

中国高产优质抗病水稻新品种(中花8号) 原生质体植株再生

李家新 杨 虹 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学研究室, 北京)

以丰产、优质, 及抗白叶枯病和20个稻瘟病生理小种的水稻花培品种中花8号的成熟胚为材料, 诱导愈伤组织, 建立细胞悬浮系, 分离、培养原生质体, 获得了再生植株。中花8号原生质体的分裂频率和植株再生频率分别高于或可与模式品种 Taipei 309 相比拟。

关键词 水稻; 中花8号; 原生质体分离和培养; 再生植株

水稻是世界上重要粮食作物之一, 其遗传操作一直受到人们的重视。近年来, 由于采用细胞悬浮系, 琼脂糖包埋^[4,10;14], 热激^[7], 电操作^[9], 看护培养^[3]等方法, 已经成功地获得了水稻原生质体的再生植株^[1-5,7]及水稻与其他植物原生质体融合的再生植株^[9]。用 PEG^[15]、电击^[16]、PEG 与电击结合^[10]及农杆菌球质体(Spheroplast)^[8]转化法, 已得到了水稻原生质体转基因的再生植株^[4]。

我们在成功地转化 δ -内毒素晶体蛋白基因到Taipei 309的基础上^[6], 选用具有优良农艺性状, 并已大面积推广应用的我国栽培水稻品种中花8号作为研究材料进行原生质体培养, 研究和获得了高频的原生质体分裂及植株再生, 并正在以中花8号为受体, 建立高效遗传转化体系。

中花8号是我国科学工作者用花药培养育成的粳稻栽培品种, 具有丰产、优质, 及抗白叶枯病和20个稻瘟病生理小种的特性, 已成为华北地区大面积推广的优良品种^[11]。本文报道从中花8号成熟胚诱导愈伤组织, 建立细胞悬浮系, 游离并

培养原生质体, 最后得到再生植株, 以及中花8号与Taipei 309原生质体分裂及植株再生频率相比较的研究结果。

材料与方法

(一) 愈伤组织的诱导

将水稻(*O. sativa* L.)中花8号的种子剥去外壳, 用20% NaClO溶液灭菌30min, 无菌水洗3次, 接种在LS2.5固体培养基^[14]上, 28℃暗培养, 诱导愈伤组织。15天后, 以相同的培养基继代, 每15天继代一次。

(二) 细胞悬浮系的建立

挑选继代后呈乳白、分散性好的胚性愈伤组织, 于LS2.5液体培养基中, 28℃, 转速120rpm暗培养, 每3天继代一次。继代5次后, 换用AA2液体培养基^[14]继续悬浮培养, 每6天继代一次, 直至摇成颜色淡黄, 比较均匀, 细胞呈圆形, 细胞质浓, 细胞壁薄的细胞团。

(三) 原生质体游离

本文于1989年5月8日收到。

取出继代培养5天的培养物,用500 μ m孔径的筛滤去大颗粒,收集小细胞团,加入酶解液^[14](其中附加了5mmol/L MES [2(N-morpholio) ethane sulfonic acid])。在30 rpm, 23℃酶解2h,然后转入28℃静置2h。

将游离好的原生质体用30 μ m的滤网过滤,100 \times g离心3min,收集原生质体,再用CPW 13M溶液^[14]将原生质体重新悬浮,洗涤两次,离心,得到的原生质体悬浮于一定体积的KPR液体培养基^[14]中,45℃水浴热激处理5min,迅速置冰浴中,冷却10秒钟,用血球计数板计数。

(四) 原生质体培养

将所得的原生质体,按1—5 $\times 10^5$ 个/ml密度包埋在1.2%琼脂糖KPR培养基^[14]中,28℃暗培养。14天后,将包埋原生质体的琼脂糖块切成对称的4块,转入KPR液体培养基中,继续培养。

(五) 愈伤组织分化和植株再生

待再生的小愈伤长到直径约2mm时,将其转移到含0.8%琼脂糖的MS0^[12]或N60^[13]固体分化培养基上,小愈伤培养密度为1/1.4cm²,继续用相同的条件培养,直到分化出芽和根,然后转移到光下(3000lx),促使变绿。

结 果

(一) 愈伤组织的诱导和细胞悬浮系的建立

由中花8号成熟胚诱导的愈伤组织呈分散的颗粒状,颜色乳白。转入液体培养基后,迅速分散。与模式品种Taipei 309比较,中花8号的分散程度看上去比Taipei 309还好。经3—5个月的继代培养,悬浮物逐渐变成由数十个圆球形,细胞

质浓,液泡小的细胞组成的较均匀、活力旺盛的小细胞团,建成了适于原生质体分离的胚性细胞悬浮系(图版I-A)。

(二) 原生质体的游离和培养

悬浮细胞经酶解处理和纯化后,原生质体(图版I-B)的产量为4.6 $\times 10^6$ 个/克鲜重,在3 $\times 10^5$ 个/ml密度下培养,第3—6天可观察到原生质体进行第一次和第二次分裂(图版I-C,D);培养9天后,原生质体平均分裂频率为26.1%,而Taipei 309的平均分裂频率这时为18%。培养的第14天,将包埋原生质体的KPR琼脂糖固体培养基切成对称的4块,转入KPR液体培养基,第28天后形成肉眼可见的小愈伤组织(图版I-E)。培养40天后,部分原生质体再生的小愈伤组织直径达到2mm左右。

(三) 植株再生

将直径约2mm的小愈伤转到分化培养基MS0和N60,1星期后,得到了直径约5mm的再生愈伤组织(图版I-F),约15天后,可看到芽的分化,20天后可得到根的分化,然后,转到光下(2000lx),得到正常绿苗(图版I-G)。中花8号原生质体愈伤组织在MS0和N60两种培养基上的植株再生频率分别为21%和27%,Taipei 309在N60培养基上的再生频率为25.5%,在MS0上没有再生。苗长到三片叶时,转入盛水稻花培土的营养钵中(图版I-H)。现已得到14株再生绿苗。

讨 论

以前,人们为了探索水稻原生质体的植株再生途径,选用材料时往往只考虑所用基因型是否利于培养和再生,还没有注意这个基因型的农艺性状以及将来的研究应用价值。目前,所报道的能从原生体质获

得再生植株的中国大陆粳稻基因型中,有的是尚未进行区域试验的品系^[2],也有的是不抗水稻病害或在华北稻区没有大面积种植的品种^[1]。鉴于此,我们选用了优良粳稻中花8号这个具有丰产、优质、及抗白叶枯病和20个稻瘟病生理小种,目前在华北稻区年种植面积130万亩的品种,因此,中花8号原生质体培养体系的建立,不仅具有重要的理论价值,而且从长远观点来看,可期待将为我国水稻生产作出贡献。

在中花8号原生质体的培养过程中,我们采用培养Taipei 309的实验程序^[14],但在同样的实验条件下,中花8号的愈伤组织比Taipei 309愈伤组织分散性更好,由中花8号游离培养的原生质体分裂频率(26.1%)也比Taipei 309(18%)高。

在原生质体分化与再生的研究中,我们采用了N60与MS0两种培养基。实验结果表明,在N60分化培养基上,中花8号与Taipei 309的原生质体都能再生,再生频率分别为27%和25.5%,二者很接近,可见,N60培养基对Taipei 309及中花8号原生质体的分化均是适合的。在MS0培养基上,中花8号原生质体形成的小愈伤分化、再生了植株,再生频率为21%,而Taipei 309则没有再生。看来,中花8号的原生质体比Taipei 309的分化、再生能力还强。

中花8号是经花药培养育成的栽培水稻品种,我们成功地从它的原生质体再生成正常植株可能与此有关,看来,从花培品种中选材可能是获得适于原生质体培养材料的一种较好途径。

参 考 文 献

- [1] 王光远、夏镇澳:实验生物学报,20(2):253—257,1987.
- [2] 雷 鸣等:科学通报,22:1729—1731,1986.
- [3] Kyozuka, J. et al.: *Mol Gen Genet*, 206: 408—413, 1987.
- [4] Zhang, H.M. et al.: *Plant Cell Reports*, 7: 379—384, 1988.
- [5] Hodges, T.K.: Third annual meeting of the Roche feller Foundation's international program of rice biotechnology: Abstracts, 1989.
- [6] Yang, H. et al.: *Rice Genetics Newsletter*, 5: 141—142, 1988.
- [7] Thompson, J.A. et al.: *J. plant physiol.* 127: 367—370, 1987.
- [8] Baba, A. et al.: *Plant Cell Physiol.*, 27(3): 463—471, 1986.
- [9] Terada, R. et al.: *Mol Gen Genet*, 210: 39—43, 1987.
- [10] Yang, H. et al.: *Plant Cell Reports*, 7: 421—425, 1988.
- [11] 李梅芳等:作物学报,9(3):173—179,1983.
- [12] Murashige, T. and Skoog, F.: *Physiol. Plant*, 15: 473—493, 1962.
- [13] Chu, C.C. et al.: *Scientia Sinica*, 16: 659—688, 1975.
- [14] Thompson, J.A. et al.: *Plant Science*, 47: 123—133, 1986.
- [15] Krens, F.A. et al.: *Nature*, 296:72—74, 1982.
- [16] Fromm, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:5824—5828,1985.

PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF A SUPER CHINESE RICE (*ORYZA SATIVA* L.) CULTIVAR— ZHONGHUA NO. 8

Li Jiixin Yang Hong Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese
Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Green rice plants were regenerated from protoplasts, which were derived from cell suspension of Zhonghua No. 8, a super Chinese rice cultivar with high productivity, good quality and high disease resistance to both bacterial blight and blast. The establishment of cell suspension line ME1 from mature embryos and the regeneration from protoplasts took 4 months and 2 months, respectively.

Key words

Rice; Zhonghua No. 8; isolation and culture of protoplasts; regeneration plants.

图版说明

Explanation of plate

- A. 中花8号水稻细胞悬浮系的细胞团(400×) Cell suspension aggregates of Chinese rice cultivar—Zhonghua No. 8
- B. 新游离的水稻中花8号的原生质体(150×) Freshly isolated protoplasts from Chinese rice cultivar—Zhonghua No. 8
- C. 培养3天后中花8号水稻原生质体第一次分裂(600×) First cell division after 3 days culture
- D. 培养6天后中花8号水稻原生质体第二次分裂(600×) Second cell division after 6 days culture
- E. 培养28天后中花8号水稻原生质体形成的小愈伤组织 Protoplast-derived micro colonies after 28 days culture
- F. 培养50天后中花8号水稻原生质体再生愈伤组织 Protoplast-derived callus after 50 days culture
- G. 中花8号水稻原生质体再生的正常绿苗 Normal green plantlet regenerated from rice protoplast of Chinese cultivar—Zhonghua No. 8
- H. 转入土中的幼苗 Plantlets transformed into soil

