁再生

细胞壁再生是原生质体分裂的前提条件,在原生质体培养过程中,多数细胞能再生壁,但不同材料复壁的滞缓期差异很大,蚕豆10min就开始复壁,烟草8—10hr复壁,水稻24hr复壁,小麦则在6—18hr复壁。哪些因素会影响细胞壁的再生呢?

5.1 影响细胞壁再生的因素

5.1.1 接种密度 就烟草原生质体来说,培养细胞密度分别为 5×10^3 、 1.3×10^5 和 4.2×10^5 时,6天内细胞复壁率依次为26.3%、60.0%、38.6%。可见,要使细胞壁尽快恢复,需要

一个合适的接种密度。

5.1.2 碳源 对于细胞壁的再生,碳源供应是必要的,但不同的碳源效果不同,如供给相同浓度的糖,供给蔗糖时复壁率为50.0%,而葡萄糖仅35.7%。因此,糖种类的选择是重要的。

5.1.3 激素 烟草叶肉原生质体,单纯供给 2,4-D 2mg/l 复壁率仅为0.8%,供给 2,4-D 2mg/l+KT0.25mg/l,则复壁率可达95%,因此,激素的适当配合是重要的。

5.2 再生壁与正常壁的比较

长春花原生质体在悬浮培养条件下,再生壁成分与正常壁不同,壁中糖成分占优势的是葡萄糖,如果在琼脂上培养,则再生壁与正常壁接近。表明物理环境对细胞壁多糖的沉积是有影响的,这就提示我们在进行培养时,不仅要考虑蔗糖的种类、浓度、激素的供应,还要考虑培养的物理环境。

6 原生质体复壁后的细胞分裂

6.1 滞缓期

胡萝卜悬浮细胞的原生质体,第2天开始出现细胞分裂,油菜胚轴细胞的为3—5天,而花生幼叶的则为15天。从老愈伤组织与幼愈伤组织分离的原生质体,其滞缓期也不同,因此,制备原生质体时要注意选择合适的年龄、部位以尽量缩短其滞缓期。

6.2 细胞密度

原生质体要进行细胞分裂,必须要有合适的细胞密度,如烟草原生质体的合适密度为 $6-8 \times 10^4$ 。欧洲酸樱桃根的为 2.5×10^5 ,野生马铃薯叶片的为 $1-2 \times 10^4$,水稻愈伤组织的为 10^5 ,一般说来,双子叶植物原生质体接种密度低一些,单子叶要高一些。

6.3 外植体

细胞分裂频率还取决于外植体本身的生理状况。外植体的取材部位、年龄、是否脱分化培养物等都是影响细胞分裂的重要因素,向日葵叶肉,胚轴、叶柄的原生质体中,以叶柄原生质体分裂频率最高,叶肉原生质体分裂频率最低。又如 *L. peruvianum* 的2—3天叶和4—5天叶分离的原生质体的分裂频率分别为11.8%和7.1%。烟草幼苗的原生质体,不同苗龄也差异很大,大麦叶肉原生质体仅形成10个细胞的小细胞团,而愈伤组织分离的原生质体可形成细胞群落,油菜茎与叶肉的原生质体培养3—5天开始分裂,而由茎、叶、愈伤组织分离的原生质体24hr后就出现细胞分裂。因此,原生质体的来源是需要仔细考虑并经过筛选的。

6.4 脱壁时酶的种类

脱壁时用的酶种类不仅影响脱壁效率,也影响培养效果。如蕃茄叶肉细胞脱壁,用 Meicalase P 代替 Dricelase cellulysin 植板率显著提高。因此,脱壁时酶的选择不仅考虑原生质体得率还要顾及以后的培养效率。

6.5 无机盐

进行原生质体培养,必须选择合适的培养基,其中,总盐浓度及各种盐的适当搭配对愈伤组织形成有重要影响,如茄子胚轴原生质体在1/2MS基础上添加 NH_4NO_3 200mg/l 培养效果好,莴苣子叶原生质体在1/2MS基础上添加 NH_4NO_3 80mg/l 对培养有利。紫菀叶肉原生质体 NH_4^+ 的存在不利。菊花子叶原生质体培养有 NH_4^+ 存在只能分裂3—4次,但蕃茄原生质体培养,需供给 NH_4NO_3 5mM,才有利于培养。总的说来,原生质体培养中,无

机盐供应,尤其是 NH_4^+ 的供应应予以仔细考虑。

6.6 有机氮

为了满足细胞生长,分裂对氮的需求除无机氮外常常需要添加各种有机氮,如 Arg、Gly、CH、Glu、Gln等。如芦笋的原生质体培养不供给 Gln 时植板率为 0.2%,供给 1000mM Gln 时,植板率可提高到 7.2%。向日葵胚轴的原生质体低密度培养时,用谷酰胺作唯一氮源时效果好。

6.7 核酸类

供给核苷可以提高植板率,蕃茄原生质体培养,供给 D-核酸有利于细胞分裂和植板率,但有关核酸供应的文献还不多。

6.8 多胺

添加多胺对原生质体的培养有时有良好影响,如燕麦叶肉原生质体供给精胺与亚精胺可衰老,供给亚精胺 1mM,细胞分裂频率可由 0.2% 上升至 2.2%。*Pinus* 子叶的原生质体供给亚精胺 40mM,可明显提高细胞分裂的百分频率。杏悬浮培养物的原生质体供给腐胺 0.05mM,可促使细胞分裂,供给精胺 1--10mM,则 30 天才出现细胞分裂。桉木叶肉原生质体供给腐胺 0.05mM 可促进细胞分裂和群落形成,供给亚精胺 0.025mM 微有促进作用,提高浓度,则反而抑制,因此多胺的供应必须经过充分试验。

6.9 碳源

培养基中糖的供应一方面起到碳源作用,另一方面又起到渗压剂作用。不同的糖作用也不同,最常见的是蔗糖和葡萄糖,一般说来,作为渗压剂葡萄糖比蔗糖好,比较稳定,因为蔗糖在细胞中会降解成单糖而引起渗透值的上下波动。材料不同所用的糖的最适浓度也相差很大。蕃茄叶肉原生质体培养供给蔗糖 1.5% 最好,因此,在原生质体培养时要注意糖浓度的选择,一般说来,逐步降低糖浓度有利于原生质体形成愈伤组织,猕猴桃叶片愈伤组织的原生质体进行培养时逐步降低糖浓度才能形成愈伤组织,这表明糖浓度要求并非固定不变。

6.10 激素

在原生质体培养中,经常使用的激素是生长素和细胞分裂素。

6.10.1 生长素 生长素主要是先进行分裂启动,并诱导持续分裂。烟草叶肉原生质体不供给 2,4-D 细胞不能持续分裂。蕃茄叶肉原生质体供给 ZAA 0.5mg/l, 2,4-D 1.0mg/l, BA 0.5mg/l 的基础上用 8E 培养基时,植板率为 25%,用 MS 培养基时植板率仅 2%,可见无机盐供应状况显著影响激素的效应。白菜原生质体供应 NAA,细胞生长快但形成的愈伤组织质地松软,供应 2,4-D 0.5mg/l 时愈伤组织质地致密。因此,不同的生长素还会影响愈伤组织的质地。一般说来,单独供给一种生长素就可促进分裂,但要注意配合条件,如 pH 值、接种密度、培养基种类等等。

6.10.2 细胞分裂素 细胞分裂素的作用是影响生长、促进细胞分裂、抑制衰老。但单独供给细胞分裂素往往不能诱导细胞分裂。如紫羊茅的原生质体培养供给 KT、BA、玉米素都不能诱导分裂,小叶旱烟茎的愈伤组织的原生质体,单独供给 KT 不能诱导分裂,因此在分裂启动时,2,4-D、ZAA 是必要的,在此基础上添加细胞分裂素则有利,如马铃薯原生质体培养时,添加 BA 可得到较高植板率。但也有报告柑桔原生质体培养时供应 NAA 或 2,4-D 时添加 KT 0.1mg/l 反而使植板率下降,因此,在原生质体培养过程中要注意激素的供应和搭配。几乎

所有单子叶植物的原生质体培养开始时都有2,4-D, 2,4-D与细胞分裂素的组合是最常见的。

6.10.3 ABA 在原生质体培养过程中,细胞分裂困难的原因之一往往在于高渗下内源ABA上升。在培养初期,细胞内源ABA较高,ABA抑制了细胞分裂,但玉米悬浮培养物的原生质体形成愈伤组织以后,加入ABA 0.2mg/l, 2,4-D 0.1mg/l,可提高愈伤组织质量,有利于组织的胚胎发生。柱形苹果在质壁分离的高渗溶液处理时只有经过0.1mM ABA处理的愈伤组织才能分化成苗,则ABA又对愈伤组织的分化起了重要作用。

6.11 维生素

一般, B₆的供应可能不利于细胞分裂,如蕃茄叶肉原生质体,去除B₆可提高植板率,肌醇的供给往往对培养有利,肌醇因与细胞壁形成有关而有利于分裂。龙葵叶肉原生质体不供给肌醇时细胞不分裂,供给250mg/l肌醇,则细胞分裂数明显增加。此外,蕃茄叶肉原生质体在脱壁时供给肌醇,可明显提高原生质体植板率。

6.12 其它附加成分

在原生质体培养中,为了使原生质体保持稳定,并能积极分裂,往往加入一些附加成分,常见的有DMSO、BSA、MES、PVP等。DMSO能促进某些物质的积累,从而加速组织形成。紫羊茅悬浮培养物的原生质体在培养基中添加DMSO 2%可促进细胞分裂和愈伤组织的形成。MES主要起稳定剂作用,葡萄叶片原生质体脱壁时,MES加入酶液中是必要的,以维持pH值稳定,保护脱壁环境。此外,在原生质体培养中,常常会出现褐化现象,如魔芋叶柄的原生质体加入PVP,可防止褐化。在细胞脱壁以后,随着培养的天数的增加,往往RNase酶活性异常升高,导致原生质体解体死亡。加入BSA,可有效降低KNase酶活性,从而保证原生质体的活力,如香石竹叶片愈伤组织原生质体,加入BSA 0.1%可提高原生质体活力。此外,还有活性炭、香豆素、葡聚糖、硫酸钾等物质的添加也可能对培养有利,要根据材料而决定。

6.13 环境因子

原生质体培养不仅受培养基的各种物质的影响,还受环境因子的影响,其中渗透值不仅影响原生质体的活力,还影响植板率。如烟草叶肉原生质体培养植板率为89%,添加甘露醇则植板率可达99%。水稻愈伤组织的原生质体渗透值对形成群落是至关重要的。pH值的影响也很大,水飞蓟愈伤组织的原生质体,pH值下降使群落的持续生长停止。pH值不仅影响细胞的分裂和群落形成,还影响某些物质的运输,小麦叶肉原生质体,随pH值上升而磷吸收下降。此外,氧气的供应对培养效果影响也很大,一般采用振荡培养,以促进氧气溶解进入培养基。棉花愈伤组织原生质体,转速为40rpm时溶氧率最高。目前,经常采用Ficoll漂浮培养,使培养物漂浮在液面,扩大氧气的吸收面积,冬油菜原生质体用2%Ficoll漂浮培养时,分裂频率最好。也有的采用薄层培养,目的之一是扩大气体交换。此外,温度和光照也是重要的环境因子,应根据不同材料,不同器官进行试验。

综上所述,原生质体复壁后能否进行分裂,及能否进行持续分裂是原生质体培养的首要关键,禾谷类叶肉原生质体培养至今不能再生植株的关键在于细胞不能持续分裂,因此,在进行原生质体培养时,参考有关文献提供的线索时,要充分考虑各种因素的影响,力求为原生质体复壁后细胞持续分裂、生长提供最佳条件。

(参考文献略)