甘蔗原生质体的分离、培养与愈伤组织的形成

颜秋生　　李向辉
（中国科学院遗传研究所，北京）

禾本科作物原生质体的分离和培养，是国内外公认的难题，也是生产实践中急待解决的一项技术．近十年来，各国科学工作者在禾本科作物原生质体培养方面进行过许多尝试，已取得了一些不寻常的进展[1-8]，特别是珍珠谷（*Pennisetum americanum*）原生质体的胚胎发生和小植株的形成[9]，已证实禾本科作物原生质体的全能性和胚胎发生能力，它鼓舞人们在禾本科作物原生质体研究上应作出更大的努力，以期使体细胞杂交和遗传饰变技术能早日用于作物改良．甘蔗（*Saccharum officinarum*）是一种重要的经济作物，其原生质体的分离与培养国外虽已有几篇报道[10-13]，但只能形成小细胞团．本文报道由甘蔗悬浮培养细胞分离的原生质体，能持续进行细胞分裂，经多次重复可形成大量愈伤组织的试验结果．

材料和方法

1. 材料　供试用的甘蔗愈伤组织是由台糖 134 的花粉植株叶外植体产生的．将愈伤组织转移到稍加修改的 MS[14]固体培养基（表 1）上，在 25±2℃ 散射光下培养，每隔 20—25 天转移一次．使用了继代培养 10 个月以后的愈伤组织．再将上述松软的愈伤组织（约 2—3 克）转移到内盛 20—30 毫升细胞悬浮培养基（表 1）的 100 毫升三角瓶中，放在每分钟 80 次的往复振荡器上，在上述相同的条件下培养，每隔 7—10 天继代培养一次，这样可以提供快速生长的细胞培养物．

2. 原生质体的分离　在无菌条件下，将培养 3—5 天的悬浮培养细胞，经 100—120 微米不锈钢滤网过滤，收集下沉的细胞．把大约 500 毫克的新鲜细胞加到 8—10 毫升的酶混合物的渗透溶液中．该溶液的组成为：1.5% 国产纤维素酶（上海酒精二厂产品）或 2% Onozuka R-10 纤维素酶（日本 Kinki Yakult 产品）、0.05% Pectolyase Y-23 浸软酶（日本 Seishin pharmaceutical 产品）、10m*M* $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ · 0.5% MES（2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid）和 0.5*M* 甘露醇，pH5.5，用微孔滤器（滤膜孔径为 0.45 微米）过滤灭菌．细胞置于酶溶液后，在 25±2℃ 黑暗条件下保温 22—24 小时，原生质体-酶混合液用 80 和 50 微米不锈钢滤网过滤，以除去未经酶解的细胞及其它细胞残渣．滤液用 500 转/分的速度离心 3—5 分钟，使原生质体沉降，去除上清液．再用含有 10m*M* $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 的 0.5*M* 甘露醇洗涤两次，最后用原生质体培养基 I（表 1）洗涤一次，即可供培养．

3. 原生质体的培养　以 2—5 × 10^4 个/毫升密度的原生质体接种到直径 4 厘米的培养

本文 1982 年 12 月 3 日收到．

瓶中，每瓶接 1 毫升，用橡皮塞塞住瓶口，放在 23±2℃ 和每天约 16 小时散射光条件下培养。每次实验至少接种两瓶。用倒置显微镜观察原生质体的发育过程。培养后，当原生质体持续分裂时，应在培养物中多次加入除去甘露醇的原生质体培养基 II（表 1）。最后，当原生质体培养物长到约 0.5 毫米大小愈伤组织时，可转到愈伤组织继代培养基上进行培养。

表 1　愈伤组织、悬浮细胞和原生质体培养基的组成（毫克/升）

培养基成份	愈伤组织继代培养基	细胞悬浮培养基	原生质体培养基	
			I	II
大量元素 微量元素	同 MS	同 MS	同 MS	同 MS
肌醇	100	100	100	100
烟酸	0.5		0.5	0.5
盐酸吡哆素	0.5		0.5	0.5
盐酸硫胺素	0.1	1	0.1	0.1
甘氨酸	2.0		2.0	2.0
水解酪蛋白	500		500	500
椰子乳		10%		
2,4-D	2	2—3	2	0.4
蔗糖	3%	3—5%	2%	3%
甘露醇			0.40*M*	
琼脂	0.7—0.8%			
pH*	5.8—6.0			

* 均为热压消毒前用 1*N* KOH 调整到的数值。

结果和讨论

用上述两种纤维素酶，同时加有 0.05% Pectolyase Y-23 浸软酶，均能从甘蔗培养细胞分离出大量有活力的原生质体（图 1）。把悬浮培养细胞放在酶溶液中，在 25±2℃ 黑暗条件经受长时间（通常是 22—24 小时，有时长达 30 小时）的处理，这样不仅可以释放出更多的易存活的原生质体，而且在分离出来的原生质体群中仅混有个别未去壁的老细胞。当把不能去壁的老细胞接种到原生质体培养基 II 或细胞悬浮培养基中后，它们都不能进行细胞分裂，通常在培养后 2—3 天内坏死或解体，这与 Vasil 在珍珠谷原生质体的培养试验中的结果是一致的[9]。

甘蔗原生质体的释放明显与所用的愈伤组织和悬浮培养细胞的质量有关。在我们的试验条件下，经继代培养 10 个月以后的愈伤组织，把它转移到细胞悬浮培养基中振荡培养，再继代 3—5 次后，使用了转移后 3—5 天的细胞培养物，这种迅速增殖的细胞最适于分离原生质体。

原生质体经 2—3 天培养后，出现两类显然不同的形态，一类原生质体个大、高度液泡化，通常在培养后 5—6 天内解体；另一类原生质体个小、细胞质稠密，在培养后一周内体积增大变为卵圆形（图 2），这表明已经再生了新的细胞壁，并能观察到均等的一次分裂（图 3）及不规则的分裂。培养后 2 周，有些原生质体再生的细胞已分裂 2—3 次（图 4、5），一旦细胞分裂以后，只要培养条件恒定，便能持续分裂下去。通常在培养后 3 周产生大量小细胞团（图 6），此时应在培养物中加入 0.1 毫升除去甘露醇和降低生长素浓度的原生质体培养基 II。培养后 4—5

周，当形成大细胞团(图 7)时，在培养物中再次加入原生质体培养基 II 0.2 毫升．再隔 7—10 天，当产生大量大细胞团时，可将这些大细胞团分数次转移到愈伤组织继代培养基上，而在余下的细胞团中再加入 0.5—1 毫升原生质体培养基 II．转移后的大细胞团，约 2—3 周后，便形成肉眼可见的愈伤组织 (图 8)．当把这些小愈伤组织再一次转移到同样的培养基上，约一个月后，便发育成较大的愈伤组织 (图 9)．目前我们正将这种愈伤组织转移到多种条件培养基上，诱导胚性细胞的产生，作进一步分化试验．

根据我们多次重复实验结果表明：接种后存活的原生质体的密度（不低于 10^4 个/毫升），

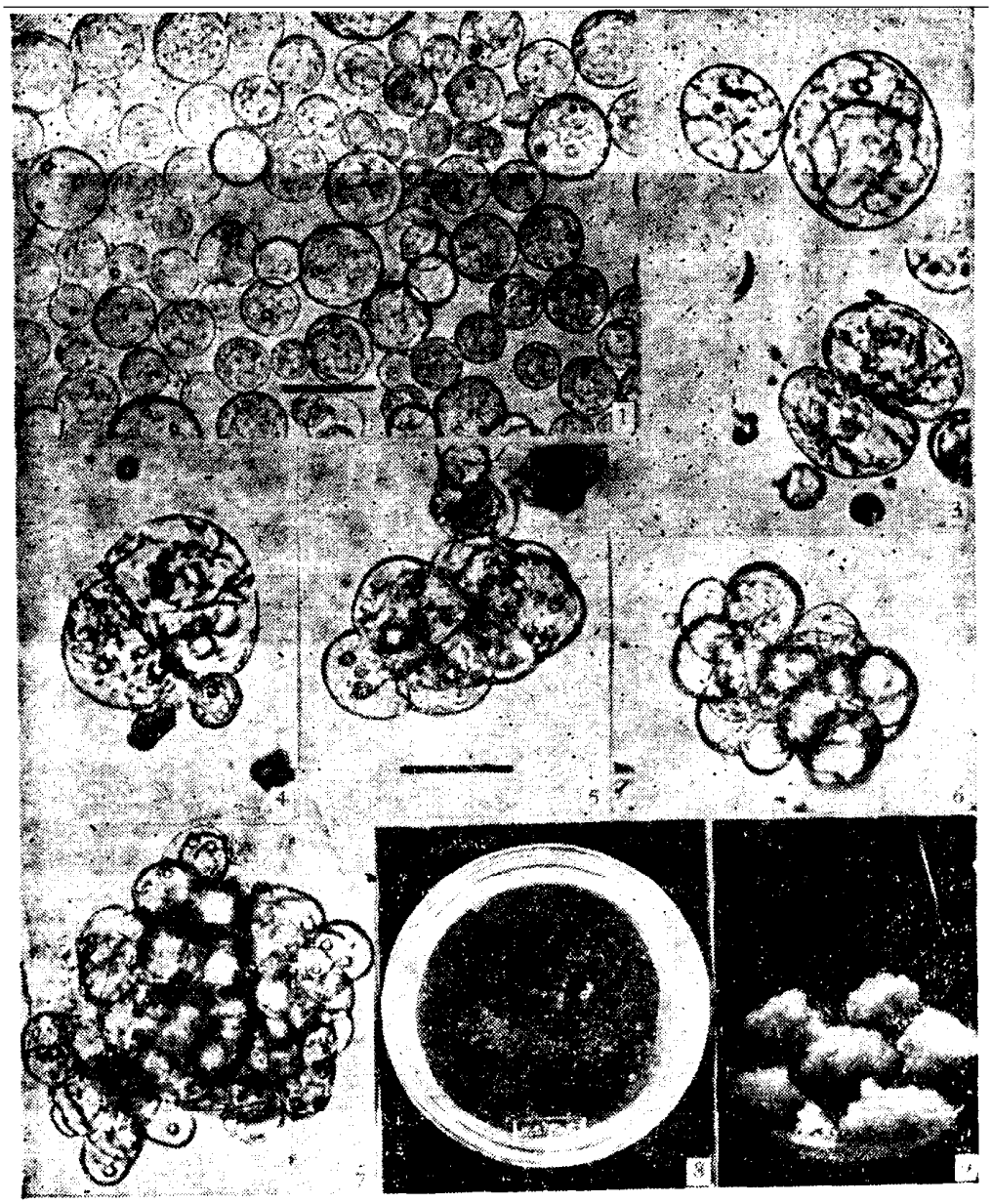

图 1-9

1.从甘蔗悬浮细胞新分离的原生质体(标尺线＝50μm)； 2.培养后一周内，原生质体体积增大变为卵圆形； 3.再生细胞的第一次分裂；4、5.再生细胞的 2—3 次分裂；6.由原生质体产生的小细胞团； 7.由原生质体形成的大细胞团 (2、3、4、6、7 与 5 标尺线相同＝50μm)； 8.植板到固体培养基后，形成肉眼可见的愈伤组织； 9、来自甘蔗原生质体的愈伤组织

是保证原生质体分裂的前提．欲使已开始分裂的原生质体能持续的分裂下去，培养的条件，特别是温度，是重要的因素，培养物在温度稍低（21—23℃）的条件下培养，有利于再生细胞的持续分裂，这也是在愈伤组织和悬浮培养细胞的继代培养中，以及原生质体培养的全过程中，防止多元酚污染，使甘蔗原生质体培养能得到可重复结果的关键．

致谢：承本所陈正华同志提供甘蔗愈伤材料，并与作者进行有益的讨论；在试验材料的继代培养过程中，曾得到张雪琴、魏荣瑄同志的帮助，在此一并致谢．

参　考　文　献

[1] 中国科学院北京植物研究所细胞杂交组、细胞生化组，中国科学，1975，6:602—605.
[2] 蔡起贵等，植物学报，20(1978)，97—103.
[3] Deka, P. C. & Sen, S. K., *Molec. Gen. Genet.*, 145(1976), 239—243.
[4] Potrykus, I. et al., *Theor. Appl. Genet.*. 54(1979), 209—214.
[5] Chourey, P. S. & Zurawski, D. B., *ibid.*, 59(1981), 341—344.
[6] Brar, D. S. et al., *Z. Pflanzenphysiol.*, 96(1980), 269—275.
[7] Koblitz, H., *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 170(1976). 287—293.
[8] Jones, M. G. K. & Dale, P. J., *Z. Pflanzenphysiol*, 105(1982), 267—274.
[9] Vasil, V. & Vasil, I. K., *Theor. Appl. Genet.*, 56(1980), 97—99.
[10] Maretski, A. & Nickell, L. G., *Colloq. Internat. C. N. R. S.*, Paris, 212(1973), 51—63.
[11] Krishnanurthi, M., *Euphytica*, 25(1976), 145—150.
[12] Evans, D. A., *Z. Pflanzenphysiol.*, 98(1980), 355—358.
[13] Larkin, P. J., *Plant Cell Tissue Culture*, 1(1982), 149—164.
[14] Murashige, T. & Skoog. F., Physiol. Plant, 15(1962), 473—479.