

# 大麦原生质体培养再生胚性愈伤组织和白化苗

刘宝 吴琴生 刘大钧

(南京农业大学细胞遗传研究室, 江苏南京, 210014)

## 提 要

来自春大麦品种“如车”成熟胚的愈伤组织中, 挑选出适于悬浮培养的松脆型胚性愈伤组织, 在短期内建立胚性细胞悬浮系。此系酶解后分离出的原生质体在修改的MS培养基上能够持续分裂形成愈伤组织。将其直接转至分化培养基上获得结构紧密的胚性愈伤组织并再生白化苗。

**关键词** 大麦 (*Hordeum vulgare* L.), 胚性细胞悬浮系, 原生质体培养, 白化苗

近年来, 禾本科植物的原生质体培养研究取得突破性进展。重要粮食作物, 包括水稻、小麦、玉米、高粱等均已从原生质体再生植株成功<sup>[1]</sup>。在大麦上已有2份关于原生质体再生植株的报告。一是颜秋生等人<sup>[2]</sup>首次来自幼胚胚性细胞悬浮系的原生质体再生绿色植株; 二是Lühns等<sup>[7]</sup>来自幼胚愈伤组织胚性细胞悬浮系的原生质体零星再生白化苗。本文将报道源自春大麦成熟胚愈伤组织胚性细胞悬浮系的原生质体再生胚性愈伤组织和白化苗的实验结果。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 胚性细胞悬浮系的建立

将春大麦栽培品种“如车”的成熟种子经表面消毒后沿胚轴方向切开, 切面朝下接种于MS附加2,4-D 3mg/L, Kinetin (KT) 0.2mg/L, 水解酪蛋白200mg/L, 谷氨酰胺300mg/L, 蔗糖30g/L, 琼脂8g/L, pH5.8的诱导培养基上诱导愈伤组织。一个月后, 挑选出具有松脆结构的胚性愈伤组织(类似玉米上的类型II愈伤组织<sup>[4]</sup>), 经一次继代繁殖后, 取约2g鲜重置于盛有50mlMS液体培养基的250ml三角瓶中, 在旋转式摇床(120rpm)上进行振荡培养。液体培养基除不含琼脂及pH降至5.7外与诱导培养基成份相同。经2—3个月培养即建成长迅速, 大多数颗粒直径在1—2mm的胚性细胞悬浮系。保持于MS附加2,4-D 2mg/L(其它成份同上)的液体培养基中, 每周继代一次。

### 1.2 原生质体的分离和培养

继代3—4天的细胞2ml置于10ml含2%CellulaseRS, 0.1%Pectolyase Y23, 95mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1029mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 600mg/LMES, 0.55mol/L甘露醇, pH5.7的混合酶液中, 在28℃黑暗、慢速摇床(40rpm)上酶解4—5小时。用400目尼龙网过滤, 300rpm

本文于1992年3月24日收到, 1992年8月19日终审完毕。

离心5分钟,收集原生质体。然后用等渗液(即溶解酶的溶液)洗2次,再用培养基洗1次。收集好的原生质体用液体浅层和低熔点琼脂糖包埋<sup>[5]</sup>两种方式进行培养。培养基为适合小麦原生质体培养的MS修饰培养基,又略加修改,培养基组成为:MS附加2,4-D 1mg/L, NAA(萘乙酸) 0.5mg/L, KT0.2mg/L, 水解酪蛋白 200mg/L, 谷氨酰胺 300mg/L, 椰子乳20ml/L, 小牛血清白蛋白 8mg/L, 蔗糖 10g/L, 葡萄糖 0.5mol/L, pH5.7。培养前原生质体最终密度均调至 $1 \times 10^6$ 个/ml。原生质体培养在26℃—27℃、黑暗条件下,培养过程中不更换新鲜培养基。培养40天后挑选出较大的微愈伤组织块直接转到分化培养基上诱导分化。选用的分化培养基有4种:(1)MS附加KT6mg/L, 水解酪蛋白 200mg/L, 谷氨酰胺 300mg/L, 蔗糖 30g/L;(2)BP<sub>4</sub>分化培养基<sup>[2]</sup>;(3)MS附加IAA(吲哚乙酸) 1mg/L, ZT(玉米素) 1mg/L, 蔗糖 30g/L;(4)CC<sup>[6]</sup>附加IAA 1mg/L, ZT 1mg/L, 水解酪蛋白 1g/L, 蔗糖 30g/L。这4种培养基均附加琼脂 8g/L, 灭菌前pH调至5.8。高压(121℃)灭菌16—18分钟。ZT和IAA抽滤灭菌后加入。分化在光强约4,000Lux, 光周期16小时光照/8小时黑暗、温度26℃—27℃下进行。

## 2 结果和讨论

春大麦“如车”的种子在诱导培养基上培养1个月后,仅以80%的频率产生愈伤组织,但胚性愈伤组织频率不高,结构松脆的胚性愈伤组织就更少,不足愈伤组织总数的2%。这种愈伤组织为淡黄色,形态上类似玉米上描述的类型II愈伤组织<sup>[4]</sup>。这种愈伤组织进行2—3个月的悬浮培养即可建成分散性好、生长速度快的胚性细胞悬浮系。发现和筛选出这种愈伤组织类型是成功的关键。这与其它禾谷类作物(如小麦、玉米)上的情况相似<sup>[1]</sup>。不过颜秋生等人(1990)通过直接悬浮培养大麦未成熟胚也成功地建成胚性细胞悬浮系<sup>[2]</sup>。成熟的胚性细胞悬浮系在液体保持培养基中,细胞体积(PCV, packed cell volume)4天可加倍,6—8天达到线性生长期。

继代3—4天的悬浮细胞酶解4—5小时可游离出大量、有活力的原生质体(产量约 $1—2 \times 10^6$ 个/ml细胞)。刚刚游离出的原生质体膜完整、胞质浓厚、大小均匀、内含物丰富(图版A)。用1%低熔点琼脂糖包埋,培养后3—4天可观察到细胞一次分裂;液体浅层则需要6—7天才可见典型的一次分裂(图版B)。琼脂糖包埋使细胞分裂提前的现象,在小麦上已有报道<sup>[3]</sup>。两周后,两种培养方式均可观察到由几十个细胞组成的小细胞团(图版C);一个月后,均能够形成大量肉眼可见的微愈伤组织,但低熔点琼脂糖包埋培养的植板率明显高于液体浅层。将较大的愈伤组织块挑选出直接转至各种分化培养基上,2周后可选择到类似供体细胞系的半疏松胚性愈伤组织(图版D)。省略微愈伤组织的增殖环节是基于许多研究者指出及早转分化可明显提高分化和再生频率<sup>[3,8]</sup>。

继续培养2周后,挑选转紧密的胚性愈伤组织转接于新鲜分化培养基上,约一个月后,可观察到少量结构紧密的胚性愈伤组织及胚状体(图版E);进一步培养可再生出白化叶片和小植株(图版F)。在所采用的4种分化培养基上均得到相近结果。通过加强光照、变换培养基中激素种类和比例以及改变原生质体培养基等试图再生绿苗的努力均未获成功。颜秋生认为大麦原生质体再生绿苗的关键是在短期(2—3个月)内建成胚性细胞悬浮系<sup>[2]</sup>。Lührs等人研究指出,大麦离体培养反应最好的基因型其全能性也至多能够保持8个月<sup>[6]</sup>。本文未能够再生绿苗的原因则可能是由于所采用的基因型本身再生绿苗的能力低。以后的实验表明,既使来自幼胚和其它外植体的胚性愈伤组织和胚状体发育成为绿色植株的频率也不高。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 贾敬芬, 1990, 禾谷类植物原生质体培养和融合, 孙敬三、陈维伦编, 《植物生物技术与作物改良》, 中国科学技术出版社, 北京, 71—82。
- [ 2 ] 颜秋生等, 1990, 科学通报, 35 (20), 1581—1583。
- [ 3 ] 孙宝林等, 1990, 生物工程学报, 6 (2), 116—119。
- [ 4 ] Green, C.E., 1988, Somatic embryogenesis and plant regeneration from friable callus of *Zay mays* In: Plant Tissue Culture. A. Fujiwara (ed). Japanese Asso of Plant Tissue Culture. pp.107—109, Maruzan Tokyo.
- [ 5 ] Kyozuka, J. et al. 1987, Mol. Gen. Genet. 206, 408—413.
- [ 6 ] Lührs, R. and H. Lorz, 1987, Theor. Appl. Genet., 75, 16—25.
- [ 7 ] Lührs, R. and H. Lorz, 1988, Planta, 175, 71—81.
- [ 8 ] Vasil, V., F. Redway and I. K. Vasil, 1990, Bio/Technology, 8, 429—434.

### Barley Protoplast Culture: Embryogenic Callus Formation and Albino Plantlet Regeneration

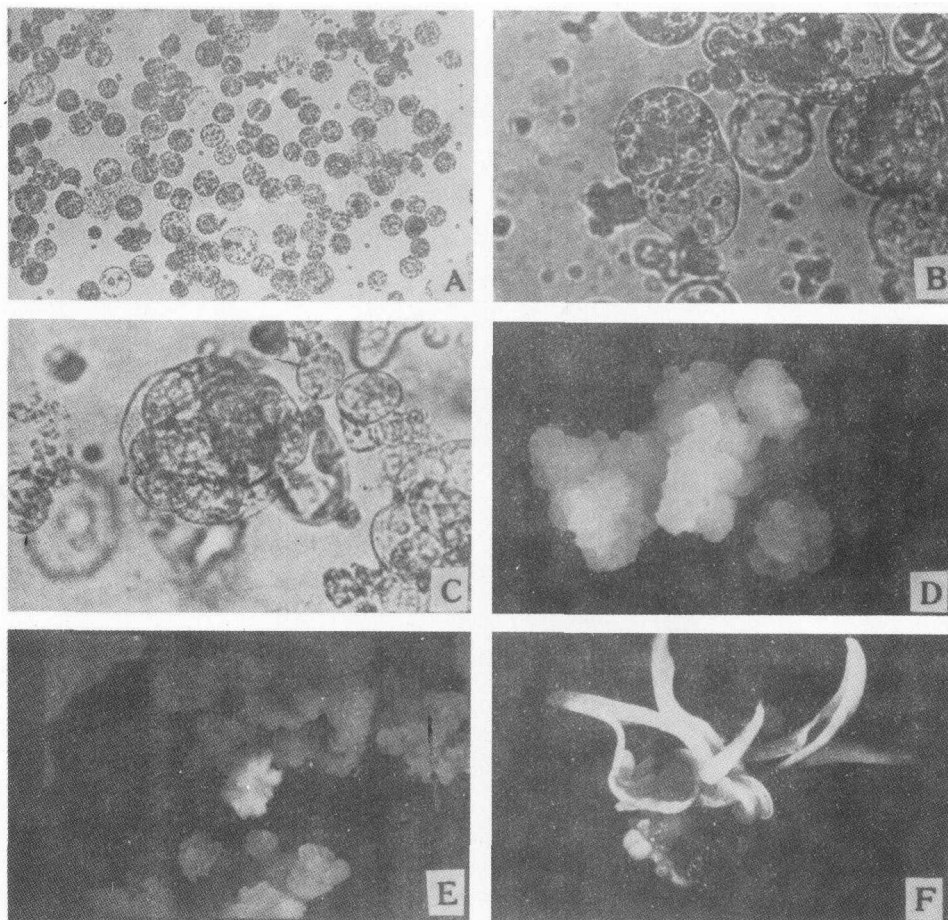
Liu Bao      Wu Qin - sheng      Liu Da - jun

(Cytogenetics Lab., Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

#### Abstract

Friable embryogenic callus was induced from seeds of spring barley cv. 'Ruche' cultured on MS medium with 3 mg/L 2, 4-D, 0.2mg/L Kinetin, 200mg/L casein hydrolysate, 300mg/L glutamine and 30 g/L sucrose. These calli were used as source material for liquid culture and stable embryogenic cell suspension cultures were established in MS liquid culture, its composition was the same as the above solid MS medium except 2,4-D concentration was dropped to 2mg/L within 3 months. Large number of viable protoplasts could be released from the suspension enzymatically, and they could undergo continuous divisions, forming colony and callus in a modified MS medium. When these small calli were directly transferred to regeneration media, friable embryogenic callus, compact and organized embryogenic callus, embryoids and eventually albino plantlets were regenerated.

**Key words**      *Hordeum vulgare* L., Embryogenic cell suspension, Protoplast culture, Albino plantlet



### 图版说明

- A. 从胚性细胞悬浮系刚游离出的原生质体
- B. 培养 7 天后细胞一次分裂
- C. 培养 2 周后形成的细胞团
- D. 转分化 2 周后形成的疏松胚性愈伤组织
- E. 进一步形成的有紧密结构的胚性愈伤组织及胚状体
- F. 再生的白化苗

### Explanation of Plate

- A. Newly released protoplasts from the embryogenic cell suspension cultures. B. Cell first division at 7 days after culture. C. Cell colony formed 2 weeks after culture. D. Friable embryogenic callus formed at 2 weeks after being transferred to regeneration media. E. Compact organized embryogenic callus and embryoids. F. Regenerated albino plantlets.