

疣粒野生稻胚性悬浮细胞系的建立及其原生质体的培养和植株再生

蔺忠龙^{1,2}, 白现广^{1,2}, 吕广磊^{2,3}, 李维薇¹, 殷富有², 黄兴奇², 程在全^{2,*}

¹云南大学生命科学学院, 昆明 650091; ²云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223; ³云南农业大学农业与生物技术学院, 昆明 650201

Establishment of Embryogenic Cell Suspension Cultures and Plants Regeneration from Protoplast Culture of Wild Rice *Oryza meyeriana*

LIN Zhong-Long^{1,2}, BAI Xian-Guang^{1,2}, LÜ Guang-Lei^{2,3}, LI Wei-Wei¹, YIN Fu-You², HUANG Xing-Qi², CHENG Zai-Quan^{2,*}
¹College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; ²Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; ³Academy of Agricultural and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

摘要: 云南疣粒野生稻的成熟种子经55 ℃温度处理3 d打破休眠后, 在诱导培养基上诱导出愈伤组织。挑选胚性愈伤组织置于液体培养基中振荡培养, 经3个月的继代培养, 建立胚性细胞悬浮系。悬浮细胞经酶解、去壁后获得大量原生质体, 固体包埋后添加液体培养基进行原生质体培养。在培养过程中调节培养体系的渗透压, 获得小愈伤组织; 经增殖后在分化培养基上诱导产生胚状体, 成功得到疣粒野生稻的原生质体再生植株。

关键词: 疣粒野生稻; 悬浮培养; 原生质体; 植株再生

野生稻是栽培稻遗传改良的天然基因库, 其中一些类型具有抗病、抗虫、耐寒、耐旱以及高蛋白含量等优良性状, 应用植物遗传操作技术将野生稻的优良特性引入栽培稻, 对于栽培稻的品种改良具有重要意义(应存山 1993)。疣粒野生稻是我国现存的3种野生稻之一, 经鉴定对水稻白叶枯病表现高抗或接近免疫, 高抗细菌性条斑病和稻飞虱, 同时抗稻瘟病、螟虫, 是一种优良的种质资源(朱永生等 2004)。然而, 疣粒野生稻属 GG 染色体组, 与染色体组为 AA 的栽培稻属不同的种, 两者存在生殖隔离, 有性杂交很难成功(李良材等 1988)。采用体细胞融合技术可以解决此困难。开展体细胞融合研究的基础是胚性悬浮细胞系的建立及原生质体再生植株, 栽培稻原生质体再生植株在近年已有重大突破和发展, 但疣粒野生稻的报道很少。随着水稻原生质体培养技术体系的建立, 琼脂糖包埋、热激冷处理、看护培养等方法的应用, 水稻原生质体培养的基因型范围不断扩大(颜秋生等 1995)。本文建立了良好的疣粒野生稻胚性细胞悬浮系, 并在此基础上进行原生质体的游离培养, 得到了再生植株。

材料与amp;方法

1 试验材料

疣粒野生稻[*Oryza meyeriana* (Zoll. et Mor. ex

Steud.) Baill.], 采自云南省景洪县境内, 移栽到昆明温室后供试验用。

2 试验方法

2.1 愈伤组织的诱导 外植体选用成熟种胚, 一部分用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 后部分直接接种于含 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 MS 诱导培养基上暗培养; 另一部分在 55 ℃ 下处理 3 d 后, 再接种于相同的培养基上。诱发愈伤组织后, 每隔 2 周用继代培养基 (MS+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+500 mg·L⁻¹ 脯氨酸+500 mg·L⁻¹ 谷氨酰胺+300 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白+3% 蔗糖, pH 5.8) 继代培养 1 次。

2.2 胚性悬浮系的建立 在继代 2~3 次的胚性愈伤组织中, 选择生长迅速、颜色淡黄、结构致密、结合松散的小颗粒状愈伤组织, 接种于改良的液体 AA 培养基中(秦发兰等 2001) (AA 大量元素, 其中微量元素及有机成分与 B5 培养基相同, 300 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白, 500 mg·L⁻¹ 脯氨酸, 500 mg·L⁻¹ 谷氨酰胺, 2 mg·L⁻¹ 2,4-D, 蔗糖 3.0%, pH 5.8), 黑暗条件振荡培养, 温度为 27.5 ℃, 转速为 110 r·min⁻¹, 每隔

收稿 2008-09-22 修定 2008-10-23

资助 国家自然科学基金(30460019)、云南省科技攻关项目(2006NG34)和云南省自然科学基金(2006C00007Q)。

* 通讯作者(E-mail: czquan-99@163.com; Tel: 0871-5111863)。

5~7 d 继代1次。悬浮培养3~4个月后, 建成良好的胚性细胞悬浮系。

2.3 原生质体的游离培养 选取继代3 d的悬浮细胞, 置于混合酶液中游离原生质体, 每克悬浮细胞加入10 mL酶液。酶液组成为: 1.0%、1.5%和2.0%的纤维素酶(Cellulase Onozuka RS), 0.1%和0.2%果胶酶(Pectolyase Y-23), 5 mmol·L⁻¹ MES, CPW13 (27.2 mg·L⁻¹ KH₂PO₄, 101 mg·L⁻¹ KNO₃, 1480 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 246 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 13%甘露醇, pH 5.6)。游离原生质体时先在50 r·min⁻¹摇床上黑暗酶解3 h, 然后静置1 h; 将混合液顺序用孔径为85 μm和35 μm的尼龙网过滤, 收集滤液, 500 r·min⁻¹低速离心5 min收集原生质体。离心沉淀物用CPW13 (CPW盐+13%甘露醇)清洗3次, 最后用KM8p培养基(KM8p+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白+100 mg·L⁻¹ 脯氨酸+10%葡萄糖浓度, pH 5.8)清洗3次。纯化后的原生质体在45 ℃的水浴中热激5 min后迅速放进0 ℃的冰水冷却15 s, 然后用含1.2%低熔点琼脂糖的KM8p培养基包埋, 原生质体的最终植板密度为0.5×10⁵~1×10⁵个·mL⁻¹, 进行暗培养。培养7~10 d时, 细胞进入第一次分裂高峰后, 加入适量的KM8p降压培养基(基本成分与KM8p相同, 但葡萄糖浓度均为1%, 蔗糖浓度为2%), 促进培养细胞分裂, 10 d后统计再生细胞分裂频率。当出现

4~5次分裂的小细胞团时, 加入少量AA培养基(含2 mg·L⁻¹ 2,4-D), 第3周时统计植板率。长至肉眼可见的愈伤组织时, 将愈伤组织转入预分化培养基(N6+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ KT+60 g·L⁻¹ 蔗糖+1.0%琼脂)进行预分化。

2.4 植株再生 将直径5 mm左右的愈伤组织块转入分化培养基(N6+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ KT+30 g·L⁻¹ 蔗糖+0.8%琼脂)分化, 光照时间14 h·d⁻¹, 光照强度为36~40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度为27 ℃。待分化出小植株后计算再生愈伤组织的分化频率(分化频率=出苗愈伤数/分化愈伤数×100%); 将再生植株转入生根培养基(1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA)促进根和幼苗的生长, 苗长4~5 cm时, 置于室温下炼苗2~3 d后移栽。对照在再生细胞分裂后不进行渗透压的调节, 再生的愈伤组织直接进行分化。

结果与讨论

1 愈伤组织的诱导

从表1可知, 成熟种子作外植体, 高温处理与未处理相比, 出现愈伤组织时间提前, 愈伤组织出现率提高, 这可能与野生稻的休眠期较长有关, 说明适当的高温有利于打破休眠促进胚的萌动。这与张伟和简玉瑜(1991)报道的高温处理普通野生稻(*O. rufipogon*)可以提高成熟种子出愈率的结果相吻合。

表1 疣粒野生稻愈伤组织的诱导

| 材料 | 初始出愈时间/d | 种子接种数/粒 | 愈伤组织诱导数/个 | 出愈率/% |
|----------------|----------|---------|-----------|-------|
| 成熟种子 | 21 | 50 | 35 | 70 |
| 55 ℃处理3 d的成熟种子 | 15 | 50 | 42 | 84 |

根据我们的观察, 诱导出的愈伤组织有3种类型, 第1类结构松软或呈粘胶状且生长缓慢, 第2类团块结构紧密、多根状突起, 第3类颗粒细小、致密而结合松散, 生长迅速淡黄色块状。前两者生长缓慢, 后者表现出胚性愈伤组织特有形态。同时还观察到, 继代时在MS培养基中添加500 mg·L⁻¹ 脯氨酸、500 mg·L⁻¹ 谷氨酰胺和300 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白, 并提高琼脂浓度至1.0%时, 对于胚性愈伤组织的诱导和胚性的保持有较好的作用, 这对形成结构致密且松散结合的理想胚性愈伤组织来说是有利的。

2 胚性细胞悬浮系的建立

将颗粒细小、致密而结合松散、颜色鲜艳呈黄白色、生长迅速的胚性愈伤组织置于液体培养基AA中培养后, 经过3个月继代, 细胞悬浮物呈细小颗粒状(<1 mm) (图1-a), 增殖迅速。显微镜下观察可以看到, 悬浮细胞大小较为一致, 细胞质浓厚, 内含物丰富, 活力强(图1-b)。用酶液处理3~4 h, 便可游离出大量有活力的原生质体(图1-c)。这表明良好的胚性悬浮细胞系已经建成。

3 原生质体的游离和培养

3.1 原生质体游离时期的选择 悬浮细胞系建立过

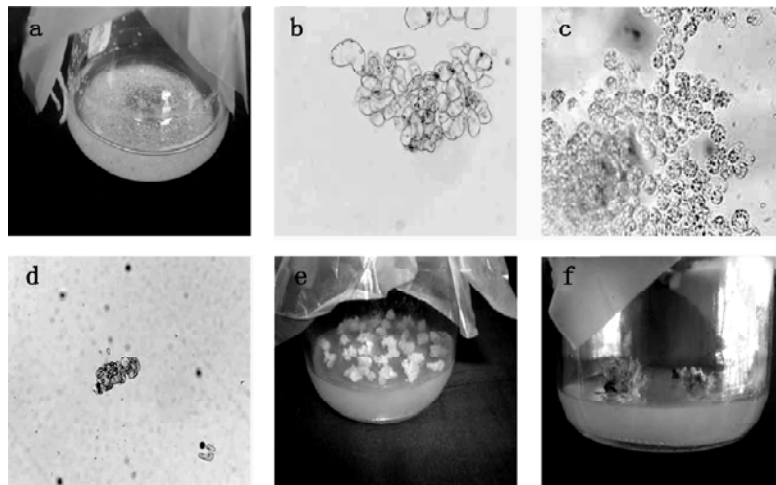


图1 疣粒野生稻胚性细胞的悬浮和原生质体培养以及植株再生

a: 疣粒野生稻悬浮细胞系; b: 疣粒野生稻悬浮细胞镜检图; c: 疣粒野生稻悬浮细胞酶解游离得到的原生质体; d: 原生质体分裂产生多细胞; e: 原生质体诱导产生愈伤组织; f: 原生质体再生小植株。

程中, 悬浮培养中期的悬浮细胞大部分呈椭圆形, 并开始有小部分细胞团形成, 其中心部分的细胞质逐渐变浓, 而边缘细胞的细胞质仍未充实。采用此期的悬浮细胞游离原生质体的原生质体产率极低, 且原生质体内含物稀薄, 包埋培养 2~3 d 后, 还有部分细胞壁未能再生, 细胞内含物易外渗。同时, 这类原生质体不能持续分裂, 培养 1 周后, 细胞逐渐变空, 胞质环流基本停止, 细胞失去活性。悬浮培养后期的细胞基本为圆形, 每个细胞团有 40~50 个细胞, 胞质浓、内含物丰富、细胞膜光滑。取继代后 3 d 的悬浮细胞游离原生质体, 原生质体得率高; 刚游离出的原生质体呈球状, 内含物丰富, 活力强。

3.2 原生质体的游离 从表 2 中可以看出, 酶种类、浓度和酶解时间均会影响原生质体的产率和质量。纤维素酶单独使用的原生质体产量小于 10^3 个 $\cdot g^{-1}$ 。纤维素酶和果胶酶配合使用的原生质体产率较高, 本文用 2% 纤维素酶+0.2% 果胶酶+5 mmol $\cdot L^{-1}$ MES

的酶液可使原生质体的产量达到 2.0×10^5 个 $\cdot g^{-1}$ 。适当的酶解时间也是影响原生质体产量的重要因素。酶解时间过短、酶浓度过低, 均会造成酶解不充分, 从而影响原生质体产率和质量; 但酶解时间过长, 原生质体产率和质量也会随之下落, 出现破碎现象。经比较发现酶解 4 h 时原生质体的产率最高, 为 2.0×10^5 个 $\cdot g^{-1}$ 。Zuily-Fodil 等(1987)曾报道, 在酶解后原生质体分离培养时, 植物细胞膜的脂类物质存在一个损伤修复过程, 若损伤的原生质体得不到恢复时, 则细胞丧失分裂能力; 李良材等(1988)也提出, 两步法酶解可避免细胞自发融合, 减小对细胞膜的损伤。我们用 2% 纤维素酶+0.2% 果胶酶+5 mmol $\cdot L^{-1}$ MES 的酶液酶解 4 h 的一步法酶解, 控制原生质体游离的时间, 并及时静置酶解, 可减少原生质体膜的损伤, 游离出高质量和高活力的疣粒野生稻原生质体, 这样可以保证细胞壁的形成和细胞持续分裂。

表2 酶种类、酶浓度和酶解时间对疣粒野生稻原生质体产量的影响

| 处理编号 | 纤维素酶 RS/% | 果胶酶 Y-23/% | 酶解时间/h | 原生质体产量/个 $\cdot g^{-1}$ |
|------|-----------|------------|--------|-------------------------|
| 1 | 1.0 | 0 | 2 | $<10^3$ |
| 2 | 1.0 | 0.1 | 2 | $<10^4$ |
| 3 | 1.0 | 0.2 | 2 | $<10^4$ |
| 4 | 1.5 | 0.1 | 3 | $<10^4$ |
| 5 | 1.5 | 0.2 | 3 | $<10^5$ |
| 6 | 2.0 | 0.1 | 4 | 1.0×10^5 |
| 7 | 2.0 | 0.2 | 4 | 2.0×10^5 |

3.3 原生质体的培养 渗透压是原生质体培养的因素之一, Russel 和 McCown (1988)报道在原生质体培养过程中采用每周降低蔗糖浓度 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的策略可以提高原生质体植板率。据此本文也做了渗透压调整研究。表3结果显示, 在游离原生质体时, 采用 CPW13 配制酶液, 渗透压调节剂甘露醇的浓度为 13% (约 $0.71 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 这样原生质体在游离和纯化过程中处于微皱缩状态, 可以避免质膜损伤而导致原生质体破裂。原生质体的 KM8p 包埋培养基中的葡萄糖浓度为 10% (约 $0.56 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时有

利于细胞壁再生, 同时可促进第 1 次细胞分裂。在细胞开始进入第 2 次分裂时, 将渗透压从 10% 降低到 3%, 然后在预分化时期将渗透压从 3% 提高到 6%、在分化时期又将渗透压从 6% 降低到 3%, 最后发现细胞分裂频率、植板率、分化率分别由 5.2%、1.8、6.2 上升到 9.8、2.4、8.6。这可能是 6% 的蔗糖有利于促进愈伤组织长成致密的小块和诱导胚胎形成; 分化时蔗糖浓度降至正常水平(3%)有利于通过胚状体途径再生植株。

3.4 原生质体再生细胞团 得到的高质量原生质体

表3 渗透压对疣粒野生稻原生质体培养的影响

| 处理 | 游离时期渗透剂甘露醇浓度/% | 培养初期渗透剂葡萄糖浓度/% | 第二次分裂时期渗透剂葡萄糖和蔗糖总糖浓度/% | 预分化时期渗透剂蔗糖浓度/% | 分化时期渗透剂蔗糖浓度/% | 再生细胞分裂频率/% | 植板率/% | 分化频率/% |
|-------|----------------|----------------|------------------------|----------------|---------------|------------|-------|--------|
| 对照 | 13 | 10 | 10 | 3 | 3 | 5.2 | 1.8 | 6.2 |
| 渗透压处理 | 13 | 10 | 3 | 6 | 3 | 9.8 | 2.4 | 8.6 |

用琼脂糖包埋培养, 48 h 后有 50% 以上的细胞质进一步变浓, 并开始膨大变形, 这表明细胞壁开始产生。3 d 后大部分原生质体形成完整的细胞壁, 4 d 后可以观察到第一次细胞分裂, 5~7 d 进入第 2 次细胞分裂, 发育良好且能持续分裂的细胞在 15 d 左右长成多细胞团(图 1-d), 1 个月左右长成愈伤组织(图 1-e)。此时应及时将愈伤组织转入分化培养基上培养, 45 d 后出现胚芽鞘和少量的根, 并再生出绿色小植株(图 1-f)。

4 植株再生

愈伤组织转入分化培养基上 15~20 d 后出现绿点, 并进一步形成幼苗。 $0.1\sim 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAA 与 $1.0\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 有利于植株再生; KT 浓度大于 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且不加 NAA 时, 非胚性愈伤组织容易快速生长, 但不利于植株分化和再生。此时将 1 cm 长的幼苗移于生根培养基($1/2\text{MS}+\text{NAA } 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)上, 可以促进根和幼苗的生长, 形成完整的绿色小植株。

参考文献

- 李良材, 陈一明, 陈英(1988). 原生质体培养及植株再生研究. 遗传学报, 15 (5): 321~328
- 秦发兰, 陈葆棠, 朱永生, 林兴华, 张端品(2001). 疣粒野生稻胚性愈伤组织诱导及分化成苗研究. 中国农业科学, 34 (5): 560~563
- 颜秋生, 张雪琴, 滕胜, 黄纯农, 严庆丰, 王君晖(1995). 水稻原生质体培养技术体系的建立. 见: 农业科学集刊编辑委员会编. 农业科学集刊(第二辑). 北京: 中国农业出版社, 20~26
- 应存山(1993). 中国稻种资源. 北京: 中国农业科技出版社, 17~28
- 张伟, 简玉瑜(1991). 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, 12 (4): 13~17
- 朱永生, 陈葆棠, 余舜武等(2004). 不对称体细胞杂交转移疣粒野生稻对水稻白叶枯病的抗性. 科学通报, 49 (14): 1359~1398
- Russel JA, McCown BH (1988). Recovery of plant from leaf protoplasts of hybrid-popular and aspen clones. Plant Cell Rep, 7: 59~62
- Zuily-Fodil Y, Teodorescu-Ionescu N, Passaquet C, Pham Thi AT (1987). Lipid synthesis in callus and protoplasts during culture: Analysis of dividing protoplasts of *Detunia hybrida* and nondividing of *Parthnocissus tricuspidata*. Physiol Plant, 71: 110~114