

大豆与豌豆原生质体融合的初步研究

赵桂兰 简玉瑜

(吉林省农业科学院大豆研究所)

摘 要

我们采用PEG—高pH—高钙的方法对大豆和豌豆原生质体进行融合,获得了10—36%的融合率。大豆原生质体游离的混合酶液为2% Cellulase ONOZUKA R-10, 2% Hemicellulase-Rhozyme, 1% Pectinase Sigma; 豌豆原生质体游离的混合酶液为2% Cellulase ONOZUKA R-10, 2% Hemicellulase sigma, 1% Pectinase Sigma。原生质体的密度对融合的影响很大,以 10^4 — 10^5 /毫升的密度适合原生质体融合及有利细胞分裂。品种间融合率有差异。融合体用高国楠的KM8P培养基培养,经过多次分裂,获得了愈伤组织。

1977年, Constabel和Gamborg进行过大豆与豌豆的融合研究。他们用的酶液是0.5% Pectinase、1% Driselase和0.55M Sorbitol; 得到了杂种细胞,经多次分裂,形成多细胞球。

我们于1983—1984年进行了大豆与豌豆原生质体融合的研究。目的是应用原生质体融合技术,导入外源遗传物质,以扩大大豆变异幅度,创造光能利用率高、品质好、抗性强和高产的新突变体。本文报导了大豆与豌豆融合的初步研究结果。

材 料 和 方 法

供试大豆品种9份,吉林8号、吉林13号、吉林10号、吉林4号、公交7511、公交7512、公交7608、小青豆、PI 90763。在温室播种,温度25℃左右,自然光照,取幼荚游离原生质体。豌豆品种3份,阿拉斯加、Rondo、沈阳早生,取室内盆栽、温度25℃左右,室内自然光照,平展的第3至第5片复叶。

一、原生质体的制备

取鼓粒初期的豆荚用酒精消毒,取出子叶,剥去种皮,用刀片纵切数片放入酶和原生质体培养基(Kao, KM8P)混合液(1:1),在室温(25℃)摇床上(60rpm)游离24小时(图版Ⅲ—1)。

豌豆叶片用70%酒精表面消毒,撕去下表皮,切小块置于酶液中酶解6小时(图版

本文于1986年8月7日收到。 This Paper was received in Aug. 7, 1986.

Ⅲ—2)。

大豆子叶的酶液为2% Cellulase ONOZUKA R-10, 2% Hemicellulase Rho-
zyme, 1% Pectinase Sigma; 游离豌豆叶肉细胞的酶液为 2%Cellulase ONOZUKA
R-10, 2% Hemicellulase Sigma, 1% Pectinase Sigma, 分别溶于渗透稳定剂中。

二、原生质体的融合

把大豆子叶的原生质体与豌豆叶肉细胞的原生质体等量混合。具体方法、步骤按高
国楠“植物原生质体融合方法”(Kao, 1982)的 PEG—高pH—高钙的技术融合, 融
合24小时后, 在倒置显微镜下观察融合细胞的分裂情况。

结果与分析

两种原生质体等量混合后, 加 PEG 在高 pH 和高钙条件下培养 20 分钟, 在倒置显
微镜下, 观察到异种原生质体或是同源亲本之间原生质体发生聚合。24小时后即可看到
融合体细胞(图版Ⅲ—3); 48小时后融合体开始第一次细胞分裂(图版Ⅲ—4); 以后
继续第二次分裂和多次分裂(图版Ⅲ—5); 最后形成多细胞球(图版Ⅲ—6)。

我们已得到了大块的杂种愈伤组织, 并转移到固体培养基, 目前仍未做核型与同工
酶分析, 有待进一步研究。

要获得分裂频率高的原生质体, 必须考虑两方面的问题: 一是供试材料的遗传特性
及生理状态; 一是培养条件, 包括培养基成分及培养时的密度, 各种融合剂的 pH 值,
钙离子的浓度, 激素的配合及渗透压的作用。

一、品种间的差异对游离、培养、融合的影响

供试的 9 份大豆品种中, 原生质体数量和分裂率有差异, 只有两份材料获得较理想

表 1 大豆品种间原生质体游离数量和分裂频率的差异

Table 1 The differences of among soybean varieties protoplasts
isolation number and division frequency

品种 Varieties	原生质体数 (%) Protoplasts number (%)	原生质体的分裂 (%) Protoplasts divided (%)
PI 90763	95以上	90
吉林 8 号	80—90	80
吉林 13 号	80	75
吉林 10 号	70	50
吉林 4 号	30—50	25
7608	30—50	25
7511	30—50	25
7512	30—40	20
小青豆	30	10

的原生质体，数量（80％以上），原生质体的分裂频率也高于其它品种，结果见表 1。豌豆品种间也有差异（表 2）。

表 2 豌豆品种间原生质体游离数和分裂频率的差异
Table 2 The differences of among pea varieties protoplasts isolation number and division frequency

品种 Varieties	原生质体数 (%) Protoplasts number (%)	原生质体分裂 (%) Protoplasts divided (%)	融合品种名称 Fusion varieties	融合率 (%) Fusion frequency (%)
阿拉斯加	90	80	吉林 8 号+阿拉斯加	10—36
			吉林 13 号+阿拉斯加	15—22
Rondo	80	60	吉林 8 号+Rondo	13—17
			吉林 10+Rondo	10—12
沈阳早生	60	30	吉林 8 号+沈阳早生	0
			吉林 10 号+沈阳早生	0

从表 1、2 中可以看出，融合率最高的达 36％。这是在吉林 8 号+阿拉斯加这个组合中获得的；第二是吉林 13 号+阿拉斯加。所以要求大量筛选材料的基因型才会得到满意的结果。

二、酶液的浓度对游离的原生质体存活及分裂的影响

我们以 PI90763 在不同浓度酶液试验，结果不同。见表 3。

表 3 酶液的浓度对原生质体产量的影响
Table 3 Effect of enzyme's density on protoplasts production

品种 Varieties	酶的组成 Composition of enzyme	数量 (%) Number (%)	原生质体数 (%) Protoplasts number (%)	原生质体分裂 (%) Protoplasts divided (%)
PI 90763	ONOUKA R-10	2	20	0
	Rhozyme	2		
	Sigma	1		
PI 90763	ONOUKA R-10	2	90—95	90
	Rhozyme	1—1.5		
	Sigma	1		

PI 90763 这一品种 在半纤维素 2％时，游离出少量的原生质体，原生质体在进行培养的过程逐渐解体，细胞不分裂。当降低半纤维素酶为 1—1.5％时，能够游离出大量的原生质体，经培养后，原生质体再生新壁，细胞能正常分裂，并多次分裂，形成多细胞球。

三、pH 的影响

游离原生质体时，酶液的最佳 pH 值是 5.5。进行酶解时，如果 pH 稍偏酸性（5.4 以下），难以游离出原生质体，即使游离出少量原生质体也很快解体。融合剂 PEG 是在 pH10.5 下促进融合。培养基的 pH 是 5.7—5.8，低于 5.3 以下时影响异核体成活。所以，试验必须严格控制 pH 值，否则达不到预期的结果。

四、融合体的鉴别和培养

加入 PEG24 小时之后，在倒置显微镜下观察有两种融合现象，一是亲本之间自发融合（大豆+大豆、豌豆+豌豆）；一是异源原生质体融合，即杂合体细胞。由于大

豆子叶原生质体细胞质呈透明网状流动,而豌豆叶肉细胞有叶绿体(绿色颗粒状),在倒置显微镜下从外形可以区分融合体。用微滴方法可直接选择出融合体培养,用高国楠培养基在暗光下培养。随着融合体细胞分裂状态,定期加入不同比例的原生质体培养基、细胞培养基及细胞团培养基。两个多月后即可形成大块愈伤组织,转入固体培养基进行分化培养。

五、原生质体密度对融合的影响

在原生质体培养过程中,密度过高、过低都不利于再生细胞的分裂,会由于营养不足或细胞代谢物过多而妨碍正常生长。融合时两亲本的原生质体要有一定的密度,并且数量比例要达到1:1,这样才能提高融合率,融合体才能正常分裂。我们认为适宜的密度为 10^4 — 10^6 /毫升。

有关融合体的选择、杂种细胞的鉴定及分化有待于进一步研究。

(参考文献略)

RESEARCH ON FUSION OF SOYBEAN AND PEA PROTOPLAST

Zhao Guilan Jian Yuyu

(Soybean Institute, Jilin Academy of Agricultural Science,
Gongzhuling, China)

Abstract

Protoplast from cotyledon of soybean and leaf of pea were isolated and cultured. The protoplast of soybean were isolated in an osmotic solution containing an enzyme mixture, 2% Cellulase ONOZUKA R-10, 2% Hemicellulase HP 150, 1% Pectinase Sigma and that of pea were isolated in 2% Cellulase ONOZUKA R-10, 2% Hemicellulase Sigma, 1% Pectinase Sigma. Protoplast from soybean and pea were fused with the method of PEG-high pH-high Ca^{++} , and 10—36% fusion rate was obtained. The density of protoplasts has an important effect on protoplast fusion, the most suitable density is 10^4 — 10^6 protoplasts/ml to protoplast fusion and division of fusion cells. Fusion cells were cultured in Kao's medium (KM8P), and the calli were obtained through division of the fusion cells.

图版 III plate III

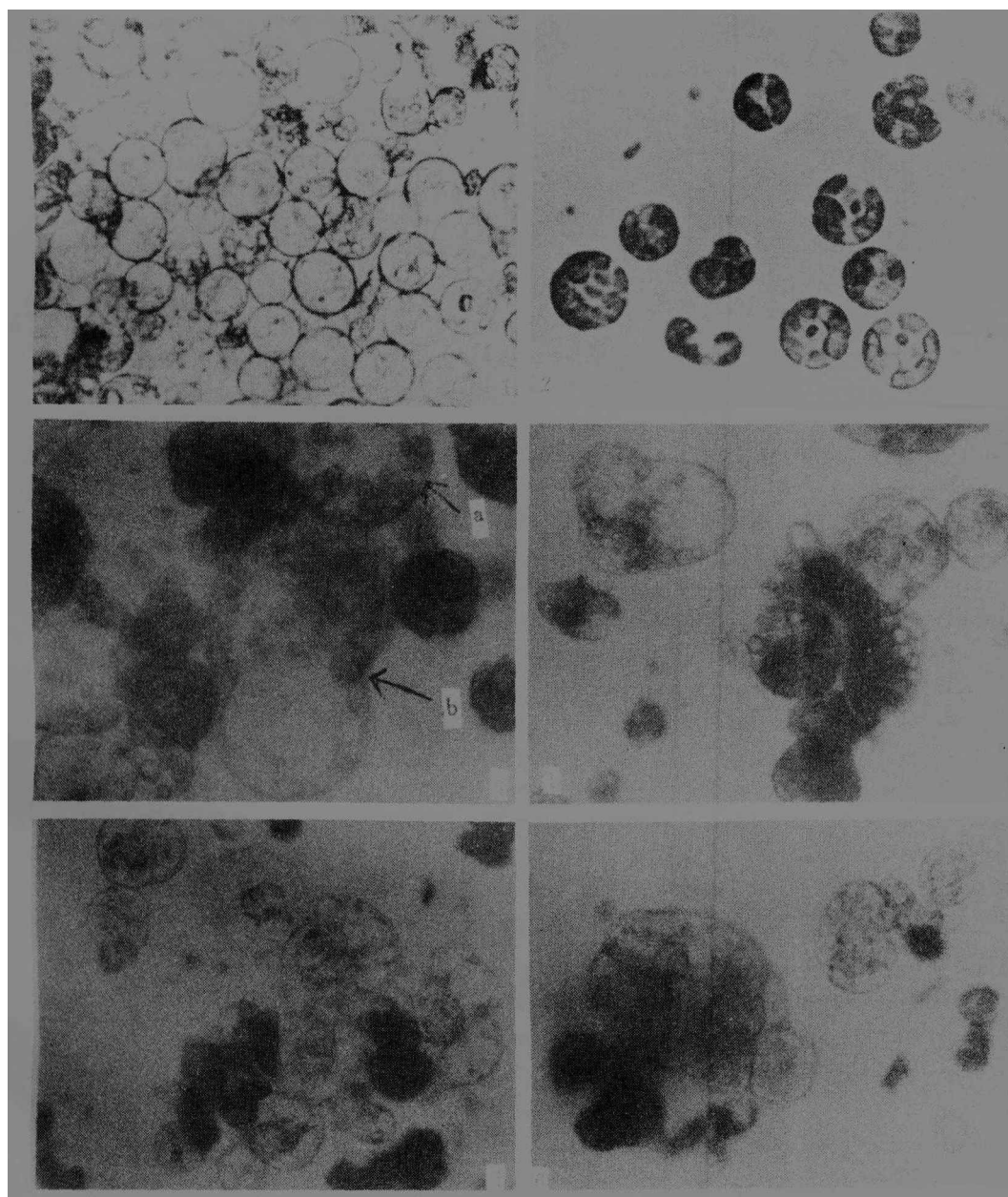


图1. 大豆子叶原生质体 Fig. 1. Soybean cotyledon protoplasts

图2. 豌豆叶肉细胞原生质体 Fig. 2. pea mesophyll protoplasts

图3. a 融合体 The fusant b 融合体细胞第一次分裂 Fig. 3. The fusant of first division

图4. 融合体第二次分裂 Fig. 4. The fusant of second division

图5. 融合体进行多次分裂 Fig. 5. The fusant through many divisions

图6. 最后形成多细胞球 Fig. 6. The forming of cell aggregate