

大豆和小麦原生质体的分离、 融合及融合体的筛选技术*

邵启全 彼得·卡尔逊**

(中国科学院遗传研究所)

摘 要

本文提供了大豆 (*Glycine max*) 根尖分生组织细胞原生质体和小麦叶栅栏细胞原生质体的分离方法, 建立了大豆和小麦原生质体融合的实验程序和融合体筛选技术。

引 言

大豆和小麦都是很主要的作物。若能将大豆的高蛋白基因转给小麦那将是一项突破。这里提供的资料仅是一个开端, 离目的尚远。体细胞杂交包括原生质体的分离、融合和培养, 以及从融合体诱导再生植株。这种技术可以用来改良农作物, 被看作是一种新的育种途径 (Peter S Carlson et al 1972, Bajaj 1974, Scowcroft 1977, Melchers G. 1977)。

本文报导了大豆根尖分生组织细胞原生质体和小麦叶栅栏细胞原生质体的分离技术, 融合的程序, 以及微针技术及利用微量针管分离融合体的办法, 把小麦大豆原生质体的融合体筛选出来。本工作的摘要曾发表在中国科学院遗传研究所1982年研究工作年会上 (邵启全和彼得·卡尔逊1982)。

材 料 和 方 法

一、小麦叶栅栏细胞原生质体的分离

禾木科植物叶片一般来说薄而坚硬, 剥去叶片表皮较难。为了克服这一困难, 我们将小麦“August”品种的种子浸种发芽和培养在人工气候箱中。箱中条件是: 恒温27°C, 相对湿度60%, 光照强度7500烛光, 光照时间12小时, 在这种情况下从浸种催芽到长出一片幼嫩的叶子只需五天的时间。这种叶片非常嫩, 在无菌条件下叶片用70%

* 这项工作是作者于1980至1981年在美国密执安州立大学彼得·卡尔逊教授的实验室任客座教授时所做的实验

** 美国密执安州立大学教授

本文于1984年9月29日收到。

的酒精消毒10分钟，用蒸馏水漂洗一次。用很锋利的镊子在叶片的一端轻轻擦伤叶片正面的上表皮，然后用镊子尖夹住上表皮，顺势一拉，就可以一次将一个叶片的全部上表皮扯下来，露出叶栅栏细胞。这时要把剥去叶表皮的一面向下接触酶解液，使叶片漂浮在酶解液上面。通过反复实验得出酶解效果的较好的配方是浸渍酶0.2%，纤维素酶2.0%，甘露糖醇0.7M，pH调至6。酶解液是事先配好，经细菌漏斗滤过消毒后，冷冻贮藏，使用前在30℃的恒温水浴中融化。这种叶片浮在酶解液上在25℃恒温箱中漂浮3小时，原生质体开始部分脱落，不需等全部脱落就应取出，在无菌条件下，轻轻摇晃，全部原生质体都会脱落下来，这时漂浮在酶液表面的只是一片透明的叶片下表皮。如果等到原生质体从叶片全部自然地脱落下来，就有些酶解过度，原生质体发脆，容易破裂。在得到原生质体后，使用低速离心（800转/分）去掉上清液。再用液体培养基B₅（Gamborg O. L. et al 1974）冲洗二次，每次离心（800转/分）5分钟，去掉上清液。这样就可以收集到大量的小麦叶栅栏细胞原生质体（见图1）用于融合。

二、大豆根尖原生质体的分离

本实验的设想是利用小麦叶栅栏细胞原生质体的绿色和大豆根尖分生组织细胞原生质体的白色的特点，试图对融合体进行机械筛选，因为融合体是一半绿一半白，绿白分明。根尖原生质体的分离比叶片难。由于根表皮细胞不易被剥出，所以全部采用酶解法，配合用微针头破碎法，得到大量的白色大豆根尖分生组织细胞原生质体。这首先要生长旺盛幼嫩的大豆根尖。为此，将大豆“Bezeen”品种的种子浸泡发芽以后，播种在恒温恒湿箱的砂盘内，恒温27℃，相对湿度60%，光照强度7500烛光，光照时间12小时。播种五天以后，将生长旺盛幼嫩的大豆根尖1厘米左右切下，并切去根冠。然后在1%的漂白液中消毒5分钟，再用95%酒精复合消毒10秒钟，然后再用蒸馏水冲洗二次后，转入酶溶液。从根尖分生组织细胞直接分离原生质体需要特殊的酶组合。为了从小麦、大麦等作物根尖分生组织分离出大量的原生质体，以便从中提取染色体，我们曾试验了许多的酶组合，从中选中一种，其分离效果很好。我们利用这个酶配方分离大豆根尖原生质体也得到了好的效果。这个混合酶的配方是：甘露糖醇0.8M，纤维素酶3%，浸渍酶1%，半纤维素酶0.5%，果胶酶0.25%，若栽酶（“Rhozyme”）1%，pH调至

大豆根尖分生组织细胞原生质体分离效果

Split effect of soybean root tip meristem protoplasts

观察细胞数 cell number	155	140	136	110	127
原生质体数 protoplasts number	55	93	80	67	95
%	35.5	66.4	58.8	60.9	74.8

5.7. 经过细菌漏斗过滤消毒以后，分装冷冻贮藏备用。使用以前在30℃水浴锅中溶

解。将消毒好的根尖投入混合酶解液，置在摇床上（40转/分钟）消化24小时以后，看到有部分原生质体从根尖脱落下来。这时要用 $18.1\frac{1}{2}$ 的针头，使全部根尖通过注射器的针头；可使全部破碎为单个的细胞，更换新的酶解液以后，再在同样的条件下又消化24小时。用无菌纱布过滤后离心（800转/分），去掉上清液，再用B₂A液体培养基冲洗两次。利用这种方法可以分离出大量的白色的根尖分生组织细胞的原生质体，原生质体数可占细胞总数的近60%（见图2）。

三、原生质体融合

将上述小麦叶栅栏细胞原生质体（绿色）和大豆根尖分生组织细胞原生质体（白色）浓缩。叶栅栏细胞原生质体的浓缩采用自然沉淀即可。根尖细胞原生质体的浓缩需经过离心（600转/分），然后用双层无菌纱布滤过，可以得到较纯的根尖原生质体，浓缩后每微升原生质体数目达到258个即 2×10^6 /毫升左右。这时将两种原生质体以1:1的体积混合，再加入同样数量的融合剂/PEG 35%水溶液，要充分搅拌，置于50℃水浴锅中反应15分钟。然后再用比反应液大四倍的（CPW混合液），稀释10分钟，借以终止融合反应。融合以后，再利用B₂A培养基冲洗两次。每次以600转/分离心15分钟，去掉上清液。这时可以观察，也可以培养，也可以在显微镜下利用微管挑选融合体。在解剖镜下看到各样的融合方式，有的是一个细胞和一个细胞融合（见图4），有的是两个细胞和一个细胞或二个细胞，或多个细胞融合。融合体都是一绿一白，在显微镜下观察一清二楚。也有自体融合的情况。1981年7—10月间先后做了6批试验，均得到融合体，其频率在0.1%左右。

四、融合体的微针筛选

在得到融合体以后，下一步的任务就是将融合体筛选出来。筛选方法有多种，较为理想的是利用选择培养基，就是说在这种选择培养基上只有融合体能够生长，而任何一种原始原生质体都不能生长。然而，在大豆小麦融合体的这种筛选培养基尚未有找到以前，仍可利用颜色标记的办法。这就是本实验所采用的方法。这就需要一种微管技术，在立体解剖镜下将融合体分离出来。微针管可以在酒精喷灯的火焰上加热抽拉，微针管的内径应当细到在同时只能通过1—2个细胞（见图3）。在微针做好以后，在微管的一端安装胶皮囊调节压力，皮囊内要充满棉球，以控制压力。这时在立体的解剖镜下就可以顺利地将融合体分离出来。一个熟练技术员每分钟可分离出1—2个融合体。因为某些原因对融合体未做培养。

结果与讨论

在这篇报告里，提供了分离小麦叶栅栏细胞原生质体的技术，分离大豆根尖分生组织细胞原生质体的技术，大豆小麦原生质体融合的技术和融合体筛选的技术。在此基础上已经可以开展大豆小麦融合体的培养获得杂种。这种技术在今天和今后都会颇为有

用, 故发表在这里以供参考。

参 考 文 献

- [1] Bajaj Y. P. S. : 1974, Potentials of protoplast culture work in agriculture "Euphytica" 23 : 633—649
- [2] Carlson. P. S. et.al.: 1972. Parasexual interspecific plant hybridization "Proc. Natl. Acad. Sci." USA 69 : 2292—2294.
- [3] Melchers G.: 1977, Plant Hybrids by fusion of protoplasts PP 209—226 in "Recombinant Molecules Impact on Science and Society" Ed. R. Beers et al. Raven Press. N. Y. 1977.
- [4] Gamborg O. L. e. al.: 1974, Canad. J. genet and Cytol 16, 737—750
- [5] Scowcroft W. R.: 1977. Somatic cell genetics and plant improvement "Adv. Agronomy" 29 : 39—81.
- [6] 邵启全, 彼得·卡尔逊: 1982 《研究工作年报》(中国科学院遗传研究所) 科学出版社 208 页。

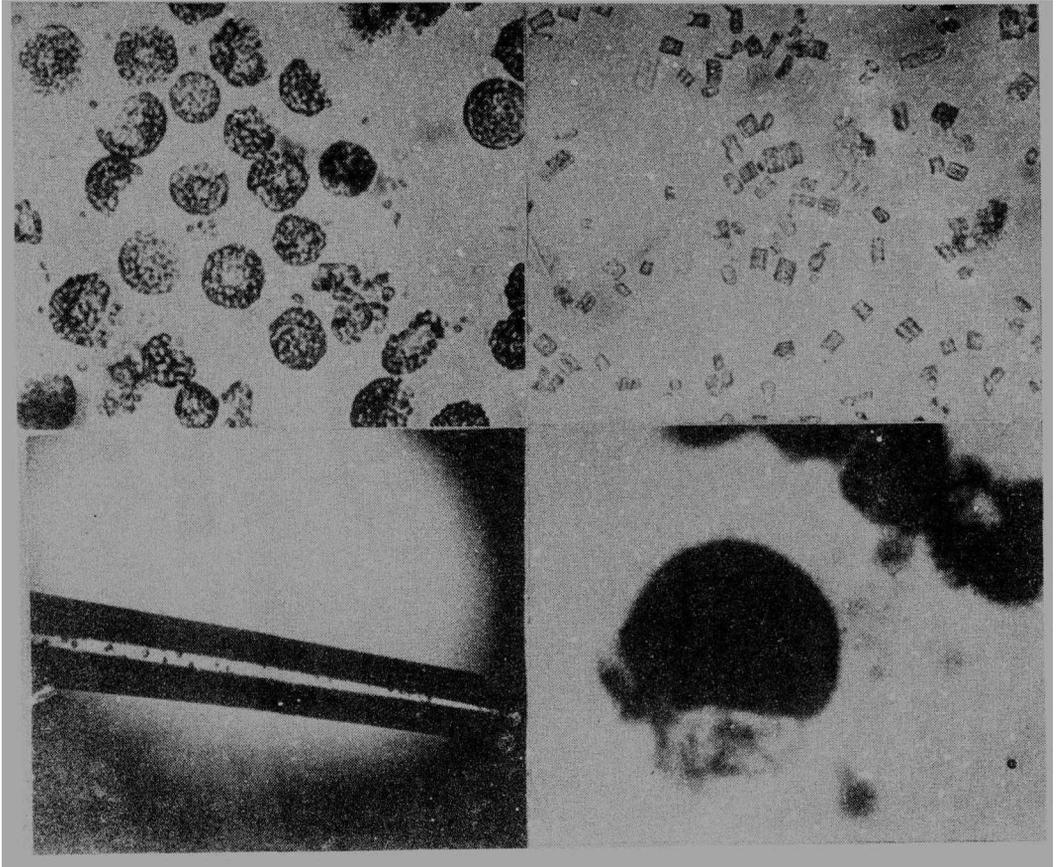
ISOLATION, FUSION OF SOYBEAN AND WHEAT PROTOPLASTS AND SCREENING OF FUSANTS

Shao Qiquan, Peter S. Carlson

(*Institute of Genetics, Academia Sinica*)

Procedures have been developed for the isolation of wheat leaf protoplasts and soybean root tip meristem protoplasts. Fusion between protoplasts has been achieved using polyethylene glycol. The fusion products has been selected by micropipette.

邵启全等：大豆和小麦原生质体的分离、融合及融合体的筛选技术
Shao Qiquan et al.: Isolation, Fusion of Soybean and wheat
Protoplasts and Screening of Fusants



图版说明：

1. 小麦叶栅细胞原生质体
Wheat leaf protoplasts
2. 大豆根尖分生组织细胞原生质体
Soybean root tip meristem protoplasts
3. 用于筛选融合体的玻璃微针管
Micropipette for selected the fusants
4. 大豆小麦原生质体融合体
The fusants of protoplasts both soybean and wheat