

籼型水稻原生质体再生植株

杨剑波 吴家道

(安徽农业科学院水稻研究所, 合肥)

卫志明 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室, 上海)

以在MSB培养基(MS无机盐, B₅有机成份附加2mg/L 2,4-D)中继代一年的87-1籼型花粉愈伤组织和由籼型水稻株系81-3在改良的RY-2培养基中继代半年的悬浮培养物游离原生质体, 分别在RY-2和KPR培养基中进行液体浅层培养或琼脂糖包埋培养, 并在琼脂糖包埋培养时饲喂以粳型广亲和材料02428的悬浮培养细胞或除去细胞的调渗悬浮液。原生质体植板率达8.7%—12.5%。将3—4周后形成的肉眼可见的小愈伤组织转移到含0.5mg/L 2,4-D的N₀固体培养基上增殖, 待愈伤组织长到直径达2—3mm大小时, 分别或串换使用三种不同激素水平的分化培养基, 最终由籼型株系81-3的原生质体再生了植株, 而87-1籼型花粉胚性愈伤组织原生质体只再生了愈伤组织。

关键词 籼稻; 原生质体培养; 植株再生

随着粳型水稻原生质体再生植株的相继成功及其培养方法与技术的不断改进和提高^[1-7], 培养难度较大且经济地位又十分重要的籼型水稻原生质体培养, 近来也有所突破, 并获得了再生植株^[8-11], 但就总体来说, 籼型水稻原生质体培养由于受供试材料基因型、生理状态及其培养方法的影响较大^[8,9], 成功率仍然很低。本文报道了从籼稻花粉胚性愈伤组织的原生质体培养得到愈伤组织, 和从籼稻株系81-3的悬浮培养物分离的原生质体再生植株的实验结果。

材料与 方法

(一) 原生质体的来源

1. 单倍性的原生质体来源: 选取籼稻杂交组合87-1(中83-4×早熟广陆矮4号)发育单核期的幼穗, 在4—6℃下预处理一周, 用75%的酒精表面消毒后, 取出花药接种于含2mg/L 2,4-D、500mg/L

水解乳蛋白和50g/L蔗糖的N₀固体培养基上, 25℃下暗培养诱导愈伤组织, 待愈伤组织长到3mm大小时, 转入含2mg/L 2,4-D的MSB培养基上继代培养, 每两周继代一次。由继代一年左右的生长迅速、淡黄色、易分散的胚性愈伤组织分离原生质体。

2. 二倍性的原生质体来源: 另取来自花药培养的籼型水稻株系81-3(密阳23×圭630)的成熟种子, 在纯酒精中浸泡5min, 70%的酒精处理30s后, 再用0.1%的氯化汞消毒10min, 尔后用无菌水反复漂洗3—5次, 接种于含2mg/L 2,4-D的LS培养基上, 待愈伤组织形成后, 选择黄嫩疏松的愈伤组织, 在添加200mg/L谷氨酰胺和500mg/L水解乳蛋白的改良的RY-2^[7](RY-2无机盐, $\frac{1}{2}$ B₅的有机

本文于1990年9月19日收到。

安徽农业科学院刘祖林、郑乐娅和黄忠祥同志参加部分工作, 特此致谢。

成分)液体培养基上悬浮培养,每周继代一次,半年后,选择生长旺盛,分散良好的悬浮培养细胞游离原生质体。

(二) 原生质体的分离和培养

选择继代第7天的87-1的花粉胚性愈伤组织和继代第4天的81-3悬浮细胞系,在含2%Cellulase Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23和0.53mol/L甘露醇的CPW混合酶液中(1g植物细胞:10ml酶液),26℃下静置保温4h。经400目滤网过滤后,低速离心收集原生质体(400r/min),用含0.5mol/L甘露醇的CPW溶液清洗两次,RY-2培养基清洗一次。纯化后的原生质体以 5×10^5 个/ml的密度分

别在RY-2与KPR^[4]培养基中进行液体浅层培养或低熔点琼脂糖包埋培养^[12]

(0.6%Sea Plaque agarose),并在包埋培养中饲喂以粳型广亲和材料02428的悬浮培养细胞或除去细胞的调渗悬浮培养液(02428的悬浮细胞系由中国水稻所颜秋生先生惠赠)。一周后除去看护细胞,10天统计植株率,3—4周后将肉眼可见的小愈伤组织转到含0.5mg/L 2,4-D的N₆固体培养基上增殖。

(三) 再生愈伤组织的分化

当原生质体再生愈伤组织长至直径2—3mm大小时,分别转入不含激素的N₆培养基(N₆),低激素复合的N₆培养

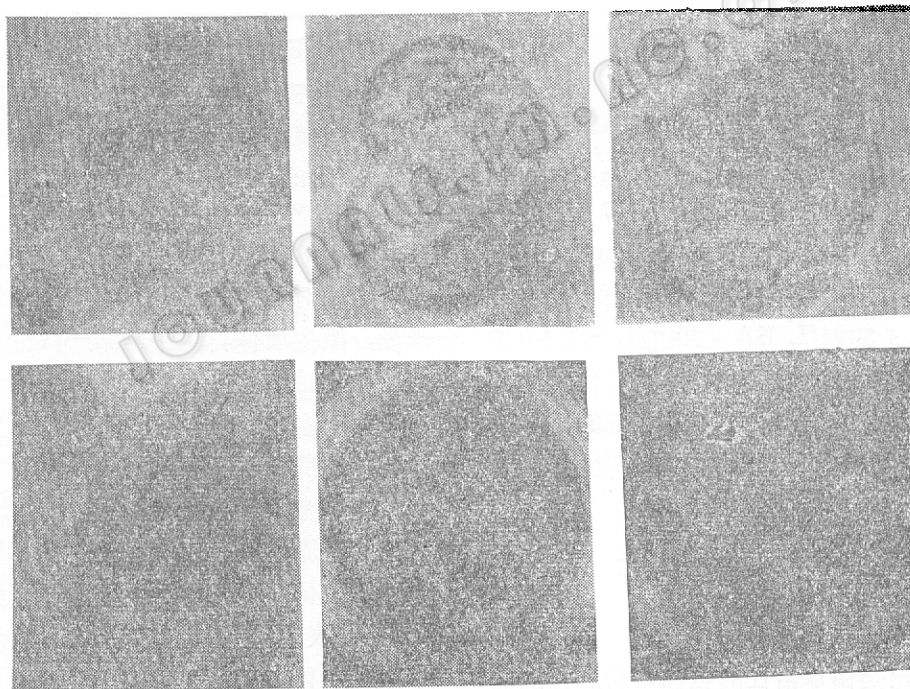


图 1-1. 从81-3悬浮细胞系分离的籼稻原生质体
Protoplasts isolated from 81-3 suspension cells

1-2.3. 原生质体培养3—5天出现的细胞分裂
Cell division after 3—5 days culture

1-4. 原生质体培养10天后出现的小愈伤细胞团
Cell colony from protoplast after 10 days culture

1-5. 原生质体培养3周后出现的肉眼可见的小愈伤组织
Visible cell clusters and small calli after 3 weeks culture

1-6. 从原生质体再生的小植株
Plantlet regenerated from a protoplast-derived callus

表 1 不同基因型、培养基和培养方法对籼稻原生质体分裂的影响

Table 1 Effect of genotype, medium and culture method on protoplast division

基因型 Genotype	培养基 Medium	培养方法* Culture method	第一次细胞分裂出现的时间 Time of the first cell division (days after plating)	细胞分裂的频率 Cell division frequency after ten days culture (%)
81-3	RY-2	I	3—4	2.3
		I	2	12.5
		II	2—3	8.2
	KPR	I	4—5	2.1
		I	2—3	10.2
		II	3—4	8.4
87-1	RY-2	I	3—5	1.5
		I	2	8.7
		II	2—3	4.8
	KPR	I	4—5	1.2
		I	2—3	7.5
		II	3	4.6

* I 液体浅层培养 Thin liquid layer culture

I 琼脂糖包埋培养饲喂以悬浮培养细胞 Agarose embedding with feeder cells

II 琼脂糖包埋培养饲喂以调渗悬浮培养液 Agarose embedding with condition medium

基 ($N_6 + 0.5\text{mg/L KT} + 0.5\text{mg/L BA} + 0.5\text{mg/L ZT}$) 和高激素复合的 N_6 培养基上 ($N_6 + 3\text{mg/L BA} + 2\text{mg/L KT} + 0.5\text{mg/L NAA}$)。或按三种不同分化培养基的激素水平由低到高或由高到低的串换使用, 进行器官的分化和植株的再生。

结果与讨论

(一) 原生质体培养

无论是由单倍性的籼稻花粉胚性愈伤组织或是从二倍性的籼稻悬浮细胞系, 经混合酶液处理后, 都得到了大量的原生质体, 其产量均达 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7/\text{gFW}$, 多数原生质体在倒置镜下能看到颗粒状内含物(图 1-1)。原生质体植板后 2—5 天便开始第一次分裂(图 1-2 和 -3), RY-2 培养基比 KPR 培养基更有利于籼稻原生

质体分裂的启动(表 1), 这可能是其铵态氮含量相对较低的缘故。就同一种培养基来说, 原生质体再生细胞第一次分裂的时间, 琼脂糖包埋培养较液体浅层培养平均提前一天左右。原生质体植板后 10 天左右即可观察到小细胞团(图 1-4), 这时统计的细胞分裂频率表明: 无论是 RY-2 还是 KPR 培养基, 琼脂糖包埋培养加以饲喂条件比液体浅层培养, 其细胞分裂频率大为提高(表 1)。因为琼脂糖包埋培养减少了原生质体的粘连, 饲喂条件的使用又丰富或完善了所需的营养。对琼脂糖包埋培养而言, 饲喂 02428 的悬浮培养细胞比饲喂其调渗悬浮培养液, 促进原生质体分裂的效果更好些, 但作者倾向于使用除去细胞的调渗悬浮培养液作为饲喂条件, 因为这可以排除饲喂细胞对原生质体的掺杂。无论在何种培养条件下, 原生质体植板后

3—4 周均可形成肉眼可见的小愈伤组织(图1-5)。及时将这些小愈伤组织转移到含0.5mg/L 2,4-D的 N_6 固体培养基上增殖收到了良好的效果, 这种由湿润状态转移到降低生长素的半湿润状态, 不仅有利于愈伤组织的增殖, 同时也有利于组织结构从疏松变为紧密。

(二) 愈伤组织的分化

将直径 3mm 大小的愈伤组织分别移入三种不同激素水平的培养基上, 或按激素水平由低到高或由高到低的串换使用, 最终只有来自籼型株系81-3的原生质体再生形成形态正常的绿色植株(图1-6), 分化过程基本上是根芽同步或芽略早于根出现。实验结果表明: 三种不同的分化培养基, 按激素水平由低到高或由高到低的串换使用, 比单一地使用同一种分化培养基的效果更好(表2), 可能这种串换使用方

式更有利于内源和外源激素的协调与平衡。

表 2 分化培养基对籼稻81-3
原生质体再生植株的影响

Table 2 Effect of differentiation medium on plant regeneration from protoplast-derived calli of Indica rice 81-3

分化培养基 Differentiation medium	再生绿苗的数量(个) /100块愈伤组织 Number of plants regenerated/100 calli
N_6 无激素(简称 N_{60})	0
N_6 低细胞分裂素复合 (简称 N_{6L})	0
N_6 高细胞分裂素复合 (简称 N_{6H})	2
N_{60} - N_{6L} - N_{6H}	9
N_{60} - N_{6H} - N_{6L}	4
N_{6H} - N_{6L} - N_{60}	7

参 考 文 献

- [1] 王光远等, 植物生理学通讯, 4:49, 1986.
- [2] 王光远等, 实验生物学报, 20:253—256, 1987.
- [3] 雷鸣等, 科学通报, 22:1729—1731, 1986.
- [4] Abdullah, R. et al., *Bio/Technol.*, 4:1087, 1986.
- [5] Coulibaly, M. Y. et al., *Z. Pflanzenzuchtg*, 96:79, 1986.
- [6] Kyojuka, J. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 206:408, 1987.
- [7] Yamada, Y. et al., *Plant Cell Reports*, 5:85, 1986.
- [8] 孙宝林等, 科学通报, 15:1177—1179, 1989.
- [9] Kyojuka, J. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 76:887, 1989.
- [10] Lee, Lisa., *Planta*, 178:325, 1989.
- [11] Wang, D. Y. et al., *Plant Cell Reports*, 8:329, 1989.
- [12] Ludwig, S. R. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 71:344, 1985.

Plant Regeneration from Protoplast of Indica Rice

Yang Jianbo Wu Jiadao

(*Rice Research Institute, Anhui Agricultural Academy, Hefei*)

Wei Zhiming Xu Zhihong

(*Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai*)

Calli were induced from germinating seeds of indica rice 8-13. Suspension cultures were established from the calli after the later were transferred to a flask containing liquid modified RY-2 medium and were maintained by weekly subculture. Half year old suspension culture was used for protoplast isolation. The protoplasts were isolated from the suspension cultures after 3—4 days subculture with an enzyme mixture consisting of 2% cellulase RS, 0.1% pectolyase Y-23 and 0.53M mannitol in CPW solution. The protoplasts were embedded in the solidified KPR medium with 0.6% Sea Plaque agarose at a density of 5×10^5 protoplasts/ml. Suspension culture cells of Japonica rice 02428 used as nurse cells were placed around the agarose beads. After one week, the nurse cells were removed completely. After three weeks, the agarose beads containing visible cell clusters and small calli were transferred onto N_0 medium with 0.5mg/L 2,4-D. When the calli were about 3mm in diameter, they were transferred to N_0 basic medium without any cytokinin, then to the medium with low level cytokinin and finally to the medium with high level cytokinin. More than ten morphologically normal plants were regenerated.

Key words

Indica rice; protoplast culture; plant regeneration