

提高小麦原生质体再生植株频率的研究

孙宝林 孙勇如 朱 祯 李向辉

(中国科学院遗传研究所, 北京)

从小麦徐州 211 的成熟种子诱导愈伤组织, 建立了胚性悬浮细胞系。酶解悬浮细胞获得原生质体, 用含 0.8% 琼脂糖的改良 MS 培养基进行琼脂糖珠培养, 再生细胞分裂, 并形成愈伤组织。诱导再生愈伤组织分化, 得到了完整的再生植株。原生质体培养两周后, 加入降渗培养液可促进克隆的形成。在分化培养基中, 低浓度蔗糖可提高植株分化率。高浓度的激动素和玉米素对芽的分化有效并能抑制愈伤化。再生愈伤组织诱导分化时期的早晚影响植株分化频率。

关键词 小麦 (*Triticum aestivum* L.); 原生质体; 植株再生

原生质体培养作为细胞融合、外源基因转化的良好实验系统日益受到人们的重视。这一技术应用于作物改良为人类展示了美好的前景。但由于禾本科植物原生质体再生植株比较困难^[1,2], 一定程度上限制了原生质体技术在粮食作物改良方面的应用。近年来相继有水稻、玉米、小麦原生质体再生植株的报道^[3-9]。但仍然存在着植株分化频率低, 重复性差等问题。本文报道了小麦原生质体植株高频率再生的结果。并着重分析研究了原生质体再生愈伤组织的一些影响因素。

材料与 方法

(一) 愈伤组织的诱导及胚性悬浮细胞系的建立

MS^[10] 培养基 (表 1) 诱导小麦徐州 211 的成熟种子产生愈伤组织, 在相同的培养基上每月继代一次。挑选表面光滑的、致密的、淡黄的愈伤组织进行悬浮培养。每 30ml MS 液体培养基加入 2g 的愈伤组织, 于 23—25℃, 120rpm 的散射光条件下进行悬浮培养。每 3—5 天继代, 6—7 周后建立起分散性好、生长旺盛的悬浮

细胞系, 悬浮培养物为 100—200 个细胞组成的细胞团。

(二) 原生质体的分离和培养

选择继代第 3 天的悬浮细胞系来游离原生质体, 酶液组成为: 2% Cellulase Onozuka RS, 0.2% Pectolyase Y-23, 1470mg/L CaCl₂·2H₂O 95mg/L KH₂PO₄, 600mg/L MES (吗啉乙基磺酸), 0.55 mol/L 甘露醇, pH5.7。在 25—27℃、黑暗、静止条件下, 游离 7—9h。经 38μm 镍丝网过滤, 500rpm 离心 1—2min, 收集原生质体。用原生质体清洗液清洗收集到的原生质体, 洗液的盐成分及渗透浓度与酶液相同。然后用原生质体培养基清洗一次。原生质体培养基为含葡萄糖 0.5mol/L, 2,4-D 1mg/L, 萘乙酸 (NAA) 0.5mg/L, 激动素 (KT) 0.2mg/L 的改良 MS (表 1), 附加了小牛血清、椰乳、水解酪蛋白等物质, 并加入了 0.8% 低熔点琼脂糖对原生质体进行琼脂糖珠培养。方法为: 把含有原生质体的 MS 培养基与含有琼脂糖, 温度为 35℃ 左右的 MS 培养基混合, 然后用滴管转入 6cm 平皿中形成琼脂糖珠, 每个

本文于 1989 年 6 月 12 日收到。

琼脂糖珠的体积为100—150 μ l,当琼脂糖珠凝固后,加入1—1.5ml的MS液体原生质体培养基,于25 $^{\circ}$ C进行暗培养。密度为 1×10^5 个原生质体/ml。两周后加入葡萄糖浓度降为0.30mol/L的新鲜MS原生质体培养液。

(三) 再生愈伤组织的分化

当再生愈伤组织长至1mm大小时,转到附加一定量的蔗糖和细胞分裂素的MS分化培养基上诱导分化。条件为:23—25 $^{\circ}$ C,16h光照(4000lx),8h黑暗。或者转到MS增殖培养基上,当增殖至2mm大小时,再转到分化培养基上进行分化。在分化过程中,比较了细胞分裂素(KT,ZT,6-BA),蔗糖浓度及不同分化时期对植株分化频率的影响。

结果与讨论

从小麦成熟种子诱导的愈伤组织,经多次继代仍保持很强的分化能力。在MS液体培养基中进行培养时,开始出现较多的长形空泡状的游离细胞。经液体继代培养,这类细胞逐渐减少。6—7周后,形成了鲜黄色、生长旺盛、分散性好的悬浮细胞系。此时的悬浮细胞为细胞质浓、细胞壁薄的圆球状。这种悬浮细胞经酶液处理可得到大量的、活力旺盛的原生质体(图版I-1)。经原生质体培养基培养后,第3—5天可见再生细胞的第一次分裂(图版I-2),第8—10天生成细胞团(图版I-3)。加入降渗培养液后细胞团迅速增殖,3—4周后长成肉眼可见的小愈伤组织。待愈伤组织长至1mm大小时,转到分化培养基上诱导分化,或者先转到增殖培养基上进行增殖,待再生愈伤组织增殖到2mm大小时,转移到分化培养基上诱导分化。前一种愈伤组织在分化培养基(表1)上生

长缓慢,继代两次后开始出现绿色芽点。后一种再生愈伤组织在上述的分化培养基上第7天可见绿色芽点出现,3—4周后分化成芽(图版I-4)。当芽长至1cm大小时,转到无激素的MS生根培养基上,7天后分化成根,进而发育成完整的绿色植株。(图版I-5)

建立分散性好、生长旺盛、具有较高分化潜能的悬浮细胞系是原生质体培养成功的关键。这种悬浮细胞经适当的酶液处理,可得到大量的、活力旺盛的原生质体。

在原生质体培养基中加入0.8%琼脂糖,可防止原生质体粘连,并能提高原生质体的分裂频率和提前分裂时间。小牛血清具有提供营养、中和毒素等作用^[11],有效地促进了克隆的形成。在再生愈伤组织分化过程中,低浓度蔗糖有利于芽分化(表2)。随着培养基中蔗糖浓度的提高,芽分化率降低,并且愈伤化程度增加。这种现象表明,随着蔗糖浓度的增加,芽的分化受到阻遏。

试验表明,高浓度的激动素和玉米素有利于芽的分化及发育而不利根的形成。低水平的激动素和玉米素不利于芽分化并发生愈伤化现象。可能是经过一定时期的继代,细胞本身含有一定的生长素水平。当芽长至1cm大小时,转到无激素的MS培养基上诱导根,芽继续发育且有根的生成,进而发育成完整植株。

关于细胞分裂素诱导芽的效果方面,KT、ZT明显好于6-BA,而前两者的作用区别不大。

当再生愈伤组织长至1mm大小,转到分化培养基上进行分化时,称早期诱导分化。如果使这样的再生愈伤组织在含有2,4-D2mg/L的MS培养基上增殖至2mm大小,再转到分化培养基上进行分化时,

表 1 实验所用各培养基组成
Table 1 Media used in the experiment

培养基组成 Composition of medium	愈伤组织诱导、悬浮(除琼脂)培养基 Media for callus induction and suspension culture	原生质体培养基 Protoplast culture medium	再生愈伤组织 增殖培养基 Media for continuous growth	再生愈伤组织 最佳分化培养基 The best medium for differentia- tion
基本培养基 Basic media	MS	MS	MS	MS
Sucrose (%)	3	1	5	3
Glucose (mol/L)	—	0.5	—	—
Caseinhydrolysat (mg/L)	250	250	250	250
L-Glutamine (mg/L)	300	—	300	300
Cocoanut milk (ml/L)	—	20	—	—
Calf serum (ml/L)	—	8	—	—
Agarose (%)	—	0.8	—	—
2,4-D(mg/L)	2	1	2	—
KT(mg/L)	—	0.2	—	6
NAA(mg/L)	—	0.5	—	—
Agar (%)	0.8	—	0.8	0.8
pH	5.8	5.7	5.8	5.8

表 2 不同因素对植株分化频率的影响
Table 2 The influence of different factors on the differentiation frequency

	蔗糖浓度 (%) Conc. of sucrose			细胞分裂素 (6mg/L) Cytokinins			早期诱导分化 Early	晚期诱导分化 Late
	3	5	7	KT	ZT	6-BA		
分化频率 (%) Differentiation frequency	40	28	15	40	37	10	45	34

* 基本培养基为MS, 附加: 水解酪蛋白250mg/L, 谷氨酰胺300mg/L, 琼脂0.8%, pH5.8

称晚期诱导分化。进行早期分化的愈伤组织由于较早脱离了培养基中的生长素, 在细胞分裂素的诱发下, 有利于芽的分化, 从而在分化频率上高于晚期诱导分化。

当再生愈伤组织在分化培养基上继代时, 每 4—5 周继代一次效果最好。较短或较长的继代时间均不利于植株的分化。

通过调节蔗糖。细胞分裂素的浓度及分化诱导时期, 实现了小麦原生质体植株高频率再生, 获得了 400 余株再生苗, 一部分已移栽成活, 这种原生质体植株高频率再生为进行原生质体融合和基因转移奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Davey, M. R. and Power, T. B.: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12:115—125, 1988.
- [2] Webb, K.J.: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12:127—131, 1988.
- [3] Fujimura, T. et al.: *Plant Tissue Culture Lett*, 2:744, 1985.
- [4] Thompson, T.A. et al.: *Plant Science*, 47:123—133, 1986.
- [5] Yamada, Y. et al.: *Plant Cell Reports*, 5:85—88, 1986.
- [6] 雷鸣等: 科学通报, 22:1729—1731, 1986.
- [7] 蔡起贵等: 植物学报, 5:453—458, 1987.
- [8] Harris, R. et al.: *Plant Cell Reports*, 7:337—340, 1988.
- [9] Wang Haiho et al.: *Genetic Manipulation in Crops Newsletter*, 4:11—16, 1988.
- [10] Murashige, T. and Skoog, F.: *Physiol Plant*, 15:473—497, 1962.
- [11] 于善谦等: 生物工程学报, 5(1):84—86, 1989.

ENHANCEMENT OF THE FREQUENCY OF REGENERATED PLANTS FROM PROTOPLASTS OF WHEAT (*TRITICUM ASETIVUM* L.)

Sun Baolin Sun Yongru Zhu Zhen Li Xianghui
(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

The calli were initiated from the mature seeds of wheat Xu Zhou 211 and the suspension cultures were established. The protoplasts isolated from suspension cells were cultured in the modified MS medium solidified with 0.8% agarose. The regenerated cells divided and the calli formed. The whole plants were regenerated from the protoplast-derived calli. The colony formation were promoted when the medium with lower osmotic pressure was added after two weeks' culture. When the protoplast-derived calli were differentiated, the frequency of regenerated plants was increased with lower concentration of sucrose. Shoots were induced effectively with higher concentration of cytokinins and the calliferous shoots were avoided. The frequency of regenerated plants was affected when the protoplast-derived calli were transferred onto the differentiation medium in different periods.

Key words

Wheat (*Triticum aestivum* L.); protoplast; plant regeneration



1. 从悬浮细胞分离的原生质体 The protoplasts isolated from suspension cells
2. 培养 3 天后再生细胞第一次分裂 The first division of regenerated cell after 3 days culture
3. 培养 8 天后再生的细胞团 Protoplast-derived colony after 8 days culture
4. 由绿色芽点发育成的芽 Shoots developed from green points
5. 再生的完整植株 The plant regenerated from protoplasts