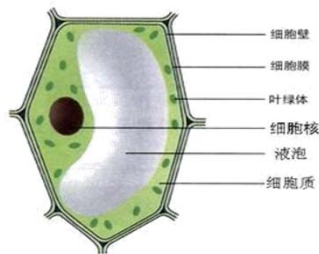




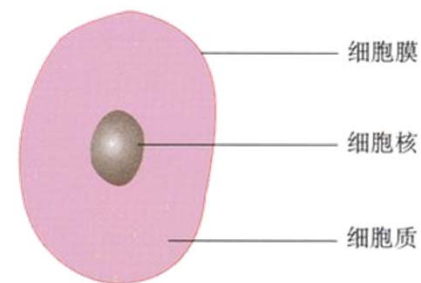
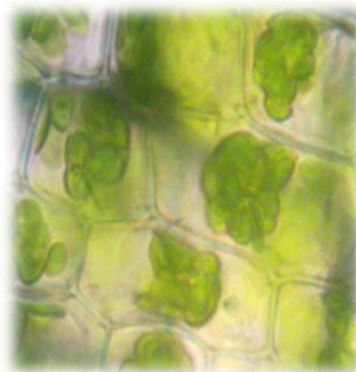
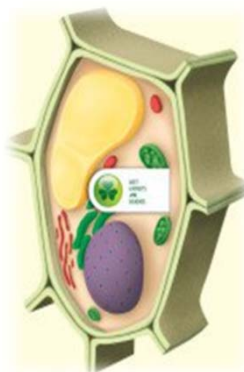
山東農業大學
SHANDONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

植物细胞杂交技术

山东农业大学生命科学学院

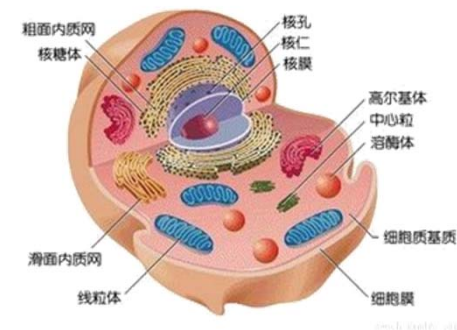
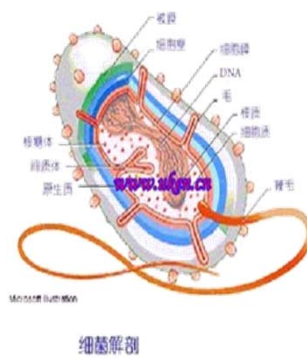
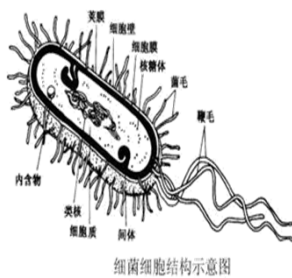


植物



动物

微生物



植物、微生物、动物细胞示意图

- 1. 植物体细胞杂交
- 1960年，植物细胞工程核心技术。
- ①拓宽可利用遗传资源
- 克服植物远缘杂交不亲和性，可利用野生远缘遗传资源，创新种质，改良品种，创造新物种。
- 植物细胞壁是一道天然的机械屏障，其上有活性很强的核酸酶，可阻止外源DNA进入细胞。
- 脱壁后，可避免核酸酶对外源DNA的破坏，原生质体比较容易摄入外源遗传物质。

- ②理想受体
- 遗传转化的理想受体。
- 遗传操作 (细胞或分子水平)的理想实验体系。
- 能广泛摄取各种形式的外来遗传物质 。

◆ 裸露外源DNA

◆ 人工包被DNA

◆ 染色体

◆ 病毒

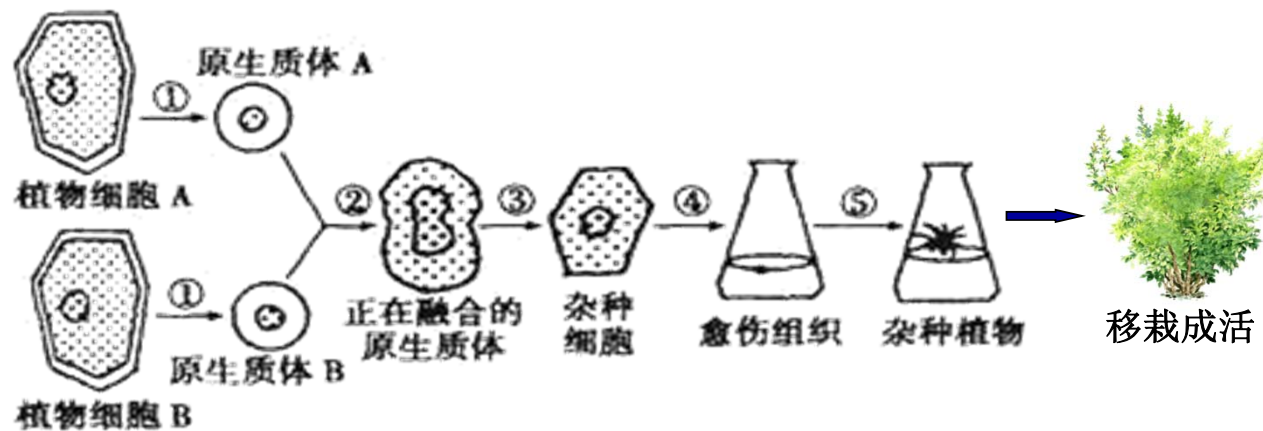
◆ 细胞器

◆ 细胞等

- 2. 原生质体

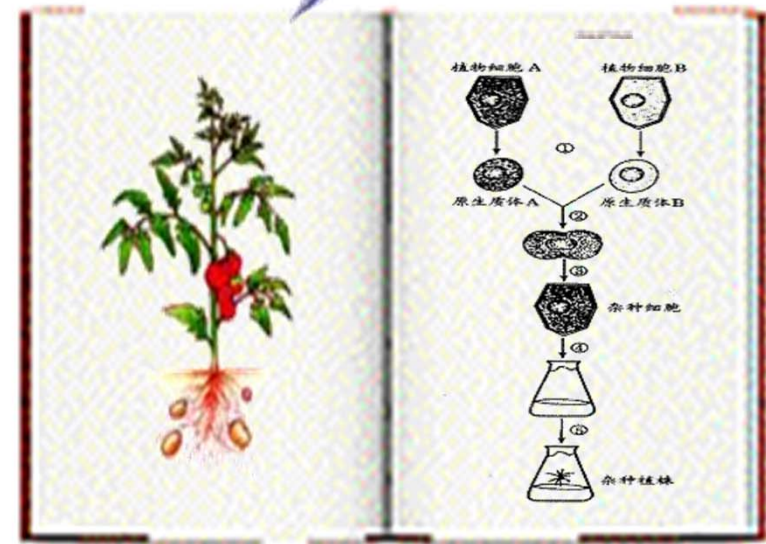
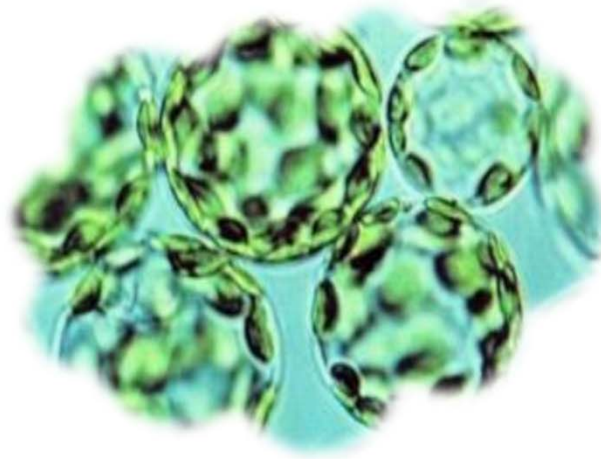
- 脱去细胞壁的裸露的有生活力的原生质团。

- **或：**植物与微生物细胞去掉细胞壁、动物细胞消化去掉包裹在其外面的粘性物质后剩下的由细胞膜及其所包含的全部细胞内含物质的总称。



• 3. 融合子

- 原生质体失去了细胞壁的机械屏障，彼此足够靠近时就会发生粘连融合成为一体。
- 根据融合发生的情况与机理，可分为自发性融合和人工诱导融合。



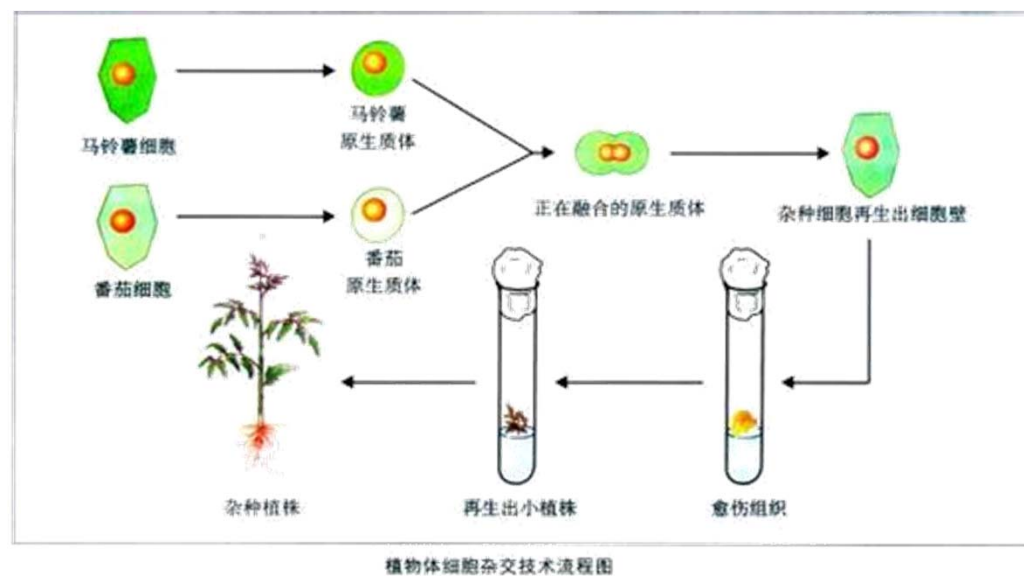
- 4. 自发融合 (同种融合. 同源融合. 自体融合)
- 在分离培养原生质体过程中，两个或多个原生质体会发生自然融合。
- 相邻细胞之间的原生质体本来就通过胞间连丝连接着，当细胞壁溶解后，胞间连丝就发生收缩，使两个原生质体相互靠近粘连融合。

对实践应用的启示

- 如果把原生质体单独分离出来，破坏胞间连丝而使其失去胞间连丝的牵引力，相邻的原生质体就不能克服相互之间的排斥力，无法无限接近，很难发生自发融合。
- 自发融合为同源融合，融合频率很低。但是若发生在人工诱导实验体系中，则会产生很大的不良影响。

• 5. 诱导融合

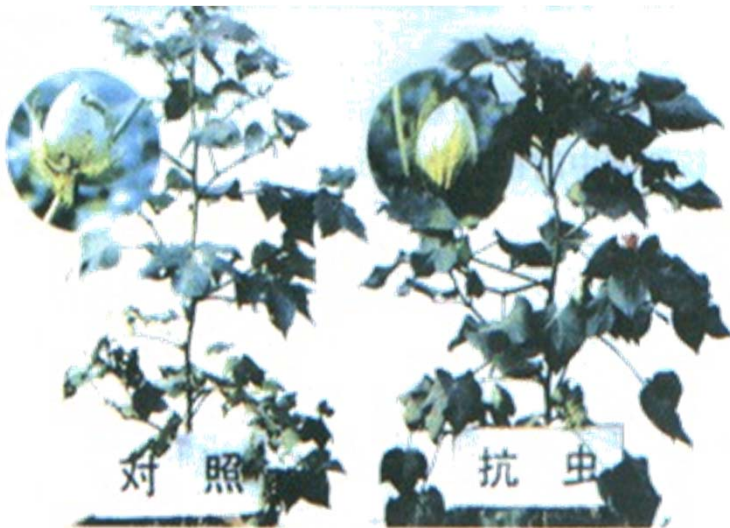
- 用诱导剂(或其它因子)诱导(或胁迫)两个(或多个)原生质体之间发生融合。
- 原生质体依靠外界因子的助力，克服彼此间的排斥力，相互无限接近，实现融合。
- 诱导融合可发生在任何两个(种内. 种间. 属间. 科间. 界间)原生质体之间。



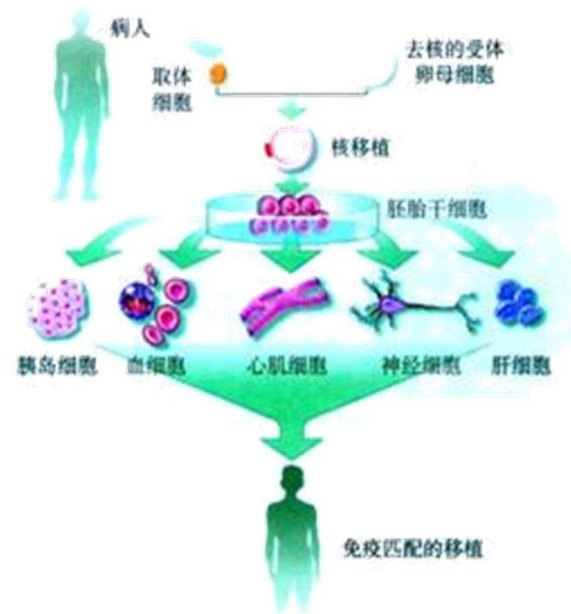
诱导融合(即人工融合, 或异源融合)

• 6. 重要事件

- 1960年，首次利用纤维素酶等从番茄根细胞分离获得了原生质体。
- 1971年，培养烟草叶肉细胞原生质体获得再生植株，首次证实原生质体全能性。

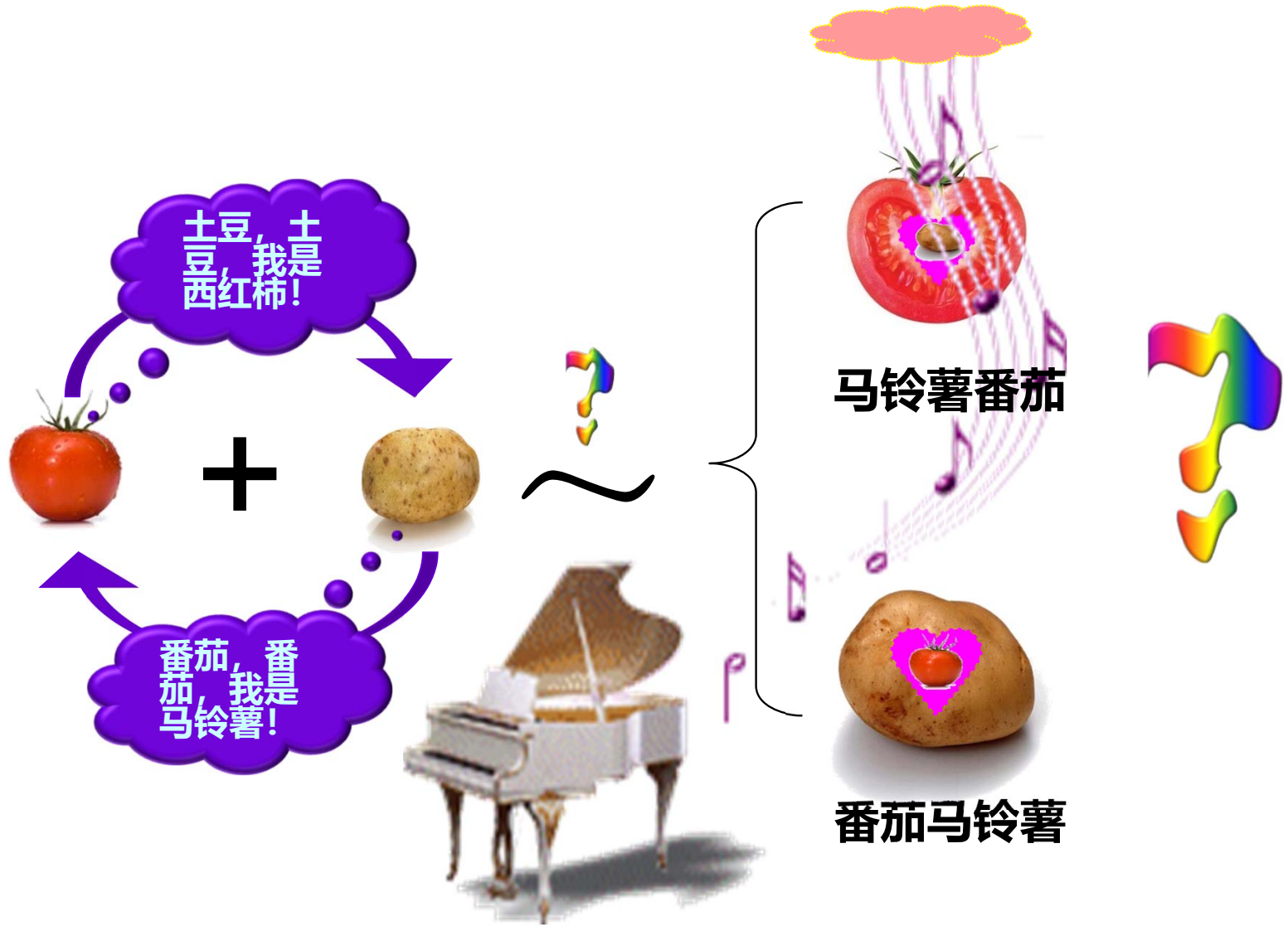


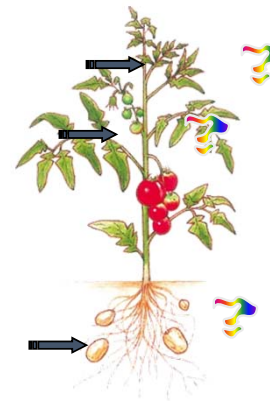
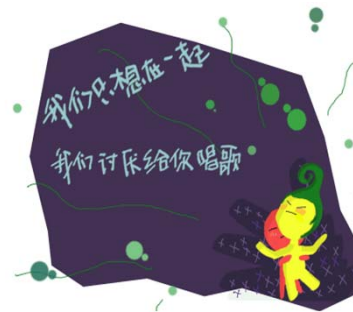
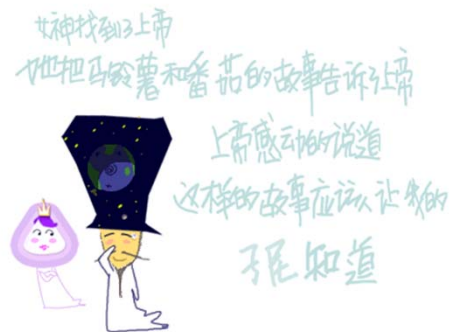
抗虫棉试验结果的照片



体细胞核移植技术用于人类疾病治疗

- 1972年，利用原生质体融合技术，首次获得两种不同烟草体细胞杂种。
- 1974年，开发出了PEG融合方法。
- 1978年，把马铃薯和番茄的原生质体融合获得体细胞杂种 — **马铃薯番茄**。
- 1981年，研究开发出了高压脉冲方法，即电融合技术。





应用状况

- 植物原生质体融合技术已经成熟，成为品种改良和创造种质资源的重要途径之一。
- 多种作物已经获得了原生质体再生植株及种间、属间的杂种植株。或用于生产，或为细胞生物学、生理学及体细胞遗传学研究提供新的操作系统。

通过原生质体遗传饰变包括以下环节：

①原生质体分离、培养、再生植株

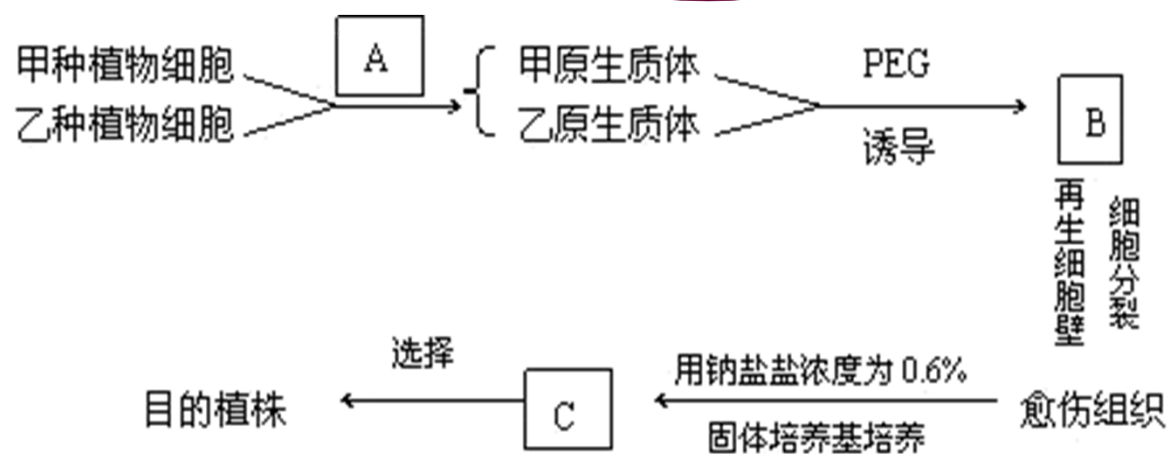
②原生质体融合 (即体细胞杂交)

③外源遗传物质导入原生质体

④筛选与鉴定

遗传转化

细胞及再生植株



第1节 植物原生质体分离技术

一、原生质体的分离

(一) 植物细胞膜电特性和膜电位

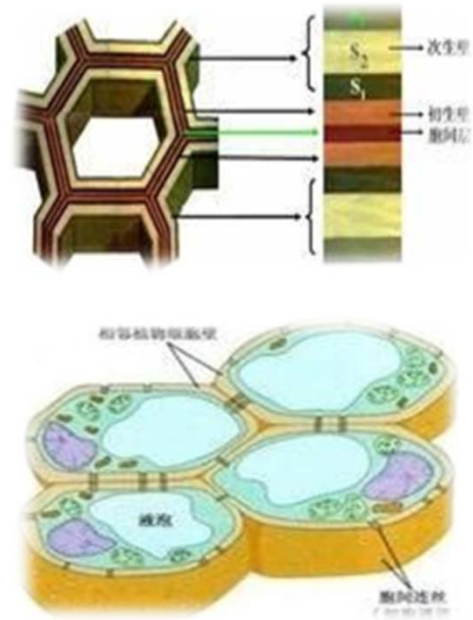
植物细胞膜是由脂类和蛋白质等构成的双层分子层膜，其物理性质类似于一个双电层，细胞膜内外层带同种电荷。

- 不同植物的细胞其膜电位不同。
- 同种植物的细胞倍性不同、外界离子环境不同，其细胞膜电位也不同。

了解植物细胞膜电位特性，对细胞融合研究很有必要。

(二) 植物细胞壁的结构及其化学组成

- 植物细胞壁可分为初生壁和次生壁，相邻两个细胞的初生壁之间存在中层（即胞间层）。



- 1. 初生壁

- ①纤维素

是 $\beta - 1, 4$ 连接的D-葡聚糖，含有不同数量的葡萄糖单位。纤维素化学性质高度稳定，能够耐受酸碱及其他许多溶剂，是一种比较亲水的晶质化合物。

- ②半纤维素

是存在于纤维素分子之间的一类基质多糖，种类很多，如木葡聚糖和胼胝质等。

- ③结构蛋白

细胞壁内的蛋白质，主要包括伸展蛋白、酶和凝集素等。

初生壁(主要成分是纤维素. 半纤维素. 果胶. 少量结构蛋白)

- **2. 次生壁**

- 主要由**纤维素和半纤维素**组成。
- 次生壁分为外层(S1)、中间层(S2)和内层(S3)；分层主要是每层中的微纤维排列方向不同的结果。

- **3. 中层**

- 主要由**果胶酸钙和果胶酸镁的化合物**组成。
- 果胶是一种可塑性好高度亲水的胶体，可使相邻细胞粘在一起，并有缓冲作用，很容易被酸或酶等溶解，导致相邻细胞彼此分离。

- **4. 细胞壁附属结构**

- ①植物某些细胞在特定的生长发育阶段可形成特殊的细胞壁(如：花粉壁由孢粉素的覆盖层和基粒棒层构成花粉外壁外层和外壁内层I, 由纤维素构成外壁内层II及内壁)。
- ②植物细胞壁复杂程度各异(因植物不同、器官组织种类、成熟程度、生理状态而异)。
- ③原生质体分离应选择结构松散的幼嫩组织(最好选用组培苗、愈伤组织或悬浮培养细胞，原生质体产率高活性强，培养后细胞植板率高)。

(三) 降解细胞壁的酶类及降解机理

1. 降解细胞壁的酶类

- 用于植物原生质体分离的酶，根据作用对象不同可分为三类。

- ◆ 纤维素酶类

- ◆ 半纤维素酶类

- ◆ 果胶酶类

•(1) 纤维素酶的商品酶

•主要种类:

- ① Cellulase Onozuka RS
- ② Cellulase Onozuka R-10
- ③ Gk3-867。

- 三种商品酶比较:
- ①和②纯度高, 毒害小;
- ①的活性是②的2倍多;
- ①是理想的纤维素酶;
- ①常用浓度为0.5%~2.0%

•主要组分:

CX (β -1, 4-葡聚糖酶)

能使纤维素分子链分离破坏微纤丝的晶态结构

C1 (含 β -1, 4-葡聚糖纤维二糖水解酶)

β -葡萄糖苷酶等。

催化纤维素分子链水解为葡萄糖

- (2) 半纤维素酶(hemicellulase)的商品酶

- 主要有:

- ①Hemicellulase

- ②RhozymeHP150。

- 主要组分:

- 3-木聚糖酶

- (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase)。

作用于木聚糖主链的木糖苷键而水解木聚糖

- β -甘露聚糖酶

- (1,4- β -D-mannan mannohydrolase)。

作用于甘露聚糖主链的甘露糖苷键而水解甘露聚糖

- 二者均为内切酶，可随机切断主链内的糖苷键而生成寡糖，常用浓度0.1%~0.5%。

- (3) 果胶酶的商品酶

- 主要有：

- ① Maceozyme R-10

- ② Pectolyase Y23

- ③ Pectinase

- 主要组分：

- 解聚酶(又称多聚半乳糖醛酸酶)

能催化以 α -1, 4-键连接的半乳糖醛酸水解为D-半乳糖醛酸，及其二聚物、三聚物等

- 果胶酯酶(又称果胶甲酯酶)

能催化果胶质的甲酯水解成甲醇及其二聚酸

商品酶说明：

②活性最强，是①的近100倍，但处理时间不宜过长，一般不应超过8h。

常用浓度：

①0.2%~2.0%；

②0.05%~0.2%；

③为0.2%~2.0%；杂质多，其酶液过滤除菌前必须离心去除沉淀，否则很难过滤。

- 主要功能：二者均能催化果胶质水解

- 2. 商品酶的纯化

- ①商品酶常含有核酸酶、蛋白质酶、重金属离子等杂质，对原生质体有害。

- 用前，两类纯化方法：

- 过滤洗提纯化 (通过聚丙烯酰胺凝胶或葡聚糖凝胶G25)

- 离心纯化

- 例如，果胶酶一般制剂中，常含有一些有害的水解酶，如：

◆核糖核酸酶

◆蛋白酶

◆脂肪酶

◆过氧化物酶

◆磷脂酶

◆酚和盐等。

- 使用前应离心纯化，实验时并尽量缩短酶解处理时间，以减轻危害。

- ②酶的纯化成本高，粗制商品酶是否要纯化应视实验要求和具体情况而定。
- ③多数情况下，粗制酶也能产生较好效果。
- ④商品酶纯化难度较大。

• 3. 酶的使用

影响酶活性与酶解效果的因素：

- 酶解体系的温度
- 酶解处理的时间
- 酶解处理液的容积
- 酶解组织的量
- 酶解体系的pH值
- 酶的浓度、酶的活性等因素。

- ①酶的活性与pH值有关

- Onozuka纤维素酶R-10和离析酶R-10的最适pH值分别为5~6和4~5, 实际应用时pH值常被调节为4.7~6.0。
- 烟草培养细胞分离原生质体的混合酶液有2个最适pH值: 4.7和5.7。

- ②酶的活性与温度有关

酶活性最适温度一般为40~50℃, 这对细胞来说太高, 一般酶处理在25~30℃为宜。

- ③酶的浓度和持续处理时间

必须经比较试验确定。

- ④组织的量

酶液的容积和植物组织的量之间的相互关系也影响原生质体的产量，一般每1g组织大约用10ml酶液。

- ⑤酶液的活力

酶液可低温保存数日而不失活。但是，时间长效力会下降。

(四) 材料的选择及处理

1. 材料来源

- 供体材料是影响原生质体培养成功与否的关键因素之一，影响原生质体分离效果和培养效果。
- 植物的茎、叶、胚、子叶、下胚轴等器官组织及愈伤组织和悬浮培养细胞均可作实验材料。

- 目前，较多的采用叶片组织来分离原生质体。
- 用叶片制备原生质体，植株的年龄和生长条件很重要。
- 一般在低光照、短日照、温度范围20~25℃氮肥充足条件下的植株效果较好。

- **禾本科植物**

- 禾本科植物的叶片难以获得适合于培养的原生质体，可用其培养物作实验材料。

- **培养材料**

- 分裂旺盛、再分化能力强的胚性愈伤组织或胚性悬浮细胞是最理想的原生质体分离材料。

- **2. 预处理**

- 为提高原生质体的产率和活性，常采用两种预处理方法：

- **①低温+暗处理**

叶片等组织材料，一般在4℃下，暗处理1~2d，原生质体产量高，均匀一致，分裂频率高。

- **②等渗溶液处理**

把材料放在等渗溶液中数小时，再放到酶液中分离原生质体，能提高其产量和活性。

尤其是多酚化合物含量较高的植物，如苹果、梨等，采用这种方法效果好。

(五) 原生质体分离的方法

植物原生质体分离方法：

◆酶分离法 (化学分离法)

◆机械分离法 (物理分离法)

酶分离法目前广泛采用，效果最佳。

- 1. 机械分离法

- ①机械方法

把植物细胞置于适当的质壁分离的介质中，用利刃切割，某些质壁分离的细胞只被切去细胞壁而释放出完整的原生质体。

- ②机械法特点

原生质体产量低，不能满足实验需要。

不适于液泡化程度低的细胞，得不到广泛应用。

避免了有害化学物质等因子对原生质体的伤害。

历史事件

- 1892年，Klercker用机械法，得到 藻类植物细胞 原生质体。
- 1931年，Hofler用机械法，得到 洋葱表皮组织 原生质体。
- 1956年，Whattley用机械法，得到了 甜菜组织 原生质体。

- 2. 酶分离法

- 1960年，德国诺丁汉大学的Cocking 首先用**纤维素酶分离番茄幼苗根尖**获得原生质体，得率高，完整性好，活力强。
- 经过不断完善，目前已成为植物原生质体分离最有效的方法。
- 酶法又分**一步法**和**多步法**。

- (1)一步法

将纤维素酶和果胶酶等配制成混合酶解体系，一次性处理材料，获得原生质体。

※ 操作简便，不易污染。

※ 一次性可获得大量高质量原生质体，满足需要。

※ 广泛应用。

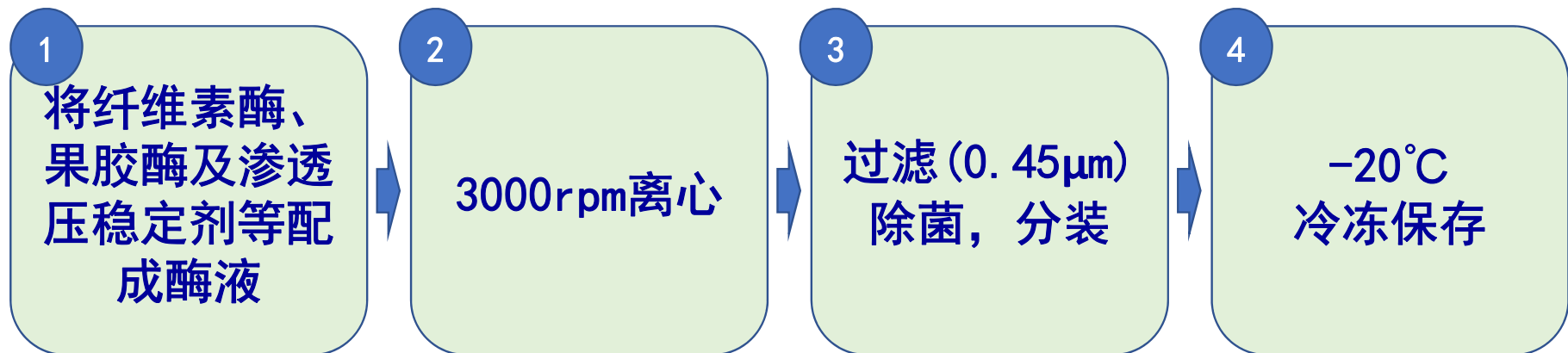
- 实验操作：
- ①取材
- 人工培养物：最好用胚性愈伤组织、悬浮培养细胞、组培苗、**无菌实生苗**；
- 植物有机体：如果是自然环境的植株，应选取生长健壮植株上充分展开的幼嫩叶片，洗涤剂洗涤，流水冲洗，常规消毒和预处理。

无菌实生苗 指利用植物种子经无菌培养萌发获得的无菌苗。

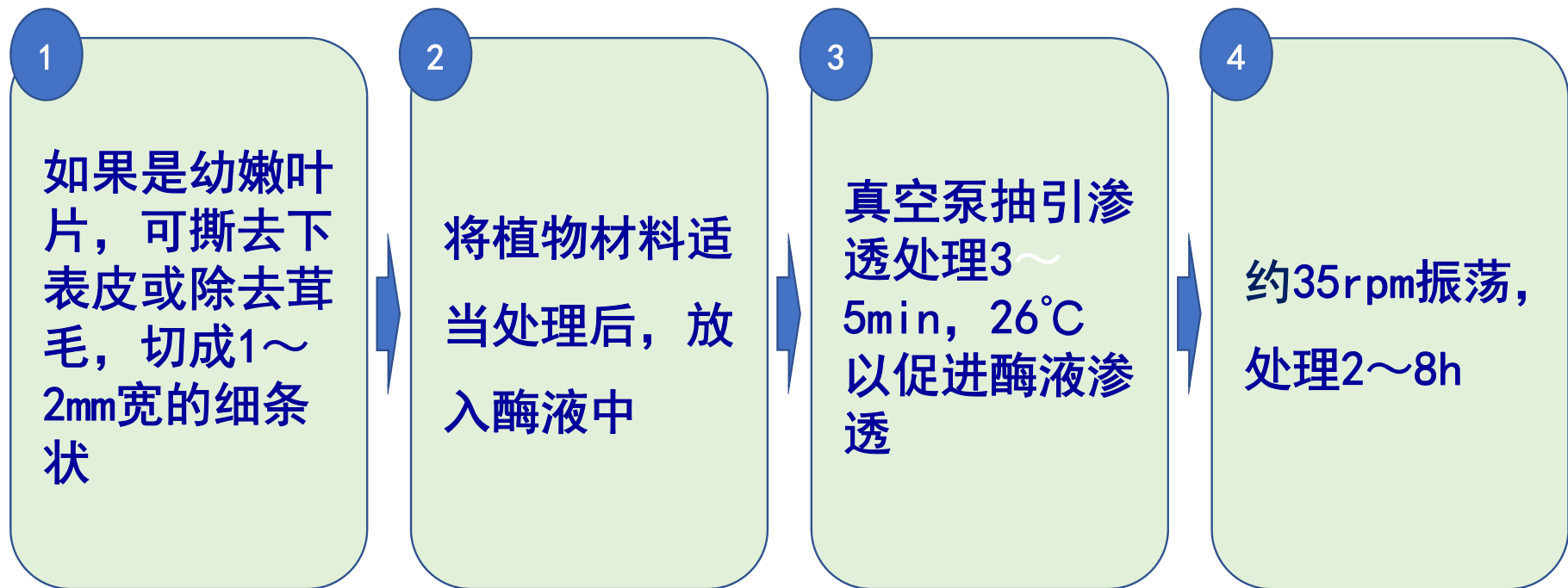
实生苗 广义上泛指由种子萌发形成的植物苗。

- ②酶液配制

- 根据材料确定酶液配方，注意酶种类、配比及酶液pH。
- 一般在酶液中添加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和葡聚糖硫酸钾，提高原生质体膜的稳定性。



• ③酶解处理



- 酶解处理期间，可用解剖针轻轻破碎叶片组织，有利于原生质体的游离释放，提高产量。
- 原生质体分离所用渗透压因植物种类、器官组织不同而异，一般在0.3~0.5M之间。
- 渗透压调节剂一般采用甘露醇，如葡萄叶片原生质体分离所用酶液。

- (2)多步法

- 将果胶酶、纤维素酶等按照实验方案分别配制成酶解处理溶液，依次分别处理材料，分离原生质体。
- 优点：获得的原生质体均匀一致、质量好。
- 缺点：操作比较繁杂，实验环节较多，易引致污染，已逐渐被淘汰。

- **实验操作**

- ①果胶酶处理材料，游离出单细胞。
- ②再用纤维素酶处理单细胞，分离原生质体。
- 酶解法对材料的适应性广泛。

（六）环境渗透压的调节

1. 原生质体的基本属性

- ①渗透破碎性
- 原生质体基本的自然属性之一。
- 原生质体失去了细胞壁的保护与约束，会不断从所处的水环境中吸收水分膨胀，直至细胞膜破碎，因此在酶液、清洗介质、培养基中必须加入适当的物质以调节渗透压。

- ②呈球形外观

- 在具有适当渗透压的溶液中原生质体 呈球形 。
- 原生质体在轻微的高渗溶液中比在等渗溶液中更稳定。较高水平的渗透压调节剂可阻止原生质体 破裂 和 出芽 ，能抑制原生质体的分裂。

- ③全能性

- 原生质体除了没有细胞壁外，它具有活细胞的一切生命活动特征。

- 2. 渗透压调节剂

- 在原生质体操作过程中，用来调节环境渗透压的物质称为 渗透压调节剂。

- 又称：渗透压保护剂
或渗透压稳定剂

简称渗压剂。

- **3. 常用的渗压剂**

- 常用:山梨醇、甘露醇、葡萄糖、果糖、半乳糖等可溶性碳水化合物。
- 山梨醇和甘露醇适宜浓度一般约450~800mM。
- 对烟草原生质体, 葡萄糖、果糖、半乳糖、山梨醇和甘露醇等都有效。

- 用非电解质作渗压剂时，常在酶液中补加某些盐类物质，尤其是 CaCl_2 (50~100mM)，以提高质膜的稳定性。
- 用电解质作渗压剂时 (335mMKCl 和 40mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 能提高原生质体的活力，使产品更纯净。
- 用盐类调节培养基的渗透压是有害的。

二、原生质体的净化

- 经过酶处理后的混合液含有未消化组织、破碎细胞、原生质球、原生质体，以及残余的酶等化学物质。
- 这些物质的存在，会影响后续培养过程中原生质体的生长，影响细胞壁的再生，必须进行纯化，以得到纯净的原生质体。
- 植物原生质体纯化方法主要有三种：沉降法、漂浮法和不连续梯度离心法。



植物原生质体净化方法

酶解混合液
粗过滤

去掉较大的杂质，为进一步净化奠定基础。

沉 降
离心法

漂 浮 离
心法

密度梯度
离 心 法

根据实际需要可以把几种方法结合起来，形成系统性实验方案，构建切实可行的实验技术体系，以获得纯度符合需要的原生质体。

- **1. 沉降法** (亦称过滤离心法)

- **(1)基本原理**

- 沉降法利用比重原理，低速离心使原生质体沉于底部。

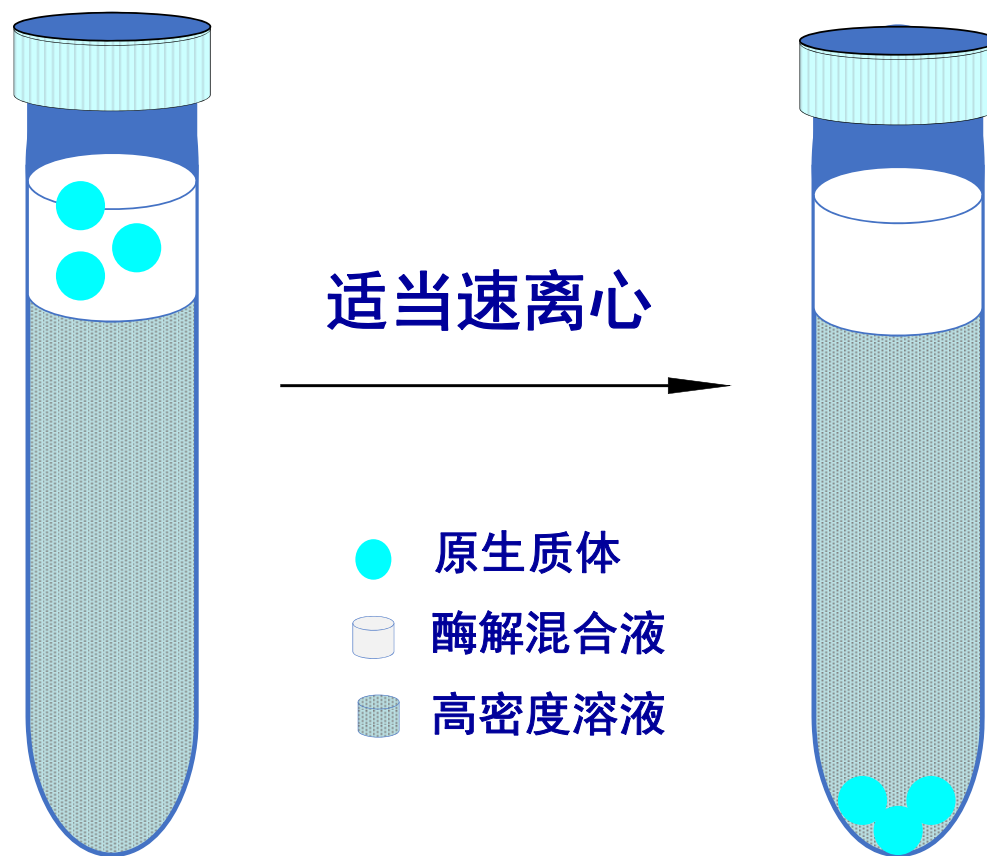
- **(2)方法特点**

纯化收集方便，原生质体丢失少，但原生质体纯度不高。

目前最为广泛采用的方法。

- (3)实验操作

- ①用适当微孔滤膜 (30~40um) 过滤酶混合液，除去未消化的组织细胞等。
- ②低速 (150g) 离心3~5min，沉淀原生质体；弃去含细胞碎片的上清液和酶液。
- ③用液体培养基或甘露醇溶液悬浮洗涤原生质体，重复2~3次。
- ④将原生质体悬浮在1~2mL的液体培养基中。



沉降法示意图

- 2. 漂浮法

- (1)基本原理

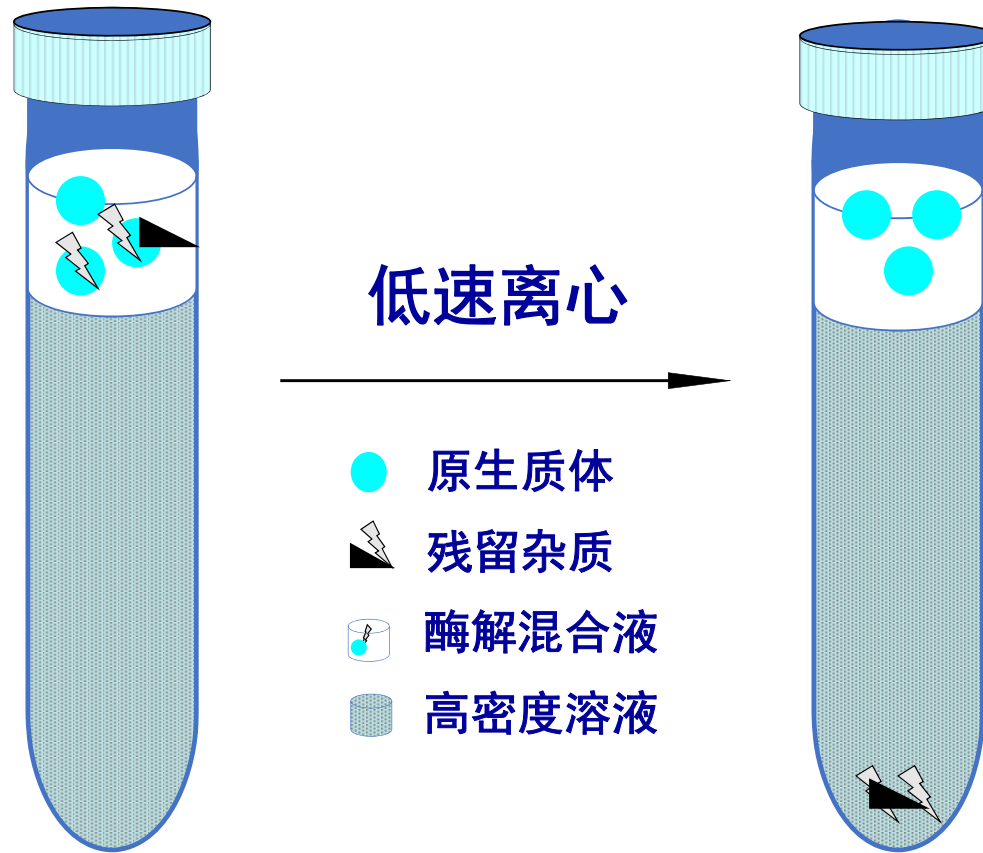
根据原生质体和细胞或细胞碎片的比重不同而分离出原生质体。原生质体的比重较小，在较高浓度的溶液中，离心后会漂浮在液面上。

- (2)方法特点

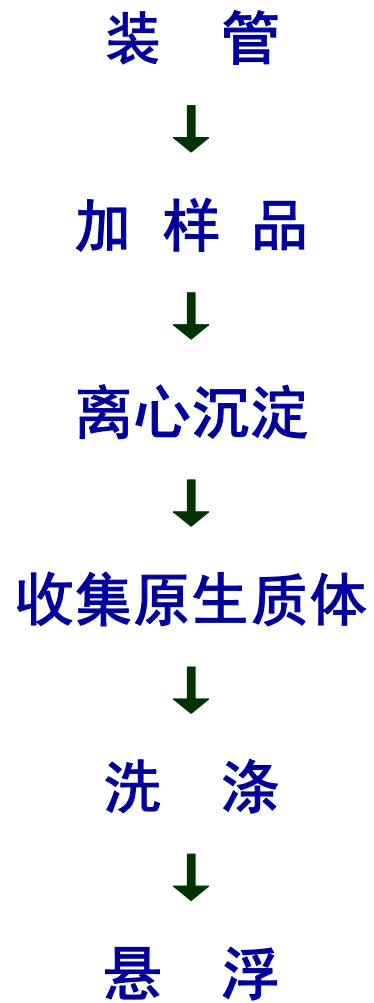
该方法获得的原生质体纯度高，但原生质体的收率较低。

- (3)实验操作

- ①在无菌条件下，把5mL浓度较高的溶液(如20%蔗糖)加入10ml离心管中。
- ②其上滴2ml酶解混合液，用锡箔纸封口。
- ③150g离心5min，细胞或组织残片沉于底部，原生质体浮于液面上。
- ④用吸管收集原生质体液层，用液体培养基或含有 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的甘露醇溶液洗涤2~3次。
- ⑤将原生质体悬浮于2ml液体培养基中。



漂浮法示意图



漂
浮
法
操
作
流
程

- 3. 不连续密度梯度离心法

- (1)基本原理

- 不同颗粒物质的沉降系数不同，在离心力的作用下，分布于相应的不同层次(密度)的液体中，从而分离纯化。

- (2)方法特点

- 该法获得的原生质体大小均匀一致，纯度比较高但操作繁杂，原生质体得率低。

- (3)实验操作

- ①在离心管中放入不同浓度的Ficoll溶液，构成不同的浓度梯度。
- ②在上部滴入1~2ml酶解混合液。
- ③150g离心5min，不同比重的原生质体漂浮在不同的浓度梯度的界面上。
- ④用吸管收集原生质体，悬浮洗涤。

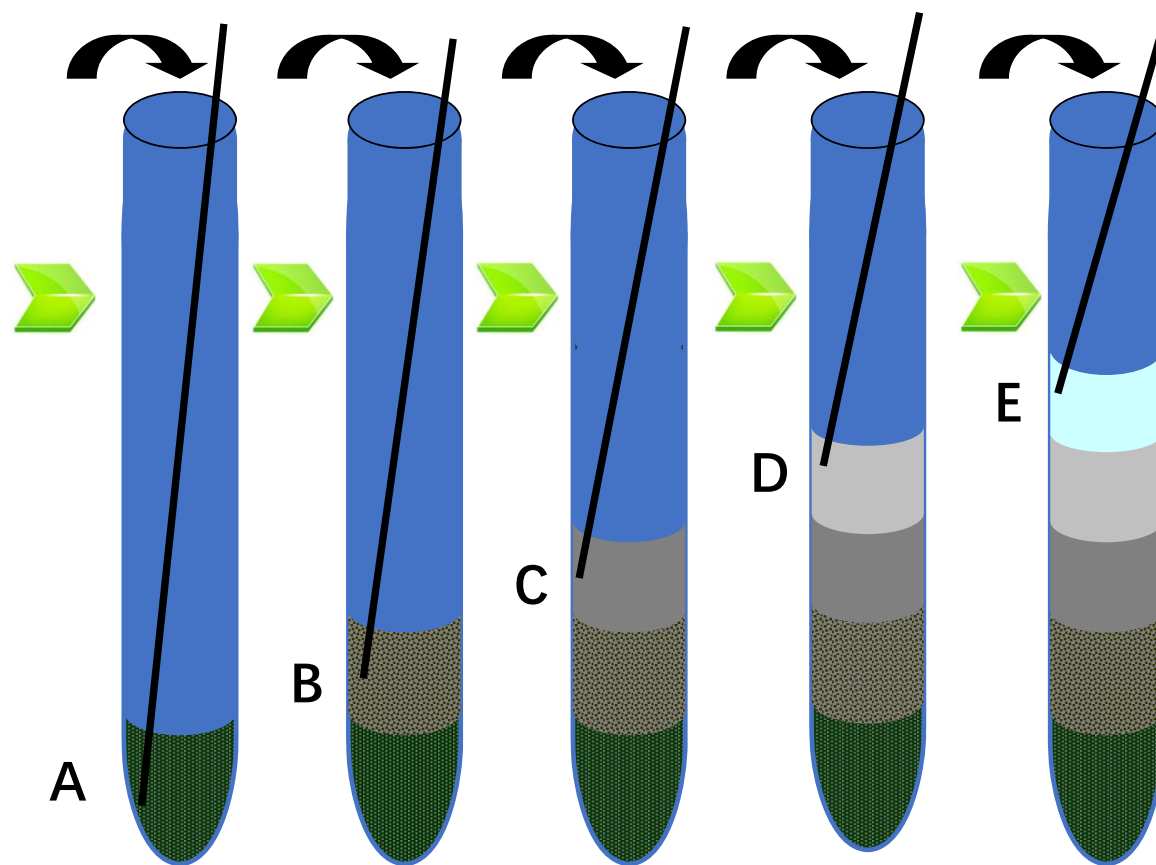
- 4. 连续密度梯度离心

- 常用氯化铯和蔗糖密度梯度离心技术，而前者虽然效果好，但较贵，一般实验不用；后者易得便宜，效果能满足大多实验需要，应用广泛。
- 密度梯度离心管的制备方法有两种，即**正装法和倒装法**。

密度大小依次： $A > B > C > D > E$

- ①正装法

- 用适当的注射器，先将 A 液装于离心管底部，再依次装B、C、D、E；静置，自上而下，由小到大形成密度梯度体系。
- 操作时，由于重力的作用，会打乱已经形成的液面，使得离心管水平面上液体密度不均，影响分离效果。



正装法示意图

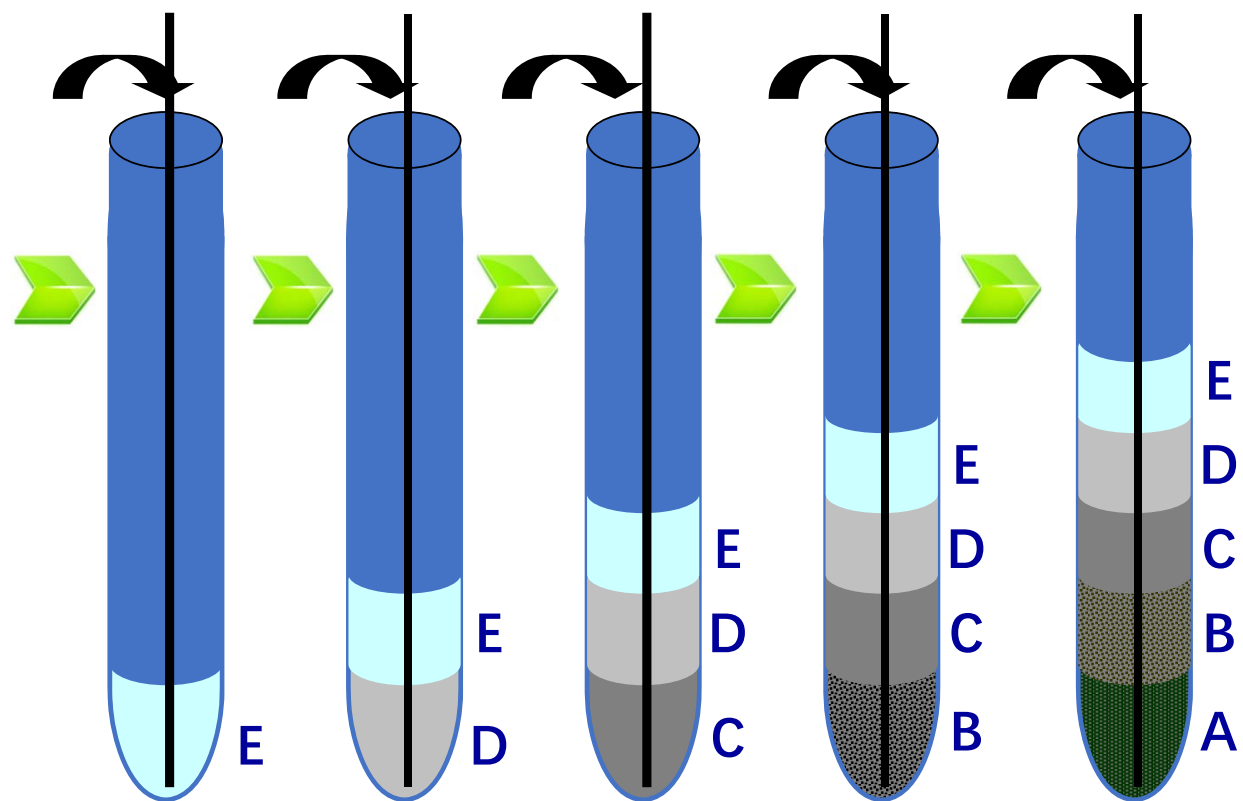
- ②倒装法

- 用适当注射器，先将E液装于离心管底部，再把D液穿过E液装于离心管底部，因比重差异，E液上移，依次装C、B、A，静置，自上而下，由小到大形成密度梯度体系。

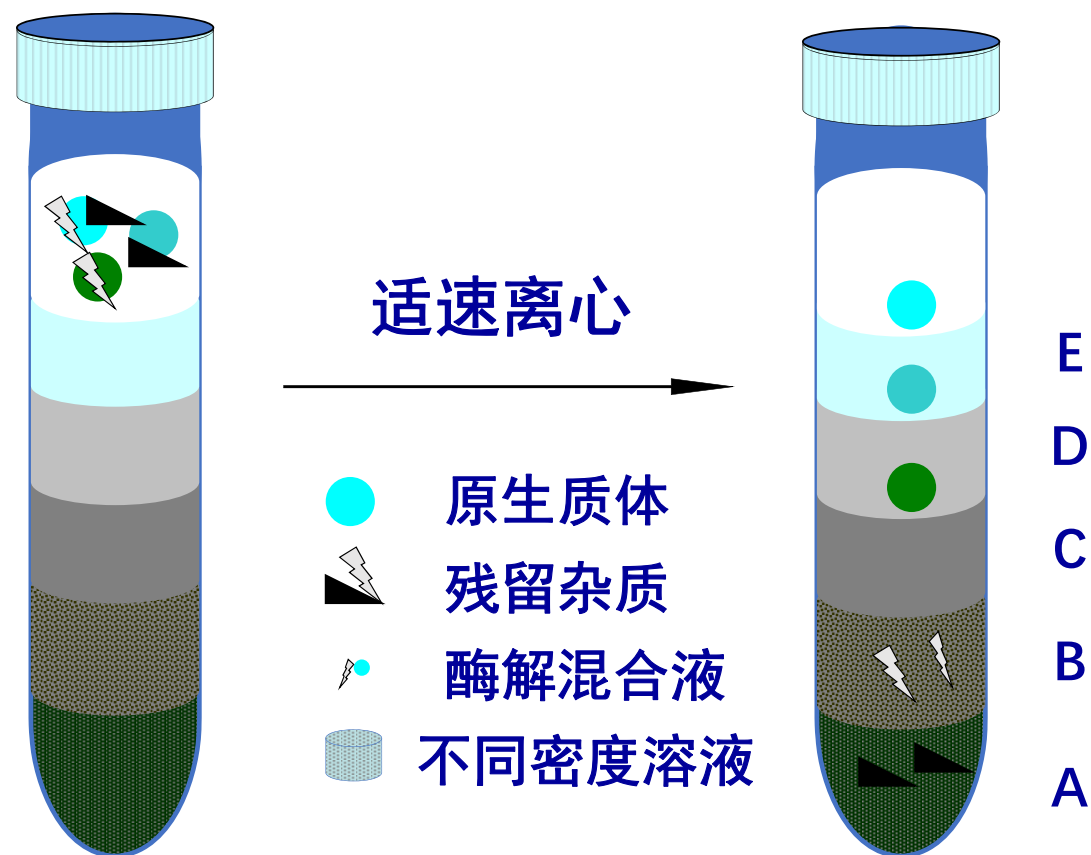
- 注射器穿过已有液体装管操作时：

- ☯如果注射器针孔前端存有气体，则易于产生气泡。

- ☯如果注射器针孔前端已有的液滴或因推动活塞露出液体，都会影响分离效果。



倒装法示意图



密度梯度离心法示意图

三、原生质体活力的测定

- 原生质体的活力强弱是原生质体培养成功与否的关键因素之一。
- 了解实验材料、分离方法及酶解体系所获得原生质体的活力，对修正酶液组合和下一步的培养至关重要。
- 在前期的实验中必须测定原生质体的活力。
- 原生质体活力测定方法有多种。

- **1. 荧光素二乙酸法(FDA法)**

- FDA染色后，活的原生质体能够产生荧光，而无活力的原生质体不能产生荧光。
- 在荧光显微镜下，能够分辨出有活力的原生质体并计算出存活百分率。
- FDA法方便可靠，是目前最常用的方法。

- ①FDA母液配制

- FDA不溶于水，能溶于丙酮。

- 把2mgFDA溶于1ml丙酮中作为母液，4℃冷藏贮存，贮期不宜过长。

- 用时取0.1ml母液加在新配制的10ml 0.5~0.7M甘露醇溶液中，终浓度为0.02%。

- ②染色观察

- 取1滴0.02%的FDA液与1滴原生质体悬浮液在载玻片上混匀，25℃染色10min。
- 用荧光显微镜观察，激发光波长330~500nm，活的原生质体产生黄绿色荧光。
- 用计数器计算存活百分率。

- 2. 酚藏花红染色法

- (1)基本原理

- 酚藏花红发射波长分别为527nm和588nm的光，是一种碱性染料，溶于水显红色并带黄色荧光，其最大激发和酚藏花红能被活的原生质体吸收而呈红色，无活性的原生质体因无吸收能力而无色。

- (2)实验操作
- ①母液配制
- 将酚藏花红溶于0.5~0.7M甘露醇溶液中，配成0.01%的母液。
- ②染色
- 取1滴新鲜母液与等量的原生质体悬浮液混合均匀，室温下染色5~10min。
- ③观察
- 荧光显微镜下镜检。

- 3. 形态观察法

- 一般凭形态特征即可识别原生质体的活力。如果颜色鲜艳，形态完整，富含细胞质，则有活力。

- 4. 渗透压变化法

- 把原生质体放入高渗或低渗溶液中，观察涨缩情况来判断其活力。如果体积随溶液的渗透压变化而改变，即为活的原生质体。

四、影响原生质体产量和活力的因素

- 1. 供试材料
- 供试材料是主要影响因素之一。
- 一般选用愈伤组织、悬浮细胞或植株上的组织。
- 要选择旺盛分裂时期的愈伤组织或悬浮细胞。
- 愈伤组织则要挑选淡黄色、颗粒状的。

- 选用植株上的组织，一定要注意植株年龄、生长发育状态、组织器官成熟度等，应选择生长健壮植株上较幼嫩的组织，该类材料原生质体产量高，活力强，培养后植板率高。
- 选用无菌组培苗，可免去材料消毒，避免消毒液对材料的伤害，提高原生质体的活力。

- 2. 酶的种类、组合和酶解时间
- 酶的纯度、浓度、活性及酶解时间显著影响原生质体的产量和活力。
- ①要选择纯度高的酶，根据材料细胞壁特性及酶的活性大小确定适宜的酶液组合。
- ②酶的浓度不宜过高，酶解时间不宜过长，最好不超过8h。
- ③木本植物的细胞壁比草本植物的坚厚，含有较多的半纤维素，分离原生质体时应适当添加半纤维素酶。
- ④配制的酶液分装后-20℃冷冻保存备用。
- ⑤用过的酶液高速离心后冷冻保存，可重复使用1~2次。

- 3. 渗透压稳定剂

- 渗透压稳定剂主要可分为两大类：

- ①目前采用较多的是由糖醇或可溶性糖 (如甘露醇、山梨醇、葡萄糖和蔗糖) 等有机溶液。
- 甘露醇或山梨醇使用较多，其次是蔗糖。
- ②由氯化钙、硫酸镁、氯化钾或培养基中的无机盐组成的无机溶液。
- 用这类渗压剂原生质体的产量比用甘露醇较高，缺点是降低细胞壁降解酶的活性，高浓度的无机盐进入细胞内，从而影响培养效果。

- 渗压剂使用浓度不宜过高或过低，以细胞轻度质壁分离为宜。
- 细胞来源不同，所需要的适宜渗透压不同，一般在0.3~0.6M之间。
- 液泡化程度低的分生组织细胞，要用较高的渗透压。

- **4. 质膜稳定剂**

- 在酶液中添加多聚阳离子和无机钙离子提高质膜稳定性和原生质体产量。
- 钙能为膜蛋白所束缚，提高膜的钙含量可增加质膜稳定性。
- 葡聚糖硫酸钾能够抑制某些酶如 RNA酶的活性，有助于质膜稳定。

- **5. pH值**

- 酶液pH对原生质体的产量和活力影响很大。
- 植物材料不同所要求的pH有较大差异，一般为pH5.5～5.8。
- 酶液中应加入缓冲剂，以稳定酶液pH。
- 一般添加0.05～0.1M磷酸盐(或3.0～5.0mM MES)。

第2节 植物原生质体培养

- **原生质体培养**

指对分离获得的原生质体进行培养，使其分裂分化直至形成完整植株。

- **培养形式**

主要有平板培养、液体浅层培养、固—液结合培养、看护培养和微滴培养等。

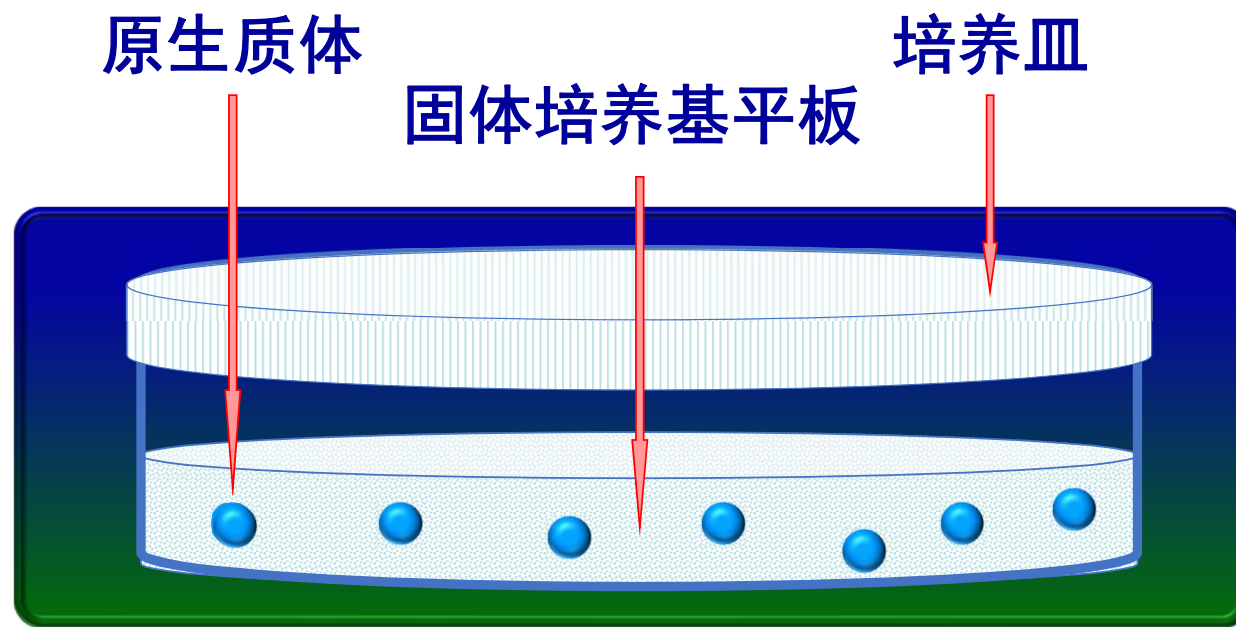
一、植物原生质体平板培养

- 是较传统的方法。
- 1. 实验操作
- ①把原生质体悬浮在液体培养基中，调整其浓度为 $2 \times$ 初始植板密度
(密度约 10^4 个 / ml)；
- ②用大口(即平口)刻度吸管，与高压高温灭菌后冷却至约 42°C 的培养基($2 \times$ 凝固剂浓度)迅速等量混合均匀；

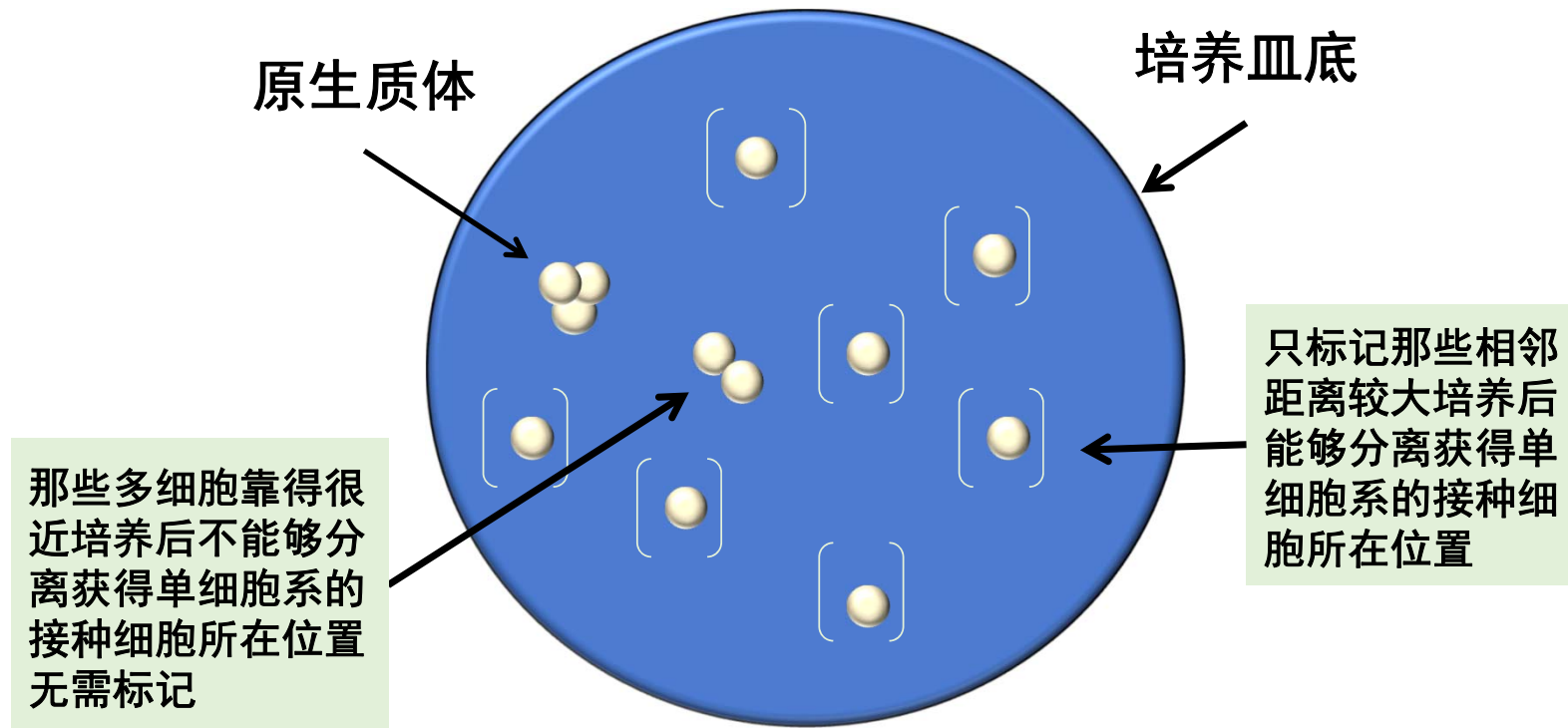
- ③迅速转到培养皿中，轻轻摇动使之快速铺满培养皿，静置凝固成约 1~2mm 厚培养基平板。
- ④用石蜡膜密封，暗培养5~7d原生质体开始分裂，约3周观察细胞植板率。
- ⑤待形成大细胞团后，转到不含渗透压调节剂的固体培养基继代培养。

• 2. 方法特点

- ①原生质体分布均匀，有利于分裂；
- ②容易获得单细胞系；
- ③可定位观察单个原生质体的生长发育情况。
- ④原生质体易受热伤害；
- ⑤易破碎；
- ⑥原生质体始终处在高渗透压胁迫下，生长发育缓慢，植板率低。



植物原生质体平板培养示意



植物原生质体平板培养标记示意图

二、植物原生质体液体浅层培养

用液体培养基进行原生质体培养。

- 1. 实验操作

- ①把纯化后的原生质体用液体培养基调整密度。

- ②用吸管转移到培养皿中，形成厚约1~2mm的液体培养基层。

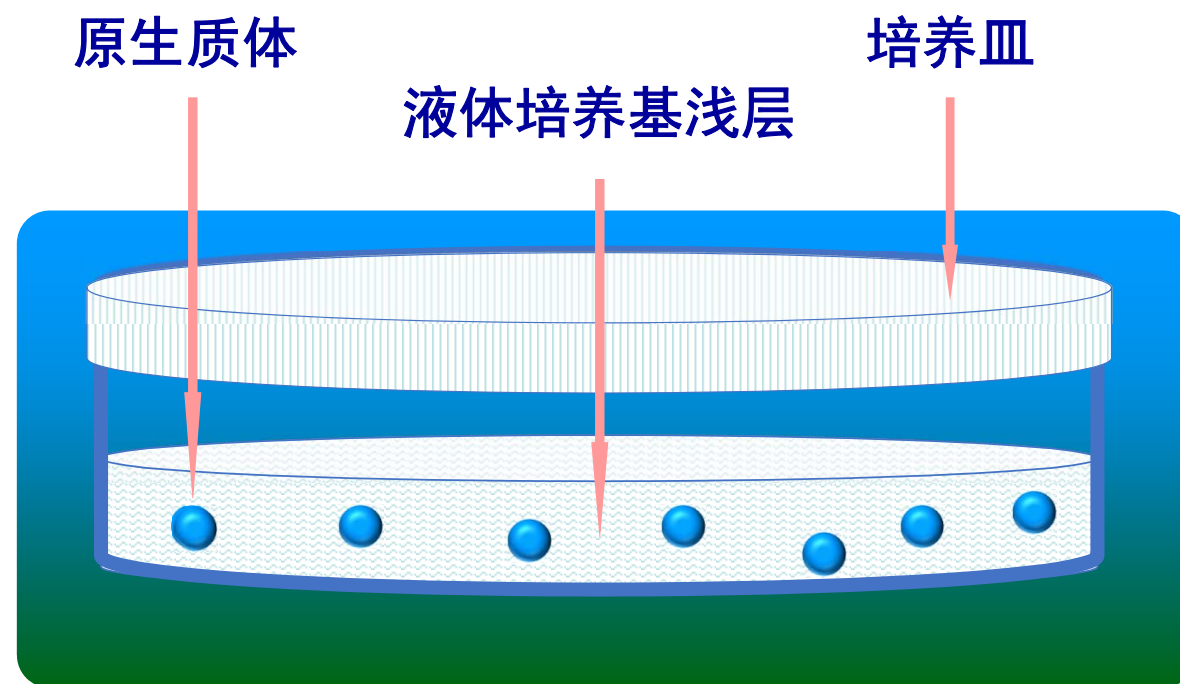
③石蜡膜带密封，暗培养。

④培养5~10d细胞开始分裂，此时开始降低培养基渗透压。每隔1周用吸管吸取不含渗透剂的新鲜液体培养基来逐渐置换原培养基。

⑤当形成大细胞团后，转移至不含渗透剂的固体培养基上增殖培养。

- 2. 方法特点

- ①操作简单，对原生质体伤害小。
- ②可微量培养。
- ③能及时补加新鲜培养基，并降低渗透压，细胞植板率高。
- ④原生质体沉淀，分布不均匀。
- ⑤形成的细胞团易聚集，难以选出单细胞系。



物原生质体液体浅层培养

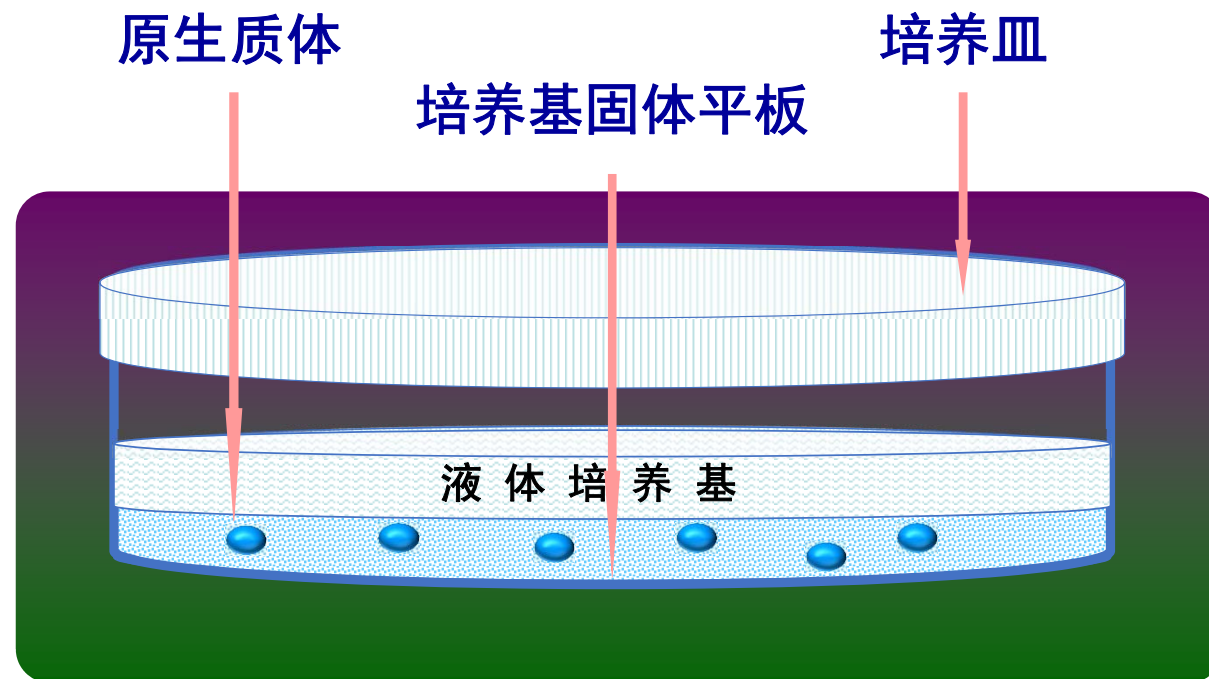
三、植物原生质体固-液结合培养

该法效果最佳。

- 1. 实验操作
 - ①先把原生质体用固体平板培养法包埋在培养皿底层 (平铺或数滴)。
 - ②在其上面再加入相同成分的液体培养基 (或添加0.1%~0.3%的活性炭)。
 - ③用石蜡膜带密封，暗培养。
 - ④当细胞开始分裂后，定期更换新鲜液体培养基 (约1次/周，添加约0.2%的活性炭，效果尤佳)，以稀释或除去培养物产生的有害物质。
 - ⑤当形成大细胞团后，转移到不含渗透压剂的固体培养基上培养。

• 2. 方法特点

- ①原生质体分布均匀，有利于分裂。
- ②容易获得单细胞株系。
- ③能除去抑制分裂的有害物质，细胞植板率高。
- ④原生质体易受热伤害。
- ⑤易破碎。



植物原生质体固-液培养示意图

二、影响原生质体培养的因素

(一) 原生质体的活力

原生质体活力是培养成功与否的关键，直接影响细胞植板率。

- 选择生长发育健康植株上的外植体，或者旺盛分裂的愈伤组织或悬浮细胞，酶浓度不要过高，处理时间不要过长，可提高原生质体的活力。

(二) 原生质体的起始密度

原生质体培养密度过高或过低均影响分裂。

- 密度过高会因营养不良或细胞代谢产物过多而影响正常生长。
- 密度过低细胞内代谢产物扩散到培养基中的量较低，导致细胞内代谢产物浓度过低而影响细胞生长和分裂。
- 一般培养起始密度为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个 / ml，看护培养可降低培养密度。

(三) 渗透压稳定剂

渗透压稳定剂常用2%~3%蔗糖、0.3~0.5M甘露醇。

- 用葡萄糖完全或部分取代甘露醇，在许多作物上效果很好，如在葡萄原生质体培养中，用0.4M葡萄糖完全取代甘露醇，细胞分裂率显著提高。

(四) 培养基的成分

1. 基本培养基

- 用于原生质体培养的培养基很多，主要有MS、B5、Nitsch、N6和KM-8P培养基等。
- 一般是通过对同种植物组织培养或细胞培养用的培养基进行优化改良而来。

- 2. 碳源

- 大多数原生质体使用葡萄糖培养效果较好，但有些植物以蔗糖为佳，还有的用其它低碳糖效果较好。

- 3. 无机盐浓度和氮的形态
- 它们对原生质体培养影响较大，一般无机盐浓度和铵态氮浓度不宜过高。
- 有的植物适合使用**铵态氮型培养基**，而有的适合使用**硝态氮型培养基**，如葡萄原生质体最好是硝态氮型的B5培养基。

- 4. 植物生长调节剂的浓度与配比
- 生长素和细胞分裂素的浓度与配比在原生质体培养中起着决定性作用。
- 生长素主要用NAA、LAA和2, 4-D。
- 细胞分裂素主要用6-BA、KT和ZT。
- 对基本培养基或培养基主要成分和植物生长调节剂进行正交试验，系统优化筛选出最佳培养基。

(五) 培养的条件

1. 光照

- 原生质体培养初期不需要光照，暗培养，当形成细胞团以后再移到光下培养，强光照抑制细胞分裂。

• 2. 温度

- 原生质体一般采用 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养，热带植物要求温度稍高，寒带植物要求温度稍低。

(六) 植物的基因型

植物基因型是决定原生质体培养成功与否的关键因素。有些基因型的材料，细胞难以分裂，培养极其困难。

- 如油菜原生质体培养中，成功报道主要是甘蓝型油菜，而芥菜型油菜较少，白菜型油菜则更少。
- 一般来讲，木本植物原生质体培养比一、二年生的草本植物困难得多。
- 木本植物中又以多酚化合物含量高的植物原生质体培养最为困难，如梨和苹果等。

三、植物原生质体的再生

(一) 细胞壁的再生

1. 细胞壁再生

原生质体培养后，首先体积稍增大，如果是叶肉细胞，则叶绿体重排于细胞核周围。由球形逐渐变成椭圆形，1~2d即可合成完整细胞壁，如烟草和矮牵牛等。只有形成完整细胞壁的细胞才能进入细胞分裂阶段。

- 据报道：
- 蔗糖浓度超过0.3M或山梨醇浓度超过0.5M时，抑制细胞壁形成。
- 有些植物的细胞壁再生，需要植物生长调节剂，如2,4-D等。
- 培养基中渗透压过高也抑制细胞壁的再生。

- 2. 影响细胞壁再生的因素
- 主要因素：植物基因型、供体细胞的分化状况及培养基成分等。
- 如烟草属、矮牵牛属和芸薹属叶肉细胞原生质体 24h即可形成新壁，而豆科和禾本科植物的叶肉原生质体则不能。
- 培养基成分对细胞壁再生起重要作用。

- 细胞壁再生速度及影响因素
- 细胞壁再生越早，细胞分裂也就越快。细胞壁再生快慢与很多因素有关。
- ①植物种类与取材的生理状态
- 如：葱幼叶原生质体经1.5h细胞壁再生；成熟叶原生质体经4h细胞壁再生。烟草原生质体细胞壁再生时间3~24h，花粉最快，叶片则慢。

- ②培养细胞所处的时期
- 对数生长期的细胞细胞壁再生快，静止期则慢。
- 如：大豆对数生长期的细胞制备的原生质体，分离净化后立即再生细胞壁，24h后就产生微纤维网状结构。其它时期则慢。
- ③酶解所用质膜稳定剂
- 如：大豆酶解时加入葡萄糖硫酸钾和 Ca^{2+} ，有利于细胞壁再生，一旦洗净酶液，立即再生新细胞壁。其它则慢。

- 3. 再生细胞壁的鉴定

- 再生细胞壁鉴定可以用荧光染色等方法。
- 荧光染色法是目前国内外最常用且方便快捷的有效方法。
- 常用荧光素为卡氏白。

- 具体过程：
- ①染色液配制
- 将卡氏白溶解在0.5~0.6M的甘露醇溶液中。
- ②染色观察
- 用荧光色素溶液与原生质体悬浮液混合，终浓度为0.1%，染色1min，410nm以上的滤光片镜检。如果有细胞壁存在，能看到蓝光(420nm)；如果原生质体含有叶绿素，则能看到红色荧光，可用滤光片除去红光。

(二) 细胞分裂和愈伤组织或胚状体形成

1. 再生细胞分裂

- 在适宜条件下原生质体培养2~3d后，细胞质浓厚，DNA、RNA、蛋白质以及多聚糖合成，很快便发生核的有丝分裂和胞质分裂。
- 外观上细胞分裂的前兆是叶绿体等细胞器集中在细胞的赤道板位置。第一次细胞分裂一般需要2~7d (如烟草3~4d、葡萄4~5d)。当细胞开始分裂后，要及时降低培养基的渗透压，以减轻培养基对细胞的胁迫作用，满足细胞不断分裂对营养的需要。

- **2. 愈伤组织或胚状体形成**

植物种类和供体材料性质不同，分裂细胞持续进行分裂可能形成愈伤组织，也可能形成胚状体。

在培养过程中一般不需要改变培养基的主要成分，只需降低渗透压，调整碳源，补充新鲜培养基和增加光照强度。

- 3. 影响细胞分裂启动的因素

- 细胞分裂启动主要受**基因型、供体材料发育状态、原生质体活性、培养基成分**等的影响。
- 一般茄科植物分裂率高(如烟草、矮牵牛等)，禾本科植物分裂率低。
- 生长调节剂的浓度、配比、渗透压等。
- 好的供体材料、活力强的原生质体、适宜的培养基等至关重要。

(三) 植株的再生

原生质体来源的细胞，器官发生有两条途径：

- ①由原生质体再生细胞直接形成胚状体，由胚状体发育成完整植株。
- 该途径最为理想。

原生质体→细胞→胚状体→植株

- ②通过愈伤组织形成不定芽
- 本途径在植株再生中占绝大多数。当原生质体形成大细胞团或愈伤组织后，及时转移到芽分化培养基上，先诱导出不定芽，再转移到根诱导培养基上诱导出根；

原生质体→细胞→愈伤组织→芽→根→植株

第3节 植物原生质体融合

- 1970年，发展起来的一门技术。
- 1980年，渐已成熟。
- 迄今，已获得了多种作物种间、属间杂种植株。

一、原生质体融合

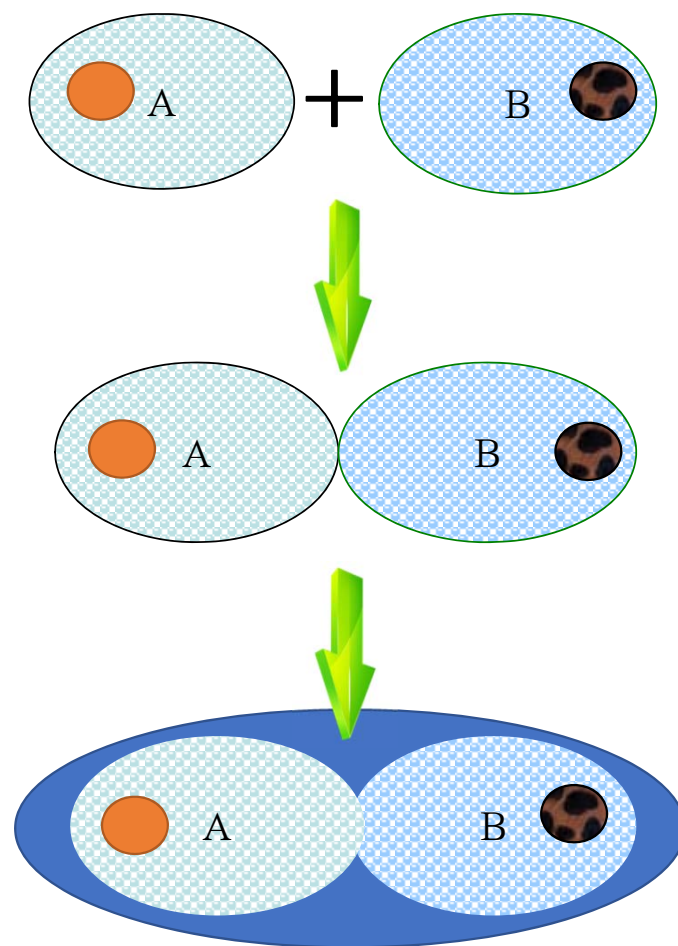
- 亦称体细胞杂交
- 通过物理或化学方法使原生质体融合，经培养获得具有双亲全部(或部分)遗传物质的后代。

(一) 融合的基本原理

细胞膜的表面有稳定的疏水性基团，具有膜电位，因其静电排斥力使原生质体不能吸附在一起。

- 1. 化学法融合原理

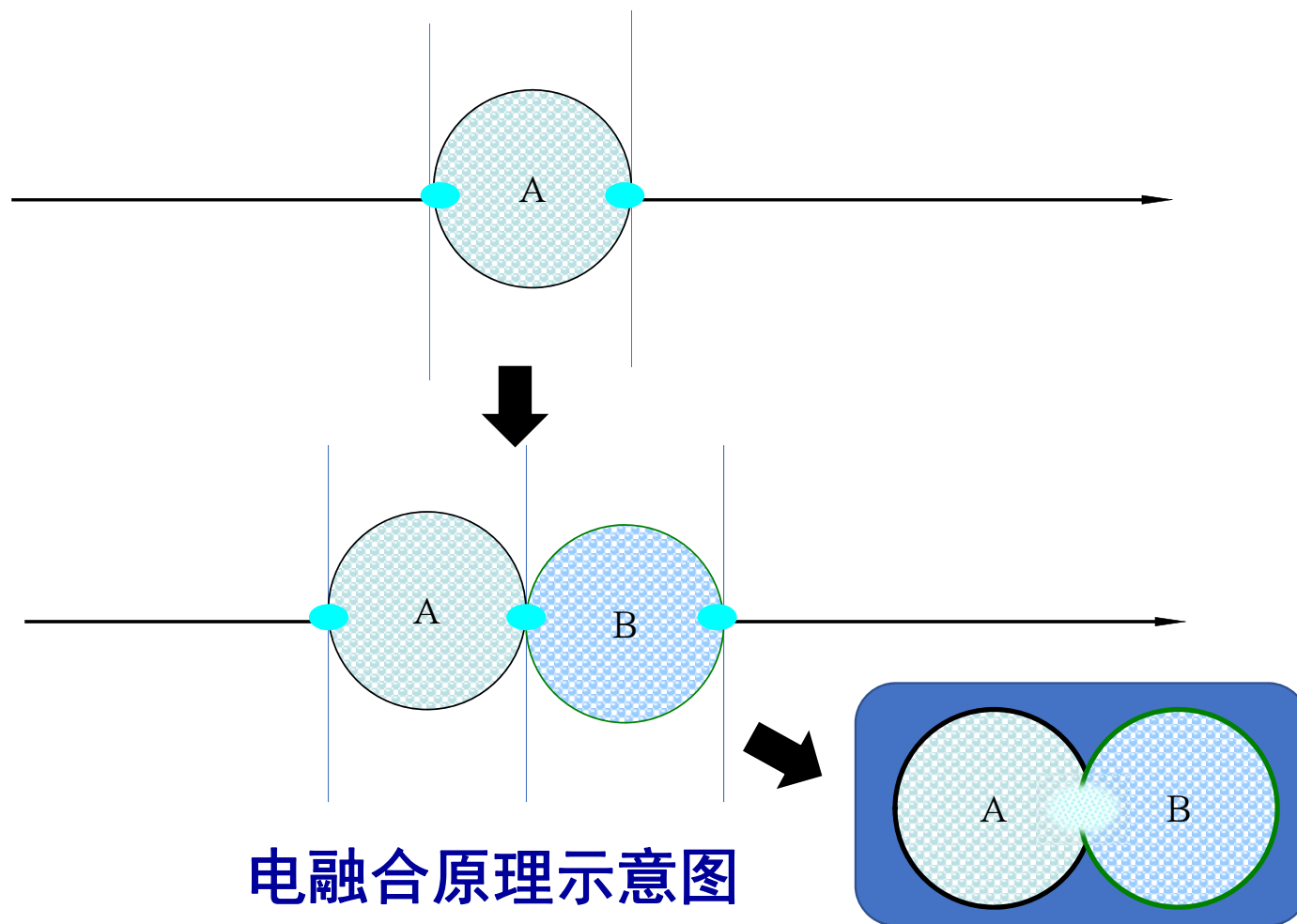
- 带阴离子的PEG分子等与原生质体表面的阴离子之间在 Ca^{2+} 连接下形成共同的静电键，促进原生质体间的黏着和结合。
- 在高 Ca^{2+} -高pH液的处理下， Ca^{2+} 和与质膜结合的PEG分子被洗脱，导致电荷平衡失调并重新分配，使原生质体的某些阳电荷与另一原生质体的阴电荷连接，吸附聚合，最后融合在一起。



化学融合原理示意图

- 2. 物理法融合原理

- 对融合槽的两个平行电极施加高频交流电压，产生电泳效应，使融合槽内的原生质体偶极化并沿着电场的方向排列成串珠状，再施加瞬间的高压直流脉冲，使黏合相邻的原生质体膜局部发生可逆性瞬间穿孔，然后，原生质体膜连接、闭合，最终融为一体。



电融合原理示意图

(二) 原生质体融合的类型和方法

1. 融合类型

- 细胞融合类型可分为：

- ① 对称融合 (或对等融合)

- ② 不对称融合 (或不对等融合)

- ③ 微原生质体融合。

- (1) 对称融合

- 通过物理或化学方法，使种内或种间完整原生质体融合，产生核与核、胞质与胞质间重组的对称杂种。
- 亲缘关系较远的植物，经对称融合产生的杂种细胞在发育过程中，由于分裂不同步等原因，常发生一方亲本的染色体部分或全部丢失，而产生不对称杂种。

- 原生质体融合后的个体称为**融合体** (亦称融合子)
- 同种原生质体间的融合称为**同源融合**，该融合体称为**同核体**
(homokaryon) ；
- 非同种原生质体间的融合称为**异源融合**，该融合体称为**异核体**。

- (2) 不对称融合

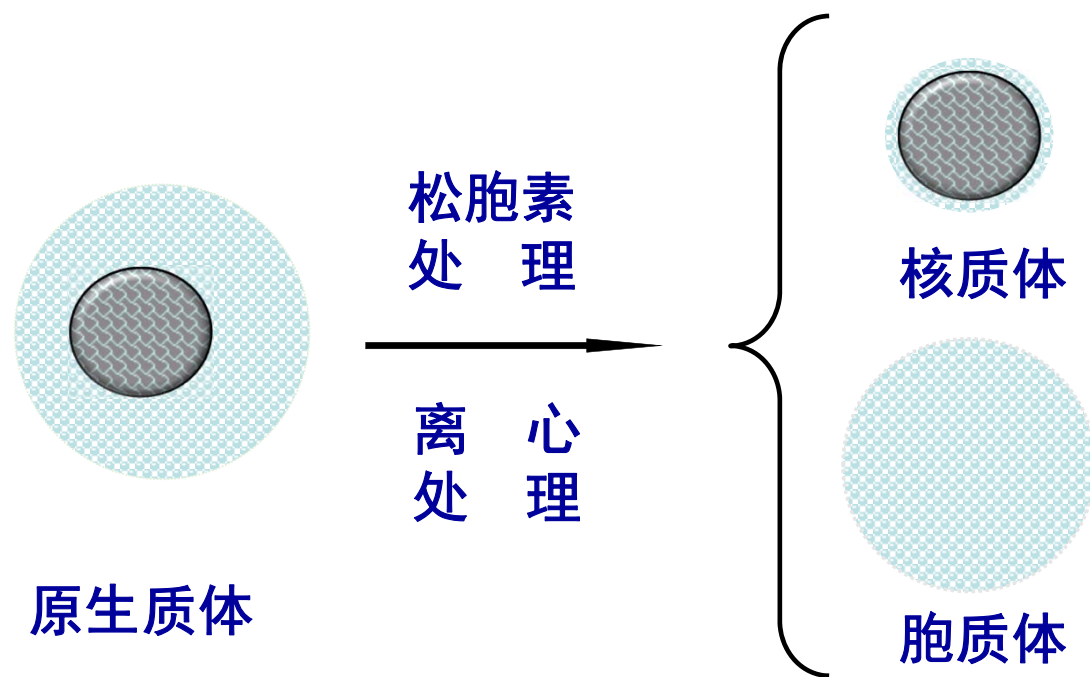
- 通过物理或化学方法处理亲本原生质体，使一方细胞核失活，或同时也使另一方细胞质基因组失活，再进行原生质体融合，获得只有一方亲本核基因的不对称杂种。
- 无核的亚原生质体称为胞质体。
- 有核的小原生质体或只有核和原生质膜构成的亚原生质体称为核质体。

胞质体(cytoplast); 小原生质体(miniprotplast) 核质体(karyoplast)

- 对称融合在实现双亲优良性状重组的同时，无法排除不良性状，也不能单独利用一方的核基因或细胞质基因。
- 不对称融合通过物理或化学方法处理原生质体，使其细胞核失活或不能正常分裂，细胞质基因组正常，培育不对称杂种。

物理(如X或Y射线、紫外线照射)或化学方法(如碘乙酸、Rhodamine 6-G)

- 例如：
- 用38Gy / min的X射线辐射伏令夏橙原生质体45min，0.25mM碘乙酸处理橘橙原主质体15min，电场诱导两种原生质体融合，获得了柑橘种间体细胞的不对称杂种植株。
- 辐射处理可能会产生诱变效应，化学物质对原生质体有伤害，注意剂量不要过高。



核质体与胞质体的制备

- (3) 微原生质体融合
- 微核(植物细胞经微核化处理，外包有被膜，内含一条或几条染色体)与受体原生质体融合，从而实现部分基因组转移。
- 又称为微核技术。

微核技术(micronucleus technology)

- 微原生质体融合是近年开发的一项新技术，可用于克服生殖隔离，转移多基因性状或未知基因性状，获得单体或二倍体附加系，建立特异染色体DNA文库以及研究外源基因的功能等。
- 该技术已成功地用于马铃薯和番茄间单条或多条染色体的转移。

- 2. 融合方法

- 细胞融合主要分为化学融合和物理融合。

- 化学融合法

- 用化学试剂作诱导剂，诱导原生质体融合，主要有PEG融合法和高钙-高pH法等。

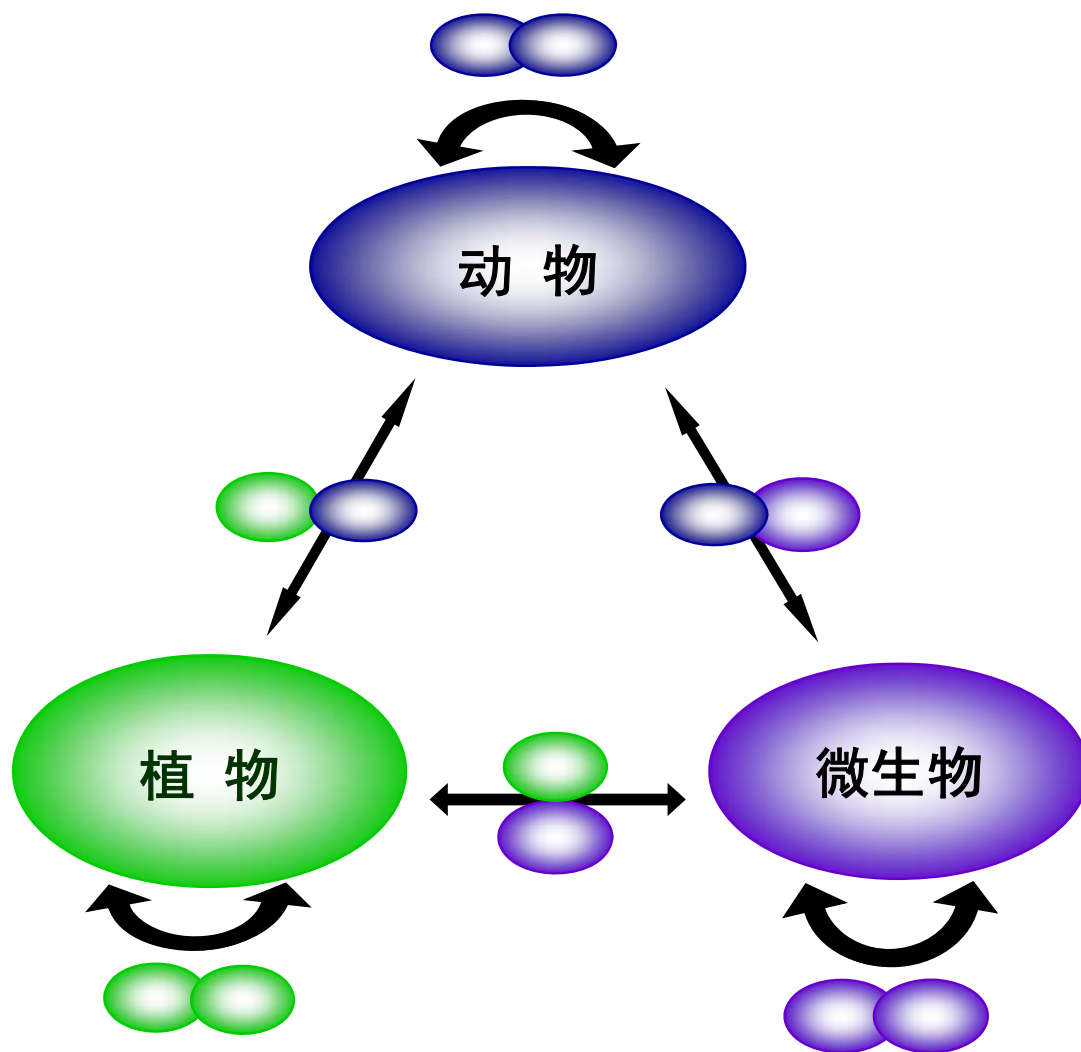
- 物理融合法
- 用电激、离心、振动等机械方法促使原生质体融合，主要有电融合和超声波等。
- 目前常用方法
 - ◆ 聚乙二醇 (PEG) 法
 - ◆ PEG结合高 Ca^{2+} -高pH法
 - ◆ 电融合法

电融合法 (electrmfusion)。

- (1) PEG融合法

- 1974年，用PEG诱导细胞融合。操作简便效果好不需要昂贵仪器，广泛采用。
- 迄今所得体细胞杂种，多数利用该技术。
- PEG处理后再用高 Ca^{2+} —高pH溶液洗除PEG提高融合率。
- 一般选用的PEG相对分子质量在1 540~6 000之间，浓度10%~30% (W / V)。

聚乙二醇诱导融合的广泛性

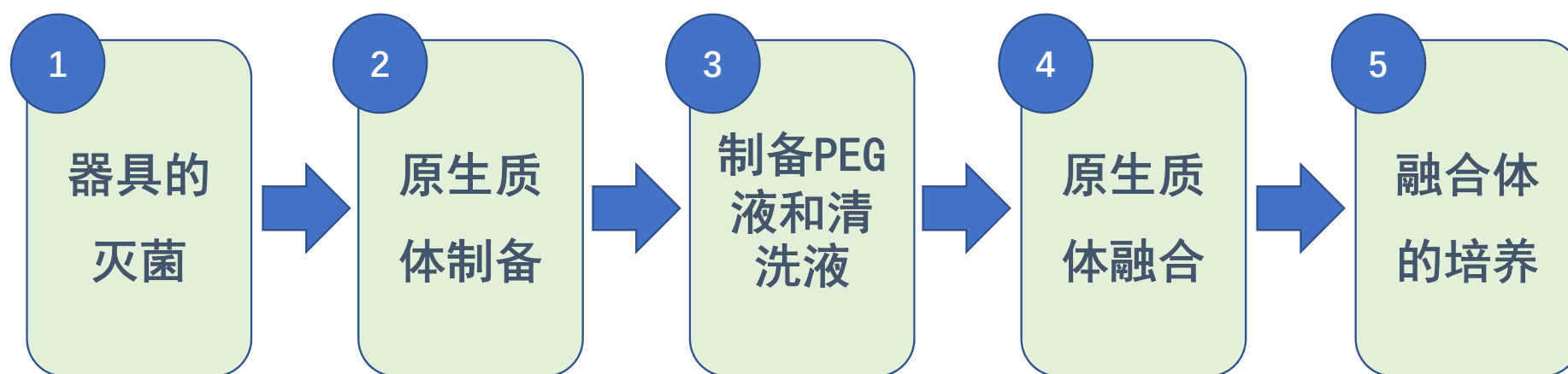


- 聚乙二醇特点

- 泛指（包括）分子量大小不等的一系列分子。
- 用于诱导细胞融合，适用性广，诱导效果好。
- 不同分子量的PEG分子诱导细胞融合的效率不同，分子量越大，诱导效率越高。
- 不同分子量的PEG分子对原生质体的毒性不同，分子量越大，毒性越高。

实验时，综合考虑，二者折中

- PEG融合操作:



- ①器具灭菌

把必要数量的培养皿(一般6cm × 1.5cm)、移液管、离心管等高温灭菌, 放在超净工作台内备用。

- ②原生质体制备

选择合适的供体，配制适宜的酶液，分离原生质体，将制备好的原生质体悬浮于0.4~0.6M的Mannitol液中(含 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 500mg / L + KH_2PO_4 100mg/L. pH5.8)，分别调整好密度(一般为 2×10^5 个 / ml)，等比例混合。

- ③制备PEG液和清洗液

根据材料选择分子量合适的PEG并确定其浓度，配制PEG溶液。

清洗液主要由 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和Mannitol组成。

- ④原生质体融合
- 将两种原生质体悬浮液等体积混合于培养皿中，静置5min，滴入等量PEG液并用吸管诱导接触混匀，镜下观察决定融合时间。
- 最佳处理时间为大部分原生质体吸附成二体、少量出现三体时，开始分次加清洗液，最后用培养用液体培养基洗1次。
- ⑤融合体培养

- PEG融合应注意:

- ①PEG相对分子质量大凝聚力强，能缩短融合处理时间，小于1000一般不能使原生质体凝聚，常用相对分子质量 >1540 ;
- ②稀释液可用Mannitol液、高 Ca^{2+} -高pH液。
- ③双亲的原生质体最好选用外观能区分开的两种细胞。
- ④操作迅速，融合后要轻拿轻放。

- (2) 高钙-高pH法
- 在高 Ca^{2+} -高pH液的诱导下，原生质体吸附、聚合，最后融合在一起。操作与PEG法类似，用高钙 ($>0.03\text{M}$) 和高pH (9.5~10.5) 液取代PEG液，高pH有利于原生质体聚集接触。
- 1973年，Keller等人用该法进行烟草叶肉原生质体融合，获得了品种间体细胞杂种。

- (3) 电融合法

- 1980年，Zimmermann等人经改良而来的一项新技术。
- 利用不对称电极结构，产生不均匀的电场，使黏合相连的原生质体膜瞬间破裂，与相邻的原生质体连接、闭合，产生融合体。
- 电融合包括两个步骤：

- ①对装有原生质体悬浮液的融合槽的两电极间施加高频交流电场，使原生质体偶极化而沿电场线方向泳动，并相互吸引形成与电场线平行的原生质体串珠。
- ②用一次或多次瞬间高压直流电脉冲，使质膜可逆性穿孔，相连的质膜瞬间被电击穿后，又迅速连接闭合，恢复成嵌合质膜而融为一体。

高频交流电场(一般为0.5~10MHz, 150~250V/cm), 高压直流电脉冲(10~50 μ s, 1~3kV/cm)

- 电融合操作：
- ①制备原生质体。
- ②调整融合参数，设定电场强度 (150~250V / cm) 高频信号、处理时间等。
- ③融合处理，等量混合原生质体，滴入融合槽内，加高压脉冲 (10-50 μ s, 1~3kV / cm)，使原生质体发生极化、排列、膜穿孔、闭合、融合。
- ④离心洗涤(参照原生质体纯化方法)。
- ⑤融合体培养(原生质体培养相同)。
- 该方法没有化学残毒，重复性好；但设备昂贵。

(三) 融合体的培养和发育

1. 融合产物的类型

融合初期不论亲缘关系远近，几乎都能形成各种融合体，因亲缘关系远近和细胞有丝分裂的同步化程度等因素，会得到几种不同类型的产物，包括异源融合的异核体，含有双亲不同比例的多核体，同源融合的同核体，不同胞质来源的异胞质体。

异胞质体 (heteroplasmon)

- 异胞质体大多是由无核的亚原生质体与另一种有核原生质体融合而成。
- 亲缘关系对融合体的发育影响很大，在种内和种间融合的异核体大多数能形成杂种细胞，并形成可育的杂种植株。
- 在有性杂交不亲和的远缘种、属间融合，有时也能形成异核体，但在其后的分裂中染色体往往丢失，难以得到异核体杂种植株，即使得到再生植株也往往不育，如马铃薯番茄。

- 2. 融合体的发育过程
- 融合体的培养主要发生三个过程。
- ①细胞壁再生
- 与原生质体的壁再生过程相似，但稍迟滞，一般培养1~2d后，在电镜下可看到融合体表面开始沉积大量纤维素微纤丝，进一步交织和堆积，几天后便形成有共同壁的双核细胞。

- ②核融合

细胞融合后得到的是一个有异核体、同核体以及多核体等的混合群体。

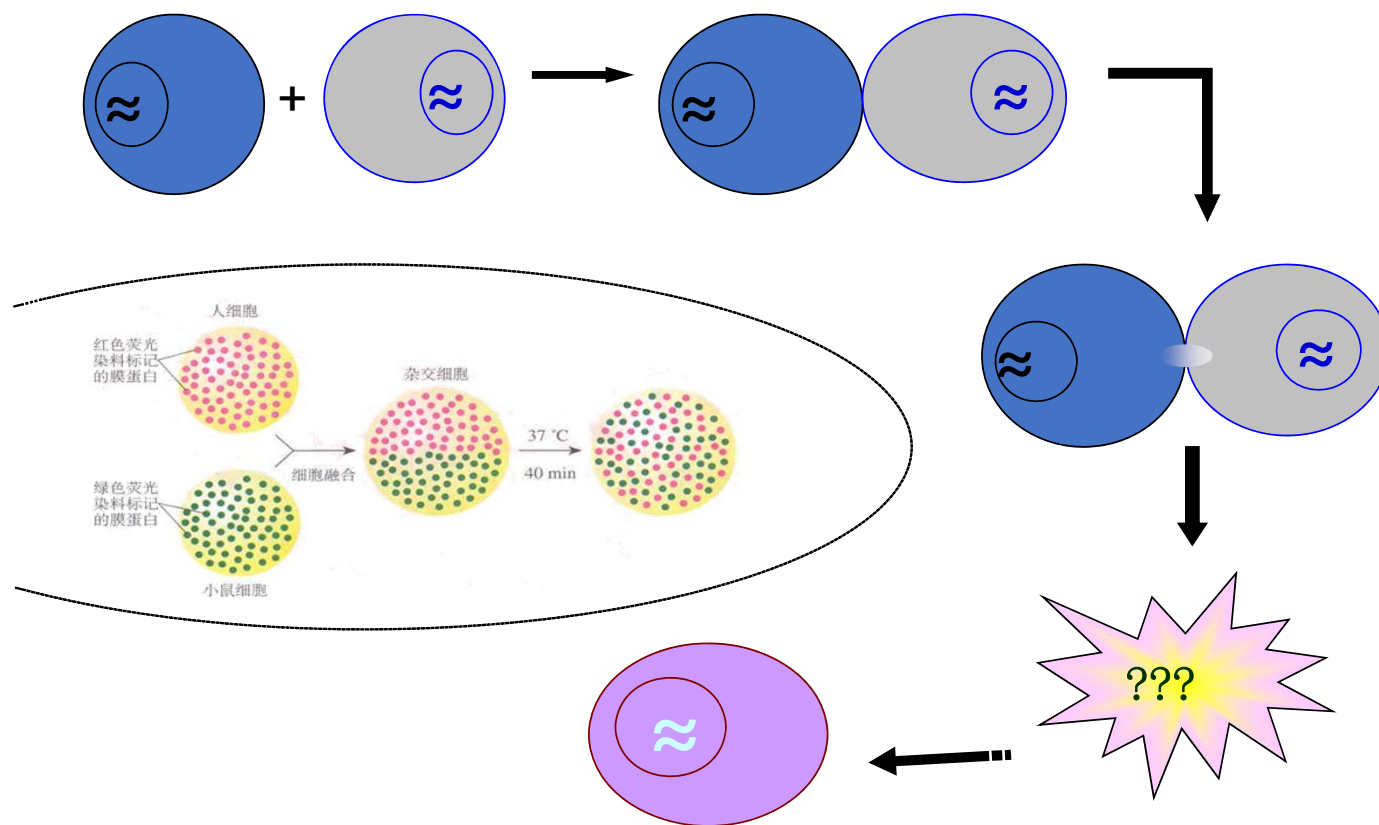
异核体双亲细胞的分裂如果同步，其后的发育有两种可能。

※双亲细胞核进行正常的同步有丝分裂产生子细胞，子细胞的核中含有双亲的全部遗传物质。

- ※双亲细胞核的有丝分裂不同步或同步性不好，双亲之一的染色体被排斥、丢失，所产生的子细胞只含有一方的遗传物质，不能发生真正的核融合。

- ③细胞增殖

- 有些植物的融合细胞形成杂种细胞后，如果培养条件合适则继续分裂产生细胞团和愈伤组织。有些植物的细胞则中途停止分裂，逐渐死亡。

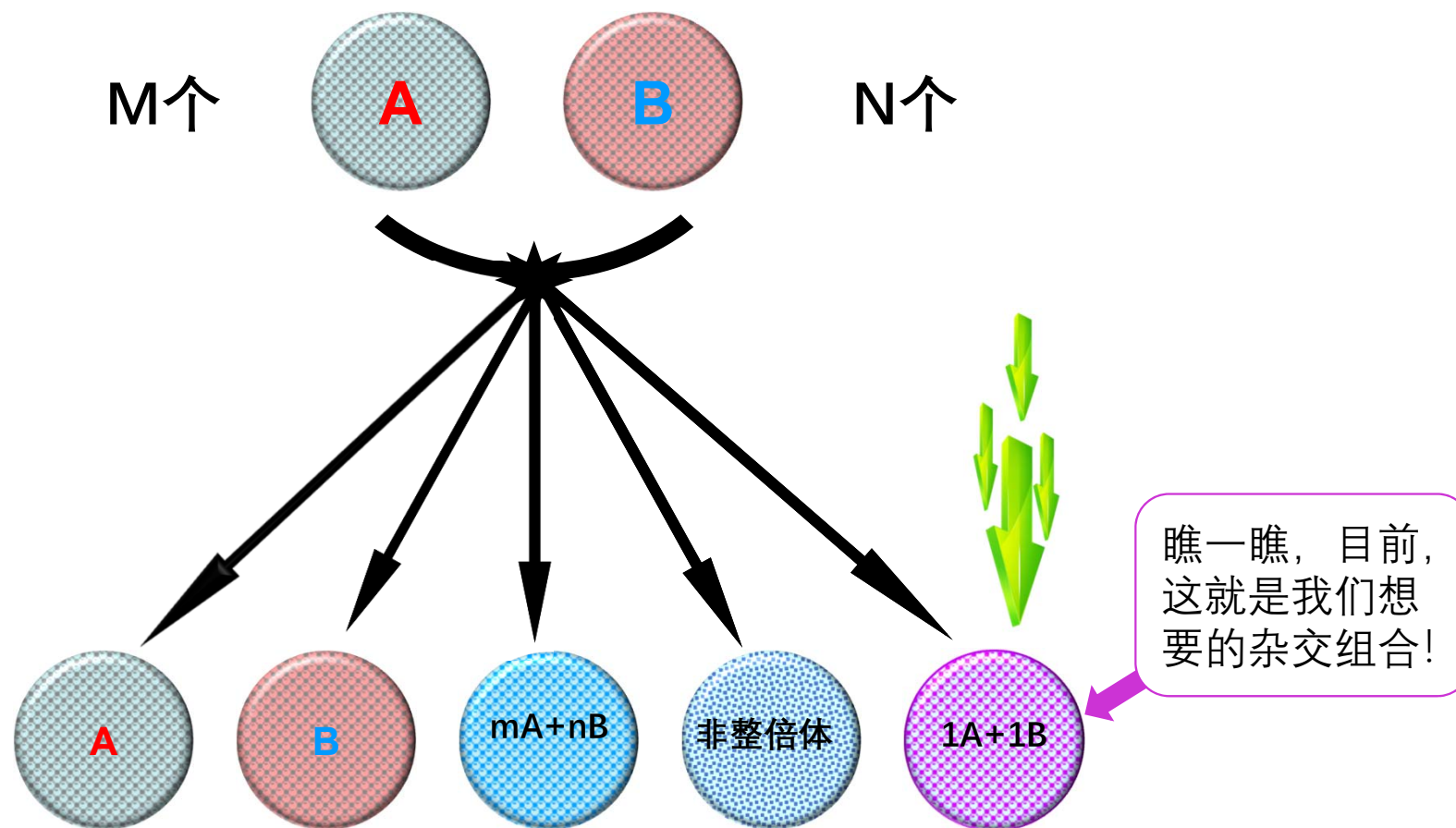


体细胞杂交过程示意图

二、体细胞杂种选择

- 原生质体融合处理后的产物是同核体、异核体以及没有融合的亲本原生质体的混合群体，必须采用一些有效的方法把异核体和真正的杂种植株选择出来。
- 根据选择时期，可分为杂种细胞的选择和杂种植株的选择。

融合产物示意图



(一) 杂种细胞的选择

1. 互补筛选法

利用双亲细胞在生理或遗传特性方面所产生的互补作用进行选择。

在选择性培养基上只有具互补作用的杂种细胞才能生长发育，非杂种细胞没有互补不能生长发育。

根据互补类型不同，分为以下几种。

- 1) 激素自养型互补 (生长互补) 选择
- 双亲任何一方的原生质体在培养基上生长时需要添加植物生长调节剂，而异核体杂种细胞由于融合后的互补效应，自身能产生内源激素，不需要添加植物生长调节剂也能在培养基上生长发育。
- 如粉蓝烟草和朗氏烟草杂种细胞的选择。

- 2) 白化互补选择
- 1977年，用能在条件培养基上生长分化的矮牵牛的白化突变体和在该培养基上只能发育成小细胞团的野生型拟矮牵牛，融合后发生互补作用，在条件培养基上选择绿色愈伤组织和杂种幼苗。
- 用该法选出了胡萝卜和羊角芹体细胞杂种。

- 3) 营养缺陷型互补选择

- 烟草硝酸还原酶缺失突变体 (NR-) 因缺乏正常的硝酸还原酶，不能在硝酸盐作为惟一氮源的培养基上生长。用表型均为NR-、但突变位点不同的突变体cnx和nia进行原生质体融合，在以硝酸盐为惟一氮源的培养基上，由于二者的互补作用，其异核体体细胞杂种恢复了正常硝酸还原酶活性；

- 4) 抗性突变体互补选择

- 1976年，用拟矮牵牛和矮牵牛对药物抗性的差异进行杂种细胞的选择；
- 拟矮牵牛在限定性培养基上只能形成小细胞团，不受1mg / L的放线菌素-D的抑制，而矮牵牛的原生质体能分化成植株，但在上述浓度的放线菌素-D的培养基上不能生长；
- 二者的融合体则能在含有放线菌素-D的培养基上分裂，发育成完整植株。

- 5) 基因互补选择

- 烟草的S和V两个光敏感叶绿体缺失突变体由非等位隐性基因控制，在正常光照下，生长缓慢，叶片淡绿，但将二者原生质体融合后，能形成绿色愈伤组织，并再生植株。在强光下，杂种叶片呈暗绿色；
- 1974年，据此选出了杂种植株。

- 2. 机械筛选法

- 互补选择需要有各种突变体，应用受限制，机械分离法则不受此限制。
- 1) 天然颜色标记分离
- 利用不同颜色的原生质体进行融合，挑选出异核体。将大豆根尖的白色原生质体与粉蓝烟草的绿色叶肉原生质体融合，用微细管选择出异核体进行培养。
- 该法效率低，挑选出的原生质体有限，采用微滴培养较困难。

- 2) 荧光素标记分离

- 该法可用于亲本间无天然色素差异的原生质体融合时异核体的分离。
- 首先在两亲本的原生质体群体中分别导入无毒性的不同荧光染料，融合后根据两种荧光色的存在，可把异核体与同核体区分开。
- 可利用显微操作技术挑选异核体，但难以挑选出大量异核体。

- 3) 荧光活性自动细胞分类器分类融合体
- 用不同的荧光剂分别标记双亲的原生质体，融合后异核体应含有两种荧光标记。
- 当混合的细胞群体通过细胞分类器时，用电子扫描确定其荧光特征并分为三类(即亲本1、亲本2、融合体)，对融合体可做进一步分析和培养。
- 该仪器结构和操作复杂。

(二) 杂种植株的选择

融合后的同核体和异核体等在适宜的培养基上继续分裂可形成愈伤组织，转移到分化培养基上可分化出完整的植株。

- 必须从形态学、细胞学、遗传学、生化及分子生物学等方面做进一步鉴定，筛选出真正的杂种植株。

- 1. 形态学鉴定

- 根据杂种植株的表型特征进行鉴定，如株形、叶形、花色等。
- 杂种植株的外部形态往往介于两亲本之间，与亲本有区别。
- 如矮牵牛的花是红色，拟矮牵牛的花为白色，其体细胞杂种的花为紫色。
- 粉蓝烟草和朗氏烟草的体细胞杂种植株叶形、毛的特征均与双亲不同。

- 2. 细胞学鉴定

- 杂种细胞中的核、染色体、细胞器特征是鉴定杂种的重要依据。
- 在融合时如采用二倍体原生质体，杂种可能是四倍体(双二倍体)，或异源非整倍体。
- 不亲和的属间杂种植株染色体数目有较大变异。如：
 - 胡萝卜和羊角芹的杂种细胞只剩胡萝卜的4条染色体；
 - 烟草和矮牵牛杂种植株染色体为23~40条。

- 3. 生物化学鉴定

- 利用亲本的某些生化特征作为鉴定指标。

- 主要有酶、色素、蛋白质、同工酶和二磷酸核酮糖羧化酶等。

- 如矮牵牛和拟矮牵牛体细胞杂种植株的叶片中的过氧化物酶同工酶，不仅具有双亲的酶谱带，而且还出现新的杂种谱带。

- 4. 分子生物学鉴定

- 利用特异性限制性内切酶对融合体再生植株的叶绿体和线粒体基因组进行酶切和电泳分析，可确定再生植株细胞质中不同亲本细胞器DNA的组成情况，来鉴定是否为杂种植株。
- 分子杂交可提供遗传物质转移的直接证据。
- 体细胞杂种的鉴定技术发展较快，目前在一些植物中已初步建立，尚有许多问题需要解决。

三、细胞质工程

- 原生质体的融合涉及双亲的细胞核和细胞质，随着细胞器移植技术的发展，人们可以进一步将不同来源的细胞核与细胞质中的遗传物质进行重新整合。

- **细胞质工程**
- 通过物理或化学方法将细胞质与细胞核分开，再进行不同细胞间核、质的重新组合，重建成新细胞。
- 细胞质工程为创造全新的工程植物开辟了新的途径。

细胞质工程(cytoplasmic engineering) (又称细胞拆合工程)

(一) 细胞器基因组的特点

在植物整个生长发育过程中，每一步复杂的生理过程都涉及特异基因的表达，这些基因的正确表达是细胞中三个独立的基因组-核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组协同作用的结果，而核基因组起绝对的主导作用。尽管大多数叶绿体蛋白和线粒体蛋白是由核基因组编码的，但在叶绿体基因组和线粒体基因组中仍包含相当比例的与自身形成及生理功能密切相关的遗传信息，因而对这两种细胞器基因组的研究越来越受到重视。

- 1. 核基因组

- 在植物细胞的三个基因组中，核基因组DNA含量和编码的基因数目最大。
- 不同种植物细胞核DNA含量不同，有很大变化。
- 拟南芥最少，单倍体只含0.07pgDNA。
- 槲寄生比较多，其单倍体中含有100pg以上DNA，(pg, 即Picogram)。

- 植物细胞中的核DNA大大超过了编码各种蛋白质所需的DNA量。
- 研究表明，植物核基因组由大量重复序列和低拷贝DNA组成。核基因组的组织结构及基因的表达与调控机制相当复杂。
- 目前模式植物拟南芥和水稻的基因组研究已经取得了可喜的进展，已有大量的核基因被分离鉴定并进行了深入的研究。

- 核基因组上基因可分为以下几大类：

- ①光合基因 (与光合作用有关)
- ②贮藏蛋白基因 (与种子萌发等有关)
- ③糖代谢基因
- ④氮代谢基因
- ⑤发育调控基因
- ⑥刺激反应基因
- ⑦膜蛋白基因等

- 这些基因编码的蛋白质在植物生长发育的各阶段均不可缺少。

- 2. 叶绿体基因组

- 大部分叶绿体DNA都是共价闭合的双链环状分子，少数为线状分子，叶绿体DNA分子一般长120~160kb：大多数植物叶绿体DNA都有一个突出的特点，即存在着两个反向重复序列。
- 一般认为，两者之间单拷贝序列的大小决定了不同植物的叶绿体基因组的大小，一小部分叶绿体DNA分子可以二聚体、三聚体或四聚体的形式存在，其机理还不清楚，很可能是几个单体之间发生了重组。

叶绿体DNA(chloroplast DNA, ctDNA)；反向重复序列(inverse repeat sequence, IR)

- 叶绿体基因组是半自主性的细胞器基因组，它对核有很大的依赖性，叶绿体中绝大部分多肽是由核基因组编码产生的，但它可以为完成自身功能编码某些非常重要的结构物质和酶，如RNA聚合酶、tRNA、rRNA、核糖体蛋白及与光合作用直接相关的蛋白质等。
- 多种植物叶绿体DNA完成了全序列测定，叶绿体基因组大约可编码120个以上基因，这些基因在光合作用中起重要作用，可以分为三大类：
 - ①遗传系统基因：与转录和翻译有关
 - ②光合系统基因：与光合作用有关
 - ③生物合成基因：与氨基酸、脂肪酸、色素等生物合成有关

- 3. 线粒体基因组

- 植物线粒体基因组 (mitochondria DNA, mtDNA) 的分子长186–2400 kb，不同植物间差异悬殊。
- 不同种线粒体DNA存在形式也不同，高等植物的mtDNA主要是线性分子，少量为环状。
- 线性分子和环状mtDNA的大小和分布也不均一。
- 与叶绿体基因组一样，线粒体基因组也是半自主性的核外基因组，大多数线粒体蛋白由核基因组编码，但线粒体基因组自身包含有10%左右的形成线粒体的遗传信息并编码线粒体呼吸链中几个重要的组成蛋白。

- 研究证明细胞质雄性不育是由线粒体基因组决定的，是由于植物线粒体DNA发生重组，产生了新的功能区域的结果。
- 对这些功能区域的转录进行深入研究，将为最终通过植物基因工程手段控制CMS、提供新的有效育种方法打下基础。
- 高等植物中线粒体、叶绿体及细胞核间遗传信息的交流是很频繁的。
- 有些植物的线粒体基因组中有来自叶绿体基因组或核基因组的片段。
- 研究表明，线粒体中的遗传信息也可向核基因组转移。
- 各细胞器间DNA转移机制还不十分清楚，但它对基因工程研究具有重要意义。

(二) 细胞器的分离

真核细胞的质膜可用各种方式破坏，包括渗透压冲击、机械剪切和某些非离子去污剂作用。

- 大小和密度不同的细胞器(如细胞核与线粒体等)沉降系数不同，由差速离心、速度区带离心和等密度离心等方法进行分离。

(三) 细胞器的移植

当植物细胞质膜外围没有细胞壁存在时，原生质体不仅能够彼此融合，而且还可以摄入叶绿体、核等细胞器。

- 根据原生质体的这种特性，人们正在探索利用原生质体进行细胞遗传饰变的新途径。

- → 在PEG诱导下，将多种禾谷类植物的核导入玉米原生质体，导入率可达5%。
- → 利用PEG法，将矮牵牛的核导入烟草原生质体，但再生植株中核染色体的复制及基因表达情况目前还不十分确定。
- → 以野生型烟草的叶绿体处理一个花斑烟草品系的白色组织，然后培养白化原生质体获得绿色植株，证明再生植株携带外源叶绿体DNA。
- 由于外源叶绿体膜与原生质体膜融合过程中会发生损伤，因而其进入原生质体后是否能够长期存活并正常复制还有待进一步研究。

(四) 原生质体对微生物的摄取

为了得到一种新的非豆科固氮植物，人们试图把固氮菌和蓝绿藻等引入植物细胞原生质体中。

- 有报道，在PEG诱导下，离体的植物原生质体能摄入酵母细胞和蓝绿藻。
- 目前已知，能被植物原生质体摄入的微生物还有异形胞犬菌的营养缺陷型细胞和固氮的蓝绿胶葡萄藻。
- 但对于这些被摄入的微生物是否能在宿主细胞中正常生存和繁殖，还缺乏足够的证据。

