

# 大豆单细胞培养和原生质体 游离的细胞形态观察\*

罗希明

(吉林省农业科学院大豆研究所)

安利佳

(东北师范大学生物系)

## 摘 要

本文将形状不同的大豆悬浮培养细胞分成三种类型：圆形和椭圆形(A类)稍长形(B类)和长形细胞(C类)。A类细胞分生能力强，经多次分裂形成多细胞团；C类细胞多数为老化细胞，能分裂但不能形成细胞团；B类细胞在悬浮细胞中含量很少，大部分能分裂形成细胞团。在用悬浮培养细胞游离原生质体的过程中，A类细胞几乎全能游离出原生质体，B类细胞大部分能游离出原生质体，C类细胞几乎不能游离出原生质体。因此，在游离悬浮培养细胞时，在原生质体中含有少量未去壁的C类细胞和极少数B类细胞可不必用其它的方法分离出去，因为C类细胞不能形成细胞团，那么经培养形成的愈伤组织和分化再生的完整植株可能几乎都是由原生质体产生的。

**关键词：**大豆·细胞培养·细胞形态学

近些年来，大豆组织培养和单细胞培养再生植株已有许多成功的报道<sup>[3,5-8]</sup>，大豆原生质体培养的研究也有许多文章发表<sup>[2,3]</sup>。但是，大豆原生质体培养至今没有获得再生植株的结果，而且关于大豆组织、细胞和原生质体培养的细胞学观察的报道也甚少。

本文的目的是在大豆单细胞培养和原生质体游离的研究中，初步探讨在单细胞到愈伤组织的形成过程中细胞的形态变化，这对单细胞培养和悬浮培养细胞游离原生质体的研究可能有一定的参考意义，现将本试验的观察结果作一描述和分析。

\* 吉林省农业科学院大豆所赵桂兰和刘艳芝同志参加了悬浮培养细胞的部分转移工作，特此致谢。

本文于1987年7月25日收到。This paper was received in July 25, 1987.

## 材 料 和 方 法

试验的大豆品种为吉林 13 号、吉林 12 号、小青豆等，种子来源于吉林省农业科学院大豆研究所，大豆植株在田间和温室中生长。

### 1. 幼胚悬浮培养细胞的建立

从大豆植株上摘取授粉后 20 天的幼荚，用酒精灭菌，从荚中取出幼籽粒，将带有子叶的幼胚切成 1—2mm 的小块，然后接种在固体培养基上 (MS + 1.5 mg/l 2,4-D)，12 小时光照，28℃，二周继代一次。40 天后形成各种形态的愈伤组织、然后将不同类型的部分愈伤组织压碎后，分别放入液体培养基 (MS + 0.5mg/l 2,4-D + 5% 椰子乳) 中，再把这种盛有培养物的三角瓶放在摇床上振荡培养 (140 转/分，25% 左右，12 小时光照)。14 天后用 200 目网过滤一次单细胞，再过 14 天后过滤一次单细胞，以后每周换入新鲜液体培养基进行继代培养，主要参考李宝健的方法<sup>[7]</sup>。倒置显微镜下观察细胞的形态。

### 2. 下胚轴悬浮培养细胞的建立

取干种子用 2% 次氯酸钠液进行表面灭菌，然后用无菌水冲洗三次，在固体培养基 SGL (Collins, 1982) 上萌发，切取生长 8—10 天无菌苗下胚轴，接在固体培养基 SLA (SL + 0.25MM 毒莠定 + 0.4.μMBA) 上，28℃ 左右，12 小时光照，二周继代一次，一个月后形成不同类型的愈伤组织，然后分别放入液体培养基 SLA 中，在摇床上振荡培养 (140 转/分，25℃ 左右，12 小时光照)。14 天后用 200 目网过滤一次单细胞，再过 14 天后过滤一次单细胞，以后每周换入新鲜液体培养基进行继代培养，倒置镜下观察细胞形态。

这两种悬浮培养细胞，在振荡条件下形成许多小块愈伤组织 (一个月左右)，将这些小块愈伤组织分别转入固体培养基 MS 和 SLA 上，愈伤组织生长较快。在倒置镜下观察单细胞的生长和分裂及细胞团和愈伤组织的形成，肉眼观察愈伤组织的形态和颜色的变化，分别取下不同形态和颜色的愈伤组织表面部分小块，压碎后放在液体培养基中观察细胞的形态。

### 3. 悬浮培养细胞的原生体质游离

分别将继代培养 2—7 天的两种悬浮培养细胞放入酶液中，游离原生质体。游离条件：15 转/分，28℃，暗处。酶液成分：100mg 纤维素酶 (Cellulase R—10)，20mg 果胶离析酶 (Pectolyase Y—23)，200mg 崩溃酶 (Driselase)，10ml CPW 9M<sup>[2]</sup>，游离 6 小时后分别得到 30—95% 的原生质体，然后用原生质体培养基 K8P<sup>[2]</sup> 悬滴培养，倒置镜下活体观察。

## 观 察 与 分 析

大豆幼胚和下胚轴悬浮培养细胞的形态，分裂和原生质体游离情况基本相同，所以

本文对这两种材料一起进行描述和分析。

1. 悬浮培养细胞的形态观察

在振荡培养的悬浮培养细胞中，细胞的大小、形状不尽相同。我们将这些细胞按形状分成三大类：A 近圆形和椭圆型（图 2）；B 中等长度细胞，长径约为短径的二倍（图 3）；C 长形细胞，长径大于三倍短径（图 7）。A 类细胞的细胞质浓厚，几乎无液泡，质体较多。B 类细胞的细胞质浓厚程度一般，有小液泡，质体较少。C 类细胞的细胞质稀少，液泡化程度较大，质体较少。

在悬浮培养细胞的建立过程中，我们观察到这三类细胞的主要来源是用于建立悬浮培养细胞的不同类型愈伤组织。（1）含有大量 A 类细胞的悬浮培养细胞系来源于结构较紧密、愈伤组织颗粒较小而数量多的浅绿色愈伤组织（图 4）。（2）含较多 B 类细胞的悬浮培养细胞系来源于较松散、表面粗糙、颗粒较大的白色或浅黄色愈伤组织（图 1）

（3）含较多 C 类细胞的悬浮培养细胞系主要来源于松散、表面粗糙、大块的褐色或浅褐色愈伤组织（图 7）。来源不同类型愈伤组织的悬浮培养细胞中，不同类型细胞的近似比例见表 1。本试验中，A 和 B 类细胞由 C 类细胞转变来的可能性不大，用含有大量类细胞的愈伤组织建立的培养细胞，经过几次继代并没有见到 A 类细胞大量增加，即使延长了继代时间也仍然含有大量的 C 类细胞。A 和 B 类细胞在不适宜的条件下可转变成 C 类细胞，在含有大量 A 类或 B 类悬浮培养细胞的继代培养过程中，由于换液不及时（延长了换液时间），或者在换液时留下的细胞过多，可见到 C 类细胞逐渐增多，结果使培养细胞群体变成浅褐色或褐色而老化。镜下可观察到长形细胞内空旷，一部分圆形细胞变大，细胞质稀少等现象。这些培养物以后再按时按量转移也不能使褐色去掉，仍然含有大量的 C 类细胞，这些长细胞在不长的时间内大量增加，可能大部分是由 A 或 B 类细胞转变而来，但也不排除在这种条件下长细胞增殖加快，而 A 和 B 类细胞增殖减慢的可能性。

表 1 来源不同类型愈伤组织的悬浮培养细胞中不同类型细胞的比例  
Table 1 Proportion of different type cells in the suspension culture cells from different type calli

愈伤组织类型 Callus types**	细胞类型 Cell types*		
	A (%)	B (%)	C (%)
1	91.2	7.3	1.5
2	73.2	10.7	16.1
3	13.5	11.3	75.2

\* 四个镜下视野的不同类型细胞的平均百分数。

- \*\* 1. 结构紧密、颗粒小的浅绿色愈伤组织。  
2. 较松散、表面粗糙、颗粒较大的白色和浅黄色愈伤组织。  
3. 松散、表面粗糙、大块的褐色和浅褐色愈伤组织。

\* The mean percentages of different type cells in four fields of vision under microscope.

- \*\* 1. The pale green callus of compact constitution, small particles.  
2. The white and the pale yellow calli of looser constitution, rough surface and bigger particles.  
3. The brown and the pale brown calli of loose constitution, rough surface, and big piece,

2. 悬浮培养细胞的分裂

在振荡培养条件下, A类细胞经过多次分裂形成分裂旺盛的细胞团, 细胞团中的细胞几乎都为A类细胞(图10, 12), 成为胚性细胞团。B类细胞的第一次分裂多为纵向分裂、形成两个纵向成对细胞(图3), 第二次分裂形成四个纵向结合的4细胞团, 极少数能形成细胞不多的小细胞团, 这类细胞可能有一部分正向长细胞的方向发展。C类细胞的第一次分裂是在中部形成细胞壁(图7), 第二次分裂也是在相连接的两个细胞中部分别形成细胞壁(图7)。这样4个细胞以长轴相连形成4细胞链。第三次分裂时四个细胞两两断开, 形成2个两细胞链或成单个长细胞, 刚断开的长细胞的长度没有快要分裂的长细胞长, 没有观察到多细胞的长链, 即使在不振荡的静止情况下也没见到细胞长链这是我们在继代换液剩下的细胞系静放5天内所见到的情况, 因此C类细胞不能形成多细胞团, 这些长形细胞分散在圆形细胞团的周围(图12)。在大豆悬浮培养细胞的培养过程中, 我们观察到细胞团几乎都是A类细胞团。这些细胞团逐渐生长形成小块愈伤组织, 多数的细胞都是A类细胞。将这些小块愈伤组织转入固体培养基后形成大块愈伤组织, 我们在镜下观察到这些大块愈伤组织中的细胞在固体培养基上产生了变化, 出现了上述三种类型的细胞, 这说明由液体培养基中转入固体培养基后所出现的C类细胞是由圆形和椭圆形细胞分化产生的, 结果又出现了各种形态和颜色的愈伤组织。这些不同类型的愈伤组织产生的原因可能是与培养条件(由液体变为固体)和培养基中添加不同浓度外源激素的变化等条件有关, 本文没有进行这方面的研究, 对这种关系不作讨论。

### 3. 悬浮培养细胞原生质体游离过程中的细胞观察

从不同类型细胞游离原生质体的情况来看, 几乎所有的A类细胞都能游离出原生质体, B类细胞大部分能游离出原生质体, C类细胞几乎都不能游离出原生质体。即使加大酶液的浓度, 增长酶解时间, 也不能使C类细胞壁降解(图11), 因此要获得高产量的原生质体, 需用含大量A类细胞的悬浮培养细胞作为游离的材料。从继代的时间来看, 取继代4—5天的培养细胞作游离材料原生质体产量最高, 因为6—7天的材料中C类细胞的数量比前几天的多, 还可能与A和B类细胞的细胞壁发育程度有关。

一般来说, 游离的原生质体产量要在95%以上才适于原生质体培养、因为有较多没法去壁的单细胞混在原生质体中进行培养, 产生的愈伤组织并不都是来自原生质体, 而较多是来自单细胞, 诱导出来的植株就很难说都是来自原生质体。但也没有必要必须得到100%的原生质体才能进行培养, 因为原生质体的分裂率一般都在20%以上, 如果1—2%的单细胞形成了愈伤组织, 它只占极少部分。原生质体的提纯方法一般是用蔗糖、血清蛋白、聚蔗糖等介质进行密度梯度离心, 去掉没去壁的单细胞。从前面的结果和分析中可以看出, 不用密度梯度离心的方法去掉C类细胞, 就可以直接放入培养基中进行原生质体培养, 因为C类细胞在培养过程中不能形成多细胞团, 进而形成愈伤组织。我们观察到这些少量的C类细胞只是分散在培养的原生质体之中, 即使有极个别的C类细胞变成圆形或椭圆型的细胞也是在原生质体再生壁经过多次分裂以后才变形的。在我们的大豆原生质体培养中, 第三天就出现了第一次分裂, 第七天出现第二次分裂, 因此当培养液中出现愈伤组织小块的时候, 取出愈伤组织植入固体培养基诱导成植株、可以说这

种植株是来自原生质体的。所以我们认为,用大豆悬浮培养细胞作为大豆原生质体游离材料,在本试验条件下,可以不必将少量没去掉细胞壁的长细胞用密度梯度离心的方法去掉,就可以直接将混有少量长细胞的原生质体放入原生质体培养基中培养,这样也可以得到几乎都是原生质体产生的愈伤组织,并且可以避免离心介质对原生质体的毒害作用,减少培养过程中的不利因素。本文的观察和分析可能为大豆悬浮培养细胞的原生质体游离和培养提供一个较为简便的方法。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译, 1978, 植物组织和细胞培养, 120—126, 上海科学技术出版社。
- [2] 吕德扬, 1985, 遗传, 7(4): 9—11。
- [3] 张 谦, 1986, 植物生理学通讯, 5: 66—76。
- [4] 黄大年等, 1983, 遗传, 5(2): 10—12。
- [5] Chowhury V. K., Widholm J. M., 1985, *Plant Cell Reports*, 4: 289—292。
- [6] Gamburg O. L. et al., 1985, *Plant Cell Reports*, 2: 213—215。
- [7] Li B. J. et al., 1985, *Plant Cell Reports*, 4: 344—347。
- [8] Wright M. S. et al., 1986, *Plant Cell Reports*, 5: 150—154。

## MORPHOCYTOLOGICAL OBSERVATION OF MONOCELL CULTURE AND PROTOPLAST ISOLATION IN SOYBEAN

Luo Ximing

(Institute of Soybean, Jilin Academy of Agricultural Sciences)

An Lijia

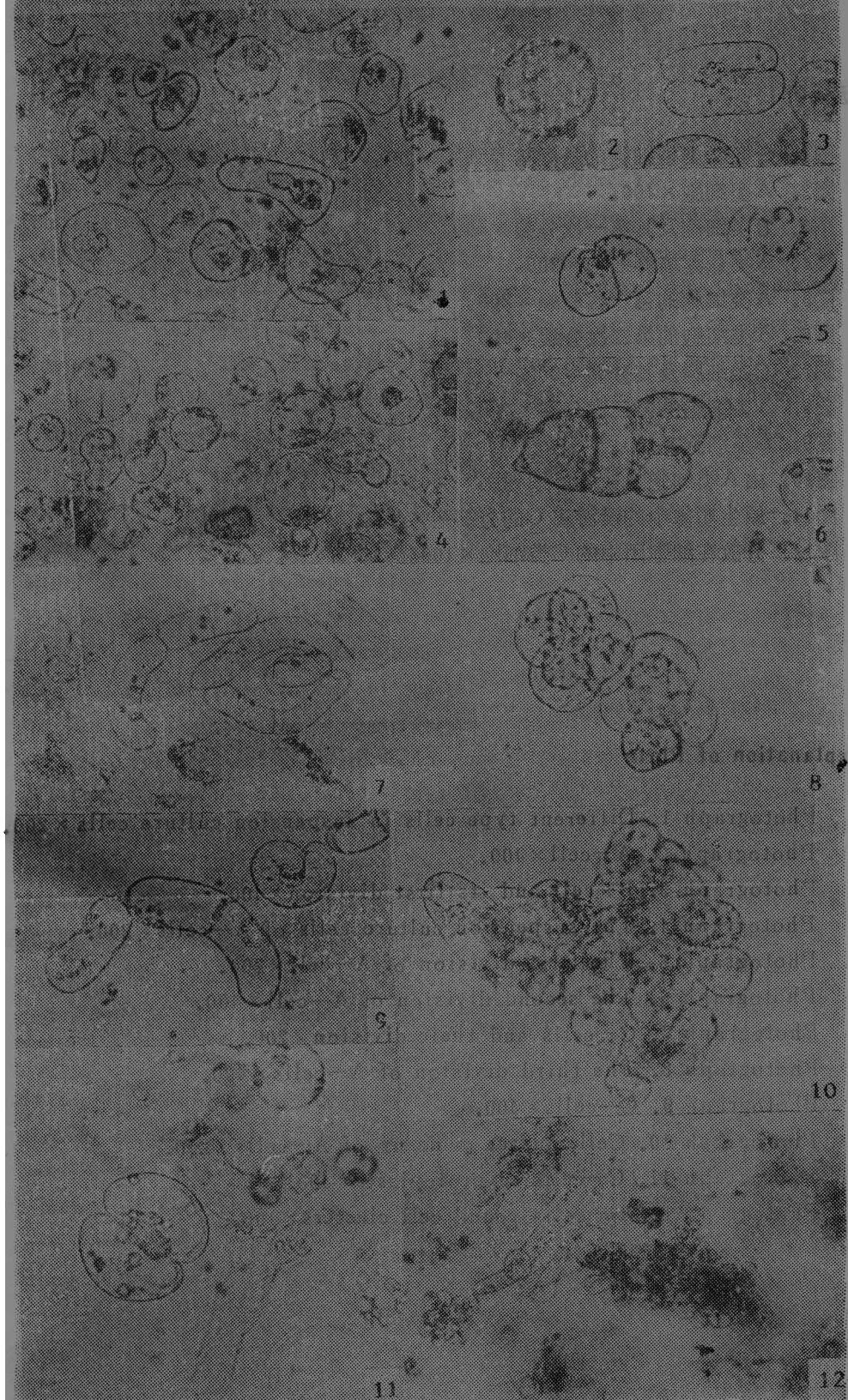
(Department of Biology, Northeast Normal University)

### Abstract

We classify different suspension culture cells from soybean (*Glycine max* L.) in shape into three types: spherical and elliptic cells (A), slightly long cells (B), long cells (C). The meristic ability of A—cells is strong, and A—cells can form into cell clusters through successive division. C—cells can divide, but can not form into long-cell clusters. C-cells are ageing cells. The case of B-cells division is situated between A and B. Protoplasts can fully be isolated from A-cells, and can not be isolated from C-cells, in the process of protoplast isolation from suspension culture cell. Therefore, C-cells need not to be removed from protoplasts using suspension culture cells as isolation material, the calli in culture fluid are from protoplasts.

key words: Soybean (*Glycine max*) Cell culture Morphocytology

罗希明：大豆单细胞培养和原生质体游离的细胞形态观察 图版



## 图版说明

- 图1. 含各种类型细胞的悬浮培养细胞 $\times 200$ 。
- 图2. A类细胞 $\times 400$ 。
- 图3. B类细胞及其第一次分裂 $\times 400$ 。
- 图4. A类悬浮培养细胞 $\times 200$ 。
- 图5. A类细胞的第一次分裂 $\times 200$ 。
- 图6. A类细胞的第二次分裂 $\times 400$ 。
- 图7. C类细胞及其分裂 $\times 200$ 。
- 图8. A类细胞的第三次分裂 $\times 400$ 。
- 图9. C类细胞 $\times 400$ 。
- 图10. 由A类细胞组成的多细胞团 $\times 200$ 。
- 图11. 原生质体中的没游离C的类细胞 $\times 400$ 。
- 图12. 分散在细胞团中的C类细胞 $\times 100$ 。

## Explanation of Plate

- Photograph 1. Different type cells in suspension culture cells $\times 200$ .
- Photograph 2. A—cell $\times 400$ .
- Photograph 3. B—cell and its first division $\times 400$ .
- Photograph 4. The suspension culture cells of A—cells $\times 200$ .
- Photograph 5. The first division of A—cell $\times 200$ .
- Photograph 6. The second division of A—cell $\times 400$ .
- Photograph 7. C—cells and their division $\times 200$ .
- Photograph 8. The third division of A—cells $\times 400$ .
- Photograph 9. C—cells $\times 400$ .
- Photograph 10. Cell cluster made up of A—cells $\times 200$ .
- Photograph 11. C—cells in protoplasts $\times 400$ .
- Photograph 12. C—cells round cell clusters $\times 100$ .