中 国 科 学
1984 年 11 月 B 辑 第 11 期

高等植物根原生质体的分离和培养*

许 智 宏
(中国科学院上海植物生理研究所)

M. R. Davey E. C. Cocking
(英国 Nottingham 大学植物系)

摘 要

本文由 12 种植物，其中包括 8 种豆科植物(绿豆、黑绿豆、大豆、豌豆、木豆、蚕豆、苜蓿和胡卢巴)和 4 种十字花科植物(油菜、本油菜、甘兰和白芥)的萌发种子的幼根分离得到了根原生质体．根原生质体在培养中表现出活跃的分裂能力．除了在木豆和蚕豆中仅观察到细胞分裂外，其余 10 种植物的根原生质体均形成了愈伤组织．其中苜蓿根原生质体通过形成胚状体再生了植株，而油菜和甘兰的根原生质体通过愈伤组织诱导成芽也再生了植株，由此证明了根原生质体的全能性．这为那些在分离或培养原生质体方面仍存在困难的植物种提供了另一可供选择的系统．本文还讨论了这一系统的优点以及存在的问题．

自从六十年代初 Cocking 用酶法成功地分离高等植物的原生质体以来，原生质体分离和培养的研究已有了很大的发展，原生质体技术越来越多地被用于植物细胞的遗传操作、细胞生理和植物病毒等研究之中[1]．

萌发种子和幼苗的初生根，由于材料一致及易于获得，乃是分离原生质体的良好材料．事实上，用酶法分离高等植物原生质体的最早的报道即是用蕃茄萌发种子的幼根做的．然而，长期以来，绝大多数有关原生质体分离和培养的研究均是用叶片和悬浮培养细胞或愈伤组织作材料进行的，仅有很少的研究有关根原生质体的分离和培养[2]．

由于很多重要的作物，特别是豆科和谷禾类作物，在原生质体分离和培养方面仍存在不少困难，使作者感到必须建立和发展新的实验系统，以寻求解决问题的途径．为此在继绿豆根原生质体培养成功之后，我们先后用分属豆科和十字花科的 12 种不同的植物进行了比较试验，以确定根原生质体技术的适用范围，本文拟将这方面的研究作一概括的报道，并讨论这一系统的特点和存在的问题．

一、材料和方法

本文所试验的材料有 8 种豆科植物：木豆 (*Cajanus cajan*)、大豆 (*Glycine max* cv. Fis-

本文 1983 年 12 月 22 日收到．
* 本工作完成于英国 Nottingham 大学植物系植物遗传操作研究组．

keby5)、苜蓿 (*Medicago sativa*)、绿豆 (*Phaseolus aureus* cv. Pism-2 和若干市售商品种子)、黑绿豆 (*Phaseolus mungo*)、豌豆 (*Pisum sativum* cv. Onward)、胡卢巴 (*Trigonella foenum-graecum*)、蚕豆 (*Vicia faba*)，和 4 种十字花科植物：油菜 (*Brassica napus* cv. Primor)、本油菜 (*Brassica campestris* cv. Snowball)、甘兰 (*Brassica oleracea* cv. Greyhound) 和白芥 (*Sinapsis alba*, 或 *Brassica alba*)。

种子表面消毒后，除了绿豆、黑绿豆和豌豆在无菌水中萌发外，其它种材料在含 0.2% 蔗糖的琼脂培养基上萌发[2-4]，获得所需合适的根尖材料的时间随所试的种子不同各异：除绿豆仅需 24h，木豆和大豆需 3d 外，其余种子一般需 2d 左右。

待萌发种子的幼根长到约 1cm 长时，切取幼根，并切成长为 0.5—1.0mm 的切段，置于 CPW-13M 溶液[5]中约 1h 以使之质壁分离，随后换入酶溶液，内含 2%(W/V) 半纤维素酶 (Rhozyme)、4% 纤维素酶 (Meicelase) 和 0.3% 果胶酶 (Macerozyme)，其它成分与 CPW-13M 相同。在水平式摇床 (60rpm，25℃) 上放置 16—18h。酶解后，通过一尼龙网 (孔径 64μ)，随后滤液在 100g 下离心 10min。弃上清液(酶溶液)后，原生质体重新悬浮于 CPW-21S 溶液 (含 21% 蔗糖，其它成分与 CPW-13M 相同)之中，随后在 100g 下离心 5min。将漂浮在溶液顶部的原生质体吸出后，以 CFW-13M 用离心方法清洗 2 次后换入培养用的培养基[2]，大豆和蚕豆的根原生质体由于在 CPW-21S 中漂浮并不理想，不少原生质体在离心后仍悬浮在上清液中，所以改将内含原生质体的上清液 (在 CPW-21S 溶液中) 全部吸出后，再加入等量的 CPW18M，然后，在 120g 下离心 10min，使其中的原生质体沉下[3]，随后的步骤与前法同。原生质体在 56 × 14mm 塑料培养皿中作浅层液体培养，或液体/琼脂培养基双层培养。培养原生质体的密度在 2.0—2.5 × 10^4/ml，温度在 23℃ 下进行。

根原生质体培养的培养基主要有：(1) 改良的 B5 培养基 (B5P)，每升内含对氯苯氧乙酸 (CPA) 和 6-苄基嘌呤 (BAP) 各 1mg，另加 7% 甘露醇和 3% 蔗糖 (B5P7M) 或仅加 7% 葡萄糖 (B5P7G)；(2) KM8P 和 KM8P/KM8(V/V2:1)[6]；(3) Kao 的原生质体培养基的改良配方 KP[7]。

二、结果和讨论

用上述含有纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶的混合酶溶液，由所试的 12 种材料均得到了相当数量的原生质体(表 1)，尤其是绿豆、黑绿豆和大豆，以每克鲜重计算，即使在用蔗糖溶液漂浮清洗后，仍可得到达 10^6 数量级的原生质体。对于根原生质体的分离，在酶溶液中加入半纤维素酶是重要的。在用绿豆根做的预备试验中已观察到如仅用纤维素酶和果胶酶分离根原生质体，产量很低，这与用玉米根分离原生质体的情况相似[8,9]。

根原生质体群体表现出明显的异质性，这与 Cocking 早年在蕃茄根原生质体所观察到的情况相似，它们通常由具稠密原生质的较小的原生质体 (由根尖幼嫩部分产生)和较大的液泡化了的原生质体(由幼根中比较分化的细胞形成)组成 (图版 I，1，2)。这种异质性也给试图用漂浮法纯化原生质体带来一定的困难，结果往往使相当多的，甚至大多数原生质体在纯化过程中丢失。所试的各种植物的根原生质体的培养情况见表 2。根原生质体在培养中的特点是开始细胞分裂较快，分裂频率高，绿豆、大豆、苜蓿的根原生质体通常在 24h 后即可观察到有相当多的原生质体已开始分裂 (图版 I，3，4)，这显然与幼根本身是一细胞处于活跃分裂的器

表 1 由初生根分离原生质体的产量

植物种类	原生质体产量		
	酶解后克鲜重根 $\times10^3$	原生质体纯化后	
		克鲜重根 $\times10^3$	每根的平均原生质体产量 $\times10^3$
豆 科			
Cajanus cajan	未称量		1.8—5.0
Glycine max	50.0	12.0	9.0—32.0
Medicago sativa	17.0—24.0	2.0—9.0	0.9—3.7
Phaseolus aureus	80.0—90.0	20.0—30.0	20.0—30.0
P. mungo	80.0—90.0	20.0—30.0	22.5—30.0
Pisum sativum	10.0	2.0—8.0	5.0—20.0
Trigonella foenun-graecum	20.0	1.0—2.5	1.2—2.9
Vicia faba	25.0	2.0—3.0	12.0—18.0
十字花科			
Brassica alba	10.0—20.0	3.0—6.0	1.5—3.0
B. campestris	10.0—20.0	1.2—2.4	0.6—1.2
B. napus	10.0—20.0	1.2—3.0	0.6—1.5
B. oleracea	10.0—20.0	1.2—4.0	0.6—2.0

表 2 根原生质体培养

植物种类	原生质体培养基	第一次分裂所需的时间	植板率(%)	培养中再生的类型
豆科				
Cajanus cajan	KM8P, KP(L)*	3d		仅细胞分裂
Glycine max	B5P7M(L)	24—48h	8—30	愈伤组织,根
Medicago sativa	KP(L)	24—48h	9—12	愈伤组织,胚状体,根
Phaseolus aureus	B5P7M, B5P7G, KM8P (L 或 L/A*)	24—48h	15—31	愈伤组织,根
P. mungo	B5P7G(L)	48h	5—8	愈伤组织,根
Pisum sativum	B5P7G(L/A)	2—3d	未统计	愈伤组织
Trigonella foenun-graecum	KM8P/KM8(2:1) (L 或 L/A)	3—4d	7—10	愈伤组织,根,类似胚状体的结构**
Vicia faba	KM8P/KM8(2:1) (L)	3d		仅细胞分裂
十字花科				
Brassica alba	KM8P(L)	2—3d	1—4	愈伤组织
B. campestris	KM8P, KP(L)	2—3d	5—8	愈伤组织,根
B. napus	KM8P, KP(L)	2—3d	15—22	愈伤组织,芽,根
B. oleracea	KM8P, KP(L)	2—3d	9—20	愈伤组织,芽,根

* L-液体培养基, L/A-液体/琼脂双层培养基.

** 在个别情况中,当将原生质体形成的组织移到附加 0.5mg/l BAP 和 0.05mg/l NAA 的 MS 琼脂培养基上时,形成类似胚状体的结构,但未能进一步发育.

官有关. 同时根分生组织中细胞分裂周期又是植物体中所有分生组织中最短的[10], 这可能也是导致上述结果的原因之一.

在花药培养中，低温预处理对于诱导小孢子分裂转向孢子体发育途径，表现出有明显的促进作用[11]．为了验证低温处理对根原生质体培养影响，我们用绿豆作材料，在种子萌发 24h 后将发芽的种子移到 7℃ 冰箱中放置 2d 或 4d，随后用新鲜萌发的种子的幼根作对照． 结果表明在分离原生质体的产量上并没有什么差异，但低温处理，尤其是处理 2d 者，明显提高根原生质体分裂的频率(表 3)． 这种分裂频率的提高可能与低温使分裂相对同步有关．

表 3　低温预处理对绿豆根原生质体分裂的影响(培养 7d 后原生质体分裂的百分率)

培　养　基	低温预处理的时间 (d)		
	0	2	4
B5P7M(L/A)	14.0	18.0	24.5
B5P7G(L/A)	13.0	30.5	17.0

表 4　肌醇对根原生质体分裂的影响(培养 7d 后原生质体分裂的百分率)

植　物　种　类	培　养　基	分裂频率(%)
Brassica napus	KM8P	23.5
	KM8P + I*	37.5
Glycine max	B5P7M	8.3
	B5P7M + I*	14.7
Phaseolus aureus	B5P7G	19.0
	B5P7G + I*	28.0

* I——m-肌醇，1000mg/l.

在绿豆根原生质体培养中我们已发现肌醇对细胞分裂具有明显的促进作用[2]，进一步用油菜和大豆根原生质体进行试验得到了类似的结果(表 4)． 在龙葵叶肉细胞原生质体的培养中，也已观察到这种效应[12]． 在花药或花粉培养中高浓度的肌醇对烟草胚状体的形成[13]以及大麦多细胞花粉形成愈伤组织[14]也有明显的促进作用．长期以来，肌醇一直被认为是一种维生素，但其在分子水平上的机理仍不清楚． 在植物的幼苗组织及花药中已发现有活跃的将肌醇转化为 UDP-D-葡萄糖醛酸，随后成为细胞壁多糖的酶系[15]． 有意思的是在鼠的纤维细胞培养中肌醇可以抑制秋水仙碱中止细胞分裂的效应[16]．多年前，在洋葱根尖中观察到类似的效应[17]，但对此结果有争论[18]．虽然要从上述有限的报告得出结论还为时过早，但是对于肌醇与细胞分裂的关系，特别是与微管系统的关系无疑值得进一步研究．

在所试验的 12 种植物中，除了木豆和蚕豆，在有限的实验中仅观察到细胞分裂外，在其它大多数种中，由于迅速细胞分裂的结果，通常在很短时期内 (5—7d) 即可形成相当大的细胞团(图版 I, 5)，进而形成愈伤组织．在从马铃薯离体诱导形成的根分离的原生质体培养中[1)]以及在 *Nicotiana*, *Brassica*[19] 和苜蓿[20]的子叶原生质体的培养中均已观察到很快形成的细胞团．然而，在本试验条件下，豌豆和白芥的细胞团和愈伤组织生长仍比较缓慢．

在根的原生质体培养中，由于分裂开始得早，所以必须及时加入新鲜培养基，并降低培养基的渗透压[2-4]，否则细胞团往往易褐化而停止分裂和生长．由绿豆、黑绿豆、大豆、胡卢巴、本

1) T. Barsby，私人通信．

油菜根原生质体形成的愈伤组织仅再生了根. 油菜、甘兰的愈伤组织用类似于油菜花药愈伤组织分化成苗的顺序分化[22],随后再生成完整植株 (图版 I, 8), 分化频率分别为20% 和10% 左右. 苜蓿根原生质体培养,与其叶原生质体培养相似[23,24],在液体培养基中即形成胚状体(图版I, 6, 7), 有意思的是在苜蓿根原生质体培养中,渗透压不能减低太快, 所以仍必须添加比较高渗的新鲜培养基 (KP/KC 1:1; KC-Kao 的细胞培养基[7]). 如直接用 KC 稀释不能形成胚状体,而只产生愈伤组织.当将子叶期的胚状体移到附加 0.5mg/l BAP 和 0.05mg/l NAA 的 MS[25] 琼脂培养基上,随后再转到无激素的 MS 基本培养基上, 即长成正常植株. 至今有关根原生质体的培养,除了在胡萝卜肉质根这一特殊情况中通过胚状体形成了再生植株外[21], 本工作从油菜、甘兰和苜蓿的萌发种子的正常幼根分离得到的原生质体的培养中再生得到了植株,由此进一步证明了根原生质体保持有全能性.

综合我们的实验可见,利用萌发种子(或幼苗)的幼根分离原生质体的优点在于: (1)作为实验材料的幼根可以在 2—3d, 甚至更短时间内(用绿豆仅需 1d) 获得,(2)种子萌发的条件易于控制,这保证了实验材料的一致性, (3) 根原生质体由于是从分生组织或尚未成熟的组织分离得到的,故表现出比之于叶肉原生质体易诱导分裂,(4)由根原生质体形成的组织,至少在一些种中表现出具有全能性. 由于根原生质体是由植物体上的幼根直接分离的, 所以比之由经反复继代培养的愈伤组织或培养细胞分离的原生质体,有可能较易于诱导分化.

当然,这一系统在一些方面也仍有待改进. 目前存在的主要问题是: (1)对于种子小的植物,要获得足够数量的根以分离原生质体有一定困难. 用这些植物的根分离原生质体,产量通常也较低. (2)有些植物的种子难于消毒,特别当微生物侵入种皮内时更是如此, 结果易于造成污染. 试验表明在酶溶液中加入抗菌素,可在一定程度上减少污染[3]. (3) 根原生质体的异质性,造成在纯化过程中有相当多的原生质体的丢失,在这方面仍有待发展有效的原生质体纯化的技术,如用 Ficoll 或 Percoll, 或蔗糖密度梯度等,以增加最终纯化后的原生质体产量.

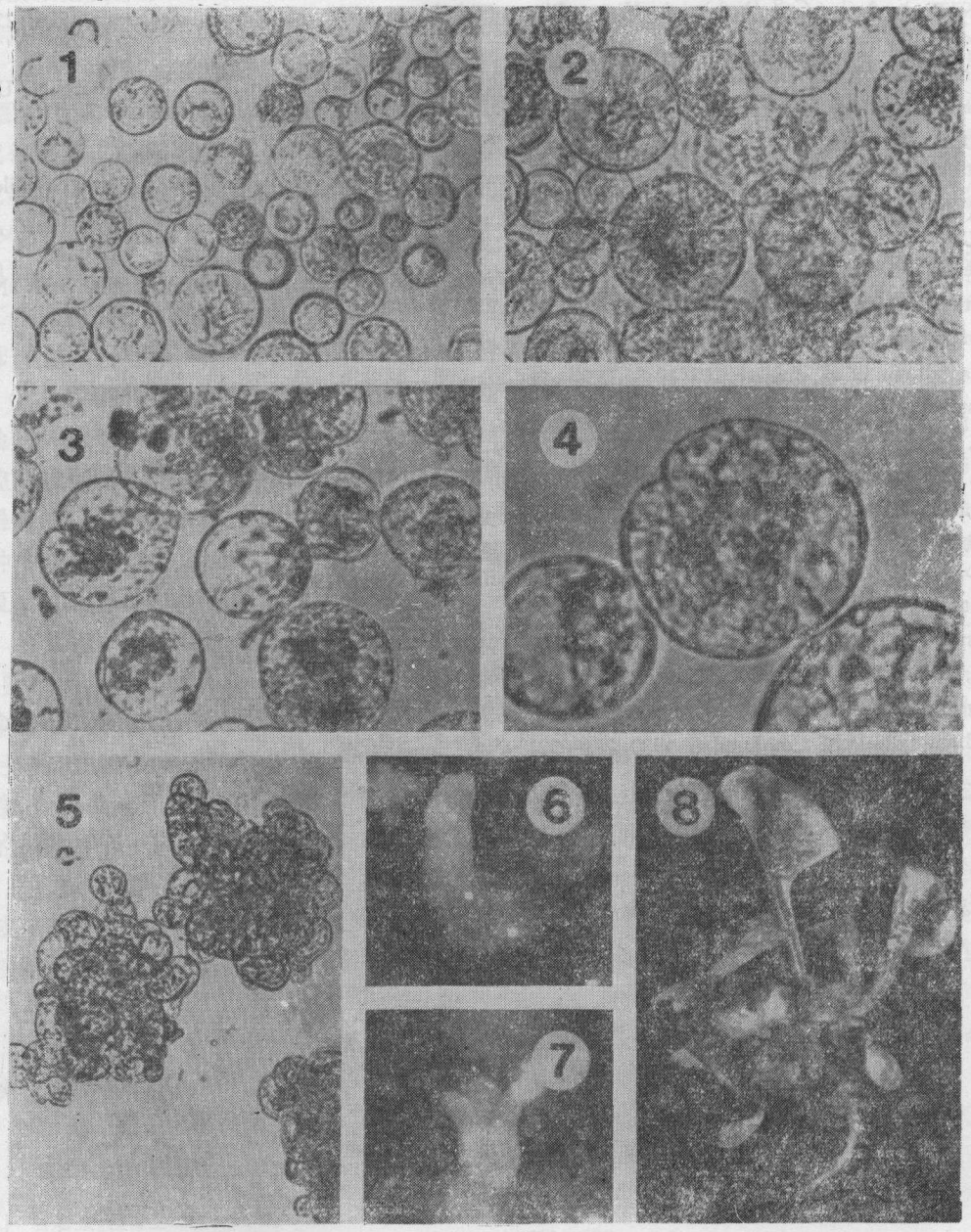
总之, 根原生质体为植物原生质体研究提供了另一可供选择的系统, 这对于那些用叶组织或培养细胞来分离和培养原生质体仍存在困难的植物种可能更有意义. 根原生质体除了用于细胞水平上的遗传操作外,对于根细胞的生理[8,26] 以及共生固氮[27] 研究也是有用的.

本研究得到中国科学院、英国皇家学会和农业研究委员会的支持,并承 B. V. Case 和陈乃先协助摄影,附此一并致谢.

参 考 文 献

[1] 许智宏,植物生理生化进展, 1984, 4: (印刷中).
[2] Xu, Z-H. et al., *Z. Pflanzenphysiol.*, **104** (1981), 289—298.
[3] Xu, Z-H. et al., *Plant Sci. Lett.*, **24**(1982), 111—115.
[4] Xu, Z-H. et al., *ibid.*, **24**(1982), 117—119.
[5] Power, J. B. and Davey, M. R., Laboratory Manual: *Plant Protoplasts* (Isolation, Fusion, Culture, Genetic Transformation), Dept. of Bot., Univ. of Nottingham, 1979.
[6] Kao, K. N. and Michayluk, M. R., *Planta*, **126**(1975), 105—110.
[7] Kao, K. N., *Molec. Gen. Genet.*, **150**(1977), 225—230.
[8] Lin, W., *Plant Physiol.*, **66**(1980), 550—554.

[9] Sen, A. and Pilet, P. E., *Z. Pflanzenphysiol.*, **100**(1980), 299—310.
[10] Clowes, F. A. L., *Cell Division in Higher Plants* (Ed. Yeoman, M. M.), Academic Press, 1976, 253—284.
[11] Sunderland, N., *Differentiation in Vitro* (Eds. Yeoman, M. M. and Truman, D. E. S.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1981, 1—24.
[12] 王光远、夏钲澳，植物学报，**25**(1983)，111—114.
[13] Nitsch, C., *Haploids in Higher Plants: Advances and Potential* (Ed. Kasha, K. J.), Univ. of Glelph Press, 1974, 123—135.
[14] Xu, Z-H. and Sunderland, N., *Plant Sci. Lett.*, **23**(1981), 161—168.
[15] Loewus, F. et al., *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides* (Ed. Loewus, F.), Academic Press, New York and London, 1—27.
[16] Lymberopoulos, G. and Hawthorne, J. N., *Exp. Celi Res.*, **129**(1980), 409—414.
[17] Chargaff, E., et al., *Science*, **108**(1948), 556—558.
[18] Pasternak, T., *The Cyclitols, Hermann, Paris*, 1965, 318—319.
[19] Lu, D-Y. et al., Z. *Pflanzenphysiol.*, **107**(1982), 59—63.
[20] Lu, D-Y. et al., *Plant Sci. Lett.*, **31**(1983), 87—99.
[21] Kameya, T. and Uchimiya, H., *Planta*, **103**(1972), 356—360.
[22] 上海植物生理研究所细胞生理室、上海市南汇县农科所，遗传学报，**4**(1977)，311—315.
[23] Kao, K. N. and Michayluk, M. R., *Z. Pflanzenphysiol.*, **96**(1980), 135—141.
[24] Santos, A. V. P. dos, *ibid.*, **99**(1980), 261—270.
[25] Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant.*, **15**(1962), 473—497.
[26] Sen, A. and Pilet, P. E., *Z. Pflanzenphysiol.*, **102**(1981), 19—32.
[27] Davey, M. R. and Cocking, E. C., *Recect Advances in Biological Nitrogen Fixation* (Ed. Rao, S. S.), Oxford and IBH Publ. Co., London, 1980, 281—324.



1.新鲜分离的苜蓿根原生质体. ×300
2.新鲜分离的甘兰根原生质体. ×300
3.培养 24h 后的大豆根原生质体，已分裂. ×300
4.培养 24h 后的绿豆根原生质体，已分裂. ×600
5.培养 6d 后的甘兰根原生质体形成的细胞团. ×150
6,7.由苜蓿根原生质体再生的组织形成胚状体. ×10
8.由甘兰根原生质体形成的愈伤组织再生出苗. ×5