

# 第六章 原生质体培养

研究概况

分离纯化

培养技术

再生植株  
遗传与变异

性细胞原生质体  
研究进展

# 第一节 原生质体研究概况

---

原生质体的概念

原生质体研究进展

原生质体研究的意义

## 一. 原生质体的概念

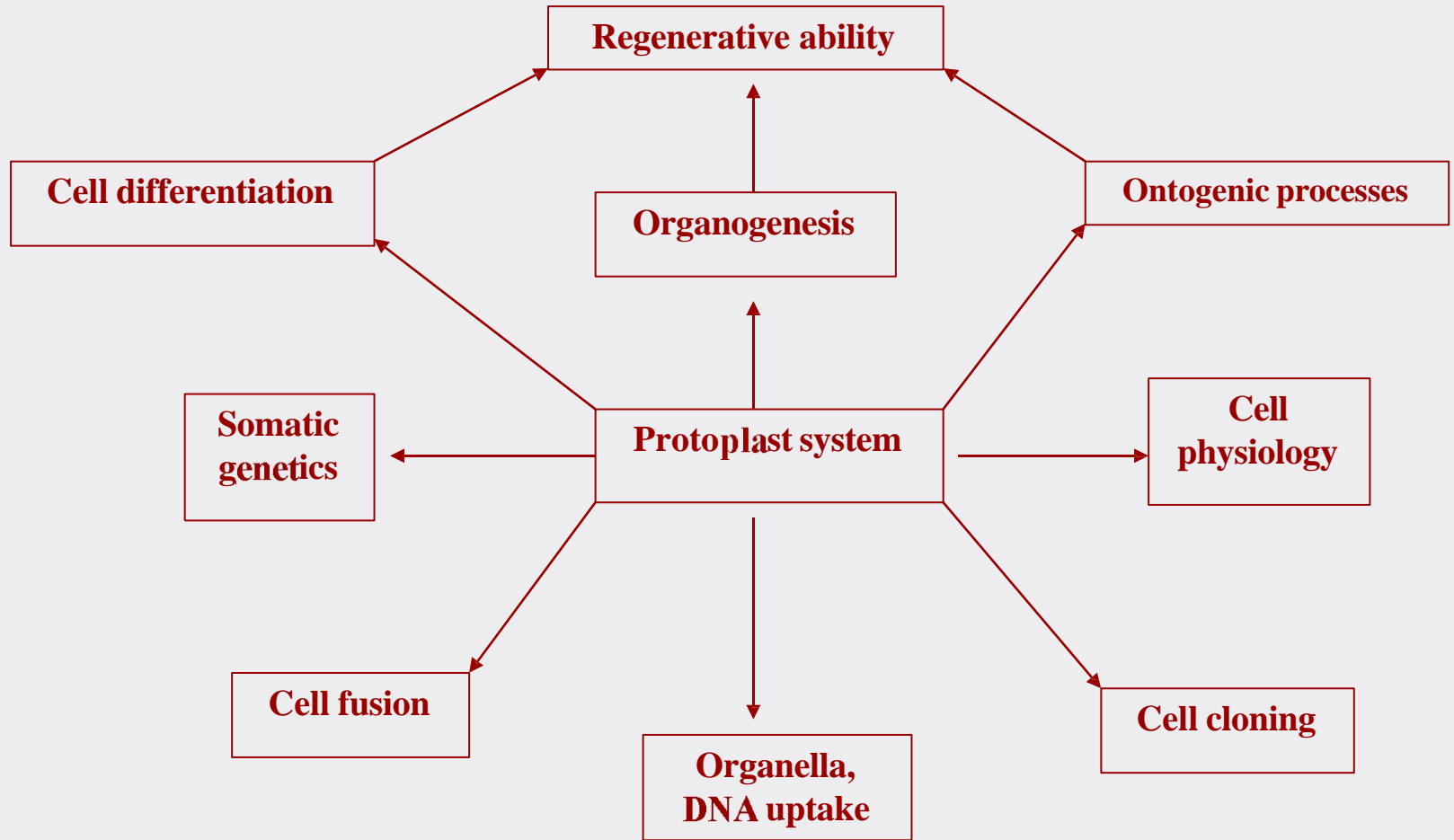
- **原生质体(protooplast): 指除去细胞壁的细胞或是说一个被质膜所包围的裸露细胞。**
  - ❖ **亚原生质体(subprotoplast): 在原生质体分离过程中, 有时会引起细胞内含物的断裂而形成一些较小的原生质体就叫做亚原生质体。它可以具有细胞核或没有细胞核。**
  - ❖ **核质体(nuclearplast): 由原生质膜和薄层细胞质包围细胞核形成的小原生质体。也称为微小原生质体(miniprotoplast).**
  - ❖ **胞质体 (cytoplast) : 不含细胞核而仅含有部分细胞质的原生质体.**

## 二. 原生质体研究进展

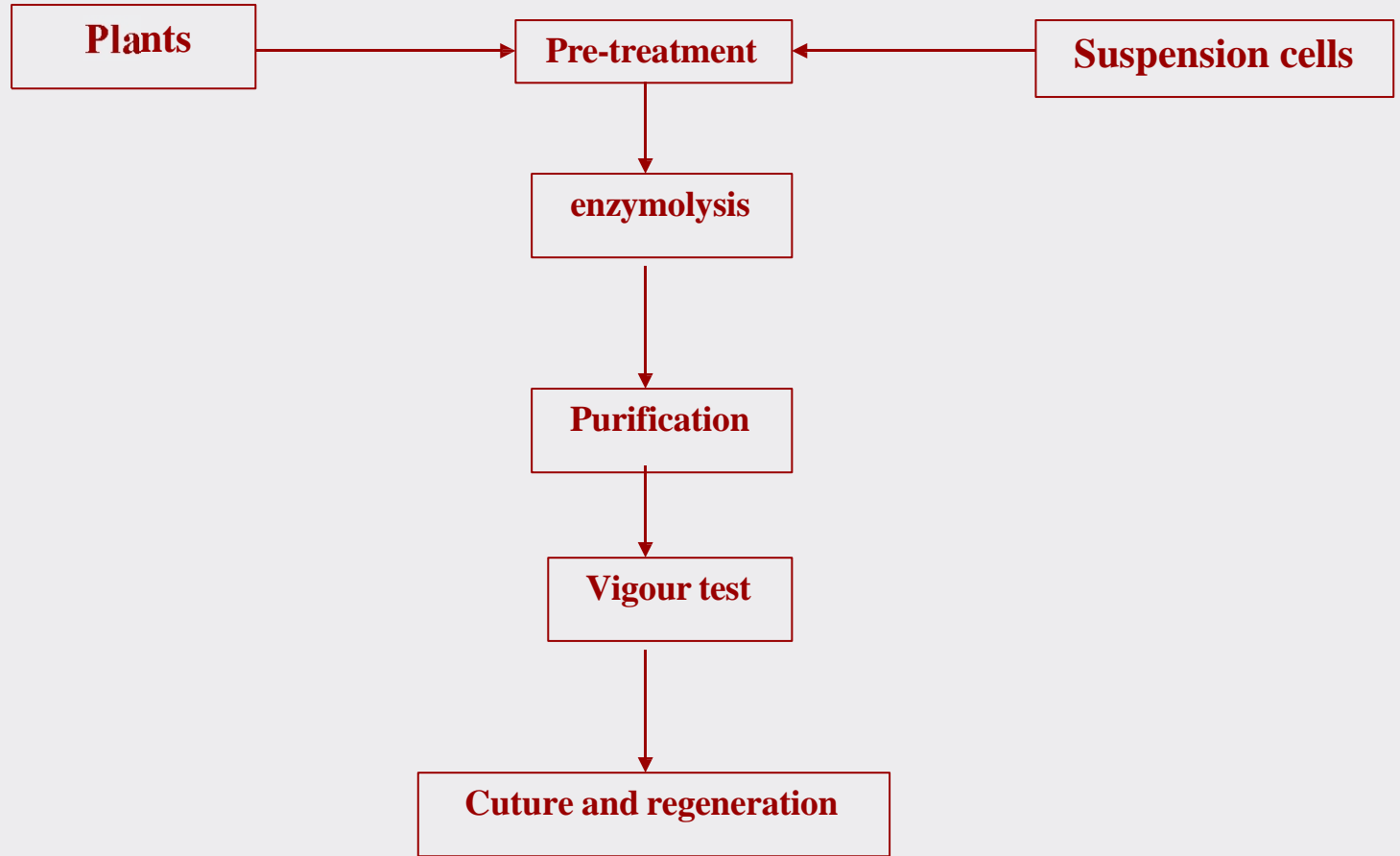
- **植物原生质体培养研究中几个重要突破性研究**
  - ❖ 1880年, Hanstein首次起用原生质体(protoplast)一词
  - ❖ 1960年, Cocking首次应用酶法制备番茄根原生质体获得成功
  - ❖ 1971年, Takebe et al.首次得到烟草叶肉原生质体培养的再生植株
  - ❖ 1985年, Fujimura et al.第一例禾谷类作物 - 水稻原生质体培养再生植株
  - ❖ 1986年, Spangenberg et al.单个原生质体培养再生植株在甘蓝型油菜上获得成功

- 据统计，目前已有49个科，146个属的320多种植物经原生质体培养得到了再生植株（1993）。其趋势仍以农作物和经济作物为主，但从一年生向多年生、草本向木本、高等植物向低等植物扩展。

### 三. 原生质体研究的意义



第一节 原生质体研究概况



**A scheme of plant protoplast**

## 第二节 原生质体的分离

基础材料准备

```
graph TD; A[基础材料准备] --> B[预处理与酶解]; B --> C[原生质体收集与纯化]; C --> D[原生质体活力测定];
```

预处理与酶解

原生质体收集与纯化

原生质体活力测定



# 一. 用于分离原生质体的材料准备



无菌试管苗  
叶片



子叶、上胚轴



培养细胞

## 二. 预处理及酶解



酶



渗透压  
调节剂



酶解

## 原生质体分离常用的商品酶

酶	来 源	生产厂家
纤维素酶类		
onozuka R-10	绿色木霉	Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan
Cellulysin	绿色木霉	Calbiochem., San Diego, CA 92037, USA
Driselase	Irpex lutens	Kayowa Hakko Kogyo Co., Tokyo, Japan
果胶酶类		
Macerozyme R-10	根霉	Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan
Pectinase	黑曲霉	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178, USA
Pectolyase Y-23	黑曲霉	Seishin Pharm. Co. Ltd., Tokyo, Japan
半纤维素酶		
Rhozyme HP-150	黑曲霉	Rohm and Hass Co., Philadelphia, PA 19105, USA

- **酶溶剂及其渗透压**

**溶剂：原生质体培养基或特殊配制。**

**渗透压调节剂：葡萄糖、甘露醇、山梨醇等。**

- **材料预处理**

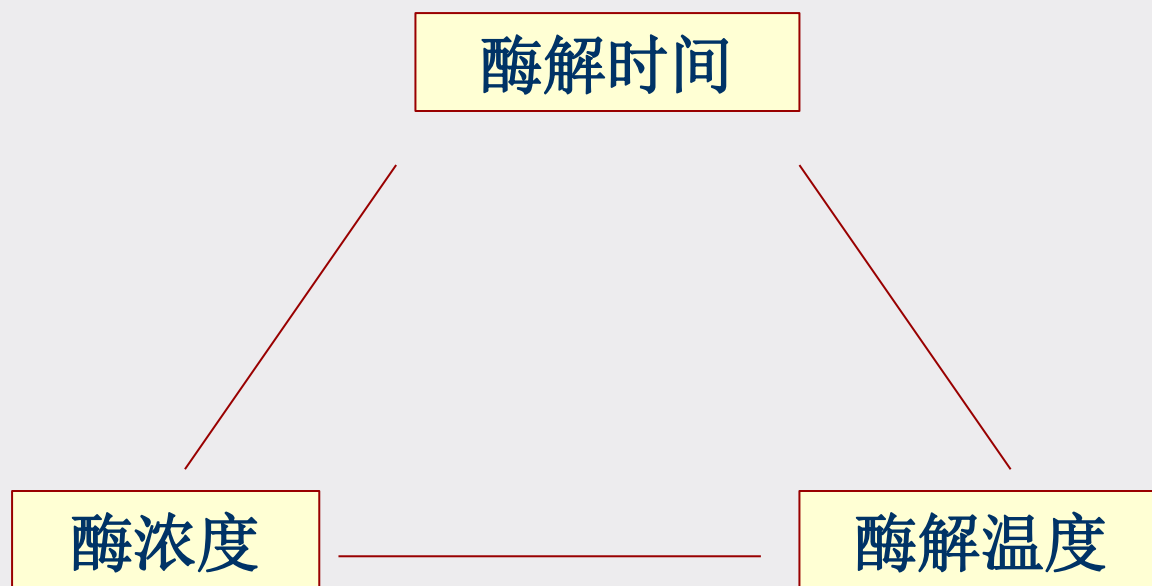
- 用黑暗处理、低温处理和不同光质照射等方法，可提高某些材料原生质体的产量和活力。不同植物及材料类型预处理方法不同。

龙胆试管苗的叶片只有用4℃低温处理;

甘蔗植株必须先先在黑暗条件下培养12h后分离的原生质体  
才能分裂;

马铃薯试管苗叶片需在黑暗下处理48h后分离原生质体，  
才会获得较高的产量。

- 酶处理



# 第二节 原生质体的分离

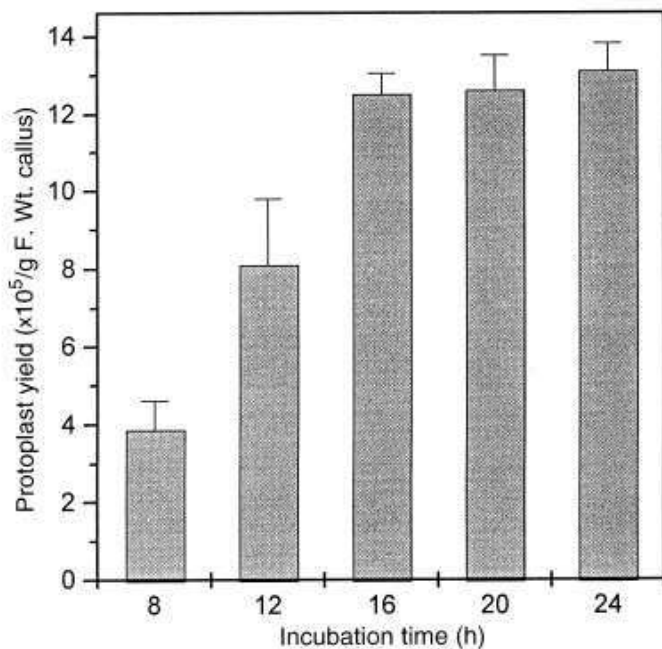


Fig. 1 Effect of enzymatic incubation period on protoplast yield

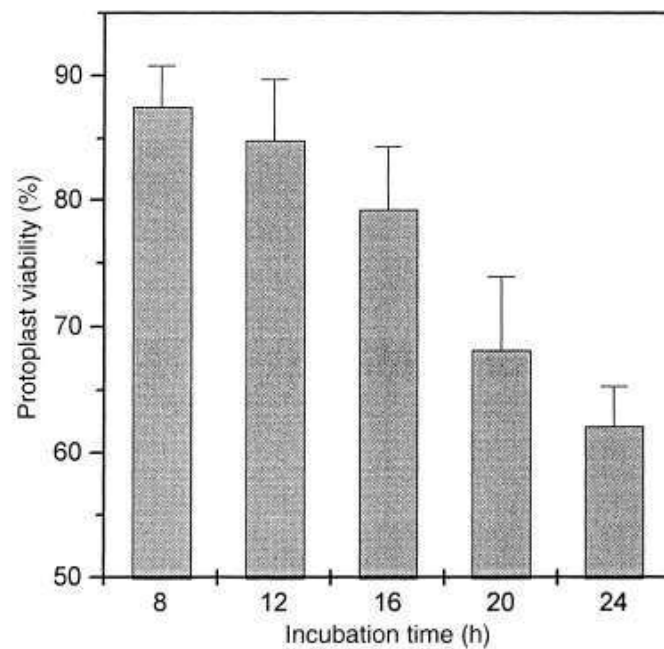


Fig. 2 Effect of enzymatic incubation period on protoplast variability

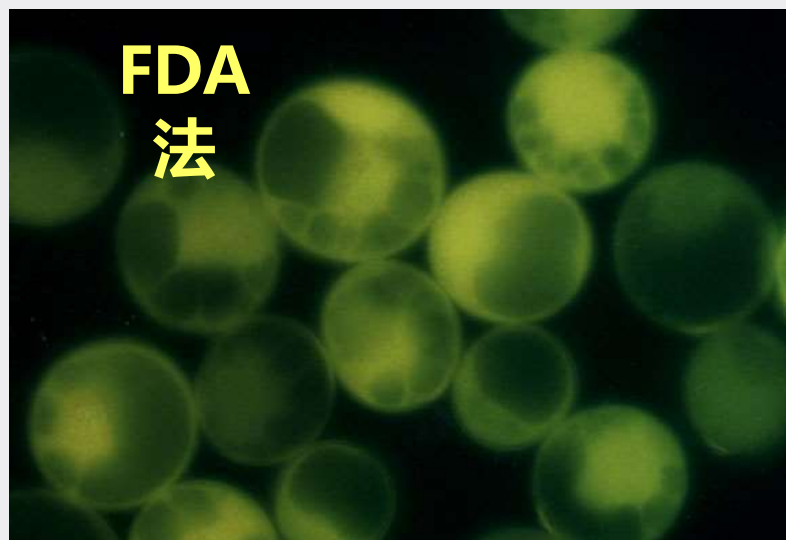
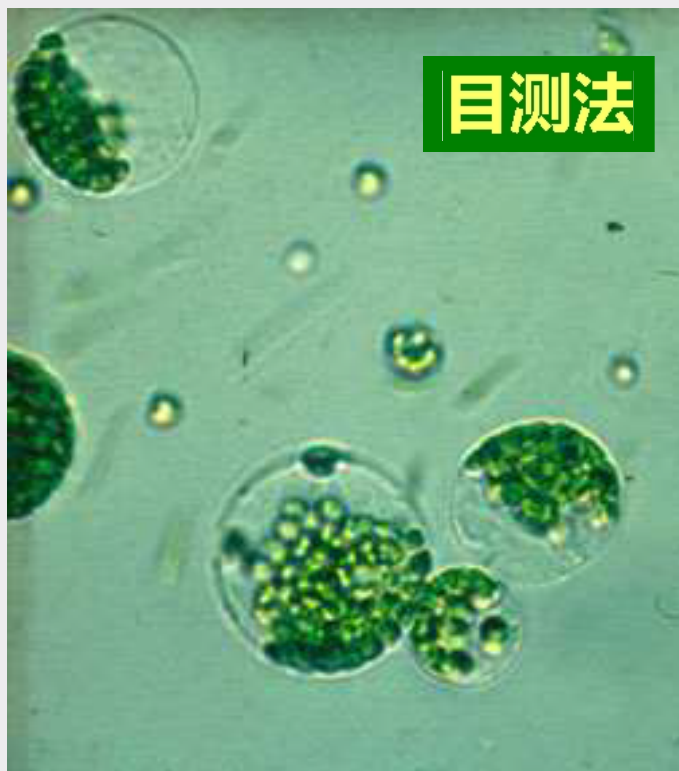
黄芪原生质体分离 (Luo and Jin, 1998)

### 三. 原生质体的收集和纯化

- **飘浮法：常用的飘浮剂有蔗糖、Percoll、Ficoll。**
- **沉淀法：常用甘露醇作为渗透压调节剂，先将酶液洗出干净，再用Percoll飘浮一次。**



## 四. 原生质体活力测定



## 分离原生质体的注意事项

- **基础材料具有培养条件和生理状态的稳定性**
- **酶解条件：酶质量、浓度、酶解温度、酶解时间、酶溶液的渗透压**
- **操作时间和环境控制**

# 原生质体培养

原生质体培养基

原生质体培养方法

愈伤组织形成和植株再生

影响原生质体培养的因素

# 一. 原生质体培养基

## 1. 无机盐

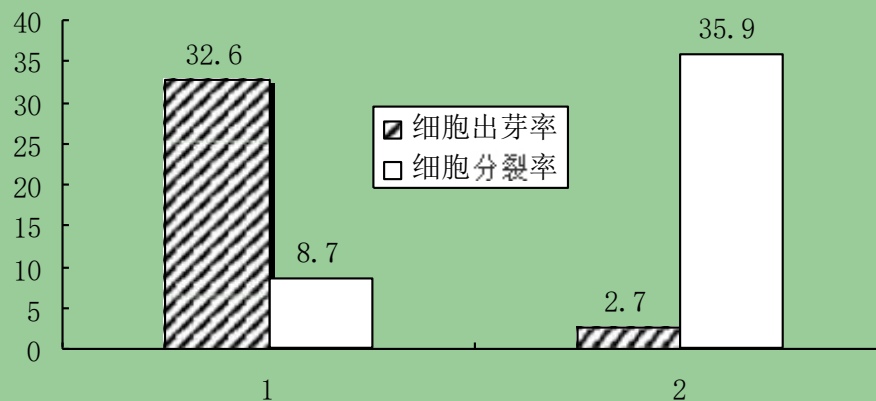
- 大量元素浓度;
- $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NH}_4^+$  的比例;
- $\text{Ca}^{2+}$  浓度

## 2. 有机成分

维生素、氨基酸、糖及糖醇等，酵母提取物、水解酪蛋白。

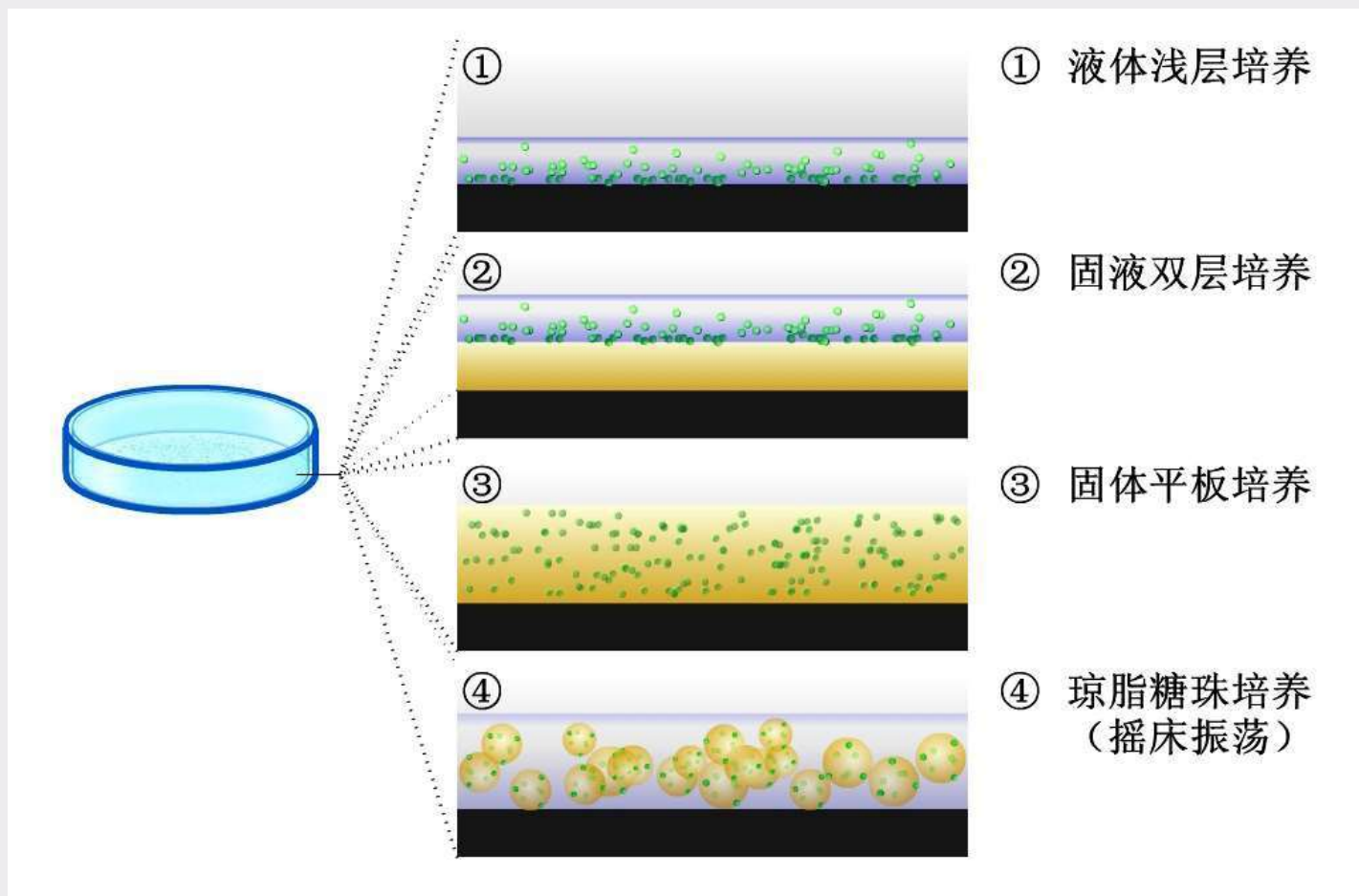
3. 激素 — 生长素先高后低

4. 渗透压 — 培养基渗透压与细胞渗透压等渗。



培养基糖醇变化对马铃薯原生质体细胞分裂和出芽率的影响。1. 在只含甘露醇、蔗糖和肌醇的培养基中培养7天；2. 在含蔗糖、纤维二糖、葡萄糖和甘露醇、肌醇、木糖醇、山梨醇的培养基中培养7天。

## 二. 原生质体培养方法



- **液体浅层培养**

将含有原生质体的培养液在培养皿底部铺一薄层，封口后进行培养。

优点：操作简单，对原生质体的损伤小，且易于添加新鲜培养基和转移培养物。

缺点：是原生质体分布不均匀，常常发生原生质体之间的粘连现象而影响其进一步的生长和发育。此外，难以跟踪观察某一个细胞的发育情况。

- **固体平板培养**

**固体培养也就是琼脂糖包埋培养。低融点的琼脂糖可在30°C左右融化与原生质体混合而不影响原生质体的生命活动。混合后的含有原生质体的培养基铺于培养皿底部，封口后进行培养。**

**优点：可以跟踪观察单个原生质体的发育情况，易于统计原生质体分裂频率。**

**缺点：是操作要求严格，尤其是混合时的温度掌握必需合适，温度偏高则影响原生质体的活力，温度偏低则琼脂糖凝固太快原生质体不易混合均匀。**



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/236030225045010044>