

光敏核不育水稻(31301s)原生质体 培养再生成株

朱根发 余毓君

(华中农业大学, 湖北武汉, 430070)

提 要 从光敏核不育水稻 31301s 胚性细胞悬浮系分离培养原生质体, 成功地实现了植株再生。原生质体在 KPR 培养基中植板率达 2.4%, 在 SKPR (除去 KPR 中复杂的有机成分, 以及葡萄糖以外的糖类) 中获得了较高的植板率(1.8%)。在高压灭菌取代过滤除菌的 SKPR 中也能培养成功。31301s 原生质体再生细胞团直接分化的分化率达 10%, 再生细胞团在含 3%蔗糖和 500mg/L 脯氨酸的 N_6 培养基上增殖后再分化, 可明显提高植株再生率。

关键词 光敏核不育水稻; 胚性细胞悬浮系; 原生质体; 植株再生

水稻原生质体植板率和分化率是反映培养效率的重要指标。Taipei 309(粳)^[1]和 IR₅₄(籼)^[2]的植板率和分化率都较高, 因而被认为是水稻原生质体培养的模式品种, 但与烟草、胡萝卜、番茄等模式植物相比, 差距仍然很大。筛选具有良好原生质体培养性能、特别是利用价值的基因型是很重要的。本试验以成熟胚为外植体诱导愈伤组织, 建立胚性细胞悬浮系, 进行原生质体培养与植株再生, 试图对植板率和分化率进行研究, 以筛选出培养性能好的基因型供研究用。

1 材料与方 法

1.1 胚性细胞悬浮系的建立

剥出粳稻品种 31301s、金南风、N5047s、31116s, 籼稻品种 IR₂₄、桂朝 2 号以及中间类型品种 02428、Dular、Java14、毫梅等种子的成熟胚, 置于 $Ms+2mg/L\ 2, 4-D$ 的培养基(维生素用量同 N_6)上诱导愈伤组织。经相同或添加 500mg/L 脯氨酸的培养基中继代后, 挑选快速生长、松散颗粒状、淡黄色的胚性愈伤组织 1—2g, 分别置于含 20ml AA、NBL (N_6 大量元素及维生素+B₅ 微量元素+水解酪蛋白 300mg/L+500mg/L 脯氨酸+1—2mg/L 2, 4-D+3%蔗糖) 或 MBL (Ms 大量元素+B₅ 微量元素及维生素+水解酪蛋白 300mg/L+谷氨酰胺 200mg/L+2, 4-D 1—2 mg/L+KT 0.2mg/L+3%蔗糖) 液体培养基的 100ml 三角瓶中。120rpm 振荡悬浮。每周继代一次。继代时去掉上层液 10ml, 加入等量新鲜培养液, 一个月后吸出并中小颗粒, 置新鲜培养基中重新悬浮。悬浮时, 籼稻需将变褐死亡细胞团去掉。当小细胞团大量增殖时, 用吸管吸取悬浮细胞 10—15ml, 加入新鲜培养液。悬浮细胞与培养基之比保持在 1.3—1.5, 以建立稳定增殖的胚性细胞悬浮系。

1.2 原生质体分离

分离前, 悬浮细胞 3 天继代一次, 以加速生长与分裂。半个月左右达迅速增殖时, 取继

收稿日期: 1993-07-17, 终审完毕日期: 1994-05-05

代后第 2—3 天的悬浮细胞 1ml (自然沉降体积), 用洗涤液 PWS (KH_2PO_4 95mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1470 mg/L; MES 600mg/L; 甘露醇 0.5M, pH5.7) 洗 2 次, 加入 5—6ml 酶液 I 或 II (酶液 I: Cellulase onozuka R-10 2%, Pectolyase Y-23 0.1%, 甘露醇 0.5mol/L, PWS 液, pH5.7; 酶液 II: Pectolyase 0.2%, 其余同 I)。20—30 rpm 振荡酶解分离 1—2 小时, 然后静置酶解至所需量。

酶解后, 经 40μ 细胞筛过滤, 除去未酶解的细胞团, 再 500rpm 离心 1—3 分钟, 用洗涤液重新悬浮, 离心 2 次, 再用培养基悬浮离心 1 次。调整原生质体至适当密度。

1.3 原生质体培养

纯化的原生质体以 $0.5-1 \times 10^6$ 的密度培养在经高压灭菌的 SKPR (简化的 KPR。本试验除去 KPR^[3] 中的 VD_3 , V_A , 椰子汁, 延胡索酸, 鼠李糖。葡萄糖 0.5mol/L, pH5.7) 中。用 0.6% 琼脂糖包埋, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 暗培养。培养第 2 天起, 在倒置显微镜下观察分裂情况。30 天后在解剖镜下计数肉眼可见的细胞团数, 统计植板率 (肉眼可见再生细胞团数与培养原生质体数的比例)。并将再生细胞团转入不同分化培养基中培养。

1.4 原生质体再生细胞团的分化

将含有再生细胞团的琼脂糖块分成大小相同的小块, 接种到不同的分化培养基 (基本成份为 MS 大量元素+B₅, 微量元素+N₆, 维生素+8%蔗糖) 中, 暗分化 1 周后光下分化, 20 天后统计每小块琼脂糖所长出的愈伤块数及分化的愈伤组织数。比较了不同培养基上增殖后的分化效果。分化率为分化的愈伤数 (出绿点及成苗的愈伤) 与总接种愈伤数之比。

2 结果与分析

2.1 原生质体分离

供试 11 个材料中, 有 4 个基因型 (31301s, Java 14, 毫梅, 金南风等) 建立了胚性细胞悬浮系, 但不同基因型悬浮细胞的分散状态、增殖速度有所不同, 因而在原生质体产量、酶解速度以及融合情况等方面都出现差异 (表 1)。Java 14 分散程度最高, 酶解速度最快, 原生质体产率最高, 酶解 2—3 小时便获 $0.8-1 \times 10^6$ / ml 的产率, 但自发融合率很低, 如果一直处于 20—30rpm 振荡酶解时, 原生质体将大量粘连, 纯化时不易分开。31301s 悬浮细胞生长最快, 分散程度不及 Java 14, 产率比 Java 14 低, 但自发融合率高达 20—30%。毫梅、金南风的悬浮细胞在游离原生质体时增殖速度不快, 酶解产率很低。可见, 原生质体产率与悬浮细胞的生长速度具有明显的正相关。自发融合现象可能是生长迅速的悬浮细胞酶解原生质体时的特征之一。

2.2 原生质体培养

31301s 原生质体培养的第 4—5 天开始第一次分裂, 一周后达分裂高峰。自发融合的一般

表 1 不同基因型悬浮细胞在酶 I 中的原生质体游离情况
Table 1 Character of protoplast isolation of different genotype on enzyme I

基因型 Genotype	酶解时间(小时) Digestion time (h)	原生质体产率 (个/ml) Protoplast yield(No./ml)	自发融合情况 Spontaneous cell fusion	分裂频率 Division frequency	悬浮细胞 生长速度 Growth of suspension cells
31301s	3-4	$6-8 \times 10^6$	20-30%	很高	++++
Java 14	2-3	$0.8-1 \times 10^6$	很少	较高	+++
毫梅	4-5	$3-4 \times 10^6$	很少	低	++
金南风	4-5	$1-2 \times 10^6$	很少	极低	+

不能分裂,只观察到膨大。培养10—14天后肉眼可见细胞团。31301s的一次分裂方式通常为均等分裂(图版c),也有一些呈不对称分裂。二次分裂的形式多样(图版d,e,f)。原生质体再生细胞一旦开始分裂,便迅速分裂。培养14天后添加0.1—0.2ml含0.4mol/L葡萄糖、2.4-D 1.25mg/L的KPR新鲜培养液,明显促进了细胞的分裂与生长。培养21天后,根据细胞分裂情况,再添加含0.3mol/L葡萄糖,2.4-D 2mg/L的KPR培养基0.2ml,可进一步促进细胞分裂,不致营养缺乏导致细胞团死亡。在未添加降低渗透压培养液的培养中,细胞团增殖稍慢,但能形成致密化的球形胚状体结构(图版h)。

31301s的分裂频率很高,细胞团生长迅速,加液时间可提早到培养后的10—20天,这有利于细胞团的快速生长,对缩短原生质体培养时间是有效的。

本试验对KPR培养基进行了简化,称为SKPR,即去掉KPR中有机物及糖类,只用0.5M葡萄糖。培养基用高压灭菌方法灭菌。SKPR与KPR中原生质体的分裂频率、分裂速度差异不大,用SKPR获得了较高的植板率(1.8%),略低于KPR(2.4%)(图版i,j)。说明31301s原生质体培养对复杂的有机物及糖类不是很必需的。

2.3 原生质体再生细胞团的分化

2.3.1 NAA和KT、6-BA配比对分化的影响

从表2可以看出,31301s原生质体再生细胞团在不含生长素NAA的分化培养基中,分化率随KT的增加而降低,死亡率随KT的增加而增大。在含NAA的培养基中,分化率随KT增加有所提高,分化率最高的组合是NAA 0.5mg/L+KT 4mg/L。KT含量相同时,随NAA增加,分化率有所提高,死亡率有所降低,这可能是NAA对细胞团的增殖有促进作用,减少了细胞的死亡率。

NAA与6-BA的不同配比对再生细胞团的分化也有明显影响(表3)。增加6-BA浓度提高分化率。在相同浓度(4mg/L)下,6-BA比KT更有利于原生质体再生细胞团的分化,前者达16%,后者只13%。

2.3.2 蔗糖和氨基酸类对分化的影响

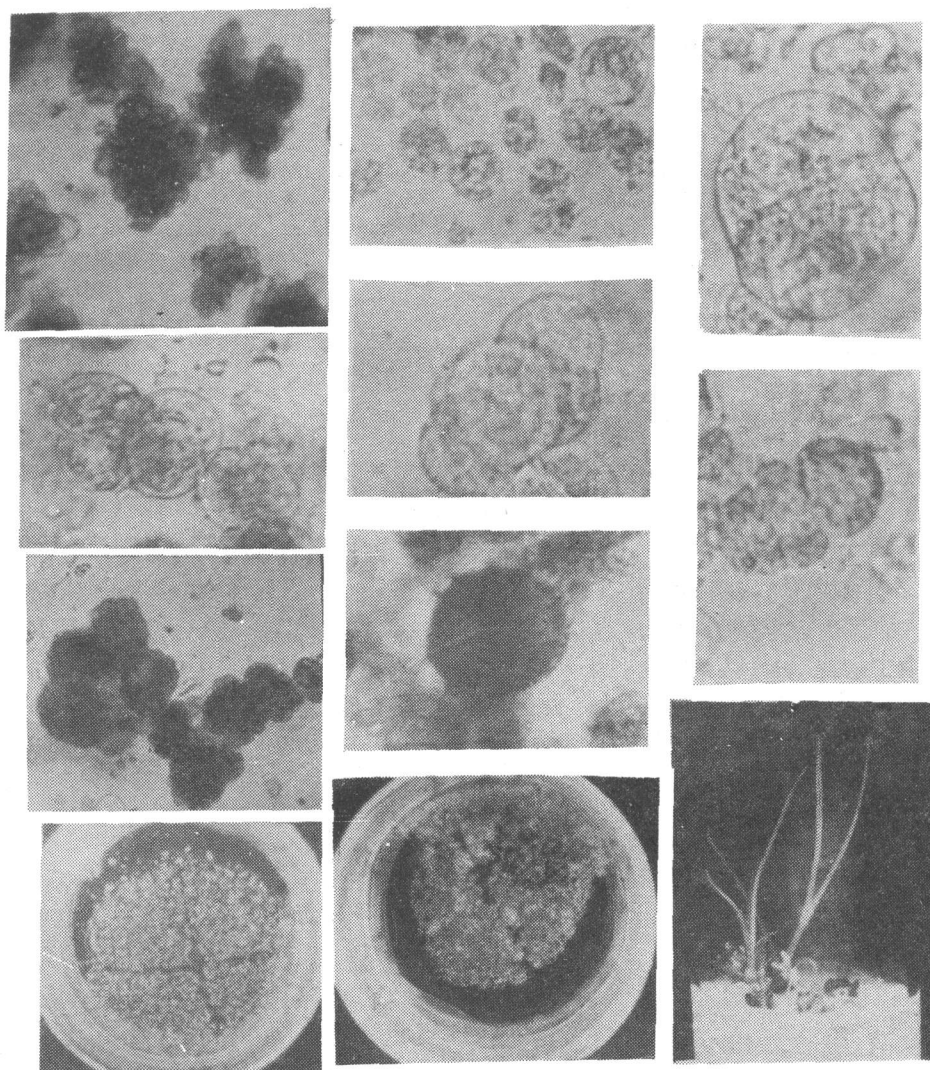
在D₁分化培养基中,8%蔗糖较3%更有利于再生细胞团的分化,分化率分别为9%和6%。在含3%蔗糖的D₁培养基中分别添加500mg/L脯氨酸(Pro),300mg/L CH或500mg/L Pro+300mg/L CH对分化均不利,分化率分别为4%、3%和2%。说明添加氨基酸类物质,只能促进细胞团的生长,反而抑制细胞的分化。

2.3.3 再生细胞团的增殖后分化

31301s原生质体再生细胞团在增殖培养基(NC+8%蔗糖或NC+脯氨酸500mg/L+3%蔗糖)上增殖一周,细胞团长至1mm以上时,转移到D₁中分化,分化率分别可达40%和80%。说明,增殖后可显著提高再生细胞团的分化能力。添加脯氨酸对长期培养的细胞悬浮系分离的原生质体新产生的细胞团的分化,也有明显的促进作用。因此,再生细胞团在NC+脯氨酸500mg/L+3%蔗糖的培养基上适当增殖后分化,是较好的分化途径。

3 讨论

本试验从31301s和Java14原生质体得到大量再生愈伤组织时,已在AA中分别悬浮约7个月和3个月(Java14原生质体已再生植株,另文报道),这与前人^[1]需悬浮4—8个月的结果相似。快速增殖、质浓、分散的胚性细胞悬浮系在简化培养基中也能获得较高的植板率。



图版：光敏核不育水稻 31301s 原生质体培养再生成株
Plate: Plant regeneration from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of photo-period sensitive genic male sterile rice

- | | |
|--|---------------------|
| a. 悬浮细胞(Embryogenic suspension cells) | 120 X |
| b. 原生质体(Protoplasts) | 230 X |
| c. 一次分裂(First division) | 460 X |
| d.e.f. 二次分裂(Second division) | 420 X; 400 X; 480 X |
| g. 小细胞团(Clones) | 160 X |
| h. 球形胚(Globe embryo) | 110 X |
| i. KPR 肉眼可见再生愈伤
(Clones from protoplasts cultured on KPR) | 1.3 X |
| j. SKPR 肉眼可见再生愈伤
(Clones from protoplasts cultured on SKPR) | 1.3 X |
| k. 再生植株(Regenerated plantlets) | 1 X |

a	b	c
d	e	
g	h	f
i	j	k

图序编码

表2 NAA与KT配比(mg/L)对31301s再生细胞团分化率与死亡率的影响

Table 2 Differentiation frequency and death frequency of clones from 31301s protoplasts in medium with different concentration of NAA and KT

NAA	分化率(%) Differentiation frequency (%)				死亡率(%) Death frequency (%)				注
	KT				KT				
	0	1	2	4	0	1	2	4	
0.00	6	3	2	2	55	85	97	97	各处理供
0.25	-	10	8	10	-	83	81	81	试细胞团
0.50	-	10	10	13	-	68	72	87	均为500个

表3 不同NAA与6-BA配比下(mg/L)再生细胞团的分化率(%)

Table 3 Differentiation frequency of clones from 31301s protoplasts in medium with different concentration of NAA and 6-BA

NAA	6-BA				注
	0	1	2	4	
0.00	6	1	1	3	各处理供
0.25	-	8	9	-	试细胞团
0.50	-	-	-	16	均为100个

本试验从晚粳型光敏核不育系31301s的原生质体获得较高的植板率,但再生细胞团直接分化率较低(16%以下),可能是悬浮细胞长期培养所致。将再生细胞团在NC或在添加500mg/L Pro的NC中增殖培养,再生能力明显提高,证明了脯氨酸有利于恢复长期继代培养物的植株再生。本试验采用原生质体简化培养基,用高压灭菌取代过滤除菌,有利于降低成本、扩大试验规模、增加试验次数,为遗传操作提供了方便。本试验从31301s原生质体培养实现了45天成苗,快速成株的方法与简便培养方法相结合,禾谷类作物原生质体培养技术将更加完善。

参 考 文 献

- 1 Abdullah, R., E.C. Cocking, and J.A. Thompson, 1986, *Bio. / Tech.* 4, 1087—1090.
- 2 Lee, L., R.E. Schroll, H.D. Grimes, et. al., 1989, *Planta* 178: 325—333.
- 3 Kao, K.N., 1977, *Mol. Gen. Genet.*, 150, 225—230.

Plant Regeneration of Protoplasts from Embryogenic Cell Suspensions of Photo-period Sensitive Genic Male Sterile Rice 31301s

Zhu Genfa Yu Yujun

(Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070)

Abstract Plantlets were regenerated from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of photo-period sensitive genic male sterile rice 31301s. The plating efficiency was up to 2.4% on KPR medium, and high plating efficiency was also obtained in 31301s protoplasts when cultured on SKPR (minusing the organic additions and sugars except glucose on KPR medium) by autoclaving. The regeneration frequency was up to 16%, and it could be increased when clones were propagated on N₆ medium with 3% sucrose and 500mg/L proline.

Key words Photo-period sensitive genic male sterile rice; Embryogenic cell suspension protoplast; Plant regeneration