

分类号

密级

湖南农业大学
博士学位论文

苧麻原生质体培养
再生植株的研究

The Study of Protoplast Culture and
Plant Regeneration of Ramie

研究生:陈喜文

导师:李宗道教授

专业:作物栽培与耕作学

研究方向:苧麻生物技术

中国 长沙

一九九四年六月

目 录

致 谢

中文摘要

前 言

材料与方法

结果与分析

一、悬浮细胞原生质体的分离和培养

(一) 细胞悬浮系的建立

1. 悬浮培养过程的观察

2. 不同激素种类和浓度对悬浮培养的影响

3. 不同甘露醇浓度对悬浮培养的影响

(二) 悬浮细胞原生质体的分离

1. 不同酶液组合对悬浮细胞原生质体产量的影响

2. 不同酶解时间对悬浮细胞原生质体产量的影响

3. 合适渗透压浓度的选择

(三) 悬浮细胞来源的原生质体的培养

1. 不同培养方式对原生质体分裂的影响

2. 不同培养基种类对原生质体分裂的影响

3. 不同激素种类和浓度对原生质体分裂的影响

(四) 愈伤组织的继代和植株再生

二、子叶原生质体的分离和培养

(一) 子叶原生质体的分离

1. 不同酶液浓度和组合对子叶原生质体分离的影响

2. 不同酶解时间对子叶原生质体产量的影响

3. 不同渗透压浓度对子叶原生质体产量的影响

4. 不同子叶生长时期和生理状态对原生质体产量的影响

(二) 子叶原生质体的培养	17
讨 论	18
一、苧麻原生质体研究的意义及潜在应用价值	18
二、有关原生质体培养中的基因型问题	19
三、有关原生质体培养中材料的选择问题	20
四、原生质体培养时的营养和条件	21
参考文献	24
英文摘要	
图 版	

致 谢

本研究和论文是在导师李宗道教授和博士生指导小组周朴华副教授的悉心指导下完成的,在试验过程中还得到了颜昌敬教授,胡久清教授,何立珍副教授、程尧楚副教授、周传云副教授及苾麻研究所陈德富、黄爱媛、李利良、甘红霞等同志的大力支持和帮助,苾麻研究所和研究生办的领导也给予了支持和鼓励,在此一并表示衷心的感谢。

苎麻原生质体培养再生植株的研究

陈 喜 文

摘 要

苎麻 (*Boehmeria nivea*) 是我国的特产 and 重要出口创汇作物。原生质体培养作为体细胞杂交和遗传转化的主要基础技术, 已引起人们广泛的注意和高度重视, 在苎麻上目前尚无成功的报道。本文首次以苎麻品种“浏阳大叶绿”为材料, 对苎麻原生质体培养进行了系统的研究, 建立了整套的苎麻原生质体培养技术, 为开辟苎麻育种新途径提供了重要的理论基础和技术基础。主要研究结果如下:

1. 选用“浏阳大叶绿”子叶来源的愈伤组织建立悬浮细胞系, 并对悬浮细胞系的整个过程进行了观察。研究了不同激素种类和浓度对悬浮培养的影响, 其中以 2,4-D 0.1 mg/L、KT (或 ZT) 0.5 或 1.0 mg/L 的组合处理效果最好。悬浮系中多为圆形、细胞质浓的小细胞组成的小细胞团; 而在生长素浓度较高 0.5 或 1.0 mg/L 的激素组合中, 悬浮系中长方形单细胞或长方形细胞组成的细胞团比例较大, 细胞大而空腔。不同浓度的甘露醇对细胞结构有一定的改善作用, 以 0.2M 处理效果最佳。0.4M 处理, 悬浮系中碎片较多, 可能是培养液中渗透压过高的缘故。

2. 研究了不同酶液组合、酶解时间及渗透压稳定剂的浓度对悬浮细胞系原生质体分离的影响。用纤维素酶 (Cellulose R-10) 4.5%、离析酶 (Macerozyme R-10) 1%、半纤维素酶 (Hemicellulose) 0.5% 处理悬浮龄代 2-4 d 的细胞系 11 hr, 原生质体产量最高。渗透压稳定剂甘露醇在 0.55 M 时, 原生质体产量也最高。

3. 研究了不同培养方式对悬浮系原生质体培养的影响。四种培养方式中以海藻酸钠包埋漂浮法效果最好, 其原生质体恢复分裂早, 分裂频率高 (15.2%), 且原生质体能持续分裂至愈伤组织。琼脂糖包埋法中, 由于所用

的为甘露聚糖,原生质体不可避免地受到热击的影响,分裂频率较前者大大降低(8.7%),并且由于营养供给方面的原因,原生质体只发育到小细胞团。液体浅层和琼脂糖双层培养方法中,由于原生质体的粘连和凝聚,原生质体分裂几次就消化死亡。

4.研究了不同基本培养基和培养液中激素组合对原生质体分裂的影响以KM₈P培养基最好,原生质体分裂频率高,能持续分裂至形成愈伤组织,而MSB培养基只能使原生质体发生几次分裂。激素组合以2,4-D 0.5 mg/L,KT 0.5(或1.0) mg/L效果较好,而2,4-D 1.0 mg/L和KT 0.5 mg/L组合处理的,尽管其原生质体恢复分裂早(4 d)。分裂频率高,但其发育而成的愈伤组织无分化能力。

5.研究了悬浮细胞系原生质体来源的愈伤组织的分化条件。愈伤组织在附加2,4-D 0.2 mg/L、6-BA 0.1 mg/L的MSB培养基上继代20 d左右,然后转入附加6-BA 2.0 mg/L的MSB分化培养基上,两周左右可以见到绿色的小点,再过2周左右产生了不定芽。待幼芽长至2 cm高时,转至附加NAA 0.05 mg/L的1/2 MS或H生根和壮苗培养基上,经过15 d左右部长出了粗壮的根系,从而形成了完整的植株。芽的分化率为6%,根的分化率为100%。

6.在悬浮系原生质体培养研究的同时,进行了子叶原生质体的分离和培养。以2℃冷藏或不冷藏,真叶初露期的绿色子叶,用3% Cellulose R-10、0.5% Macerozyme R-10的0.6M甘露醇混合溶液处理5 hr,原生质体产量最高。但其原生质体以海藻酸钠包埋方式培养在附加2,4-D 0.5或1.0 mg/L,KT 0.5 mg/L的KM₈P培养基上,原生质体仅发生二次分裂。

【关键词】 苎麻;原生质体培养;悬浮系;子叶;植株再生

苧麻原生质体培养再生植株的研究

前 言

“原生质体”其含意是植物细胞壁内的生活物质,由于具有没有细胞壁的特性,它不仅可作为研究细胞壁再生、细胞膜的离子转运以及病毒侵染等课题的系统,而且在作物品种改良方面起着越来越重要的作用。目前已有成功的实验表明,原生质体能超越有性杂交的不亲和或子代不育等障碍,便于进行各种远缘杂交(孙勇如等,1982;李文彬等,1983;Heigsen等,1986;Kinsara等,1986;Hinata等,1988);也有实验说明,利用原生质体进行体细胞杂交能转移作物育种上十分有价值的雄性不育基因(Kyozuka等,1989;Yang等,1989);原生质体也是遗传转化研究的一个理想受体,它能直接摄取外源DNA、细胞器、细菌、病毒和质粒,这就可能有目的地引入特定的有用基因来提高作物的产量,改进品质和抗性(Marton等,1979;Potrykus等,1985;Shillito等,1985)。原生质体培养过程中,与其他组织培养一样,有可能产生体细胞无性系变异,其中的变异体将可能成为改良上的重要遗传资源(Jacobsen,1987;Johnson等,1984;Ogura等,1987)。

但是,原生质体用于应用基础研究,特别是用于作物改良的一个前提条件是:首先能获得大量成活的原生质体,并能再生成细胞甚至完整的植株。自从Takebe等(1971)首次利用烟草叶片分离原生质体并获得再生植株以来,原生质体培养的研究便进入到一个崭新的时期。目前由原生质体培养诱导分裂并形成细胞团和愈伤组织的植物种类已达170多种,其中可再生植株的也有100多种(许智宏,1986)。原生质体再生植株已不再局限于茄科、十字花科等模式植物的范围。一些重要的粮食作物和经济作物,例如大豆(Wei和Xu,1988)、棉花(陈志贤等,1989)、油菜(Spangenberg等,1986)等已成功地从原生质体再生植株,特别是一直认为难以培养成功的禾谷类如水稻(Fujimura等,1985;李良材等,1988;Wang等,1989)、玉米(蔡起贵等,1987;Rhodes等,1988;Sun等,1989;Zhang等,1990)、小麦(Harries等,1988;王

海波等,1989)、谷子(董晋江、夏镇澳,1989),以及高粱(卫志明、许智宏,1989)的原生质体培养都已相继突破。木本植物成功的例子也逐渐增多,如猕猴桃(Tsai,1988;肖尊安等,1992)、柑桔(Vardi等,1982)、杨树(Russell和McCown,1988)、云杉(Attree等,1989)等。以上这些研究,不仅为利用原生质体进行遗传操作奠定了基础,也为更多的植物种类原生质体再生积累了经验和数据。

苎麻(*Boehmeria nivea*)是我国的特产 and 重要出口创汇作物,有关组织培养的研究开展较晚,最早由周朴华等以苎麻茎叶为材料开始研究(周朴华等,1980)。自此以后,苎麻组织培养研究方兴未艾。在苎麻快速无性繁殖方面,颜昌敬等首次建立了腋芽增殖技术的程序,并应用于生产(颜昌敬等,1981;1982a;1982b)。李宗道等报道了一整套提高试管苗移栽成活率的措施(李宗道等,1981;1982)。颜昌敬等又在此基础上创建试管苗的管外水插法,改进和简化了试管苗的生产程序(颜昌敬等,1986;1988)。在苎麻器官分化研究方面,先后报道了由苎麻下胚轴、子叶、茎段、叶片经过愈伤组织阶段分化出不定芽并再生完整植株(黄记生等,1980;莫荣达等,1981;黄记生等,1981a;1981b;莫荣达等,1982;颜昌敬等,1982a;1982b;赵庆华等,1984),并对苎麻离体叶面生芽进行形态和细胞学观察,探讨了细胞脱分化和愈伤组织形成的原因(胡继金,1991)。在单倍体培养方面,颜昌敬等以苎麻花药为材料培育出单倍体植株(颜昌敬等,1986)。此外,在低温保存方面也开展了研究(李树川,1992)。这些研究成果,不仅对缩短苎麻育种周期,加速良种繁育步伐具有重要意义,而且为进一步发展和利用组织培养技术开辟新的育种途径打下了坚实的基础。但是苎麻原生质体培养的研究目前尚未见报道。本文首次对苎麻原生质体培养进行了研究,以期建立整套的苎麻原生质体培养技术,为进一步利用苎麻原生质体进行体细胞杂交和遗传转化,创造新品种提供重要的理论基础和技术基础。

材料与方法

一、悬浮细胞原生质体的分离和培养

(一) 试验材料

选用苧麻品种“浏阳大叶绿”子叶来源的愈伤组织进行悬浮培养,从中选择4个悬浮细胞系作原生质体培养研究,种子材料采自本校苧麻研究所的种质资源圃。

(二) 试验方法

1. 外植体的准备

一九九一年十二月中旬采收种子,经恒温箱45℃烘烤1 hr,搓皮去杂,置于干燥器中保存备用。挑选饱满种子,盛于铝锅中,包上纱布,用70%的工业酒精浸泡1 min,再用含有效氯2%的次氯酸钠溶液灭菌40-50 min,然后用无菌水反复冲洗4-5次,无菌接种到无激素的附加30 g/L蔗糖的MS琼脂培养基上发芽。取实生苗茎部接种在含NAA 0.05 mg/L的MS壮苗培养基上得到试管苗,切取叶片、幼茎、子叶、下胚轴作为外植体材料。

2. 愈伤组织的获得

将幼茎和下胚轴切取约0.5 cm。子叶和幼叶切取约 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ 大小,接种在一定激素浓度和组合的脱分化培养基中,比较其初代和继代愈伤组织的颜色、质地和结构等。子叶来源的愈伤组织质地好,为淡黄色、生长速度适中、疏松、表面呈颗粒状,因而作为进一步建立悬浮细胞系和原生质体培养的材料。

3. 细胞悬浮系的建立

挑选淡黄色、疏松、颗粒结构、继代4-5代后培养10-12 d的愈伤组织约5 g,放入盛有80-100 ml液体培养基的250 ml灭菌三角瓶中,置于摇床上振荡,摇床转速为 $100 \pm 10 \text{ rpm}$,温度为 $27 \pm 1^\circ\text{C}$,光照1000 lux,12 hr光、12 hr暗,悬浮培养初期,由于培养物易变褐而使培养基显褐色,此时,一般视褐色轻重2-4 d更换一次培养基,10-12 d待恢复正常后,5-7 d更换一次培养基。换培养基时,先静置5 min,倒掉上清液,再加入新鲜培养基。待悬浮系中细胞达到一定数目时,过1 mm筛去掉培养液中的大颗粒,以保证均匀悬浮系的建立,培养基配方为附加各种激素种类和浓度的含葡萄糖30 g/L

的MSB培养基(MS无机与B5有机的简称)。

4. 原生质体的分离和纯化

(1) 酶液的组成

按照一定组成, 将纤维素酶 Cellulose Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co.LTD.), 离析酶 Macerozyme R-10(Yakult Honsha Co.,LTD.), 半纤维素酶 Hemicellulose (Sigma), 溶解在含 KH_2PO_4 27.0 mg/L、 KNO_3 101.0 mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1500 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246 mg/L、KI 0.166 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L 组成的一定甘露醇浓度的CPW (颜昌敬, 1986) 溶液中, 待酶液完全溶解后, 调节 pH5.8, 然后通过 $\phi 0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤灭菌。

(2) 原生质体的分离与纯化

取悬浮培养3个月, 继代约3 d的旺盛生长的细胞系过50目筛, 取静置5 min自然沉在瓶底的培养细胞1-2 g, 投入10 ml酶液中, 在28℃黑暗条件下静置过夜, 然后在转速为30 rpm的摇床上摇2 hr, 酶解过程中定时用列置显微镜观察, 以酶混合液中原生质体的数量等指标比较原生质体分离效果, 以探讨较好的酶解条件。

分离的原生质体顺序通过200目和350目不锈钢网筛进行过滤, 然后用CPW 10 M(pH5.8)的洗液冲洗滤网2次, 滤液在500 rpm下离心5 min, 用吸管轻轻吸去上清液, 沉淀用CPW 10 M洗液洗涤2次, 再用原生质体培养基洗涤1次。

(3) 原生质体密度采用血球计数板统计, 并以纯化后原生质体的密度推测产量。原生质体活力测定采用酚藏花红染色法(颜昌敬, 1986)。

(4) 原生质体的培养及植株再生

将原生质体密度调整至合适范围(视不同培养方法而定)培养在附加各种激素浓度的 KM_8P (Kao和Michayluk, 1975)和MSB培养基中。采用液体浅层培养、琼脂糖双层培养、琼脂糖包埋漂浮和海藻酸钠包埋漂浮四种方式。

液体浅层培养法: 将0.5 ml左右, 密度为 $1-2 \times 10^6$ 个/ml的原生质体悬

浮培养在 $\phi 35$ mm 的培养皿中,用 Parafilm 封口。

琼脂糖双层培养法:将含琼脂糖 0.7% 的不含原生质体的原生质体培养基 1 ml 左右熔化后,均匀地在 $\phi 35$ mm 的培养皿底铺上一层,待其冷却后,将 0.5 ml 原生质体悬浮液(密度同上)置于其上,进行双层培养。

琼脂糖包埋漂浮法:将含有与原生质体培养基相同成分的 1.2% 的琼脂糖熔化,并保持温度 48°C ,用滴管等量地将密度已调整到 5×10^5 个/ml 的原生质体和琼脂糖混合滴制到培养皿中,冷却后即成块状或片状,然后加入液体培养基即可。

海藻酸钠包埋漂浮法:用不加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的原生质体培养基将原生质体洗涤 3 次后,沉淀加入 1.5% 的海藻酸钠(用不加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的培养基配置)重悬,悬浮后滴入含两倍钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1600 mg/L)的原生质体培养液的培养皿中,因交联作用而固化,形成片状或块状(Adachi 和 Roscoe, 1982; 贾士荣, 1988)。

原生质体培养 15 d 后,统计其分裂频率。分裂频率以视野内发生分裂的原生质体数(包括一次和多次分裂)占总原生质体数的百分比。多个视野统计,取平均值。此后每周定期添加一次含葡萄糖 0.2 M 的原生质体培养基,以达到逐渐降低渗透压的目的,待原生质体培养再生出肉眼可见的小细胞及小愈伤组织时,转入到生长培养基 I (附加 0.5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L 6-BA, 500 mg/L LH, 50 g/L 蔗糖的 MSB 琼脂培养基)和生长培养基 II (附加 0.2 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L 6-BA, 其他同 I) 上, 20 d 后,转移到附加 6-BA 2.0 mg/L, 蔗糖 30 g/L 的 MSB 分化培养基上,待不定芽长至约 2 cm 高时转至附加 NAA 0.05 mg/L 的壮苗和生根培养基上即可产生完整再生植株。

二、子叶原生质体的分离与培养

(一) 试验材料

供试品种为“浏阳大叶绿”,取其一定生长时期的无菌实生苗的子叶作为试验材料。

(二) 方法

1. 种子的收集、外植体的准备同本文第一部分。

2. 子叶原生质体的分离和纯化

取不同发育时期的子叶1 g, 切碎后投入一定组成的酶液中, 27℃黑暗条件下酶解。以其原生质体的数量和活力作指标, 筛选最佳的酶解条件、子叶发育时期和生理状态。

分离的原生质体顺序通过 200 目和 350 目的不锈钢网筛过滤, 并用含 0.6 M 甘露醇的 CPW (pH 5.8) 的洗液冲洗滤网 2 次, 滤液在 500 rpm 下离心 5 min, 沉淀用不加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的培养基洗涤 3 次后, 进行海藻酸钠包埋漂浮培养。

在上述工作基础上, 将子叶原生质体调整至合适密度, 以海藻酸钠包埋漂浮方式培养在附加 0.5 mg/L 2,4-D、0.5 mg/LKT 的附加 1.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/LKT 的含葡萄糖 0.55M 的 KM_8P 培养基上, 定期观察原生质体的发育过程。

结果与分析

一、悬浮细胞原生质体的分离和培养

(一) 悬浮细胞系的建立

1. 悬浮培养过程的观察

愈伤组织投入液体培养基的最初一段时间, 培养物逐渐变褐使液体显茶色。此时根据褐化轻重, 2-3 d 更换一次新鲜培养基, 并弃去严重褐化的愈伤组织块, 一般经处理 2 周即可恢复正常。培养初期在培养基中加入水解酪蛋白 (CH) 使褐化加重, 所以在培养初期的培养液中不加。将愈伤组织切碎也会使褐变加重。褐变期间, 培养物体积增长很慢。为了尽快获得稳定的细胞系, 起始时应有足够的接种量。

褐变消失后, 培养物的体积开始增长, 愈伤组织上不断振荡下来一些单个游离的长形细胞和许多由细胞质较浓的小细胞组成的小细胞团, 前者分

裂能力差,大多悬浮在培养液的中上部。通过不断更换培养基即可逐渐剔除,将沉降于培养基层的小细胞团转入新瓶,多次继代,并用1 mm孔径的尼龙网过滤。60 d后由小而圆,内含物丰富、无液泡细胞组成的小细胞团逐渐增加,单细胞和长细胞逐渐减少。培养物的增长也显示规律,90 d后,待培养物体积增长一倍所需时间减少至一周时,即可认为悬浮系已经建立(图2)。此时悬浮系的细胞团大都由几个到几十个细胞组成,这些细胞均为圆形,细胞质较浓。细胞处于旺盛生长期,细胞壁成份必然简单,细胞壁也较薄,用合适浓度的酶混合液处理,可获得大量的原生质体。

2. 不同激素种类和浓度对悬浮培养的影响

在悬浮培养的初期,培养物的生长状态不稳定。当悬浮培养继代60 d后,培养物的增长显现出规律时,我们比较了不同激素种类和浓度对悬浮培养的影响(表1)。从表1可以看出,不同激素组合处理后,悬浮培养的效果不同。当生长素浓度(2,4-D和CPA)为1.0 mg/L时,其增殖速度很快。在倒置显微镜下观察,基本为长形单细胞或由长形细胞组成的细胞团,细胞大,空胞,很少有小而圆的细胞团。当生长素浓度降至0.5 mg/L浓度时,细胞系增殖速度有所下降,细胞结构向好的方向转化。当生长素浓度为0.1 mg/L时,多为小细胞团,细胞结构好,多为圆形,细胞小,细胞质浓。生长素(2,4-D和CPA)之间差别不明显,细胞分裂素(KT和ZT)之间差异也不大。KT为0.5 mg/L或1.0 mg/L时差异不明显。可以认为悬浮培养可采用附加0.1 mg/L CPA(或2,4-D)、0.5 mg/L KT(或ZT)的激素组合的培养基较好。

3. 不同甘露醇浓度对悬浮培养的影响

在悬浮培养基中,添加0.1M、0.2M、0.4M甘露醇,细胞形态明显不同(表2)。其中0.2M甘露醇处理,效果最佳,细胞小,圆形,细胞质浓。0.1M甘露醇处理与对照差异较小,而0.4M甘露醇处理,细胞结构虽有所改善,但悬浮系中有碎片,可能是渗透压过高之故。可见附加适量的甘露醇对细胞结构的改善有一定的作用。

表1 不同激素种类和浓度对悬浮培养的影响(1992-1993)*

Table 1 Effects of different hormones on suspension culture

激素种类				接种 瓶数	增殖 速度	显微观察结果
2,4-D	CPA	KT	ZT			
1.0		0.5		4	过快	长形单细胞或细胞团多,细胞大,空胞,很少小而圆的细胞或细胞团
0.5		0.5		4	快	长形单细胞或细胞团较多,细胞较大,质稍浓,有部分小而圆的细胞团
0.1		0.5		4	平稳	基本上为小而圆构成的小细胞团,细胞质较浓,很少长细胞
0.1			0.5	4	平稳	基本上为小而圆构成的小细胞团,细胞质较浓,很少长细胞
	1.0	0.5		4	过快	长形单细胞或细胞团多,细胞大,空胞,很少小而圆的细胞构成的细胞团
	0.5	0.5		4	快	长形单细胞或细胞团较多,细胞较大,质稍浓,有部分小而圆的细胞构成的细胞团
	0.1	0.5		4	平稳	基本上为小而圆构成的小细胞团,细胞质较浓,很少长细胞
	0.1	1.0		4	平稳	基本上为小而圆细胞构成的小细胞团,细胞质较浓,很少长细胞

* 悬浮培养 60 d 后,连续观察三次悬浮结果。

培养基为:附加 0.2M mannitol, 500 mg/L CH 和 30 g/L glucose 的 MSB。

表2 不同甘露醇浓度对悬浮培养的影响(1992-1993)*

Table 2 Effects of different mannitol concentration on suspension cell culture

处理	显微观察结果
CK	细胞团中细胞较小,圆形或椭圆形,胞质较浓,有少量长形空胞
0.1M	细胞团中细胞较小,圆形或椭圆形,胞质较浓,有少量长形空胞
0.2M	细胞团中细胞小,圆形,胞质浓,无长形空胞细胞
0.4M	细胞团中细胞小,圆形,胞质浓,有碎片

* 悬浮培养 60 d 后,连续三次观察悬浮培养结果。

培养基为:附加 0.1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L KT, 500 mg/L CH 和 30 g/L glucose 的 MSB 培养基。

(二) 悬浮细胞原生质体的分离

原生质体培养能否成功首先取决于能否有效地获得大量有活力的原生质体。影响原生质体分离效果的因素很多,如不同酶液浓度和配比、酶解时间、渗透压稳定剂等。

1. 不同酶液组合对悬浮细胞原生质体产量的影响

采用不同浓度和配比的纤维素酶(Cellulose R-10)、离析酶(Macerozyme R-10)、半纤维素酶(Hemicellulase)来游离“浏阳大叶绿”悬浮细胞系,原生质体产量明显不同(表3)。纤维素酶浓度过高(6%)和过低(3%),对原生质体产量均不利,而以浓度4.5%较适宜。半纤维素酶和离析酶似有相互补充的作用。在离析酶较低(0.5%),但加有半纤维素酶(0.5%)时,其游离效果与较高的离析酶浓度(1%)似乎相同。本试验结果表明,各种不同酶组合中组合H即纤维素酶4.5%、离析酶1%、半纤维素酶0.5%的游离效果最佳,原生质体产量最高。

表3 不同酶液组合对悬浮细胞系原生质体分离的影响(1992)*

Table 3 The effects of different enzyme combination on the isolation of protoplast of suspension cell line

酶组合	Cellulose R-10 (%)	Macerozyme R-10 (%)	Hemicellulase (%)	产量**
A	3	0.5	0	+
B	3	0.5	0.5	++
C	3	1.0	0	++
D	3	1.0	0.5	+++
E	4.5	0.5	0	+++
F	4.5	0.5	0.5	++++
G	4.5	1.0	0	++++
H	4.5	1.0	0.5	+++++
I	6	0.5	0	+++
J	6	0.5	0.5	+++
K	6	1.0	0	+++
L	6	1.0	0.5	+++

* 27℃,黑暗条件下游离11 hr时的观察结果。

** “+”代表原生质产量极少,“++”少,“+++”较多,“++++”多,“+++++”很多。

2. 不同酶解时间对悬浮细胞原生质体产量的影响

用纤维素酶4.5%、离析酶1%、半纤维素酶0.5%游离悬浮细胞,在27℃和黑暗条件下,游离时间分别为5、8、11、14 hr时,酶解效果明显不同(表4)。当酶解时间为5 hr时,只有极少量的原生质体得以释放。随着酶解时间的加长,原生质体的产量逐渐提高。当酶解时间为11 hr时,原生质体产量达最高值。但随着酶解时间的继续延长达14 hr时,原生质体产量又下降。这可能由于最早游离的原生质体产生破碎的缘故。

表4 不同酶解时间对悬浮系原生质体产量的影响(1992)*
Table 4 The effects of different duration of time on the
isolation of protoplasm of suspension cell line

酶解时间(hr)	产量
5	+
8	+++
11	+++++
14	+++

* 酶解条件与计量标准同表3。

3. 合适渗透压浓度的选择

原生质体游离过程中,添加不同浓度的渗透压稳定剂(甘露醇),原生质体产量明显不同(见图1)。甘露醇浓度只有在0.35 M以上时,才能获得完整的原生质体,甘露醇浓度在0.45 M时,产量有所增加,在0.55 M时,产量增加最多;在0.65 M时,产量较0.55 M又有所下降。故采用0.55 M甘露醇(约10%)作为合适渗透压稳定剂的浓度。

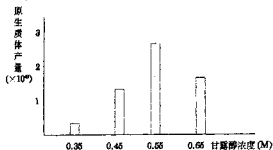


图1 不同渗透压浓度对悬浮细胞原生质体产量的影响

Fig.1 The effects of different mannitol concentration on the isolation of protoplast of suspension cell

(三) 悬浮细胞来源的原生质体培养

影响原生质体分裂、细胞持续分裂、愈伤组织形成以及植株再生的因素很多。为了寻求最适合的培养条件,作者比较了不同培养方式、基本培养基种类及激素浓度等因素。

1. 不同培养方式对原生质体分裂的影响

将原生质体调整至合适浓度,作液体浅层、琼脂糖双层、琼脂糖包埋漂浮和海藻酸钠包埋漂浮方式。培养在附加2,4-D 0.5mg/L、KT 0.5mg/L、CH 250mg/L、葡萄糖90g/L的 KM_8P 培养基中,原生质体分裂情况明显不同(表5)。

液体浅层培养:原生质体在培养24 h后,开始膨大,细胞逐渐拉长呈椭圆形,这表明细胞壁已经开始再生。3-4d后,原生质体之间严重粘连,并见到部分原生质体破裂。6d后,原生质体开始第一次分裂,以后未见第二次分裂发生,总分裂频率大致为1.2%(由于粘连严重,观察不便,为大约统计数据),原生质体便开始褐化死亡。

琼脂糖双层培养:与液体浅层培养相比较,原生质体状态较好,原生质体粘连和死亡现象减轻。原生质体第5d开始第一次分裂,且原生质体能够持续分裂,10d后出现第二次分裂,14 d开始第三次分裂,原生质体分裂频率达3.8%。但原生质体的粘连仅仅只是减轻和推迟而已,原生质体最终还是褐化

死亡。

琼脂糖包埋漂浮法:因低熔点琼脂糖在一般地区不易买到,且价格高昂,本实验所用的为普通琼脂糖,经测定熔点为48℃。原生质体包埋过程中,由于高温的冲击,原生质体活力不可避免地受到一定程度的影响,并且少量破裂,原生质体第5d发生第一次分裂,10d后有第二次分裂的出现,这与琼脂糖双层培养法相仿。但原生质体分裂频率大大提高到8.7%,且有部分能发育到二十个左右细胞的细胞团,但不能持续发育到肉眼可见的小愈伤组织。

海藻酸钠包埋漂浮法:原生质体用海藻酸钠包埋后,与琼脂糖包埋一样,原生质体被机械地分开并固定了位置,避免了原生质体之间相互粘连,并减轻琼脂糖包埋过程的高温冲击,原生质体第5d发生第一次分裂(图4),10d后发生第二次分裂(图5,图6),分裂频率高达15.2%,30d左右有十几到几十个细胞构成的细胞团(图7,图8),但达到这种细胞团的原生质体频率较低,50d左右即可有肉眼可见的小愈伤组织(图9)。

综上所述,在本实验的条件下,海藻酸钠包埋法是较好的一种原生质体培养方式,其原生质体分裂频率高,且能使原生质体持续分裂至小愈伤组织,比较其他方法具有明显的优越性。

表5 不同培养方式对原生质体分裂的影响(1992)

Table 5 The effects of different culture methods on division of protoplast

培 养 方 法	第一次分裂 时间 (d)	第二次分裂 时间 (d)	发育阶段	分裂频率* (%)
液体浅层	6	无	第一次分裂	1.2
琼脂糖双层	5	10	第三次分裂	3.8
琼脂糖包埋漂浮	5	10	20个细胞的细胞团	8.7
海藻酸钠包埋漂浮	5	10	愈伤组织	15.2

*分裂频率为培养15d时,视野内分裂原生质体数占总原生质体数的百分比,以下同。

2. 不同培养基种类对原生质体分裂的影响

调整原生质体密度为 $2.5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL, 以海藻酸钠包埋漂浮方式, 将原生质体培养在附加2,4-D 0.5mg/L 、KT 0.5mg/L 、CH 250mg/L 的 0.50M 葡萄糖的 KM_8P 和MSB培养基中, 原生质体的生长的分裂情况明显不同(表6)。在 KM_8P 培养基中, 原生质体5d开始第一次分裂, 10d开始第二次分裂; 在MSB培养基中, 第一次分裂和第二次分裂分别推迟到第6d和第12d, 且两者分裂频率差异很大, KM_8P 培养的分裂频率为15.2%, 而MSB中则为4.7%。 KM_8P 培养的原生质体可持续分裂至形成肉眼可见的小愈伤组织, 而MSB中只持续分裂几次至十多个细胞的细胞团阶段。究其原因, 一是由于 KM_8P 中富含多种糖类、有机酸、维生素等, 二是 KM_8P 中的高 Ca^{2+} 和低 NH_4^+ 对原生质体的存活和分裂有利, 因此, 它较MSB具有明显的优越性。

表6 不同培养基种类对原生质体分裂的影响(1992)

Table 6 The effects of different media
on the division of protoplast

培养基	第一次分裂 时间(d)	第二次分裂 时间(d)	分裂频率 (%)	最终阶段
MSB	6	12	4.7	十多个细胞的细胞团
KM_8P	5	10	15.2	愈伤组织

3. 不同激素种类和浓度对原生质体分裂的影响

将原生质体调整密度为 $2.5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL, 以海藻酸钠包埋方式培养在 KM_8P 附加不同激素组合, CH 250mg/L , 0.50M 葡萄糖的 KM_8P 培养基中, 试验结果见表7。原生质体在KT 0.5mg/L 、2,4-D浓度不同的情况下, 分裂情况不同。当2,4-D为 0.1mg/L 时, 仅有少数原生质体再生细胞发生第一次分裂, 个别的发生第二次分裂, 分裂频率为0.5%; 2,4-D浓度为 0.5mg/L 时, 原生质体第5d发生第一次分裂, 第10d发生第二次分裂, 分裂频率为10.8%, 且能持续分裂至形成愈伤组织; 当2,4-D浓度为 1.0mg/L 时, 原生质体第4d发生第一次分裂, 第8d发生第二次分裂, 分裂频率为11.5%, 也能持续分裂至

形成愈伤组织。KT 1.0mg/L和KT 0.5mg/L之间,原生质体发育情况差异不显著。

表7 不同激素组合对原生质体分裂的影响(1992)

Table 7 The effects of different hormones combination on division of protoplast

激素组合	第一次分裂 时间(d)	第二次分裂 时间(d)	分裂频率 (%)	发育阶段	分化
2,4-D0.1+KT0.5	8	15	0.5	第一次分裂	
2,4-D0.5+KT0.5	5	10	10.8	愈伤组织	植株
2,4-D1.0+KT0.5	4	8	11.5	愈伤组织	
2,4-D0.5+KT1.0	5	10	9.4	愈伤组织	植株

2,4-D 1.0mg/L与2,4-D 0.5mg/L比较,原生质体恢复分裂早,分裂频率也稍高,但其愈伤组织经过继代后,在分化培养基中不能分化出植株,而2,4-D 0.5mg/L的能分化出植株,这可能是较高2,4-D浓度对器官形成有抑制作用的缘故。

(四)愈伤组织的继代和植株再生

悬浮系原生质体再生的小愈伤组织,转移到生长培养基上增殖,其愈伤组织在生长培养基上的成活率与转移时愈伤组织的大小有关。凡愈伤组织直径大于1mm的,转移到生长培养基后成活率在90%以上,凡愈伤组织直径小于1mm的,转移后不久就褐化死亡。成活的愈伤组织在生长培养基I(附加2,4-D 0.5mg/L、6-BA 0.1mg/L的MSB)上,生长较快,但结构疏松。以后的分化试验表明,无器官发生能力;而在生长培养基II(附加2,4-D0.2mg/L、6-BA 0.1mg/L的MSB)上,则可促使其愈伤组织逐渐紧密,继代2Cd左右的生长紧密的愈伤组织,其总体增殖不大(直径约5mm),将其转至附加6-BA 2.0mg/L的MSB分化培养基上,两周左右其愈伤组织表面可见到绿色小点,再经2周左右通过器官发生途径产生了不定芽(图10)。

愈伤组织来源不同,其器官分化差异很大。培养在含1.0mg/L 2,4-D

和0.5mg/L KT培养基上的原生质体,尽管其恢复分裂早,发育到细胞团和愈伤组织的时间较短,但其愈伤组织在生长培养基 I 上改造 20d 后,仍难以诱导出芽,这可能是由于长期的高 2,4-D 浓度,降低了分化潜力,而来源于 0.5 mg/L 2,4-D、0.5~1.0mg/L KT 培养基上的原生质体愈伤组织,其诱导芽分化潜力较大,但两者之间无明显差异。在供试的 84 块愈伤组织中,有 5 块分化出 7 个芽,芽分化率为 6%。将分化培养基上诱导出的幼芽长至约 2cm 高时,剪取幼芽,转接到附加 0.05mg/L NAA 的 1/2 MS(或 H)生根和壮苗培养基上,约 15d 后,均长出了粗壮的根系,终于形成了完整的植株(图 11),根的分化率为 100%。

二、子叶原生质体的分离和培养

(一)子叶原生质体的分离

1. 不同酶液浓度和组合对子叶原生质体分离的影响

将纤维素酶 Cellulose Onozuka R-10(Yakult Honsha Co.,LHD)和离析酶 Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co.,LTD)溶解在 0.6M 甘露醇中,配成不同浓度和配比的酶液来游离子叶原生质体,原生质体产量差异明显(表 8)。组合 1 和组合 2 因酶液浓度太低,原生质体产量不高,而以纤维素酶 3% 和离析酶 0.5% 的组合处理效果最佳,原生质体产量最高。组合 4 和组合 5 中出现较多破碎的原生质体,可能是酶液浓度太高,作用太强,使已游离的原生质体发生破裂的缘故。

2. 不同酶解时间对子叶原生质体产量的影响

用 Cellulose R-10 3%,Macerozyme R-10 0.5% 游离子叶原生质体,酶解时间分别为 1、3、5、7h,酶解效果明显不同(表 9)。当酶解时间为 1h 时,几乎没有原生质体的释放;随着酶解时间的延长,原生质体的数量逐渐增多。当酶解时间为 5h 时,原生质体达最大释放。但酶解时间过长,最早游离的原生质体发生破碎,又会影响产量的进一步提高。

表8 不同酶液组合对原生质体产量的影响(1992)*

Table 8 The effects of different enzyme combinations on isolation of protoplast of cotyledon

处理	Cellulose R-10	Macerozyme R-10	产量
1	1.0	0.5	+
2	2.0	0.5	++
3	3.0	0.5	+++
4	3.0	1.0	+++
5	4.0	1.0	++

*27℃、黑暗条件下酶解5h结果,采用真叶初露期的绿色子叶;

“+”表示很少,“++”表示少,“+++”表示多,“++++”表示很多。

表9 不同酶解时间对子叶原生质体产量的影响(1992)

Table 9 The effects of different duration of time on isolation of protoplast of cotyledon

酶解时间(h)	产量
1	0*
3	++
5	+++
7	++

*“0”表示几乎无,“+”表示很少,“++”表示少,“+++”表示多,

“++++”表示很多;酶解条件同表8。

3. 不同渗透压浓度对子叶原生质体产量的影响

子叶原生质体分离时,渗透压稳定剂甘露醇在0.40M以上才能获得完整的原生质体,在0.50M时,产量有所增加;在0.60M时,产量增加最多;在0.7M时,产量较0.60M有所下降,故应采用0.60M甘露醇作为分离子叶原生质体的合适浓度(图I)。

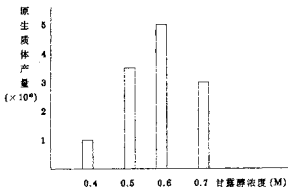


图 I 不同渗透压浓度对子叶原生质体产量的影响

Fig. I The effects of different mannitol concentration on isolation of protoplast of cotyledon

4. 不同子叶生长期和子叶生理状态对原生质体产量的影响

选择子叶初展期、子叶平展而真叶初露期、真叶初展期三个时期的子叶进行原生质体分离。子叶初展期时,游离下来的原生质体破碎严重,原生质体产量低。真叶初露期,子叶原生质体产量最高,每克子叶可制得 5×10^5 个原生质体,原生质体活力达79%。真叶初展期,游离原生质体的产量降低,游离所需的时间增长。

无菌苗材料是否经过 2°C 低温保存(冰箱冷藏),对原生质体产量影响不大。但子叶的颜色对原生质体产量影响很大,绿色子叶游离出来的原生质体产量较黄色子叶要高出10倍,而且原生质体状态好,活力强(图13)。

(二)子叶原生质体的培养

我们在悬浮系原生质体培养工作的基础上,选择用海藻酸钠包埋方式,将原生质体调整密度为 2×10^5 个/mL,培养在分别附加2,4-D 0.5mg/L,KT 0.5mg/L和附加2,4-D 1.0mg/L,KT 0.5mg/L的 KM_8P 培养基中,原生质体

在黑暗中培养1d后,部分原生质体叶绿体趋于向一极集中,叶绿体集中的部分似有出芽现象发生,有些叶绿体则在原生质体的中部形成一个环状的带,这些原生质体培养两天后,部分由圆形变椭圆形,并逐渐拉长,这表明新的细胞壁已经再生。原生质体的体积也明显增加,6d左右出现第一次分裂(图14),其中少数能持续发生第二次分裂(图15),但分裂频率仅1.5%。两种培养基中均见分裂现象,但没有什么明显差异,至于有关子叶原生质体的培养条件还需进一步研究。

讨 论

一、苎麻原生质体培养研究的意义及潜在应用价值

长期以来,苎麻品种改良主要依赖于以营养系和实生苗为内容的系统选种,以及苎麻品种间的杂交育种。利用原生质体导入外源基因和开展体细胞杂交将为苎麻育种开辟新的途径。基因工程固然有很强的目的性,但目前对于控制作物的许多重要农艺性状的多基因系统还无能为力。体细胞杂交虽有随机性的缺陷,但可转移细胞核中的染色体组、染色体、染色体片段或者细胞质的叶绿体DNA和线粒体DNA,可利用的基因资源十分广泛(孙勇如,安锡培,1990)。另外,体细胞杂交是一无性过程,后代不存在基因分离现象,亲本中由显性或共性基因控制的性状在体细胞杂交中有可能得以表现。从中选择到理想类型后,即可通过一般无性繁殖方法,扩大群体。

随着病原扩大和生态平衡失调,形成了病、旱、风等自然灾害的连锁反应。苎麻的抗性育种已提到议事日程(赖占钧,1984;李宗道,1986)。苎麻的野生种则是极有希望的种质资源。苎麻属有50多个种,中国有10余个种,除大面积栽培的*Boehmeria nivea*(白叶种)和南洋群岛小面积种植的*B. tenacissima*(绿叶种)外,其余均为野生种。苎麻野生种在我国分布范围极广,它能在自然界长期严酷的环境中生存下来,必然有着其独特的特性。一般野生种具有抗逆性强的特点,这些都是栽培种所缺乏的。它们是宝贵的基因资源。但由于一般作物种间杂交常会出现高度不孕的障碍,从而限制了

有利资源的利用。体细胞杂交可超越这种障碍,将开发利用这些基因资源成为可能。体细胞杂交的基础——原生质体培养和再生植株具有重要的理论和现实意义。

原生质体应用于苎麻育种研究的另一个主要领域是原生质体克隆群体中变异的筛选。1978年,Bajaj等报道了蒴麻原生质体再生植株的遗传变异(Bajaj等,1978),以后又相继有不少类似的报道。最好的例子就是Secor和Shepard发现65个褐色布尔班克马铃苎原生质体克隆中35个性状有22个发生了显著变异(Sink,1984;魏荣宣,1984)。目前已从这些变异中筛选出了有价值的变异体(孙勇如,安锡培,1991)。这种方法的优点在于仅仅使优良品种的不良性状得以改良(Sink,1984)。对于长期进行无性繁殖的苎麻来说,原生质体再生植株所产生的变异可能极为丰富,原生质体可以不经另外的操作,仅通过培养就可得到丰富的遗传资源。

二、有关原生质体培养中的基因型问题

目前对于原生质体培养时是否应注意基因型的选择有两种看法:一种认为重要,另一种认为不重要。持前一种观点的人们大都由于注意到了几乎所有原生质体成功培养的报道中,基因型是非常有限的,如玉米仅几个细胞系(A_{128B} , B_{78-1} , 杂种4号, $sh2sh2$) (孙宝林等,1989),相对来说,水稻基因型比较广泛,籼稻和粳稻都有成功的报道(Kyozuka等,1988;Lee等,1989)。持后一种观点的人们认为基因型与形态发生的关系是复杂的,分化能力主要受到生理和环境等因素的影响,因它们影响了内源激素合成、运输以及可利用性(Vasil,1987),从而导致形态发生的有无与差异。总的来说,对于难以进行原生质体培养的某些植物或同一种的某些品种,通过选择合适的基因型和细胞系来制备原生质体,并通过选择合适的培养基和培养条件,仍是原生质体培养成功的一条可行途径(胡舍,陈英,1988;陈正华,1986)。

苎麻是雌雄同株,异花授粉的作物,目前现有的品种都是杂合体,遗传基础非常复杂,生产上用无性繁殖的方法来避免种子繁殖后代的普遍变异从而保持其优良品种的种性。组织培养研究,本来可以用遗传基础基本一致的用

试管繁殖取得的幼叶和茎段作为外植体,但由于它们所诱导的愈伤组织在诱导率和质量上均显著低于幼嫩的子叶和下胚轴来源的(陈喜文等,1994)。而子叶、下胚轴来自种子,某一品种的天然种子既有母系一方的遗传(这也是我们基于微基因型试验的基础),又有父系一方的遗传,而且由于我们采用的种子取自种质资源圃,其父系遗传显得更为复杂和多样化,导致子叶、下胚轴愈伤组织的多样性。我们在愈伤组织的诱导中,做了30多个品种,发现即使是同一品种,其诱导的愈伤组织颜色有无色、淡黄、灰绿、白色至褐色,愈伤组织质地有紧密、疏松、水渍状,愈伤组织大小直径1cm以上,小的不到2mm,且品种间的多样性程度不同,这样复杂的变异如果不加以区别和选择,经过多次继代和悬浮后,其变异将更为广泛,将导致实验重复性差。

在本次实验中,我们在悬浮细胞系基因型的选择和建立方面做了大量工作。我们将初代和继代中愈伤组织质量好的逐个挑出作继代繁殖,单独做悬浮培养,并在继代和悬浮过程中定期观察细胞结构,及时去除一些质量差的细胞系。通过这种方法,我们建立了来自“大叶绿”的四个细胞系,但在以后的原生质体培养中,发现来自同一细胞系的不同瓶间也存在差异,这与杨世潮在柚梢原生质体培养中的发现相似(杨世潮,1991)。这种同一细胞系状态不太稳定的问题,导致实验的重复性差,这也是我们本次试验研究中没有将基因型单独做一个影响原生质体分裂因素的原因。苎麻细胞系经过如此严格的选择仍具有差异,其有关机制有待进一步研究。

三、有关原生质体培养材料的选择问题

原生质体培养时,材料的选择至关重要。它不但影响原生质体的产量和质量,而且对细胞能否进行分裂也有影响,因此,在具体研究中,除考虑实验目的外,普遍的原因就是要使分离的原生质体产量高、活力强,培养时有较强的分裂和分化能力。

本研究选择子叶来源愈伤组织的悬浮系和子叶作为原生质体研究的材料。悬浮细胞系是原生质体研究应用最广泛的材料,其优点,除了无菌外,它们已经适应体外生长条件,故原生质体培养时很容易诱导分裂,培养条件

也易控制,还可借鉴组织培养的经验对原生质体的分化潜力作出估测。其缺点是较长的继代培养可能使植株分化潜力下降。但我们通过选择合适的质量好的愈伤组织作为悬浮培养材料,并在悬浮系中添加0.2M甘露醇,以改善细胞的结构。甘露醇还可能具有保持和恢复悬浮细胞系再生潜力的作用,这一点已在水稻、小麦的研究中得到证实(Gabibu和Erdel,1986;Kishor和Raddy,1986;Liu和Lai,1986)。目前建立的这种苎麻悬浮细胞系,其细胞小、圆形,内含物丰富,基本上具有胚性细胞系的特征,其分离得到的原生质体在一定条件下有较强的分裂和分化能力,能再生出完整植株。

悬浮培养的条件,也对原生质体的分离和培养起着关键的作用。有研究报道,经常对培养物转移,并提高培养基中生长素浓度,有利于悬浮系的建立和原生质体产量的提高。但在苎麻悬浮系的建立过程中,并不需要较高浓度的生长素同样可以在较短时间内建立悬浮细胞系。这可能是苎麻内源生长激素浓度较高的缘故。

子叶具有污染少、生理状态稳定、结果易于重复,而且有叶绿体作为融合标记等优点,并在不少植物原生质体培养中已有成功的报道(许勇等,1990;罗希明等,1990)。本研究中采用子叶虽容易得到大量的原生质体,但其原生质体不易诱导分裂,仅见少量二次分裂的发生,这与棉花子叶原生质体培养有相似的结果,并认为主要原因是能保证一定原生质体产量的子叶材料常常年龄较老,原生质体大多处于G₁期,而细胞壁再生和细胞分裂与G₁期呈较强的负相关,与G₂期呈较强的正相关(Firoozabady,1986;赵彦修等,1988)。苎麻子叶原生质体培养不能持续分裂,是否有相似的原因,还是目前尚未找到合适的培养基和培养条件,有待于进一步研究。

四、原生质体培养时的营养和条件

原生质体培养中,培养基是重要的影响因素之一。KM₈P培养基是国际公认的富营养培养基,其中含有多糖类、有机酸、氨基酸、维生素等,它被Binding(1982)在第五届国际植物组织和细胞培养会议的报告所推崇,并

认为近几年原生质体培养之所以有突破性进展,就是由于高国楠创建了高度富营养的8F培养基的缘故(Binding等,1982)。本试验采用KM₈F取得了良好的结果,分析培养基成分除了富含原生质体分裂所必需的各种营养成分的原因外,另一原因可能是KM₈F培养基的高Ca²⁺ (600mg/L)和低NH₄⁺ (900mg/L)。一般认为高Ca²⁺和低NH₄⁺对原生质体的存活、细胞再生及细胞分裂都是有利的,高NH₄⁺对原生质体的毒害作用抑制了原生质体的生长和分裂(Boyes等,1980;Upadhy,1976;Sink和Niedz,1982)。

激素对原生质体的生长发育起着重要的作用。不同植物对激素种类和浓度的要求不同,但总的来说,生长素和细胞分裂素还是必要的,并需要二者的适当搭配。本试验采用2,4-D和KT的适当配合,能有效地促进原生质体的持续分裂至形成细胞团和愈伤组织。但2,4-D浓度较高(1.0mg/L)时,尽管能使原生质体恢复分裂早,形成愈伤组织所需时间短,但其分化潜力下降,以至未能分化出植株。这与牛豆树(Saxena和Gill,1987)和黄芪(安利佳等,1991)所报道的结果相似,可能是因为较高的2,4-D对器官分化有抑制作用。

培养方式是影响原生质体能否持续分裂、形成愈伤组织的重要因素。在液体浅层培养中,苾麻原生质体极易粘连和凝聚,导致原生质体局部密度过高,原生质体易褐化死亡,琼脂糖双层培养法能稍微减轻粘连的程度,但在双层培养的效果和优势没来得及发挥之前,原生质体就褐化死亡。琼脂糖包埋漂浮法,机械地将原生质体分开并固定了位置,既防止原生质体的凝聚,便于早期观察,减少因聚集引起的褐化,又改善了通气状态,从而使分裂频率较前两种方法大大提高。但由于低熔点琼脂糖在一般地区难以买到,本试验中采用的普通琼脂糖(其熔点为48℃),虽然避免了琼脂中某些杂质对原生质体的毒害(Shillito,1983),但原生质体包埋过程中,由于高温的冲击,原生质体活力不可避免地要受到一定的影响。海藻酸钠是一种广泛应用于人工种子研究中的包埋材料,并在大麦花药培养中作为一种代替Ficoll增加比重、使花药漂浮的物质也有报道(戎均康、黄巧玲,1994)。海藻酸钠包埋的原理是利用海藻酸钠与钙离子的交联化学反应,避免了高温冲击对琼脂糖的伤害,形成的凝胶对水溶液中营养物质有通透性,从而引起人工种球内的营养微流,

量人工种子研究中应该避免的问题(Redenbaugh等,1987)。但这种通透性在原生质体培养中是一个优点。我们使用的2%海藻酸钠与0.01M形成的凝胶硬度更小,通透性可能更大,这样,液体培养基中的营养可以缓缓不断供给凝胶中原生质体生长的需要,其效果可能类似于琼脂糖软包埋,这也可能是本研究中海藻酸钠包埋法中原生质体能够发育到愈伤组织,而琼脂糖包埋法仅发育到细胞团的原因。在海藻酸钠研究方面,虽然Abrahambanasco和Roscoe(1981)报道海藻酸盐的固体包埋培养中并未明显地提高植株率,但本试验和贾士荣(1986)利用海藻酸钠的包埋与液体培养相结合的方法,均取得了较好的结果,是一种行之有效的办法。

参 考 文 献

- 1 卫志明,许智宏.1989 高粱原生质体培养再生植株.植物生理学通讯,6:45-46
- 2 王海波,方仁,王培等.1989 小麦胚性细胞系的建立及原生质体的培养.作物杂志,3:26-28
- 3 安利佳,罗希明,李嘉文等.1991 细叶黄荻叶肉原生质体再生植株.植物学报,33(1):38-42
- 4 戎均康,黄巧玲.1994 大麦花药培养中海藻酸钠作用的初步探讨.遗传,16(1):31-34
- 5 孙宝林,李向辉,孙勇如等.1989 籼稻原生质体高频率植株再生.科学通报,18:1177-1179
- 6 孙勇如,黄美娟,李文彬等.1982 粉蓝烟草与矮牵牛的属间体细胞杂种植株的再生.遗传学报,9(4):284
- 7 孙勇如,安锡培主编.1991 植物原生质体培养研究.科学出版社
- 8 孙敬山,路铁刚,Prigole L.M.等.1989 超甜玉米原生质体培养和植株再生.植物学报,31(12):905-915
- 9 许智宏.1986 植物原生质体培养研究进展.植物生理生化进展,4:15-31
- 10 许智宏.1988 植物原生质体的分离和培养技术.李向辉主编,植物遗传操作技术.科学出版社,149-176
- 11 许勇,王福均,周长久.1990 粘毛茄子叶原生质体的培养及植株再生.植物生理学通讯,(4):27-30
- 12 李文彬,孙勇如,黄美娟等.1983 对粉蓝烟草与矮牵牛体细胞杂种植株的进一步观察.遗传学报,10(3):194
- 13 李良村,陈一明,陈英.1988 水稻原生质体及植株再生的研究.遗传学报,15(5):321-328
- 14 李树川.1992 苎麻茎尖组织低温保存技术研究.中国麻作,(1):7-11
- 15 李宗道,潘昌立,王春桃等.1981 苎麻组织培养及其移栽技术.湖南农业,(11):12-14
- 16 李宗道,潘昌立,王春桃等.1982 苎麻试管苗移栽技术研究.湖南学院学报,(1):33-37

- 17 李宗道,1989 苎麻的生理生化与遗传育种.农业出版社
- 18 陆承勋,张天宏,邓秉莲等.1990 活性炭的吸附与解附特性在胡萝卜人工种子中的应用.见:李修庆主编,植物人工种子研究,北京大学出版社,36-40
- 19 肖尊安,沈德绪,林伯年.1992 中华猕猴桃原生质体再生植株.植物学报,34(10):736-742
- 20 陈嘉文,陈德富,李宗道.1993 植物原生质体培养研究.作物研究,7(4):42-44
- 21 陈嘉文,陈德富,周朴华等.1994 苎麻组织培养与原生质体培养.作物研究,8(增刊):85-88
- 22 陈志贤,李淑君,岳建雄等.1989 从棉花胚性细胞原生质体获得再生植株.植物学报,34(10):736-742
- 23 陈正华,李文彬.1986 木本植物原生质体的培养及融合.见:陈正华主编,木本植物组织培养及其应用.高等教育出版社,110-140
- 24 罗希明,赵桂兰,简玉琦.1990 大豆原生质体的植株再生.植物学报,32(8):616-621
- 25 杨世潮.1991 水稻原生质体培养和植株再生.实验生物学报,24(2):127-132
- 26 周朴华,李宗道,徐桥生.1980 苎麻组织培养简报.中国麻作,(1):31-32
- 27 胡继金,周朴华,范鹤芝.1982 植物激素对苎麻试管苗生根的影响.湖南农学院学报,(1):25-32
- 28 胡继金.1990 苎麻试管苗未离体叶面生芽的细胞学观察.作物学报,17(3):192-197
- 29 赵庆华,颜昌敬,潘昌立等.1984 苎麻叶片组织培养的研究.中国麻作,(4):9-12
- 30 钱迎倩,邹吉涛,张士波等.1988 植物细胞工程进展.生物工程进展,(1):1-17
- 31 赵彦修,姚教义.1988 棉花子叶原生质体分离与培养初探.全国植物原生质体和基因工程学术讨论会论文(西安),10
- 32 莫荣达,黄纪生.1981 苎麻组织培养再生植株的研究.植物生理学通讯,(1):52-53
- 33 莫荣达,黄纪生.1982 植物激素对苎麻茎、叶外植体器官分化的影响.植物生理学通讯,(3):39-41
- 34 莫荣达,黄纪生.1988 苎麻组织培养育苗方法及组培植株的大田经济性状观察.见:罗士书,许智宏主编,经济作物组织培养.科学出版社
- 35 贾士荣,罗美中,林云.1988 黄瓜胚性细胞悬浮培养及其原生质体的植株再生.

- 植物学报,30(5):463-467
- 36 贾士荣.1990 植物遗传转化的进展.江苏农业学报,6(1):44-47
 - 37 黄记生,莫荣达.1980 苎麻子叶及下胚轴离体诱导再生植株研究简报.广西农业科学,7:27
 - 38 黄记生,莫荣达.1981a 苎麻组织培养快速繁殖试验.广西农业科学,(8):16-17
 - 39 黄记生,莫荣达.1981b 苎麻下胚轴组织培养的器官形成.实验生物学报,(2):111-114
 - 40 董晋江,夏镇熹.1989 小米原生质体再生小植株.植物生理学通讯,2:66-67
 - 41 熊占均.1984 探讨苎麻育种的几个问题.中国麻作,(1):29-30
 - 42 蔡起贵,郭仲琛,钱迎南等.1987 玉米原生质体植株再生.植物学报 29:453-458
 - 43 颜昌敬,赵庆华,胡继金等.1981 用组织培养法快速繁殖苎麻良种.中国麻作,(3):28-31
 - 44 颜昌敬,赵庆华,胡继金.1982a 苎麻组织培养及其在快速繁殖上的应用.中国农业科学,(2):1-8
 - 45 颜昌敬,赵庆华,胡继金等.1982b 组织培养法快速繁殖苎麻良种.湖南农学院学报,(1):21-24
 - 46 颜昌敬,黄剑华.1986 苎麻花药培养研究初报.上海农业科技,(4):13-17
 - 47 颜昌敬,黄剑华,陆瑞菊等.1988 组织培养应用于苎麻快速繁殖.上海农业学报,4:17-20
 - 48 颜昌敬编著.1990 植物组织培养手册.上海科学技术出版社
 - 49 魏荣宜译.1984 原生质体融合与植物改良.国外遗传育种,(6):1-4
 - 50 Adahambanazo E.M.and Roscoe D.H.,1982 Alginate:an alternative to agar in plant protoplast culture.Plant Sci Letter 25(1):61-66
 - 51 Attree S.M.,Dunstan D.I.and Powke L.G.,1989 Plantlet regeneration from embryonic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*). Bio/technology 7:1060-1062
 - 52 Bajaj Y.P.S.,Gosch G.,Ottma M.,Weber A. and Grobler A.,1978 Production of polyploid and aneuploid plants from anthers and mesophyll protoplasts of *Atropa belladonna* and *Nicotiana tabacum*. Indian J Exp Biol 16:947-953

- 53 Binding H., Nehls R., and Jorgensen J., 1982 Protoplast regeneration in higher plants. In: Plant Tissue Culture, Fujiwara A., (Ed) Tokyo, 575-578
- 54 Boyce C.J., Zapata F.J. and Sink K.C., 1980 Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of *Salpiglossis sinuata* L.Z Pflanzenphysiol 99:471-474
- 55 Cassel A.C. and Cocker F.M. 1982 Seasonal and physiological aspects of the isolation of tobacco protoplasts. *Physiol Plant* 56:69-79
- 56 Davey M.R., 1983 Recent development in the culture and regeneration of protoplasts. In: Protoplast 1983 lecture proceedings. Potrykus I. et al. (eds) Birkhauser verlag, Basel, 19-29
- 57 Firoozabady E., 1986 The effects of cell cycle parameters on cell wall regeneration and cell division of cotton protoplasts *J Exp Bot* 37:1211-1217
- 58 Fujimura T., Sakurai M. and Akagi H., 1985 Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Cult Lett* 2:74-75
- 59 Galiba G. and Erdel I., 1986 Dependence of wheat callus growth, differentiation and mineral content on carbohydrate supply. *Plant Sci* 45:65-70
- 60 Harris R., Wright M., Byrne M., Varnum J. and Brightwell B., 1988 Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 7:337-340
- 61 Helgeson J.P., Hunt G.J., Haberlach G.T., and Austin S., 1986 Somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum* expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistance. *Plant Cell Rep* 3:212
- 62 Hinata K., Toriyama K., Kameya T. and Ishu R., 1988 Production of somatic hybrid plants, "*Brassicomericandia*", through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. In: Progress in plant protoplast research. Kluwer Academic Publishers.

63. Jacobsen E., 1987 Genetic diversity in protoplast- and cell-derived plants of potato. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry 3. Potato*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, PP 388-374
- 64 Johnson L.B., Stuteville D.L., Schlarbaum S.E. and Skinner D.Z., 1984 Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclones regenerated from nonmutagenized calli. *Crop Sci* 24:948-957
- 65 Kao K.N. and Michayluk M.R., 1975 Nutrient requirements for growth of *Vicia bajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid medium. *Planta* 126:105-110
- 66 Kiosara A., Patnaik S.N., Cocking E.C., and Power J.B., 1986 Somatic hybrid plants of *Lycopersicon esculentum* Mill and *Lycopersicon peruvianum* Mill. *J Plant Physiol* 126:225
- 67 Kishor P.B.K., and Roddy G.M., 1986 Regeneration of plants from long term culture of *Oryza sativa* L., *Plant Cell Rep* 5(5):391-393
- 68 Klein T.M., Kornstein L., Sanford J.C., and Fromm M.Z., 1989 Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol* 91:440-444
- 69 Kyoizuka J., Otto M. and Shimamoto I.K., 1988 Plant regeneration from protoplast of indica rice: genotypic difference in culture response. *Theor Appl Genet* 76:887-890
- 70 Kyoizuka J., Kaneda T. and Shimamoto K., 1989 Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. *Bio/technology* 7:1174
- 71 Lee L., Schroll R.E., Grimes H.D., and Hodges T.K., 1989 Plant regeneration from indica rice protoplasts. *Planta* 178(3):325-333
- 72 Liu L.F., and Laik L., 1986 High frequency plant regeneration from water-stress rice tissue culture. In: 1st Intern. Congr. of Plant Molecular Biology Abstr pp11

- 73 Marton L.,Wullems G.J.,Molemdijk L.and schilperoort R.A.,1979 in vitro transformation of cultured cells from *Nictiana tabacum* by *Agrobacterium tumerfaciens*.*Nature*(London) 227:129-131
- 74 Oruga H.,Kiyosuka J.,Hayashi Y.,Koba T.and Shimamoto K.,1987 Field performance and cytology of protoplas derived rice (*Oryza sativa*): high yield and low degree of variation of four japonica cultivars.
- 75 Potrykus L.,Shillito R.P.,Saul M.W.and Paszkowski J.,1986 Direct gene transfer:state of the art and future potential.*Plant Mol Biol Rep* 3:117-128
- 76 Qiao Ying-qian,Zhou Yun-luo,Cai Qi-gui,Zhang Zhi-guo and Yan Xiao ,1984 Studies on the callus formation of mesophyll protoplasts from *Gentiana scabra* Bunge.The Abstracts of Internat.Sym.Genetic Manipulation in Crops,Beijing,China.pp100
- 77 Rhodes C.A.,Lowe K.S.and Rady K.L.,1988 Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell culture. *Bio/technology* 6:56-60
- 78 Rhodes C.A.,Pierce D.A.,Mettler I.J.,Mascarenhas D.and Detmer J.J., 1988 Genetically transformed maize plants form protoplasts.*Science* 240:204-207
- 79 Russell J.A.and McCown B.H.,1988 Recovery of plants from leaf protoplasts of hybrid-poplar and aspen clones.*Plant Cell Rep* 7:59 -62
- 80 Saxena P.K.and GHI R.,1987 Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the tree legume(*Pithecellobium dulce* Benth).*Plant Sci* 53:257-262
- 81 Schnabl H.and Youngman R.J.,1986 Immobilisation of plant cell protoplasts inhibits enzymic lipid peroxidation.*Plant Sci* 40:65-69
- 82 Shepard J.F.,1982 Cultivar dependent cultural requirement on potato protoplast regeneration.*Plant Sci Lett* 26:127-132
- 83 Shillito R.D.,Saul M.,Paszkowski J.and Potrykus L.,1986 High efficiency direct gene transfer to plants.*Biotechnology* 3:1099-1103

84. Shillito R.D., Paszkowski J. and Ptrykus I., 1983 Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast derived colonies in number of plant species. *Plant Cell Rep* 2:244-247
85. Sink K.C. and Niedz R.P., 1982 Factors controlling plating efficiency in tomato. In: Fujiwara A. (ed), *Plant Tissue Culture*, JAPTC, pp588-584
86. Spangenberg G., Koop H.U., Lichter R. and Schweiger H.G., 1986 Microculture of single protoplasts of *Brassica napus*. *Physiol* 66:1-8
87. Sun C.S., Prioli L.M. and Sondahl M.R., 1989 Regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of supersweet (sh2sh2) corn. *Plant Cell Rep* 8:313-318
88. Tsai Q.G., 1988 Plant regeneration from leaf callus protoplasts of *Actinidia chinensis* planch var. *chinensis*. *Plant Sci* 54:231-235
89. Upadhyya M.D., 1976 Isolation and culture of cereal protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res* 18:438-445
90. Vasil I.K. and Vasil V., 1980 Isolation and culture of cereal protoplasts. *Theor Appl Genet* 56:97-99
91. Vasil I.K., 1987 Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and grass crops. *J Plant Physiol* 128: 193-218
92. Wang D.Y., Miller P.D. and Scmdahl M.R., 1989 Plant regeneration from protoplasts of indica type rice and CMS rice. *Plant Cell Rep* 8: 329-332
93. Wei Z.M. and Xu Z.H., 1988 Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep* 7:348-351
94. Yang Z.Q., Shikanai T., Mori K. and Yamada Y., 1989 Plant regeneration from cytoplasmic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 77:305
95. Zhang S.B., Kuo C.S., Qian Y.Q., Qu G.P., Cai Q.G. and Zhou Y.L., 1990 Factors influencing isolation, division and plant regeneration in maize (*Zea mays* L.) protoplasts culture. *Chinese J Bot* 2:18-25

STUDY OF PROTOPLAST CULTURE AND PLANT REGENERATION OF RAMIE

Chen Xiwen

ABSTRACTS

Ramie (*Boehmeria nivea*) is a native product to China and important crop of earing foreign exchange. Protoplast culture, being an important basic technique of somatic hybridization and genetic transformation, has been attached extensive attention, but still no successful report in ramie. For the first time, the author used ramie variety "Liuyang Dayelu" as material and studied protoplast culture of ramie systematically and formed a series of technique. The main results are as follows:

1. The calli induced from cotyledons of Liuyang Dayelu were choosed to establish cell suspension and the whole process was observed. The effects of different hormones on suspension culture has been studied. The best result was obtained from the combination of 2,4-D 0.1mg/L, KT or ZT 0.5(or 1.0) mg/L which was composed mainly of small groups of rounded cytoplasmic cells, while the combinations containing high concentration of auxin (2,4-D 0.5 or 1.0mg/L) were mainly composed of long single cells or clumps of highly vacuolate long-shaped cells. Mannitol is beneficial to the cell mechanism. The best result was got from 0.2M mannitol treatment, while residues produced in suspension culture from 0.4M treatment possibly due to high osmotic pressure.

2. The results of different enzymes combination, the isolation time and the concentration of mannitol on the yield of protoplast of cell suspension have been studied. The highest protoplast yield was obtained from the enzyme combination of Cellulose R-10 4.5%, Macerozymes R-10 1.0%, Hemicellulose 0.5% with the treatment of 1hr. The highest protoplast yield was also obtained from 0.55M mannitol.

3. The results of different culture methods on division of protoplast of cell suspension have been studied. The best result was obtained from alginate embedding floating in liquid among four methods, in which the protoplast were earlier to divide, the

efficiency was higher and the protoplasts could divide continuously to form calli. In agarose embedding floating in liquid, owing to usual not low melting agarose used, protoplasts were inevitably influenced by heat shock, then the division efficiency is greatly lowered and only cell clusters formation obtained. In liquid layer and agarose double layer culture, protoplast adheres seriously and become brown and die after several divisions.

4. The effects of different media and hormone combinations on division of protoplast of cell suspension have been studied. The best result was obtained from KM_8P medium, in which the protoplast division efficiency was higher (16.2%) and calli were formed. While the protoplasts in MSB medium could only divide several times and no callus was formed. The best result was also obtained from the hormone combination of 2,4-D 0.5 mg/L, KT 0.5 or 1.0 mg/L. Although the treatment with the combination of 2,4-D 1.0 mg/L and KT 0.5 mg/L, the protoplast was earlier to restore division and the efficiency highest, but no differentiation capacity of the calli derived from it.

5. The differentiation condition of callus derived from protoplasts of cell suspension have been studied. The calli were subcultured on the MSB medium containing 2,4-D 0.2 mg/L and 6-BA 0.1 mg/L for 20 days and then transferred to the MSB medium containing 6-BA 2.0 mg/L. Green spotting were emerged 2 weeks later and the adventitious buds formed another 2 weeks later. When the bud grew to 2 cm in length, it was transferred to 1/2 MS or H medium containing NAA 0.05 mg/L. Study roots were formed about 15 days later, thus a whole plantlet was formed. The differentiation ratio of bud is 6% and the differentiation ratio of root is 100%.

6. The cotyledon protoplast isolation and culture have also been studied simultaneously. The highest protoplast yield were obtained from the green cotyledon when the true leaves begin to emerge with or without cold storage in 2 degrees Centigrade with the treatment of 3% Cellulose R-10, 0.5% Macerozyme 0.6M mannitol solution for 5 hr. But the protoplast only divided 2 times when cultured on KM_8P medium containing 2,4-D 0.5 mg/L or 1.0 mg/L, KT 0.5 mg/L in alginate embedding floating in liquid method.

KEY WORDS: Ramie; Protoplast culture; Suspension cell line; Cotyledon; Plant regeneration

Plate I

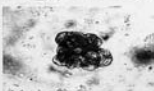
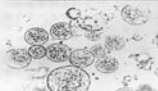
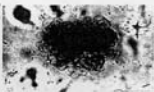
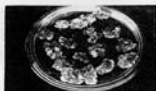


图 版 说 明

图 版 I

1. 子叶来源的愈伤组织
2. 用于分离原生质体的悬浮细胞系
3. 刚分离的悬浮细胞原生质体
4. 培养5 d后的第一次分裂
5. 6. 培养10 d后的第二次分裂
7. 原生质体的多次分裂
8. 培养25 d形成的细胞团

1	2
3	4
5	6
7	8

Plate I

1. Calli derived from cotyledon
2. Suspension cell line used for protoplast isolation
3. Freshly isolated protoplast of suspension cell
4. First divisions observed after 5 days in culture
5. 6. Second division observed after 10 days in culture
7. Several divisions of protoplast
8. Cell colony formation after 25 days in culture

Plate I

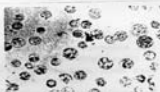
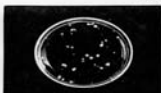


图 版 说 明

图 版 II

9. 悬浮细胞原生质体来源的小愈伤组织

10. 愈伤组织再生芽

11. 根、芽完整的再生植株

12. 生长在土壤中的再生植株

13. 子叶来源的原生质体

14. 培养6 d的第一次分裂

15. 原生质体第二次分裂

9	10
11	12
13	14
15	

Plate I

9. Small calli from suspension cell protoplast

10. Buds regeneration from calli

11. Whole plantlets with roots and buds

12. Plant grown in soil

13. Freshly isolated protoplasts of cotyledon

14. First divisions observed after 6 days in culture

15. Second divisions of protoplasts