

# 大豆原生质体的游离、培养和愈伤组织的生成\*

简 玉 瑜

(吉林省农业科学院大豆研究所)

## 提 要

从大豆未成熟荚的子叶游离出大量原生质体,经培养保持分裂,并获得了肉眼可见的愈伤组织。

组织培养技术作为改良品种的一种手段日益受到人们的重视。特别是最近十多年来,植物原生质体的培养和体细胞杂交的研究工作的发展十分迅速,是进行遗传工程、遗传物质转导必不可少的试验技术;目前已有三十多种植物的原生质体再生成完整植株。通过原生质体融合获得种间杂种植株的有烟草、矮牵牛、胡萝卜、曼陀罗等;特别是自1978年Melchers<sup>[1]</sup>等获得了马铃薯与番茄、Gleba与Hoffmann<sup>[2, 3]</sup>获得了拟南芥菜与油菜属间杂种后,体细胞杂交在克服远缘杂交不孕的道路上迈出了可喜的一步。

豆科原生质体再生植株成功的还为数不多,目前除苜蓿(Alfalfa)原生质体再生成植株外(Kao, 1980)<sup>[4]</sup>、豌豆(Constable, 1973)<sup>[5]</sup>、豇豆(Davey, 1974)<sup>[6]</sup>、蚕豆(Binding, 1978)<sup>[7]</sup>、菜豆(Plecher, 1974)<sup>[8]</sup>原生质体只获得了愈伤组织。大豆是重要经济作物,在组织培养上,许多学者以大豆为材料,试图从大豆的根的培养细胞(Kao, 1970)<sup>[9, 10, 11]</sup>、根(许智宏, 1982)<sup>[12]</sup>、未成熟豆荚的荚皮(Zieg and Outka, 1980)<sup>[13]</sup>和叶(Schwenk, 1981)<sup>[14]</sup>游离原生质体,目前只从荚皮和根的原生质体获得了愈伤组织,至今未获得原生质体的再生植株。

我们的目的是应用原生质体融合,遗传物质转化等体细胞杂交方法,以期改变大豆遗传组成,增大变异幅度,为大幅度提高大豆产量、质量、抗性,提供有利的变异体。为了建立遗传工程研究的实验系统,第一步,必须获得大量的原生质体,并促进原生质体再生植株。为此,我们试图从根、叶、髓部和荚游离原生质体。本文报导从大豆未成熟荚的子叶游离出大量的原生质体,经培养保持分裂,并获得了肉眼可见的愈伤组织。目前尚未见到用子叶游离大豆原生质体的报导。

\* 此项工作的技术方法承蒙加拿大国家研究委员会草原地区实验室高国楠教授的指导,特此致谢!

## 材 料 和 方 法

取材：供试材料共 69 份，其中栽培大豆 29 份，半栽培大豆 17 份，野生豆 23 份。从田间取鼓粒初期的豆荚（栽培大豆豆荚约 1 厘米×4 厘米，野生豆较小），将荚用酒精进行表面消毒，用镊子取出豆粒，剥去种皮，用锋利的解剖刀，把幼嫩的子叶横切成多片，放进 60×15mm 的培养皿中，加酶和原生质体培养基混合液进行酶介。

原生质体游离：酶液（成分见表一）和原生质体培养基（Kao, 1982）<sup>[15]</sup>等量混合，每粒豆用 3ml 混合液，培养皿用石蜡膜封口，保持在 25℃，放在黑盒内暗光培养；不时轻微摇动，以助细胞壁酶介，酶介 24 小时。酶介后期，子叶被酶溶液溶解成碎片。用吸管把酶液与游离的原生质体通过 60 微米不锈钢网过滤，收集于离心管内，除去残渣和未酶介的细胞团，离心收集原生质体，用吸管小心去掉上清液，然后加进 5ml 原生质体培养基，把原生质体重新漂浮起来，再度离心收集，再次去上清液。原生质体连续使用培养基洗涤 4 次。离心速度为 1000 转/分，每次离心 4—6 分钟。

原生质体培养：经过四次清洗后，在原生质体沉淀中加入少量的培养基，原生质体约为培养基的 0.01% 至 0.2%，让原生质体均匀漂浮，达到每毫升  $1 \times 10^5$  细胞数的密度。用微滴（约 50 微升）滴进 Falcon 1007 塑料培养皿中，增加通气，每皿约 5—12 滴。用石蜡膜封口，放在 25℃ 暗光下培养，经过 2—3 天，待原生质体重新形成壁，并开始分裂时，加进新鲜的培养基。

表 1 大豆原生质体分离的酶液

成 分	数 量	成 分	数 量
Onozuka R-10 纤维素酶	200mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mg
Rhozyme 半纤维素酶	200mg	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10mg
Sigma 果胶酶	100mg	MES (2-N-吗啉代乙烷磺酸)	5.8mg
葡萄糖	1260mg	H <sub>2</sub> O	10mg

pH5.5

## 试 验 结 果

我们进行了二十四次试验，供试材料 69 份，其中有 15 份材料获得了大量的细胞团，其中栽培大豆 12 份，半栽培大豆 2 份，野生大豆 1 份；其他许多材料原生质体分裂 1—2 次就死亡或根本不分裂。初步看出用这个方法游离，栽培大豆较野生大豆容易。栽培大豆不同品种表现不同。有的品种分裂容易，有的品种分裂难。

原生质体在游离后，胞质环流清楚可见，原生质体的产量占细胞总数的 80%。大豆幼嫩的子叶，由于是具有分生能力的材料，在培养后二、三天即见再生细胞第一次分裂；培养四、五天即可见第二次分裂。分裂的原生质体占原生质体总数的 30—50%。

随着细胞的分裂, 减低培养基的渗透压, 将原生质体培养基的 68.4 克/升葡萄糖用 5 克/升葡萄糖和 25 克/升蔗糖所代替。随着细胞的增殖, 培养基量增加, 应放在慢速摇床上培养, 并逐步加光, 可促进细胞团形成肉眼可见的愈伤组织, 目前正在分化培养中。

### 参 考 文 献

1. Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder, 1978, Carlsberg Res. Commun. 43: 203—21
2. Gleba, Y. and F. Hoffmann: 1978, MGG, 165: 257—264.
3. ————: 1980, Planta, 149: 112—117
4. K. N. Kao and M. R. Michayluk: Z. Pflanzenphysiol. Bd, 93, S. 135—141, 1980
5. F. Constable, J. W. Kirkpatrick and O. L. Gamborg: Can. J. Bot. 51 (1973) 2105
6. M. R. Davey, E. Bush and J. B. Power: Plant Sci. Lett. 3 (1974) 127
7. H. Binding and R. Nehls: Z. Pflanzenphysiol. 83 (1978) 327
8. L. E. Piecher, O. L. Gamborg and K. N. Kao: Plant Sci. Lett. 3 (1974) 107
9. K. N. Kao, W. A. Keller and R. A. Miller: Exp. Cell Res. 62: 333 (1970)
10. K. N. Kao, O. L. Gamborg, R. A. Miller and W. A. Keller: Nature New Biology 232: 124 (1971)
11. R. A. Miller, O. L. Gamborg, W. A. Keller and K. N. Kao: Can. J. Genet. Cytol. 13, 347 (1971)
12. Z. H. Xu, M. R. Davey and E. C. Cocking: Plant Sci. Lett. 24 (1982) 115
13. R. G. Zieg and D. E. Outka, Plant Sci. Lett. 18 (1980) 105
14. F. W. Schwenk, C. A. Pearson and M. R. Roth, Plant Sci. Lett. 23 (1981) 153
15. K. N. Kao, In L. R. Wetter and F. Constable (Eds) Plant Tissue Culture Methods 1982, p. 52

## ISOLATION, CULTURE AND CALLUS FORMATION OF SOYBEAN PROTOPLAST

Jian Yuyu

(Soybean Institute, Jilin Academy of Agricultural Science)

### Abstract

Protoplasts isolated enzymatically from cotyledons of immature pods and rapidly obtain in high number. Protoplast regenerated a wall, sustained division, and consequently callus can be formed from it. Protoplast division occurred after 2—3 days of culture, compact clusters of cells appeared in the second week of culture, transfer of these clusters to the liquid medium resulted in formation of rapidly growing, callus tissues, which exposure to light turned green.

