植物学通报 1995,12(增刊):17—20
Chinese Bulletin of Botany

影响植物单细胞克隆的条件因子

罗建平　　李　元*
(兰州大学生物系,兰州　730000)

CONDITIONING FACTORS INFLUENCING PLANT SINGLE CELL CLONE

Luo Jian-ping　　Li Yuan
(Dept. of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

植物单细胞克隆一般需要较高的细胞密度,这对于精确研究和突变体的有效筛选是不适宜的。虽然每个细胞都能够合成所有细胞生长和促进细胞分裂的必需代谢物,但是要诱导细胞生长和分裂,这些物质必需达到一定内源水平。细胞在培养时首先要适应培养基环境,细胞一方面从培养基中吸取营养成分,同时也向培养基中释放细胞内代谢物。只有当细胞内源代谢物达一定阈值,才能诱导细胞生长和分裂。当细胞密度较低时,这一阈值很难达到,造成细胞低密度培养在没有特殊条件时很难成活。因此细胞低密度培养时,细胞能否成功地克隆是取决于细胞生物合成能力和细胞内代谢物质外渗能力之间的大小(Street,1977)。看护培养、饲喂培养或条件培养能获得较高的植板率,其主要原因正是看护愈伤组织、饲喂细胞或条件培养基提供了细胞在低密度培养条件下所需的物质,使其达到一定水平诱导细胞生长和分裂。Muir(1954,1958)等认为他们成功地克隆万寿菊单细胞就是看护愈伤组织提供了单细胞生长和分裂的一些必需因子。Bergmann(1960)将愈伤组织置于细胞平板上,越靠近愈伤组织的细胞越先分裂形成克隆,而远离愈伤组织的细胞则较后分裂或几乎停止生长。Stuart 和 Street(1969)将细胞旺盛生长一段时间的悬浮培养液加入新鲜培养基中,细胞在低密度培养时能生长和增殖。这些实验都表明细胞本身能产生一些物质因子进而调节细胞生长和分裂,这些因子对低密度细胞克隆的诱导促进作用非常明显,被称为条件因子(Conditioning Factors, CFs)。

CFs 的生物化学性质

Street 等人在研究烟草细胞悬浮培养时发现"富裕"了的悬浮培养液能有效地刺激低细胞密度培养时的细胞生长和分裂(Stuart&Street,1969)后,就曾采用一种特殊的培养系统来考查 CFs 的性质(Stuart&Street,1971)。他们把低密度培养的细胞放在一个细胞快速生长的高密度

* 工作单位:云南农业大学,昆明 650201

培养的密闭环境中，即使细胞密度低于600个细胞/ml时仍能生长和分裂。据此认为CFs可能是一些不稳定具挥发性的物质，进一步的实验结果表明CO_2分压在诱导细胞生长和分裂中起作用，试图通过调节CO_2浓度代替这种挥发性因子，但结果并不能有效地诱导细胞生长和分裂。Xu(1981a,b)等在培养大麦花粉细胞时证明CFs是热稳定的，它们虽然不是激素但具有激素性质，和外源激素具有相互协同作用。

1985年，Kohle和Wenzel利用凝胶过滤层析和离子交换柱层析对CFs进行分离纯化，结合Ehrich显色反应都表明有两种低分子量的化合物具有CFs的作用，它们电泳时的迁移率和IEA相似。Bellincampi和Morpurgo(1987)首先把胡萝卜细胞悬浮培养物经渗透膜过滤得到CFs粗提物，经试验证明CFs在冰冻条件下相当稳定，能耐热能抗酸碱，是一类强亲水性的化合物。经葡聚糖凝胶过滤层析表明CFs的分子量约为700道尔顿。Somers(1987,1988)等对甜玉米的CFs性质作了较为详细的研究。CFs在室温下储存10天仍保持80%的活性，在－14℃下冷冻储存相当稳定，但100℃高温处理10分钟完全失活。经超滤膜过滤得到的CFs分子量在500－1350道尔顿之间，进一步凝胶过滤层析发现其中起主要作用的一种单体分子量约1200道尔顿左右。CFs具亲水性，pH5时最稳定，当pH小于2或大于8时失活。通过正负离子交换柱层析后不改变CFs活性。他们推测CFs可能是一类寡糖类(oligosaccharides)物质。Steinbrenne等人于1989年提出把条件培养基(conditioned medium，CM)中诱导细胞生长和分裂的因子分成VPFs(viability promoting factors)和CFs(conditioning factors)(Steinbrenne等，1989)，但后来的实验结果证明这两种因子是同一类物质(Schroder等，1989)。未纯化的VPFs对温度敏感，40℃时稳定性下降，常规高温高压灭菌处理后完全失活，当VPFs经纯化后即使高温高压灭菌处理仍相当稳定。酸性较强时VPFs不稳定，但在较碱性的溶液中保持稳定。VPFs具有一定的极性，经过渗析，超滤及凝胶过滤层析分析，烟草的VPFs分子量约在1000－1500道尔顿之间。电泳结果说明它们带正电荷，用蛋白酶K和E处理不影响VPFs的活性，当用β－糖甙酶和果胶酶分别作用于纯化和未纯化的VPFs，活性均丢失，这些结果说明VPFs无氨基肽链段存在或者不是活性结构组成，而糖支链的存在对VPFs活性起决定作用。根据以上结果推测VPFs可能是一类寡糖或寡糖类衍生物，支持了Somers等人(1987)的观点。Teasdale和Richards(1991)还提出LIGF(low inoculum growth factor)，其实就是CFs。他们的实验结果和上面相似，LIGF的分子量约为1000道尔顿，冰冻和室温条件下储存稳定，80℃高温处理一小时也不影响它的活性，但经过高温高压灭菌和在CM中加入活性碳则活性完全失去。LIGF经蛋白水解酶作用活性稳定同样说明是非肽段的化合物。综上所述，CFs可能就是一类寡糖物质。当细胞进行分裂和快速生长时，CFs可能参与细胞壁的生物合成，起到一种重要的作用(Teasdale和Richards，1991)。Fry(1986)利用放射性同位素标记证明植物培养细胞能产生一种对细胞生长有调节作用的九聚寡糖，其作用浓度很低，约为10^{-8}mol/L。最近，周平和郑光植(1989)进行红花单细胞克隆时将黑节草寡糖和人参寡糖加入平板培养基中，细胞克隆的植板率能显著提高。

CFs的生理作用

通常情况采用能提供CFs的培养技术和方法都可以大大提高细胞克隆的植板率。CFs的

浓度，和产生 CFs 的细胞培养物培养时间都能影响 CFs 的生理活性。在一定浓度范围内，CFs 浓度和克隆形成之间呈线性关系，甜玉米细胞的 CFs 浓度和细胞克隆形成之间的相关系数 $\gamma=0.997$(Birnberg 等，1988)，辐射松细胞的 CFs 浓度和细胞克隆形成之间的相关系数 $\gamma=0.994$(Teasdale 和 Richards，1991)。来自悬浮培养细胞对数生长期的 CFs 活性最大(Somers 等，1987)。Struuss 和 King(1981)克隆玫瑰细胞时用处于对数生长的细胞饲喂培养，结果植板率可达 80－95%。Teasdale 和 Richards(1991)考查辐射松培养细胞 LIGF 积累的时间进程表明 LIGF 在培养的第 9 天(对数生长期)达最大值。已有许多文献报道看护培养的效果比条件培养更好，而且细胞植板密度很低时也能产生较满意的刺激效果(Eigel&Koop，1989；Bellincampi&Morpurgo，1989；Hahne 等，1990)。看护培养时细胞密度可以低到 7cells/ml，而条件培养时细胞密度不能低于 1000cells/ml(Schroder 等，1989)。Bellincampi 和 Morpurgo (1989)发现胡萝卜细胞低密度培养时，采用 CM 和附加油菜素类脂等都不能提高植板率，只有看护培养时植板率才显著提高，由此推测看护愈伤组织另外还产生一类因子，这类因子不稳定，但对低密度培养细胞生长有很强的增效作用。Stuart 和 Street(1971)早先已证明悬浮细胞培养液中某种挥发性因子的存在，在制备 CM 的过程中可能已丢失不再存在。Schaffler 和 Koop(1990)等采用条件培养基和看护细胞共培养原生质体时并不能得到比单独看护培养更好的效果；当单独条件培养时，效果明显降低，他们认为某种不稳定因子的存在正是看护培养和条件培养相比细胞密度更低时获得较高植板率的原因，并且把诱导细胞生长和分裂的因子进一步分为 CFs 和 NFs(Nursing Factors)，测得 NFs 的分子量不超过 2000 道尔顿。

CFs 的生理作用专一性

CFs 的生理作用专一性不能一概而论，不同种属来源的 CFs 的生理作用专一性差异很大。大豆、马铃薯和胡萝卜细胞对玉米细胞克隆无饲喂作用，而燕麦细胞具有明显的饲喂效果，表现较强的专一性(Smith 等，1984)。用来自胡萝卜悬浮细胞培养物的 CM 条件培养烟草细胞克隆效果和来自烟草悬浮细胞的 CM 一样，CFs 无专一性(Steinbrenner 等，1989)。Teasdal 和 Richards(1991)指出 LIGF 在不同的植物种属之间是不同的。Hahne(1990)等证明虽然单子叶植物间细胞相互饲喂时具有一定的专一性但效果要比单子叶植物和双子叶植物之间饲喂效果好。也有许多实验结果表明 CFs 的作用没有专一性(Bellincamoi&Morpurgo，1987；Aviv&Galun，1984)。一般认为，在双子叶植物间 CFs 的生理作用没有很强的专一性，而单子叶植物特别是禾谷类植物的培养细胞对 CFs 表现较强的作用专一性，产生较好的饲喂效果至少要在同一科内(Vardi&Raveh，1978；Smith 等，1984；Mottley& Sybenga，1988；Hein& Schieder，1986；Kyozuka 等，1987)。

根据以上所述，CFs 的一些化学和生理性质总结如下：(1)CFs 的分子量约在 500－1500 道尔顿之间，分子结构中无氨基肽段存在，糖苷链段决定其生理活性，纯化的因子较稳定，低温条件下长时间储存和高温处理仍保持相当大的作用活性，强酸条件下不稳定但较能耐受弱酸和碱性条件的处理；具激素效应，低浓度即可产生显著的生理作用，可能是一类寡糖物质，在细胞生长和分裂时参与细胞壁的合成。(2)CFs 的生理作用专一性因种属而异，同一细胞来源的 CFs 其促进作用最有效。(3)CFs 的生理活性大小也受到产生 CFs 的细胞培养物早期生长状

态，培养时间的长短和克隆细胞早期生长状态的影响，CFs 的作用具有剂量效应，在一定浓度范围内，CFs 和细胞克隆形成比率呈线性函数关系，从细胞对数生长期分离的 CM 诱导效果最好。(4)看护培养能有效地保证不稳定的 NFs 存在，可以比仅有 CFs 时更有效地促进细胞生长和分裂。

实际上，影响植物单细胞生长、分裂的因素是很复杂的，对于不同类群的植物或同种不同基因型的植物所需条件差异甚大，看护培养被认为是使细胞培养成功的一个有效技术，但不同作者所采用的方式、看护培养的质量等往往不同，所取得的结果也不相同。

参 考 文 献

周平　郑光植(1989)植物学报 **31**:505－511。

AvivD & Galun E (1984) In Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 1. P:199－203(Vasil lK ed) Academic Press, New York.

Bellincampi D & Morpurgo G (1987) *Plant Sci.* **51**:83－91.

Bellincampi D & Morpurgo G (1989) *Plant Sci.* **65**:125－130.

Bergmann L (1960) *J. Genet. Pyhsiol.* **43**:841－851.

Birnberg PR et al(1988)*J. Plant Physiol.* **132**:316－321.

Eigel C & Koop HU (1989)*J. Plant Physiol.* **134**:577－581.

Fry SC (1986)*Planta* **169**:443－453.

Hahne B et al (1990)*Plant Cell Rep.* **8**:590－593.

Hcin T & Schicdcr O (1986) *Plant Brcding* **97**:255－260.

Kohler F & Wenzel G (1985) *J. Plant Physiol.* **121**:181－189.

Kyozuka J et al (1987) *Mol. Gen. Genet.* **206**:408－413.

Mottey J & Sybenga J (1988) *Plant Cell Rep.* **7**:193－196.

Muir WH et al (1954)*Science* **119**:877－878.

Muir WH et al (1958) *Amer. J Bot.* **45**:589－596.

Schaffler E & Koop HU (1990) *J. Plant Physiol.* **137**:95－106.

Schroder R et al (1989) *J. Plant Physiol.* **135**:422－427.

Smith JA et al (1984)*Plant Sci. Lett.* **36**:67－72.

Somers DA et al (1987)*Plant Sci.* **53**:249－256.

Steinbrenner B et al(1989)*J. Plant Physiol* **134**:582－585.

Strauss A & King OJ(1981)*Physiol Plant.* **51**:123－129.

Street HE(1977)In:Plant Tissue and Cell Culture (Street HE ed) Black vell Scientific Publication Oxford, P:207－222.

Stuart R & Street HE (1969)*J. Exp. Bot* **20**:556－571.

Stuart R & Street HE(1971)*J. Exp. Bot* **22**:96106.

Teasdale RD & Richards DK (1991)*Plant Cell Tissue & Organ Culture* **26**:53－59.

Vardi A & Raveh D (1978) *Z. Pflanzenphysiol* **78**:350－359.

Xu ZH et al (1981a) *J. Exp. Bot.* **32**:767－778.

Xu ZH & Sunderland N(1981b)*Plant Sci.* **23**:161－168.