

# 水稻原生质体细胞核及原生质体融合体的 简易染色观察法

向太和\*, 王利琳

(杭州师范学院生命科学学院, 杭州 310036)

**摘要:** 筛选出一种荧光染料罗丹明 B(Rhodamine B), 利用该荧光染料染色, 原生质体细胞核在普通光学显微镜或荧光显微镜下呈红色或发出强烈的桔红色荧光, 能清晰地进行分辨。利用罗丹明 B 或者使用荧光染料 FDA, 对两种不同来源的原生质体进行染色, 在荧光显微镜下, 两种不同来源的原生质体分别发出桔红色或绿色荧光, 因此可以用于原生质体融合中不同的融合体类型的观察和分析。

**关键词:** 水稻; 原生质体; 细胞核; 融合; 染色

**中图分类号:** Q942.5, Q743.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-321-03

植物原生质体培养和原生质体融合不仅是植物遗传改良的重要手段之一, 而且原生质体也是研究植物细胞壁再生、细胞分裂和分化等一系列细胞遗传和生理过程的良好实验材料<sup>[1]</sup>。我们在水稻原生质体培养过程中, 筛选出一种能够简单地观察原生质体细胞核和原生质体融合的染色方法, 现将我们的方法报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 胚性悬浮细胞系的建立及原生质体的分离和融合

利用广亲和品系 02428 和籼稻 90AL<sub>4</sub> 种子的成熟胚, 在 MS+2, 4-D 2mg/L 的诱导培养基上诱导愈伤组织。参照颜秋生等的方法<sup>[2]</sup>建立胚性悬浮细胞系, 进行原生质体的分离。原生质体的融合参照李向辉的方法, 即采用 PEG<sub>6000</sub> 结合高 Ca<sup>2+</sup>-高 pH 法<sup>[3]</sup>。

### 1.2 染料的筛选和原生质体的染色观察

配制 0.1mg/mL 的 FDA(荧光素二醋酸酯)、Rhodamine B(罗丹明 B)、Evan's blue(伊文斯蓝)、Congo red(刚果红)、Eosin red(曙红)、Safranin(番红)、TTC(2,3,5-三苯基四唑氯化物)溶液, 其中 FDA 用丙酮配制。各染料在使用前用含有 13% 甘露醇的 CPW 盐(简称 CPW<sub>13</sub>)<sup>[4]</sup>溶液稀释 10 倍。每 5mL 原生质体悬浮液(密度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL)加 0.1mL 的稀释染料, 室温条件下染色 5min, 用 CPW<sub>13</sub> 离心

清洗 2 次, 再用 KPR 原生质体培养基<sup>[5]</sup>清洗 1 次后用于融合操作和观察。显微观察用 Olympus VANOX AX 型显微镜, 分别在普通光和荧光下观察, 荧光观察时激发滤片为 BG<sub>12</sub>、阻挡滤片为 475nm 滤片。

## 2 结 果

本研究选用了 7 种常见的染料对原生质体进行染色, 其结果见表 1。

原生质体经 FDA 染色后, 在普通光下原生质体不被着色; 在荧光下观察, 有活力的原生质体发出绿色荧光(图 1), 这是由于 FDA 进入细胞或原生质体内经脂酶的作用而发出绿色荧光<sup>[6]</sup>。经罗丹明 B 染色, 在普通光下观察, 原生质体内的细胞核被染上深红色, 也有个别颗粒状内含物被染上淡红色(图 2); 在荧光下观察, 整个原生质体都发出红色荧光, 但其中细胞核发出强烈的桔红色荧光, 很容易与其他成分区别(图 3)。通过观察可以发现, 经胚性悬浮细胞系制备的原生质体中, 细胞核多为 1 个, 个别为 2 个, 极少数有 3~4 个细胞核, 也有未见明显细胞核的亚原生质体, 而其中多核的原生

收稿日期: 2003-09-19; 修回日期: 2003-12-04

杭州师范学院科研启动基金项目(No.87)

本研究部分工作在安徽省农业科学院生物技术室完成

\* 通讯作者, E-mail: xtb0101@sina.com

表1 不同染料对有活力的原生质体的染色结果

	FDA	罗丹明 B	伊文斯蓝	刚果红	曙红	番红	TTC
普通光下观察	原色	细胞呈原色, 核呈深红色	原色	原色	原色	原色	浅红色
荧光下观察	绿色	细胞呈浅红色, 但核呈桔红色	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光	无荧光

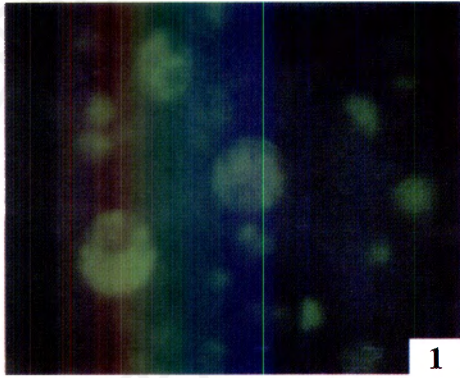


图1 在荧光下观察, 经FDA染色的原生质体(200×)

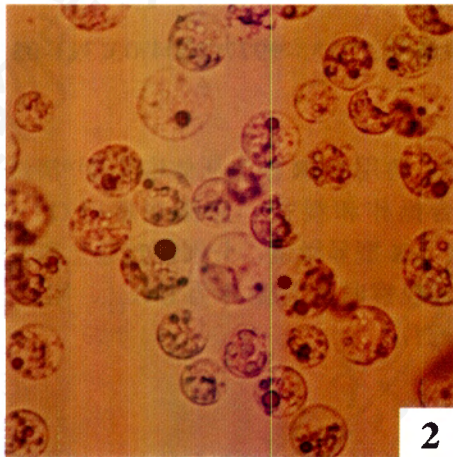


图2 在普通光下观察, 经罗丹明 B 染色的原生质体(200×)

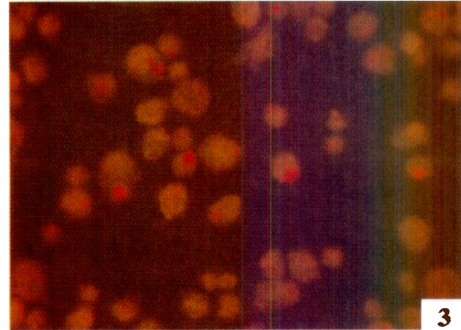


图3 在荧光下观察, 经罗丹明 B 染色的原生质体(200×)

图4 籼稻 90AL<sub>4</sub> 和粳稻 02428 原生质体的接触融合(200×)

质体通常系原生质体自发融合所致。

根据上述研究结果, 分别利用罗丹明 B 和 FDA 对粳稻 02428 和籼稻 90AL<sub>4</sub> 原生质体进行染色后清洗, 二者的原生质体以 1:1 比例混匀, 经 PEG<sub>6000</sub> 融合处理后洗涤, 在荧光显微镜下可清晰地观察到两种不同来源原生质体的融合情况(图 4)。

### 3 讨论

针对原生质体的染色观察, 常利用 FDA 或 FDA-PI 双色荧光法<sup>[6]</sup>, 有活力的原生质体发出绿色荧光。对于细胞核的染色观察, 目前多根据 DAPI 与 DNA 的特异结合的原理, 利用 DAPI 作为荧光染料用于核的荧光染色观察或制备特异性探针进行原位杂交分析<sup>[7, 8]</sup>。本研究筛选出的荧光染料罗丹明 B, 对原生质体染色后, 不仅利用荧光显微镜而且

利用普通光学显微镜也可对原生质体的细胞核进行观察。此外, 结合使用 FDA, 可对两种不同的原生质体进行融合观察和分析。

### 参 考 文 献

- [1] 夏镇澳. 植物原生质体的理论研究[M]// 孙勇如, 安锡培编. 植物原生质体培养, 北京: 科学出版社, 1991: 7 - 12.
- [2] 颜秋生, 张雪琴, 施建表, 李浚明. 大麦原生质体再生绿色植株[J]. 科学通报, 1990, 35(20): 1581 - 1583.
- [3] 李向辉. 植物体细胞杂交[M]// 李向辉编. 植物遗传操作, 北京: 科学出版社, 1988: 190 - 194.
- [4] FREARSON E M, POWER J B, COCKING E C. The isolation, culture, and regeneration of Petunia leaf protoplast [J]. *Dev Biol*, 1973, 33: 130-137
- [5] KAO K N. Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-Nicotiana glauca [J]. *Mol Gen Genet*, 1977, 150: 225 - 230.
- [6] 黄纯农. 用 FDA-PI 双色荧光法鉴定大麦原生质体活性

- [J]. *细胞生物学杂志*, 1988, **10**(3): 133 – 135.
- [7] KAMO K K, GRIESBACH R J. Evaluation of DAPI as a fluorescent probe DNA in viable *Petunia* protoplasts [J]. *Biotech Histochem*, 1993, **68**(6): 350 – 359.
- [8] 陈乐真, 张 杰. 荧光原位杂交技术及其应用[J]. *细胞生物学杂志*, 1999, **21**(4): 177 – 180.

## A Simple Staining Method for Observation of Protoplast Nucleus and Protoplast Fusion in Rice

XIANG Tai He\*, WANG Li Lin

(School of Life Sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China)

**Abstract:** A new fluorescent dye of Rhodamine B was screened. Protoplast nucleus staining with Rhodamine B became red under ordinary microscope or had red fluorescent light under fluorescent microscope. Staining by Rhodamine B or FDA (fluorescein diacetate), protoplasts from different plant can be distinguished because protoplast had red or blue fluorescent light respectively. Different types of protoplasts fusion can be clearly observed with this method.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.); protoplast; nucleus; fusion; dye

---

This work was supported by grants from the Science Foundation for the Talents of Hangzhou Normal College (No.87)

This work was partly finished in Biotechnology Laboratory at Anhui Academy of Agricultural Sciences

\*Corresponding author, E-mail: xth0101@sina.com