水稻原生质体的植株再生

雷 鸣 李向辉 孙勇如 黄美娟

（中国科学院遗传研究所，北京）

迅速发展的生物工程技术已成为改良作物遗传特性的重要手段，原生质体培养作为粮食作物的细胞融合、基因转移等遗传操作技术的重要基础，已有广泛的研究[1-2]。但是，一些重要的禾谷类作物，如水稻、小麦、玉米等的原生质体植株再生一直是这一领域的难题[3-6]。国内外不少实验室的试验表明：一般的禾谷类培养细胞和离体体细胞的原生质体培养多不能发生器官分化并再生植株[3,5-6]。这些曾引起科学家们怀疑禾谷类作物原生质体的全能性[1]。虽然由水稻原生质体培养较早就形成了愈伤组织[3]，但直到最近才表明由水稻原生质体再生植株的可能性[7-9]。本文报道本实验室由水稻悬浮培养物游离原生质体并获得再生植株的结果。

一、材料和方法

1. 悬浮细胞系的建立 选用栽培水稻（*oryza sativa* L.）77-170 品系的幼穗诱发的愈伤组织为材料。这种愈伤组织呈浅黄色，生长迅速，具有良好的分化能力。将此愈伤组织 1—1.5g 放入 50ml 的三角瓶中，加入 20ml 液体培养基 A_1（见表 1），于散射光条件下进行悬浮培养，温度变化为 20℃ 12h/25℃ 12h，转速 150rpm 每 3—4 天继代一次。

表 1 水稻原生质体再生植株系列培养基

成分		培养基 A_1	培养基 A_2	培养基 A_3	培养基 A_4
基本成分		N-free 培养基[10]	KM[12]	MS[11]	MS
附加成分 (mg/l)	水解酪蛋白	250	250	250	250
	椰子乳	50(ml)	50(ml)	50(ml)	50(ml)
	蔗糖	20,000	10,000	30,000	30,000
	蜂王浆	—	400	400	400
	琼脂	—	—	6,000	6,000
	小牛血清	—	8(ml)	—	—
	葡萄糖	—	0.4(mol/l)	—	—
生长激素 (mg/l)	2,4-D	1	1	2	—
	Kinetin	0.2	—	—	—
	Zeatin	—	0.5	—	—
	GA_3	0.1	—	—	—
	NAA	—	0.5	—	—
	pH	5.7	5.7	5.7	5.7

2. 原生质体游离 悬浮培养二个月后，取出继代培养第三天的培养物，按 1g/10ml 的比例加入降解细胞壁的混合酶液（1% 纤维素酶 Onozuka R-10，0.5% 纤维素酶 Onozuka RS，

本文 1986 年 6 月 30 日收到。

1% 离析酶 Macerozyme R-10，0.1% 果胶酶 Pectolyase y-23，1470mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，95 mg/l KH_2PO_4，600mg/l MES，0.25mol/l 山梨醇，0.25mol/l 甘露醇，pH 值为 5.7) 置于 27℃、黑暗条件下，并轻轻摇动几次．酶处理后的悬浮液经孔径 50μm 的镍丝网过滤，150 × g 离心 5min，吸去上清液，用清洗液 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1470mg/l，$KH_2PO_4$95mg/l，MES600mg/l，山梨醇 0.25mol/l，甘露醇 0.25mol/l，pH 值为 5.7) 清洗二次，然后用原生质体培养基 A_2 (表 1) 再清洗一次．纯化后的原生质体用 A_2 培养基制成悬浮液并计算产量．

3. 原生质体培养　将悬浮于 A_2 培养基中的原生质体以 1—8×10⁵/ml 的密度接种到 2 × 4cm 的玻璃培养瓶中，每瓶接种 1.5—2ml，用 Parafilm 封口．置于 27℃ 下暗培养．15—20 天后加入 1—2ml 含 0.3mol/l 葡萄糖的 A_2 培养基，并转移到 25℃，光照强度 2000lx、12h/黑暗 12h 的人工气候箱中．其后每隔二周分别加入与培养物等体积的，含 0.2mol/l 葡萄糖的 A_2 培养基和液体 A_3 培养基(表 1)．最后将培养物连同培养基一起均匀地倒在含琼脂 0.6% 的固体 A_3 培养基表面，于相同条件下培养．

4. 植株再生　将固体 A_3 培养基表面迅速生长的原生质体再生小愈伤转移到分化培养基 A_4 (表 1) 表面，置于 16h 光照/8h 黑暗，光照强度 2000lx，27—30℃ 的培养室中培养．

二、结果与讨论

悬浮培养中的愈伤组织逐步分散，二个月后形成均匀的细胞团(图 1)．这种细胞团直径约为 250—350μm，细胞壁薄，原生质稠密，生长迅速．酶液处理 3h 后，95% 以上的细胞释放出有活力的球形原生质体 (图 2)．产率约为 5 × 10⁶ 个/g，纯化后的产率约 3.6 × 10⁶ 个/g．所得原生质体可分为二类，一类较大，胞内物质特别丰富，约占原生质体总数的 10%，在培养中不易发生典型的分裂．另一类较小，约占原生质体总数的 90%，在培养中易于发生典型的原生质体分裂．

原生质体于 A_2 培养基中培养 6h 后，80% 以上的都出现微微膨大，1 天后，20% 左右的再生细胞开始拉长，第三天出现第一次细胞分裂(图 3)，第八天统计时能判断为正常一次分裂的频率为 3—5%，还有部分不同于典型分裂的再生细胞类似体细胞胚胎发育的状态(图 4)．经过约二个月的培养，得到直径约为 1mm 的再生细胞团，这种细胞团转移到 A_3 固体培养基表面 10 天后，即可长成直径 2—3mm 的小愈伤组织 (图 5)．这种小愈伤组织转移至分化培养基 A_4 表面后，生长速度变慢，愈伤表面呈较紧密的状态，发育出颗粒状的白色突起．第十天开始分化出绿色芽点，再过一周后，有相当数量的带 1—2 片小叶的绿芽和细根的分化．此时将绿芽同根一起脱离愈伤组织，转移到同样的培养基上．半个月后它们发育成叶片浓绿，分蘖旺盛的完整水稻植株(图 6)(共 23 株)．本实验中使用的培养基中附加了蜂王浆、椰子乳、小牛血清等天然有机活性物质，它们对水稻原生质体的分裂、再生愈伤的分化可能有促进作用．我们使用葡萄糖作为主要的渗透稳定剂，在初期培养中，它的含量为 0.3mol/l、0.35mol/l 时，原生质体一天后大量破裂；它的含量为 0.5mol/l 时，原生质体发生皱缩，逐步失去活力；而在含 0.4 mol/l 葡萄糖的培养基中观察到了再生细胞的分裂．

本实验中，纯化后的原生质体都经过倒置显微镜的仔细观察，没有发现完整的单细胞；清楚地观察到了原生质体的一次分裂、二次分裂及细胞团形成；我们还曾将悬浮培养中的小细胞团放入原生质体培养基中培养，在此条件下，细胞质壁分离，细胞团停止生长．因此，可以排除原生质体培养中的细胞分裂是由漏过镍丝网的单细胞发生的可能性．

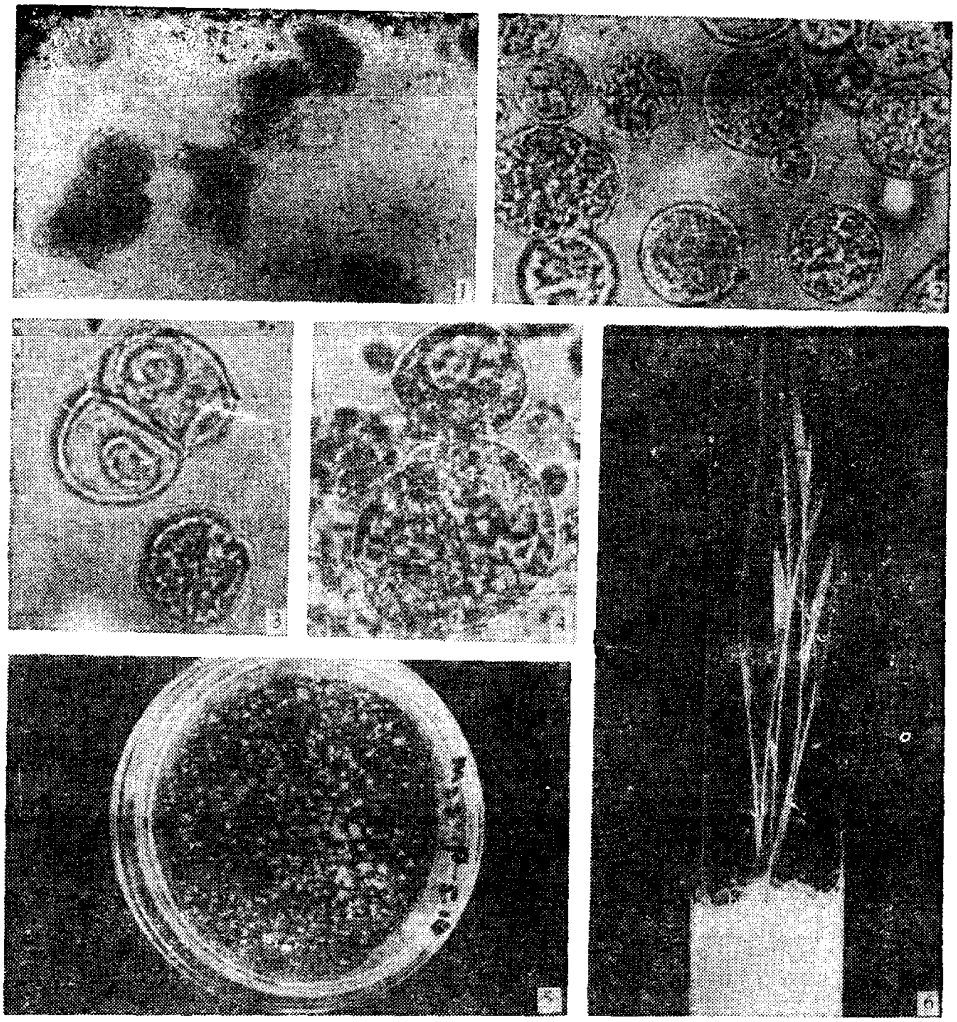


图 1—6

1.游离前悬浮培养中的细胞状态 (×264)； 2.纯化的原生质体 (×1056)； 3.再生细胞的第一次分裂 (×1056)； 4.类似胚胎发生的再生细胞 (×1056)； 5.由原生质体再生的小愈伤； 6.再生植株

致谢：本实验所用愈伤组织是由陈英先生、吴克强同志、陈少麟先生提供的；张俊龙同志在工作中给予了大量帮助，作者在此一并表示感谢.

参 考 文 献

[1] Potrykus, I., in *Advances in Protoplast Research*, Akad. Kiado, Budapest, 1980, 243—254.
[2] Vasil, I. K., in *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*, Plenum Publishing Corporation, 1985, 31—47.
[3] 蔡起贵、钱迎倩、周云罗、吴素萱，植物学报，**20**(1978)，97—102.
[4] Li Xianghui, Yan Chiusheng, in *Advances in Protoplast Research*, Akad. Kiado, Budapest, 1980, 261—267.
[5] Dudits, D., Nemet, G., Huydu, Z., *Can. J. Bot.*, **53** (1975), 957—963.
[6] Potrykus, I., Harms, C. T., Lörz, H., *T. A. G.*, **54** (1979), 209—214.
[7] Fuzimura, T., Sakurai, M., Akagy, H., *Plant Tissue Culture Letters*, 2(1985), 2: 74—75.
[8] Yamada, Y., Yang Zhi-qi, and Tang Ding-tai, *Plant Cell Reports*, 5(1986), 85—88.
[9] Coulibaly, M. Y., Demarly, Y., *Z. Pflanzenzüchpg*, **96**(1986), 79—81.
[10] Müller, A. J. and Grafe, R., *Mol. Gen. Genct.*, **161**(1978), 67—76.
[11] Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant*, **15**(1962), 473—497.
[12] Kao, K. N. and Michayluk, M. R., *Planta*, **126**(1975), 105—110.