

# 原生质体的生理特性与原生质体技术

刘 丽 君

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

植物原生质体作为一个实验系统的可能性已越来越被证实。在过去三十年里,原生质体的研究多集中在基因应用上。其中一个研究方向是植物微器官、细胞染色体、及某些器官原生质的植入;另一个研究方向就是原生质体融合;体细胞杂交及外源DNA的植入。然而人们却忽视了原生质体生理特性方面的有关问题,已发表的论文多集中在原生质体的生物学和细胞学特性的研究上。目前,虽然在植物上做到了原生质体的分离和再生,并在原生质体的获得和处理上已取得了很大的进展,但还有许多植物种类的原生质体分离和再生尚未成功。原生质体的再生目前仍处在一个实验和探索的阶段,尽管人们可以分离出大量活的原生质体,然而再生方面仍缺少一个有效的原生质体再生系统。因此,揭示原生质体技术中的一些生理问题,对于深入了解原生质体的生理特性与原生质体之间的关系,深入开展原生质体培养、再生、融合等实验具有重要的指导意义,因为这些生理反应对于原生质体的分裂和它们生活力的强弱起着决定性的作用。

## 一、原生质体技术的生理问题

原生质体在基因操作的各个方面的应用上已取得了明显的进展。然而,人们已逐渐认识到,对原生质体生理特性的详细了解,将极大地增强人们在这一方面的能力。研究者们都支持在细胞水平上进行研究比在组

织、器官或个体水平上的研究有其优点。这些优点在原生质体技术研究中也是适用的。利用酶法分离出来的原生质体在某些特性上可直接类比它的母体细胞,那么反过来,细胞和从这个细胞中提取出来的原生质体之间是否能进行平行类比分析呢?要解决这些特殊且基本的问题,就必须注意细胞和原生质体生理特性之间是否存在直接关系。有实验证明:原生质体的原生质同其母体细胞有着完全不同的特性。例如:原生质体没有壁,原生质体能融合在一起的能力就是原生质体形成过程中原生质所获得新特性的一个结果。有人提出原生质体分离使细胞从原来分化状态转入脱分化状态,部分遗传信息和翻译会终止,某些遗传性状的表达会被激活。但也有人提出:在合适的条件下制得的原生质体能在物质运输方面较好地保留原组织的一些性状。由此可见,这方面的工作还较少,需要进一步做有关物质吸收方面的生理生化研究。

将植物原生质体作为一个研究系统有许多优点:如从原生质体中可分析到原生质的化学结构(类脂、蛋白质、酶等)和物理特性(表面变化、质子压、离子泵、渗透性);原生质体有许多衍生系统,从原生质体中可制备出亚原生质体象胞质体、微质体、核质体等,为细胞器的制备和核质关系的研究提供了许多有利材料,当原生质体再生成新壁时,又可观察到它们的超微结构和它们的生化反应,这些都比在完整细胞中更容易一些。原生质体技术在禾谷类作物和豆类植物

上的应用上受到限制,人们还不能从分离部分再生出植株。存在的问题之一就是我们还 没有能力从禾谷类作物和豆类植物中诱导和分离出原生质体,并使之达到永久分离,从而也使细胞分离(特别是高度分离的细胞)受到阻碍。研究原生质体分离和永久分离的工作者们大多并没有注重细胞壁再生的研究。Burgess(1983年)一直着重于细胞壁再生中可逆抑制剂的应用,如香豆素等,用香豆素去处理烟草的原生质体,在48小时内无纤维物质出现,但原生质膜的表面确长出许多小突起。他认为这些抑制剂对于原生质体状态的延长和原生质体群体的同步是一种有用的工具。最近几年,许多研究者都对原生质体的稳定性很感兴趣。Shillito等人(1983年)提出在培养基(琼脂)中培养不仅可以很明显地促进原生质体再生植株,而且在不适宜培养条件下也会保持分离,这一实验表明,这种稳定性可明显地推迟了原生质体衰老的出现(Sehnabl等1983年)。因此,这些基础生理生化方面的研究极有助于解释存在一些因素控制着细胞分离的诱导频率。

原生质体的培养除注意选择环境条件(光、温、pH值)以外,同时也不可忽视生理方面问题的研究,如筛选培养基所用的有机和无机营养元素,维生素以及生长调节剂等。这些必须经过反复实验,才能提供出有关细胞壁形成,延伸以及膜和胞基质所需新物质合成方面的资料。目前,关于原生质体培养和再生方案的制定较复杂,多凭借经验。这主要是由于对原生质体愈伤组织全能性表达的基本生化、生理和解剖学等因素的了解甚少。因此,使得这一实验变得棘手。

## 二、原生质体分离中酶的特性问题

成功的提取一定数量和质量的原生质体,不仅取决于植物种类,所用的植物组织以及组织的幼嫩程度,同时也取决于分离培

养基的种类(性质)。随着原生质体作为实验系统的普及,分离培养基中各种酶成分的应用也变得很普遍了,但在所用酶化物特性及其它“附加成分”特性方面的知识并未取得同样的进展。为此,人们迫切需要有关酶的特殊产物对原生质体数量和生理产生影响的数据。

Cocking(1972年)认为,目前用于原生质体分离的酶化物是一些组成成分尚不详细的产品,如Cellulysin,虽然目前有一些介绍其性质的材料,但工厂的产品说明书很少详细的说明这些产品的纯化过程,只是用纤维素单位表明其活性而已,如将许多同类产品一同对待,是不恰当的。Weyers(1983年)提出纤维素酶能完全降解植物表皮组织的细胞壁,但是对于这些组织,仅用一种酶进行原生质体的分离却没有作用(Lin 1980年)。目前,在游离原生质体中,使用一种或多种的交叉混合酶液均不能游离出不同叶龄叶片组织中的叶肉细胞的原生质体,只有采用适当浓度的混合酶液才可游离出大量的原生质体。根据资料报道,在双子叶草本植物的叶片中(烟草、蚕豆、马铃薯)脱壁时需用纤维素酶和少量的果胶酶,要求加速解离时,可采用Driselase纤维素酶,分解时需用蜗牛酶。在分离材料时常要加上半纤维素酶。

Guy(1978年)Randall,Ruesink(1983年)提出利用一种加入渗化剂混合物的分离培养基就可获得原生质体,或采用酶络合物或其它附加物来分离,如牛血清蛋白(BSA)、二巯苏糖醇(DTT),蛋白酶抑制剂苯甲基硫代氟和二异丙基氟磷酸(DIFP)。这些化学物质对原生质体分离数量和生理方面的实际影响以及它们的特殊功效尚不十分清楚,然而确有许多学者支持在原生质体分离培养基中加某种特殊化合物会增加原生质体产量的论点。

Wareling(1982年)指出在比较细胞和他们原生质体的生理特性时不可忽视的一点就是大多数细胞在分离后会失去对一些激素,

特别是对一些生长激素的反应能力,因此实验中,必须注意细胞表皮和细胞壁质壁分离时所用的酶。酶制剂的活性和纯度影响原生质体的质量和产量。目前常将酶制剂用过凝胶柱子的形式使酶液脱盐纯化,酶制剂中常含有一种核糖酸酶,此酶能影响原生质体的活力。所以,人们常用降低保温的温度或减少酶解时间的方法来提高原生质体的活力。

### 三、原生质体中的膜生理

原生质体能否再生受植物原生质体再生效率高低的影 响,也取决于同分离方法有关的胁迫条件。分离后的植物原生质体,特别是原生质膜暴露在各种高渗溶液下时,质膜仍有做为选择屏障,规则运输和获得信息的功能。如果原生质膜没有高度适应各种胁迫条件的能力,以上那些规律性是做不到的。然而,要获得有关胁迫生理中有关膜形成理论的唯一途径就得通过实验来验证。Hartmann和Hock(1985年)研究了在原生质体分离诱导下和原生质体再生期间类脂代谢和类脂类型上的变化,指出植物组织中脂肪酸类型上的变化经常受环境胁迫的影响。零度以下的低温将导致植物体内多聚不饱和脂肪酸的增加,这种代谢主要发生在结构类脂上,它是膜流动性处于最适情况下的直接结果(Breidenbach Radwan, et al 1978年)。水和渗透胁迫也导致多聚不饱和脂肪酸的减少和膜类脂的调整。(Ketes 1982年, Douglas和Paley 1981年)。Fluidity报道温度改变时,质膜上磷脂状态的改变可以影响质膜构型和流动性。然而,有关分离过程中原生质体对类脂类型以及对原生质体再生调节期间类脂类型修饰方面的数据报道极少。

原生质体融合,首先发生的是膜融合。共分四个时期:接触、诱导、融合和稳定,其

中 $\text{Ca}^{++}$ 、ATP及三磷酸腺苷酶参与调节膜融合的变化,融合体的筛选、培养以及融合体互补选择系统的建立,都需要做有关膜生理方面的工作。因此,研究原生质体膜生理的工作对原生质体再生系统的建立具有启蒙意义。

原生质体技术已引起世界各国的广泛重视,并成为生物技术研究的重要内容之一。今日的科学,就是明天的技术。原生质体技术必将在生产上发挥巨大的经济效益,现在看来,这只是一个时间上的问题。虽然植物原生质体融合和细胞杂交可能成为育种的途径之一,但它不可能取代已行之有效的有性杂交以及由此衍生而来有关的育种方法。目前,它正处在一个探索阶段,要利用这种途径培养出在生产上适用,性状优良的品种,还需做大量和艰巨的理论及技术问题的探讨。原生质体的培养、融合和细胞杂交,细胞器引入以及基因工程等研究都涉及到原生质体。原生质体生理特性方面的研究是这些工作的基础,它给研究者们带来了许多新问题,这些问题的解决必定为原生质体技术的应用奠定坚实的理论基础。

### 主要参考文献

- [1] Paul-Emile Pilet, (The Physiological Properties of Plant Protoplasts, 1985 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
- [2] Lshii S, Mogi Y (1983), Protoplasts, Birkhauser Basel P6
- [3] Randall SK, Rue sink AW (1983), Plant Physiol (Bethesda) 73: 385~391
- [4] Wareing PF (1982) The molecular biology of Plant development P 517~541
- [5] Nagata T, Melchers G (1983) Planta (Berl) 142: 235~278