

籼稻原生质体游离培养及再生植株

张 伟 简玉瑜

(实验中心遗传工程研究室)

摘要 籼稻 (*Oryza sativa* L.) 推广品种“秋桂矮 11”成熟种胚在 N6+2, 4-D 培养基上诱导选择胚性愈伤组织, 然后转入 N6+2, 4-D 及高浓度脯氨酸的液体培养基悬浮培养。继代近 6 个月后建成胚性细胞悬浮系。悬浮细胞通过酶解游离产生大量原生质体, 经合适渗透压的 KpR 琼脂糖培养基包埋, 在无哺育培养条件下, 分裂频率为 11.36%, 细胞克隆转至 N6 分化培养基再生出完整绿色小植株, 分化频率为 9.4%。

关键词 籼稻 悬浮培养 原生质体 植株再生

植物原生质体再生植株系统是进行外源基因导入、细胞融合、细胞诱变等遗传操作改良作物的一个重要基础。在重要粮食作物水稻中, 建立高效的原生质体再生体系, 利用原生质体具有无细胞壁、单细胞状态、生长较一致、具“全能性”、易进行遗传操作等特点, 应用生物技术, 可为水稻的品种改良提供一条新的途径。因此, 多年来, 水稻原生质体培养及再生植株研究受到高度重视, 并取得了重大突破^[1,5~3,11,17~18]。通过改进方法, 先后在多个水稻品种获得再生植株。但是, 相对而言, 籼稻原生质体再生植株比较困难, 成功的品种不多^[3,9,13], 尤其缺少生产上推广品种。扩大籼稻品种原生质体培养再生植株的基因型范围, 提高再生频率, 建立成熟的技术系统, 对这一技术的实用化有重要意义。我们在建立多个籼稻细胞悬浮培养系基础上, 以目前广东生产推广品种“秋桂矮 11”为材料, 成功进行了原生质体游离培养获得了再生植株, 从而可以为这一技术应用于实际生产建立基础。

1 材料与方法

1.1 胚性愈伤组织诱导与选择

籼稻“秋桂矮 11”属中迟熟晚籼, 中矮秆, 结实率高, 适应性广, 是广东省推广品种, 1988 年种植 165.4 万亩。取其成熟、饱满、完整种子去壳后, 经表面消毒, 置于 RIP1 培养基上 (见表 1), 暗培养, 26±1℃。通过外观鉴别, 选择胚性愈伤组织继代培养增殖。

1.2 胚性细胞悬浮系的建立

选择胚性愈伤组织置于 RIP3 液体培养基中, 继代培养建立胚性细胞悬浮系。

1.3 原生质体游离与培养

将建成的悬浮胚性细胞转入 RIP3 液体培养基中继代 2~3 次, 收集细胞游离原生质体。原生质体经纯化后以不同浓度 (0.35 mol, 0.40 mol, 0.45 mol, 0.50 mol, 0.55 mol) 的葡萄糖 KpR 琼脂糖培养基包埋进行培养观察, 统计再生细胞分裂频率。方法和步骤同张

1993-04-08 收稿

伟、简玉瑜^[3]。

1.4 再生细胞克隆的分化

将再生克隆产生的小愈伤组织置于 RIP4 分化培养基上分化培养, 光照, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 统计分化频率 [分化频率 = (分化愈伤组织块数) / (观察愈伤组织块数)]。

1.5 植株再生

将分化产生的长度大于 2 cm 的幼苗置于 RIP5 固体培养基上, 光照, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 再生完整植株。

表 1 水稻原生质体培养过程中不同培养基组成 (mg/L)

培养基类型	基本培养基	生长激素		附加物	
RIP1	N6	2.0~4.0	2, 4-D	—	
RIP2	N6	4.0	2, 4-D	2300 50	脯氨酸 色氨酸
RIP3	AA	2.5	2, 4-D	230	脯氨酸
RIP4	N6	2.0	KT	230	脯氨酸
		0.5	6-BA	300	谷氨酰胺
		0.2	IAA		
RIP5	N6	0.2	IAA	—	

2 结果

2.1 胚性愈伤组织诱导与选择

籼稻“秋桂矮 11”成熟种子在 RIP1 培养基上发芽, 1~2 周后, 在叶基部膨大并产生愈伤组织, 愈伤组织经继代培养增殖, 通过选择得到颗粒小, 紧密, 颜色鲜艳, 生长迅速的胚性愈伤组织。调节 2, 4-D 浓度可影响不同类型愈伤组织生长, 以 2~4 mg/L 为宜。

2.2 胚性细胞悬浮系的建立

选择胚性愈伤组织转于 RIP2 液体培养基中, 经过近 6 个月的继代培养, 细胞迅速增殖, 长形细胞减少, 细胞团块变小, 细胞圆而小, 结合紧密, 胞质浓密, 悬浮系呈淡黄色, 1 个继代周期内 (7 d), 压紧细胞体积 (packed cell volume PCV) 增加 1 倍。

2.3 原生质体游离与培养

游离原生质体前 2~3 周, 将已建成的胚性细胞悬浮系转入 AA 液体培养基继代培养, 可提高原生质体游离产出量, 增强游离原生质体的活力与再生能力, 但在 AA 培养基中继代时间过长, 培养物变粘稠, 生长缓慢。“秋桂矮 11”游离产生的原生质体形状较小 (图版—1), 纯化后, 经不同浓度渗透压稳定剂——葡萄糖的 KpR 琼脂糖培养基分别包埋培养, 无哺育培养, 镜检观察比较, 最适渗透压为 0.45 mol 的葡萄糖。在合适渗透压条件下包埋培养约 5d 后, 细胞稍拉长, 出现第 1 次分裂 (图版—2), 第 2 次分裂 (图版—3), 3 周后一次 10 个视野统计平均分裂频率为 11.36%。待形成多细胞团 (图版—4) 后, 转入低渗透培养基中, 细胞团继续增殖形成肉眼可见的细胞克隆。

2.4 再生细胞克隆的分化

挑出小愈伤组织转至 RIP4 分化培养基 (图版—5), 经光照培养, 愈伤组织增殖, 出现绿点, 发育成绿芽。统计 74 块愈伤组织块中得到 7 株再生植株, 分化频率为 9.4%。

2.5 植株再生

高于2 cm的幼苗转于RIP5培养基上,根系发育形成完整植株(图版—6)。

3 讨论

3.1 基因型对籼稻原生质体的影响

许多研究表明,禾本科植物原生质体再生植株在一定程度上受基因型的制约。Jenes等^[10]在44个水稻基因型中,有25个从愈伤组织再生植株,进行原生质体培养仅仅2个基因型再生植株。在籼稻中,基因型制约作用更明显。我们研究中,在建立的16个籼稻悬浮系中,至今只有“秋桂矮11”获得原生质体再生植株。其中发现“秋桂矮11”具有较高的体胚发生及分化频率,表现出原生质体再生植株与基因型的体胚发生及分化能力有一定对应联系。在大多数籼稻中,以分裂能力较强的梗稻细胞系进行哺育培养才获得原生质体再生植株^[11,12],而我们不用哺育培养得到了再生植株。最近,Datta等^[9]也有同样报道。

3.2 脯氨酸对籼稻胚性细胞悬浮系建立的影响

K. Ozawa等^[14]曾报道,在N6悬浮培养基中加入脯氨酸可显著提高水稻细胞的生长和再生频率,再生能力维持达18个月。L. Lee等^[13]在籼稻IR54悬浮培养基中加入20~100 mmol的脯氨酸,提高了细胞生长率并游离原生质体,获得了再生植株。我们在研究中发现,籼稻胚性细胞悬浮系的建立需要较长时间,加入较高浓度(2300 mg/L)的脯氨酸有利于其再生能力的保持。至于脯氨酸对植物细胞生长和再生能力的影响的机理目前还不十分清楚^[16],有待进一步的研究。

3.3 不同培养基对籼稻悬浮系建立及原生质体游离培养的影响

水稻悬浮培养系的建立常用MS、LS、N6和AA培养基,品种之间对培养基的反应有所不同。我们发现,“秋桂矮11”胚性细胞悬浮系建立中,以N6培养基为佳,但在游离原生质体前,转入AA培养基中培养,有利于增加分裂频率。AA培养基以多种氨基酸为唯一氮源,丰富的氨基酸是细胞分裂再生的物质基础,已发现氮源是影响水稻原生质体培养再生的一个重要因素^[1,7,15]。

3.4 影响分化的因素

原生质体再生的愈伤组织分化中,细胞激动素起主要调节作用。Kyojuka等^[11]和L. Lee等^[12]曾报道水稻原生质体再生愈伤组织在无激素培养基上分化出芽,但不能形成植株。我们发现,在分化中,以细胞激动素(KT+6-BA)为主,加入低浓度(<0.5 mg/L)的IAA,有利于平衡激素影响,增加分化频率,并促进根系发育,维持再生植株的生长。

参 考 文 献

- 1 王光远等. 水稻原生质体再生成熟植株. 实验生物学报, 1987, 20 (2): 253~257
- 2 王海波等. 小麦原生质体培养——高频率的细胞团形成和植株再生. 中国科学B辑, 1989, 8: 828~834
- 3 孙宝林等. 籼稻原生质体高频分裂及植株再生. 科学通报, 1989, 34 (15): 1177~1179
- 4 李良材等. 水稻原生质体培养及植株再生的研究. 遗传学报, 1988, 15 (5): 321~328
- 5 张伟等. 普通野生稻胚性细胞悬浮系的建立及原生质体再生植株. 华南农业大学学报, 1991,

- 12 (4): 13~17
- 6 张雪琴等. 从水稻原生质体再生植株. 生物技术在农业上的应用, 上海: 上海科学技术出版社, 1989, 103~104
- 7 Abdullah R, et al. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. Bio/Technology 1986, 4: 1087~1090
- 8 Datta K, et al. Genetically engineered fertile indica—rice recovered from protoplasts. Bio/Technology, 1990, 8: 736~746
- 9 Datta K, et al. Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the Indica rice breeding line IR72 (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports, 1992, 11: 229~233
- 10 Jenes B, et al. Plant regenerated from protoplast derived calli in rice (*Oryza sativa* L.) using dicamba, Plant Sci. 1989, 63: 187~198
- 11 Kyojuka J, et al. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nerse culture methods. Mol. Gen. Genet. 1987, 206: 408~413
- 12 Kyojuka J, et al. Plant regeneration from protoplasts of indica rice: genotypic differences in culture response. Theor. Appl. Genet. 1988, 76: 887~890
- 13 Lee L, et al. Plant regeneration from indica rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts, Planta 1989, 178: 325~333
- 14 Ozawa K, et al. Establishment of a system of high—frequency embryogenesis from long—term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 1989, 77: 205~211
- 15 Toriyama K, et al. Cell suspension and protoplast culture in rice. Plant Sci, 1985, 41: 179~183
- 16 Vasil V, et al. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. J Plant Physiol. 1986, 124: 399~408
- 17 Wang D, et al. Plant regeneration from protoplasts of indica type rice and cms rice. Plant Cell Rep. 1989, 8: 329~332
- 18 Yamada Y, et al. Plant regeneration from protoplast—derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Rep. 1986, 5: 85~88

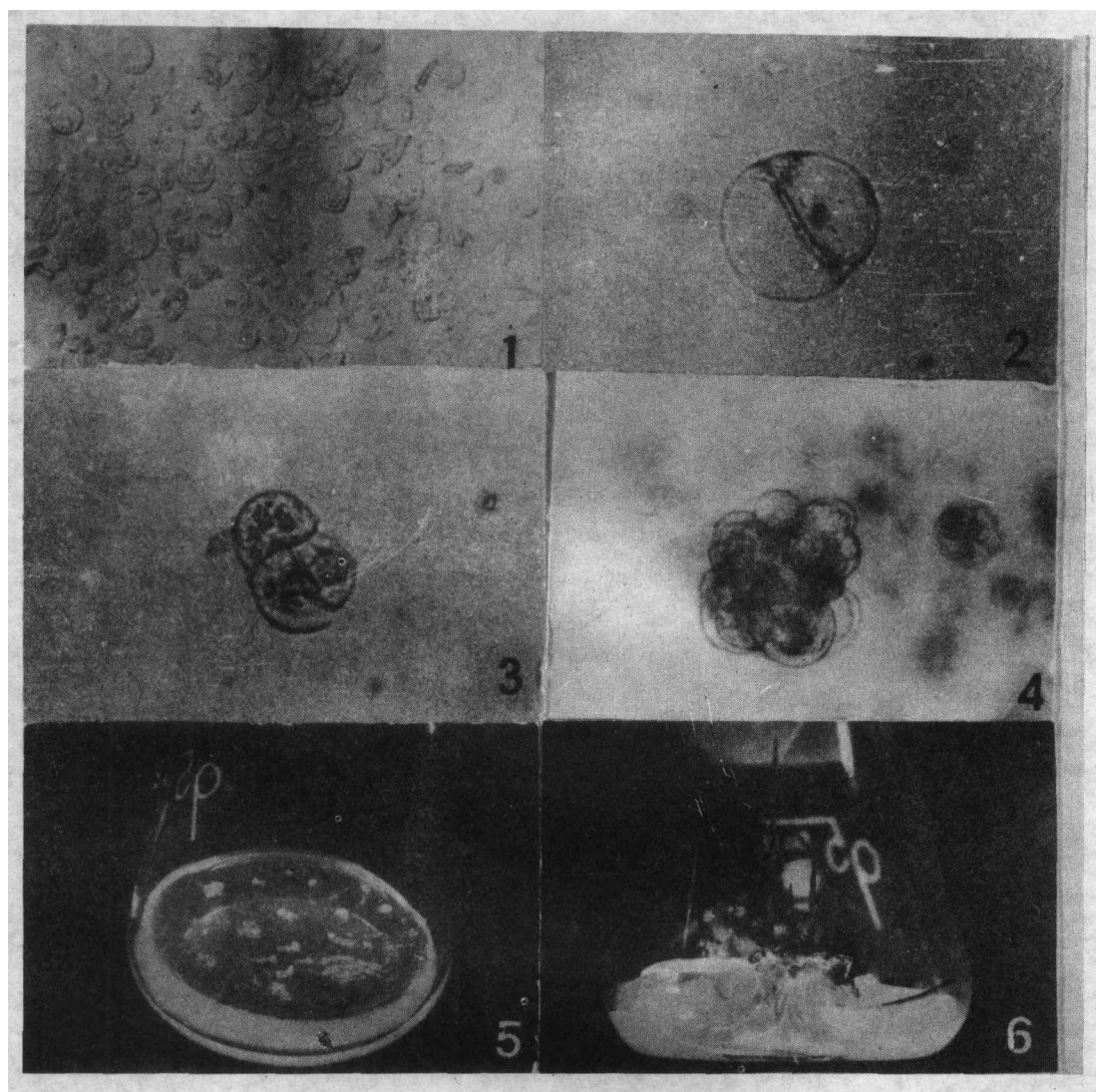
THE ISOLATION, CULTURE AND PLANT REGENERATION OF INDICA RICE

Zhang Wei Jian Yuyu

(Genetic Engineering Laboratory, Experimental Center)

Abstract Calli were induced from germinating seeds of indica rice (*Oryza sativa* L. indica variety) " Qiuguai 11" and the embryogenetic calli were selected and transferred to N6 liquid media in which embryogenetic cell suspension cultures were established after 6 months' subculture. Protoplasts were isolated from suspension cultures and imbedded in KpR agarose media. Without using nurse culture, the division frequency was 11.36%. The regenerated cell colonies were transferred onto N6 differentiation medium in which green plant formed. The plant regeneration frequency was 9.4%.

Key words Indica rice; Suspension culture; Protoplast; Plant regeneration



图版1 游离原生质体 $40\times 10\times 3$

2 原生质体再生细胞第一次分裂 $40\times 10\times 3\times 4$

3 原生质体再生细胞第二次分裂 $40\times 10\times 3\times 4$

4 原生质体再生多细胞团 $40\times 10\times 3$

5 原生质体再生细胞克隆

6 原生质体再生完整植株