

小麦胚性悬浮系与原生质体植株再生

夏光敏 李忠谊 周爱芬 郭光沁 陈惠民

(山东大学生物系 济南 250100)

摘要 普通小麦 (*Triticum aestivum*) 昌乐 5 号 (冬性) 胚性悬浮细胞系的组成成分对原生质体再生频率发生影响。此种悬浮系是由混合型愈伤组织建立起来的, 建成的悬浮系中含有 2—3mm 的小愈伤组织和分散好的几十至上百个细胞的细胞团。分别用悬浮系中的小愈伤组织和细胞团分离原生质体进行培养。结果表明, 由小愈伤组织来源的原生质体再生植株的频率显著高于由细胞团分离的原生质体的再生频率。培养基中不同成分对原生质体分裂的影响也作了研究。

关键词 胚性悬浮细胞系, 原生质体, 植株再生, 冬小麦

自 1988 年 Harris 等^[1]首次报道小麦原生质体的植株再生以来, 在最近几年内有相当数量的实验室也取得了成功^[2—10]。然而, 一些问题如原生质体再生能力的提高, 再生植株的移栽成活及极低的可育性^[10], 克服基因型的障碍等仍然亟待解决。在我们以前的工作中^[6—7], 使用在继代培养过程中逐步筛选出的小颗粒状愈伤组织 (0.2—1mm) 来建立细胞悬浮系, 此种悬浮系具有分散性好、生长快、原生质体分裂频率高以及重复性好等特征。已成功地将这种方法应用到三个基因型上, 但是由此种悬浮系制备的原生质体再生频率较低。本文报道一种改进的方法, 此方法应用混合型愈伤组织来建立悬浮系, 建成的悬浮系中含有小愈伤组织和细胞团, 其中的小愈伤组织有很高的分化潜力。

1 材料和方法

1.1 混合型愈伤组织和胚性细胞悬浮系的建立

冬小麦品种昌乐 5 号授粉后 12 天的未成熟胚接种在含 2mg/L 2, 4-D 的 MB 固体培养基上。MB 固体培养基含 MS 无机盐^[11], 2mg/L 甘氨酸, 146mg/L 谷氨酰胺, 300mg/L 水解酪蛋白, 30g/L 蔗糖和 7g/L 琼脂, pH5.8。诱导的愈伤组织在相同的培养基上每 2—3 周继代一次。大约半年以后, 出现直径为 2—3mm 的颗粒组成的愈伤组织, 按文献^[6, 7]的方法进行选择。然后继代、增殖所选愈伤组织直至其表面出现小的颗粒 (0.2—1mm), 用这种混合型愈伤组织建立悬浮系 (以前工作单独用 0.2—1mm 小颗粒)。在 20 毫升含 2, 4-D 2mg/L 的 MB 培养基中放入 3 克愈伤组织, 悬浮培养物放置在往复式摇床上, 110r/min, 25℃, 黑暗条件下, 每 4—7 天换液一次。约一个月建立起生长迅速的悬浮系, 该悬浮系主要由颗粒状小愈伤组织和分散很好的几十至上百个细胞的细胞团组成。

1.2 原生质体的制备与培养

用镊子挑取悬浮培养物中的小愈伤组织, 用解剖刀将其切碎后放入酶液中, 另取细

胞团同样处理后放入酶液中作对照。酶液组成: Cellulas Onozuka RS 2%, Pectolyase Y-23 0.5%, 0.3mmol/L MES, 5mmol/L CaCl₂ 以及 0.6mol/L 甘露醇, pH5.8, 在 25℃ 黑暗中温育 2—4 小时后用 45μm 不锈钢网过滤, 500r/min 离心 5 分钟收集原生质体, 然后用洗液洗两次 (洗液含 0.6mol/L 甘露醇和 5mmol/L CaCl₂, pH5.8), 原生质体培养基 (P₅) 洗一次。以 5×10⁵/ml 的原生质体密度包埋在含 0.3% 琼脂糖的 P₅ 培养基中, P₅ 培养基的成分除水解酪蛋白 500mg/L, 2, 4-D 1mg/L, 蔗糖 1% 以及附加 0.5mol/L 葡萄糖外, 其余成分同 MB。40 天后, 将培养皿中的愈伤组织转到 MB 固体培养基上增殖, 最后转移至含 1mg/L IAA 和 1mg/L 玉米素的 MBIZ 上观察分化情况。

1.3 原生质体培养基成分的优化

用继代后 2—4 天的昌乐 5 号悬浮细胞系分离原生质体, 各种培养基的组成见表 1 (以 P₅ 培养基为基础), 观察原生质体分裂的情况, 15 天时统计原生质体的分裂频率, 选择出有利于原生质体分裂的基本成分。

2 结果与讨论

2.1 悬浮系的建立及其特点

用来建立悬浮系的混合型愈伤组织放在无激素的 MB 固体培养基上测定其分化能力, 10 天后通常有 70% 或更多的愈伤组织分化成苗。

表 1 各种原生质体培养基的成分

Table 1 Composition of different protoplast culture media

Media (mg/L)	P ₃	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉	P ₁₀
Major elements	N ₆	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Micro elements	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitamins	B ₅	B ₅	B ₅	B ₅	B ₅	B ₅	* B ₅ ⁻
Casein hydrolysate	500	500	500	500	500	0	500
Glycine	2	2	0	2	2	2	2
Glutamine	146	146	146	73	0	146	26

Each above medium was added with glucose 0.5 mol/L, MES 975 mg/L, sucrose 10 000mg/L, 2, 4-D 1 mg/L, agarose 0.3%, pH5.8.

* B₅⁻: B₅ Vitamins + folic acid 0.5mg/L + biotin 0.05mg/L + ascorbic acid 30mg/L.

胚性悬浮系建立后, 分别将 2—3mm 的小愈伤组织及分散好的细胞团置于 MBIZ 上, 一周后长大的小愈伤组织上出现绿点, 以后进一步分化成小苗, 分化频率在 90% 以上 (再生植株的愈伤组织块数/用于分化的愈伤组织总块数)。分散好的细胞团形成的愈伤组织上绿点的出现及小苗的分化需要较长时间, 分化频率小于 10% (出现小苗的愈伤组织堆数/用于分化的愈伤组织总堆数)。

2.2 原生质体培养及植株再生

无论是用小愈伤组织还是用细胞团分离的原生质体大部分胞质浓厚 (图版 I-1), 在 P₅ 培养基中第 4 天就能观察到一次分裂 (图版 I-2), 进一步分裂形成小细胞 (图版 I-3), 但小细胞团的进一步发育表现出差异。小愈伤组织来源的原生质体再生细胞团形成较多的结构致密的小愈伤组织 (图版 I-4), 而细胞团来源的原生质体再生细胞团产生粉粒状分散的愈伤组织, 仅有少数致密团块。40 天左右, 两种再生愈伤组织均布满小皿, 分别转

入含 2mg/L, 2,4-D 的 MB 培养基上增殖, 15—20 天后进一步转到 MBIZ 培养基上分化。结构致密的愈伤组织在分化培养基上 8—10 天出现绿点, 进一步长成小叶 (图版 I-5), 也有的出现胚芽鞘后小叶从芽鞘中长出。多数小叶基部无根产生, 进一步转到含 1mg/L NAA 的 1/2 大量元素 MB 培养基上, 其中大多数能诱导生根 (图版 I-6), 分化频率大约为 1.5×10^{-4} (再生植株的数目/开始培养时原生质体的数目, 三次重复的平均值)。粉粒状的愈伤组织在分化培养基上一个月后才有绿点出现, 分化频率与我们前面报道^[7]的相近, 约为 1×10^{-5} 。

对小麦品种济南 177 的悬浮细胞进行了同样的实验, 也获得类似结果。用混合型愈伤组织的悬浮系, 可比以前的原生质体再生植株频率^[7]提高 10 倍以上。前人的工作多采用分散好的小麦悬浮细胞系, 此种细胞系由细胞团组成。最近的一篇报道用此种悬浮系获得的再生植株中仅有一株是可育的^[10]。可见用分散好的悬浮系作小麦原生质来源还存在着再生频率低可育性差等不足, 而采用混合型悬浮系, 取其中的小愈伤组织分离原生质体提供了一条新的途径, 可望克服以上的问题。但是另有作者报道^[12]液体培养中的大细胞团 (>1mm) 不适宜小麦原生质体的分离和培养, 这两种实验结果不一致, 我们认为可能是由于建立悬浮系时所选的愈伤组织状态不同, 大细胞团与小愈伤组织在结构上有差异, 我们实验中也曾发现过这种差异。

2.3 原生质体培养基的优化

培养基的组成见表 1。实验结果经方差分析表明 (表 2), P_5 显著优于 P_6-P_{10} , P_5 与 P_3 无显著差异, 说明以 MS 大量及微量元素以及 B_5 维生素为基本成分的培养基, 对原生质体培养是较合适的, 甘氨酸、谷氨酰胺及水解酪蛋白均不可缺乏; 谷氨酰胺的量降低一半明显降低分裂频率。

表 2 不同成分的培养基对原生质体分裂的影响

Table 2 Comparison of division frequency in different protoplast culture media.

Protoplast culture media	P_3	P_5	P_5	P_6	P_7	P_8	P_9	P_{10}
Division frequency of protoplasts (%)	3.7	8.6	15.7	6.7	6.5	3.3	5.6	3.5
	16.3	18.0	10.8	6.1	6.8	5.6	7.3	6.1
	10.7	13.8	11.6	—	6.0	5.4	5.8	9.2
	4.5	3.4	4.5	3.8	3.3	2.8	4.9	2.2
Average value			12.3	10.3	9.3	4.6	7.7	8.9
			11.6	—	7.0	4.8	6.8	5.4
	8.8	10.9	11.1	6.7	6.5	4.4	6.4	5.9
F	2.895		4.895**					
$F_{0.05}$	10.13		2.53					

Every value of the division frequency indicated the mean of 2—3 duplicates in each one experiment.

用 LSR 法比较 P_3-P_{10} 间的差异

Difference among media based on method of LSR

$\bar{X}_{P_3} = 6.367$		$P_7 = 3.718$	$P_9 = 3.614$	$P_{10} = 3.374$	$P_6 = 2.572$	$P_8 = 2.542$
$x_1 - 2.542$	3.825**	1.176	1.099	0.832	0.03	
$x_2 - 2.572$	3.795**	1.146	1.069	0.802		
$x_3 - 3.374$	2.993**	0.344	0.267			
$x_4 - 3.641$	2.726**	0.077				
$x_5 - 3.718$	2.649**					

** Indicate remarkable difference

以上说明我们采用的 MB 培养基不仅可用于小麦的愈伤组织和悬浮细胞的培养, 对原生质体的培养也是适宜的, 将 P₅ 培养基用于其它小麦品种 (如济南 177, 科红和山农 587 的原生质体培养也获得较高的分裂频率 (如济南 177 培养第 10 天, 分裂频率可达 30% 以上)。

参 考 文 献

- [1] Harris R, Wright M, Byrne M *et al.* Plant Cell Reports, 1988, 7: 337-340.
- [2] 任延国, 贾敬芬, 李名扬等. 科学通报, 1989, 9: 693-695.
- [3] 王海波, 李向辉, 孙勇如等. 中国科学 (B 辑), 1989, 8: 828-834.
- [4] 郭光沁, 夏光敏, 李忠谊等. 中国科学 (B 辑), 1990, 9: 1053-1057.
- [5] Vasil V, Redway F, & Vasil I K. Bio/Technology, 1990, 8: 429-434.
- [6] Li Z Y, Xia G M & Chen H M. Plant Cell Tiss Org Cult, 1992, 28: 79-85.
- [7] Li Z Y, Xia G M, Chen H M *et al.* J. Plant Physiol 1992, 139: 714-718.
- [8] Chang Y F, Wang W C, Warfield CY *et al.* Plant Cell Reports, 1991, 9: 611-614.
- [9] 李宏潮, 胡道芬等. 植物学报, 1991, 33 (9): 706-711.
- [10] Kasem Z. A. *et al.* Plant Cell Reports, 1993, 12: 175-179.
- [11] Murshige T & Skoog F. Physiol Plant, 1962, 15: 473-479.
- [12] He D Y, Yang Y M & J. Scott. Plant Cell Reports, 1992, 11: 16-19.

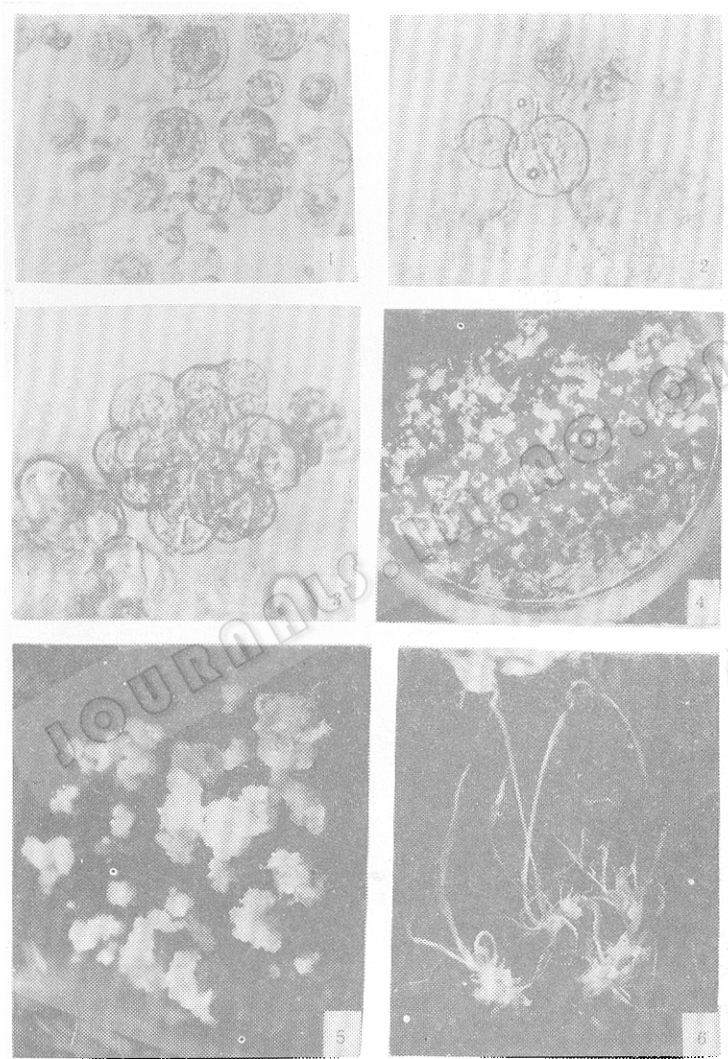
Plant Regeneration of Wheat Protoplasts Prepared from Different Composition of Suspension Culture

Xia Guangmin Li Zhongyi Zhou Aifen Guo Guangqin Chen Huimin

(Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Regenerable embryogenic cell suspensions initiated from immature embryo-derived 'mix-type' calli of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) Chang-le 5 served as sources of protoplast. Cell suspension consisted of small calli (2-3mm in size) and cell clumps (0.2-1mm in size). The regeneration frequency of the protoplasts derived from small calli of the suspension was remarkably higher than that of cell clumps. The effect of different composition in culture medium including macro elements, vitamins, glycine, glutamin and casein hydrolysate on protoplast division was also investigated.

Key words Cell suspension, protoplast, plant regeneration, winter wheat



1. Protoplasts freshly prepared from embryogenic suspension.
2. First division of the regenerated cell from protoplasts.
3. Protoclones derived from protoplasts.
4. Small calli derived from the protoplasts.
5. Growing and differentiating calli.
6. Regenerated plants from the protoplasts.