

水稻原生质体的分离和培养*

中国科学院北京植物研究所

摘 要

近年来国内外都在大力开展植物体细胞杂交的研究工作,为创造植物优良品种探索新方法、新途径,以适应生产上不断提高的要求。本工作报道了水稻(*Oryza sativa* L.)体细胞原生质体的制备和培养,为引进外来遗传物质以改变细胞遗传组成及细胞杂交准备条件。

用纤维素酶和果胶酶处理由花药离体培养所产生的花粉愈伤组织,可以消化掉细胞壁并获得大量有生活力的原生质体。经过在液体培养基中培养,原生质体增大体积,变为卵圆形并产生了新的细胞壁。培养约 10 天左右新形成的细胞开始分裂,培养约 20 天以后,形成了数十个细胞的细胞团。

社会主义农业生产的迅速发展是巩固无产阶级专政的重要条件之一，而不断地提供优良新品种又是农业生产迅速发展的一个关键。目前，常规的杂交育种仍作为提供新品种的主要手段，但是由于有性杂交不亲和性的限制和杂交程序繁琐等缺点，促使生物学和农业研究工作者去探索育种的新方法、新途径。

通过烟草“单育一号”新品种^[1]的培育成功证明,由花粉培育成的单倍体植物,通过染色体加倍处理,即成为不分离的纯合二倍体,从而缩短育种时间并简化了选育程序,这在农业实践上是一种有效的新途径。这个新途径的研究已在我国广泛开展,并应用于水稻、小麦等主要粮食作物,在不久的将来可能收到令人鼓舞的成效。通过人工诱导花粉产生单倍体植株,以简化常规杂交育种程序,这在育种技术革新方面迈进了一大步,然而创造超越亲本所具有的优良性状的新品种,尚缺少有效方法。远缘杂交的不亲和性是这方面的一大障碍。近年来国内外大力开展体细胞杂交的研究,即企图在创造优异的新品种方面有所突破。体细胞杂交的研究虽然目前还处在探索阶段,但从它在农业生产应用上的潜力来看^[2,3],已足以激励着我们朝这一方向努力。植物体细胞杂交的第一步是原生质体的制备和培养。去掉了壁的原生质体不仅易于彼此融合,且具有摄取如去氧核糖核酸和蛋白质等生物大分子的特性;甚至完整的叶绿体、病毒、细菌以及细胞核也能够移植到原生质体中去^[3]。这样就不仅通过远缘体细胞的融合有可能获得优良的杂种,而且还可以利用引进和移植等技术直接改变细胞代谢、转移遗传物质、交换细胞核以及移植细胞器,以创造适合于人类要求的新变种。目前不仅对菸草、胡萝卜、矮牵牛

本文 1975 年 8 月 2 日收到。

* 文内图片由高桂珍同志协助放大,特此致谢。

等几种植物的原生质体培养已能再生成完整的植株^[4-7]，而通过体细胞杂交也已获得了菸草种间和品种间的杂种^[8,9]。这方面的研究在我国一些单位也已开展起来，并已取得了初步结果^[10-12]。

禾本科作物是各国人民的主要粮食来源，而水稻又是我国的一种主要粮食作物。目前对禾本科植物原生质体的分离与培养工作做得并不多，其中只有雀麦的原生质体通过培养能进行几次细胞分裂^[13]。在水稻方面，从根、叶和愈伤组织分离原生质体虽早已成功^[14,15]，但还没有见到原生质体再生细胞，并进行细胞分裂的资料。本工作即报道由水稻愈伤组织分离的原生质体的培养以及细胞的再生和分裂。

一、原生质体的分离和培养

原生质体的来源 制备水稻(品种廉江密早)原生质体所用的原始材料是由本室单倍体育种组所提供的花粉愈伤组织。将由花药培养所产生的单倍体愈伤组织^[16]转移到稍为修改的 LS^[17] 培养基上进行继代培养。培养基的主要修改如下：去掉其中选择部分及激动素，加入 4 毫克/升 2,4-D 及 2% (V/V) 椰乳。每隔 10—14 天转移一次，转移 7—8 次即可应用。

原生质体的分离 在无菌条件下，把转移后 10 天左右生长旺盛、浅黄色或金黄色的愈伤组织 1—2 克(用线形刀稍加切碎)放到 50 毫升三角瓶中，其中装有 15 毫升通过微孔滤器(孔径大小为 0.45 微米)过滤灭菌的酶混合液。酶溶液的组成有两种(但用于原生质体培养的主要是第一种)：

1. 5% (V/V) 纤维素酶(Onozuka R-10, Kinki Yakult Mfg. Co., Ltd., Nishinomiya, Japan), 1.5% 果胶酶(Carl Roth-Karlsruhe, Germany), 0.2% 葡聚糖硫酸钾及 0.8M 甘露醇; 把 pH 调至 5.4。

2. 3—4% 自提纤维素酶^[10], 1% 离析酶(Macerozyme R-10, Kinki Yakult Mfg. Co., Ltd., Nishinomiya, Japan) 及 0.85M 甘露醇; 把 pH 调至 5.7。先在 34℃ 的恒温水浴中静置培育 2—3 小时，然后移到恒温旋回振荡培养装置上，在 34℃ 下振荡(60—80 转/分)培育约 2 小时。混合物用灭菌的 300 目不锈钢丝网过滤，以除去未被去壁的一些细胞团。通过离心(800 型离心机，500 转/分，2—5 分钟)，从溶液中将原生质体分离出来，并用含 0.1mM CaCl₂ 的 0.75M 灭菌甘露醇洗涤 2 次，然后用培养基洗涤 1 次。这样可以使混在原生质体悬浮液中的破损细胞残余物去掉，因为残余物一般留在上清液中，原生质体就会沉淀下去。

原生质体的培养 把原生质体培养在含有下列物质的合成培养基中(毫克/升)：KNO₃ (2200)，NH₄NO₃ (360)，CaCl₂ (340)，KH₂PO₄ (300)，MgSO₄·7H₂O (185)，MnSO₄·4H₂O (4.4)，ZnSO₄·7H₂O (1.5)，H₃BO₃ (1.6)，KI (0.8)，FeEDTA (5 毫升含 7.45 克/升 Na₂EDTA 和 5.57 克/升 FeSO₄·7H₂O 的溶液)，甘氨酸(2)，盐酸硫胺素(1)，盐酸吡哆醇(0.5)，烟酸(0.5)，2,4-D (0.5)，6-苄基腺嘌呤(0.3)，酪朊水解物(200 或 400)，甘露醇 0.6M，蔗糖 10 克/升。用 1N NaOH 将 pH 调至 5.8，并进行热压灭菌。

悬浮分离的原生质体在上述培养基中，原生质体的浓度是每毫升大约 10^5 — 2×10^5 ，在 25 毫升具磨口瓶塞的三角瓶中培养 1 毫升悬浮液，用透明胶带封好。把培养物放在弱光下，每天光照约 10 小时，温度 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ，并且每天轻轻摇动两次。

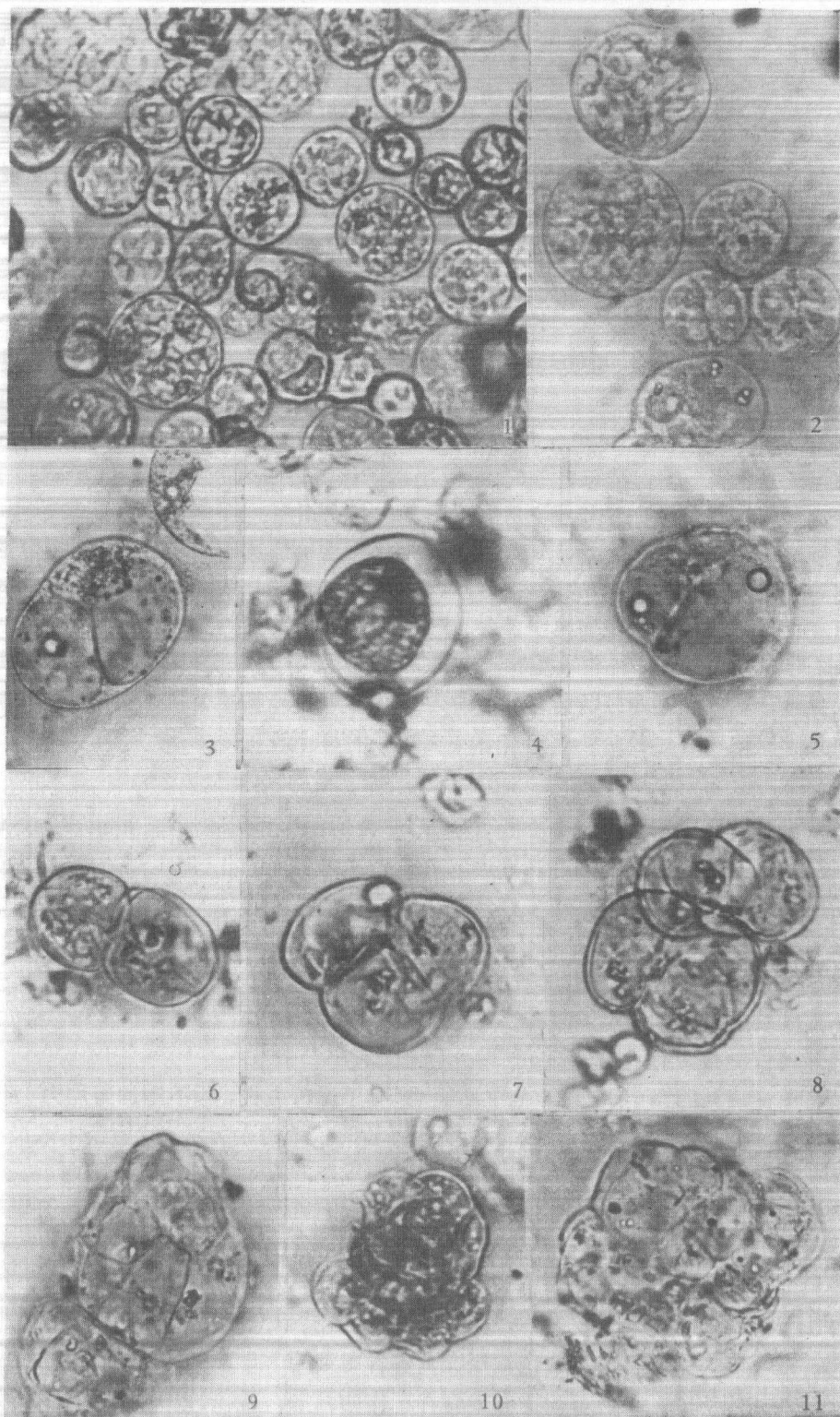
二、结 果

无论用第一种或第二种酶溶液培育愈伤组织所获得刚分离出来的原生质体,一般都呈圆形,具浓厚的细胞质,细胞核清楚可见,有轻度的液泡化,能较易地看到原生质环流或活跃的布朗运动(图版 I, 1—2)。有时在原生质体群中偶尔也可看到混有个别弯月形或其他形状没有去掉壁的老细胞。培养后约一星期,一些原生质体保持原状或逐渐恶化;另一些原生质体的体积显著增大,并由圆形变为卵圆形(图版 I, 3),这被认为是原生质体已重建新壁的特征^[6]。由于初生的新壁极薄,在普通的光学显微镜下有时不易分辨。培养后约二星期,大多数原生质体逐渐地恶化,少数原生质体新形成的细胞壁已愈来愈明显。由原生质体再生的细胞的发育有四种情况: 1. 随着原生质体体积增大与新细胞壁长成的同时,逐渐产生质壁分离现象,细胞也随之慢慢地死亡(图版 I, 4)。2. 新形成的细胞内产生一些不规则的折皱,细胞质也较稀薄。3. 分裂为两个对称的半圆形子细胞,但它们中的大多数以后似乎慢慢地退化了。4. 分裂为两个不对称的子细胞(图版 I, 5—6)。有迹象表明,只有这种子细胞才有进一步分裂的能力。在现在的培养条件下,后两种情况的分裂频率约为0.1%。在这期间个别原生质体已分裂了两次。培养三星期后,有些原生质体已发育成4—10多个细胞的细胞团(图版 I, 7, 8及10)。值得指出的是,在加入酪朊水解物400毫克/升的培养基中,我们获得了具有共同外壁的多细胞的细胞团,这些子细胞的外形有类似分生细胞的特征(图版 I, 9)。培养至四星期,原生质体的发育可达30多个细胞的细胞团(图版 I, 11)。

本研究工作所观察到的结果表明,尽管对单子叶植物特别是禾本科植物原生质体的培养较难产生细胞分裂,但不是不可能的。在广泛地阐明禾本科植物原生质体对培养条件要求的基础上,将会加速引进外来遗传物质以改变植物细胞遗传组成及体细胞杂交的实现,以便早日培育出符合人类需要的新的杂种植物。

参 考 资 料

- [1] 山东省烟草研究所、中国科学院北京植物研究所烟草单倍体育种协作组, 植物学报, **16** (1974), 4, 300—303
- [2] 朱 激, 遗传学通讯, 1973, 4, 43—50.
- [3] Bajaj, Y. P. S., *Euphytica*, **23** (1974), 633—649.
- [4] Takebe, I., Labib, G., Melchers, G., *Naturwissenschaften*, **58** (1971), 318—320.
- [5] Nitsch, J. P., Ohyama, K., *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **273D** (1971), 801—804.
- [6] Grambow, H. J., Kao, K. N., Miller, R. A., Gamburg, O. L., *Planta*, **103** (1972), 348—355.
- [7] Durand, J., Potrykus, I., Donn, G., *Z. Pflanzenphysiol.*, **69** (1973), 26—34.
- [8] Carlson, P. S., Smith, H. H., Dearing, R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69** (1972), 2292—2294.
- [9] Melchers, G., Labib, G., *Molec. and Gen. Genet.*, **135** (1974), 277—294.
- [10] 中国科学院植物研究所五室细胞组, 植物学杂志, 1974, 1, 29—30.
- [11] 中国科学院遗传研究所五室二组, 遗传学通讯, 1973, 4, 7—12.
- [12] 中国科学院遗传研究所五室二组, 遗传学报, **1** (1974), 1, 59—68.
- [13] Michayluk, M. R., Kao, K. N., *Z. Pflanzenphysiol.*, **75** (1975), 181—185.
- [14] Maeda, E., *Proc. Crop Sci. Soc. Jap.*, **40** (1971), 397—398.
- [15] Maeda, E., Hattiwara, T., *Proc. Crop Sci. Soc. Jap.*, **43** (1974), 68—76.
- [16] 王敬敏、孙敬三、朱至清, 植物学报, **16** (1974), 1, 43—54.
- [17] Linsmaier, E. M., Skoog, F., *Physiol. Plant.*, **18** (1965), 100—127.



图版说明

1—2. 从水稻单倍体愈伤组织新分离的原生质体。3. 示原生质体体积增大, 变为卵圆形。4. 再生的细胞质壁分离, 示新的细胞壁。5. 进行细胞分裂的原生质体, 新细胞壁已清楚可见。6. 从一个原生质体起源的2个细胞。7. 从一个原生质体起源的4个细胞团。8. 从一个原生质体起源的6个细胞团。9. 从一个原生质体起源的具共同外壁的多细胞团。10. 从一个原生质体起源的10多个细胞的细胞团。11. 从一个原生质体起源的30多个细胞的细胞团。所有图片均放大 $\times 500$ 。