

# 水稻原生质体培养及应用研究进展

王景余 金润洲

(吉林省农科院水稻研究所)

## 摘 要

本文综述了近十年水稻原生质体培养研究的进展及其在远缘杂交、细胞融合、基因转移技术等方面应用。自1985年以来水稻原生质体培养取得了突破性进展。梗稻、籼稻、爪哇稻和野生稻种的原生质体培养相继成功,从中筛选出许多适于原生质体培养的水稻品种或品系。随着培养技术的完善,水稻与其他远缘植物(如稗草、野生稻等)细胞杂交、应用电导基因或PEG法将外来DNA直接导入水稻原生质体中的基因转移技术都得到了应用和发展。

**关键词** 水稻 原生质体培养 细胞融合 基因转移

## 一、前 言

1960年Cocking首次用分解细胞壁的方法得到了大量原生质体后,人们对植物原生质体的分离和培养方法有了深入的研究。近些年来高等植物的原生质体培养取得了可喜成果,已报道了百余种植物的原生质体培养成植株,证明了植物原生质体的全能表达性。原生质体培养技术在开拓育种新途径和遗传工程方面有着巨大的应用价值。可以利用原生质体融合引入外源染色体或染色体片断,创造常规有性杂交不能得到的属间或种间杂种,原生质体可以做为基因工程受体系统,导入外源DNA。

水稻是世界上重要的粮食作物,水稻原生质体培养的成功为水稻育种的遗传操作提供了新的途径。Deka(1976)首次从水稻叶鞘中分离出来的原生质体诱导出愈伤组织,并分化出根。蔡起贵(1978)应用水稻花药愈伤组织,经一次悬浮培养得到的细胞悬浮分离原生质体,培养后形成了 $\phi.5\sim 2.0\text{mm}$ 直径的愈伤组织。随后Fumijik(1981)得到水稻原生质体形成的愈伤组织,同时观察了水稻和大豆原生质体融合后形成的杂种细胞愈伤组织。此后几年里水稻原生质体培养一直处于停止状态,直到1985年后才有了一个飞跃的发展。<sup>(6~44)</sup>特别是英国诺丁汉大学Cocking实验室建立了一套水稻原生质体培养程序,采用热击处理和琼脂糖包埋等方法提高了原生质体的活力和植板率,为这一领域的发展作出了贡献。随着水稻原生质体培养技术的不断完善,水稻和其他植物的细胞融合、基因转移相继亦有报道<sup>(3,30~35)</sup>。如水稻和野生稻种、稗草的细胞融合后得到了植株,通过向水稻原生质体导入外源DNA得到了抗卡那霉素、潮霉素的转基因植株等。

## 二、水稻原生质体的分离

### (一)原生质体分离材料

叶鞘叶片细胞,愈伤组织和细胞悬浮系均可以用来分离水稻原生质体。从叶鞘叶片细胞分离原生质体较难,应用实例较少。多应用花药或胚的愈伤组织或悬浮细胞系分离原生质体。Masak O. (1989)用在MS培养基上生长6天的秧苗叶鞘分出了原生质体,但产量不高。SuSuMu T. 同年用一种新型细胞壁溶解酶 furcelase 与1%的Cellulase“ONozoka”R-10混合直接从叶片细胞中分离原生质体,产量为 $10^4\sim 10^6$ /克鲜重,成活率在80%~90%之

间。这和新型细胞壁溶解酶更容易从叶肉中分离水稻原生质体,且产量高、成活率高。省去了建立细胞悬浮系的烦索工作,使操作步骤更为简便实用。Michiek. (1988)应用成熟胚愈伤组织分离水稻原生质体,产量达  $3 \times 10^6$ /克鲜重,并且应用这种原生质体培养得到了再生植株。

目前多用水稻细胞悬浮系做为原生质体的分离材料。建立细胞悬浮系时必须挑选继代培养后呈乳白色、生长旺盛的分散度高的愈伤组织。水稻基因型和培养基成份对建立细胞悬浮系起关键作用。目前最有效的培养基是用氨基酸为氮源的 AA 培养基。培养基中附加不同水平的激素物质影响水稻悬浮细胞系的质量。李良才(1988)认为在 AA 培养基中附加 2.5mg/L 的 ABA 能够使悬浮细胞团紧密、细胞小而质浓,分离出的水稻原生质体植板率高达 2.5%,利于原生质体的存活和分裂。杨世湖(1990)认为增加 2.4-D 浓度(4mg/L)利于增加培养物的分散性,Y. Yamada(1986)认为的悬浮细胞系由 10~15 个细胞组成的小细胞团,细胞小呈圆型,细胞质丰富。不同品种所需悬浮培养时间不同,李国甫等(1993)所用的 H1610 水稻新品系只用了 2 个月就形成了适于原生质体分离的悬浮细胞系,是目前所需时间最短的品系。

## (二)原生质体的分离

目前多采用几种酶的混合液分离水稻原生质体见表 1。原生质体分离一般在一定的渗透压条件下进行。如果让水稻原生质体直接释放到标准培养液中,就会由于细胞壁消失而破裂。过高的渗透压又会影响细胞壁的再生和分裂。渗透压主要靠在分离液中加入甘露醇、葡萄糖、蔗糖等来调节。水稻原生质体多在 pH5.6, 25~34℃、弱光或黑暗、静止或轻轻摇动(30~120rpm)条件下完成。

表 1 水稻原生质体分离液成份

文 献	蔡起贵 (1978)	Y. YAMADA (1986)	M. Y. COULIBALY (1986)	杨世湖 (1990)	J. KYOZUKA (1987)	M. KANDA (1988)	M. OHSHIMA (1989)	S. TOYAMA (1986)
分离材料	悬浮细胞	悬浮细胞	悬浮细胞	悬浮细胞	悬浮细胞	愈伤组织	叶 鞘	叶 肉
酶液组成								
cellulase "onozuka" R-10(%)	4		1		4		1	1
Macerozyme R-10(%)	0.6	2	1		1	2	0.25	
Cellulase "onozuka" RS(%)		2		1		4		
Pectolyase Y-23(%)		0.1	0.5	0.1				
Driselase(%)		1	0.6					
Funcelase(%)								2
半纤维素酶(%)	0.2							
葡萄糖硫酸钾(%)	0.2							
Calf serum(%)		0.8						
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O(mm)	1	80		10		3		
MgCl <sub>2</sub> (mm)		0.125				0.35		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>								
Mannitol	0.8M		5.5%	10%	0.4M			0.42M
MES(mm)		0.5		0.5				
Glucose(M)		0.3						
Sucrose				同 MS 盐 LS 维生 素混合		0.45M	10g/L	
sorbitol(%)			5.5					
BSA(%)							1	1
2.4-D(mg/L)							1mg/L	
KT(mg/L)							2.5mg/L	
pH	5.4	5.6	5.4	5.6	5.6	5.5	5.6	5.5

### 三、水稻原生质体培养

目前已建了用于水稻原生质体培养的较完善培养基体系。表 2 例举了几种水稻原生质体培养基。最初蔡起贵等所用的 LB 培养基培养水稻原生质体只形成了愈伤组织,到 1985 年 K. TORIYAMA 建立了  $\text{NO}_3$  和 B5-3 培养基。在以硝态氮为氮源的  $\text{NO}_3$  培养基中原生质体的植板率较高为 0.14%;以  $\text{NH}_4^+$  为氮源的 B5-3 培养基较低为 0.012%。但原生质体第一次分裂的时间提前两天。作者推断  $\text{NH}_4^+$  对最初分离的原生质体的分裂有较好的效果,但对水稻原生质体形成细胞团产生不利影响。同时 Toriyama 确定了水稻原生质体培养的可行性体系。包括三个步骤:1. 用在以氨基酸为氮源的 AA 培养基中生长的愈伤组织分离原生质体;2. 在  $\text{NO}_3$  培养基中培养原生质体;3.  $\text{N}_6$  培养基进行植株分化。1986 年诺丁汉大学 Cocking 实验室建立了一套较完善的水稻原生质体培养程序。采用 45℃ 热击处理和琼脂糖包埋技术,提高了原生质体的植板率和培养效果。热击处理即是在原生质体分离后悬浮于一定体积的 KPR 液体培养基中,在 45℃ 水浴中热处理 5 分钟,然后迅速在冰浴中冷却 10 秒钟。但也有学者不用热击处理也得到了较好的培养效果。

不同的水稻品种和类型对培养效果影响很大。目前世界上以粳稻原生质体培养成功的例子较多,J. Kyojuka 证实粳稻的原生质体的植板率和植株再生频率均高于籼粳。1990 年杨世湖建立了适于籼稻培养的 Y8 培养基,其原生质体植板率和再生植株频率显著高于适合粳稻原生质体培养的 KPR 培养基。值得一提的是有多家应用 Taipei309 水稻品种原生质体培养成功,Taipei309 成了水稻原生质体培养的标杆品种。

培养条件不同使原生质体愈伤组织的形成和植株再生有很大影响。一般琼脂糖包埋固体培养优于液体培养,看护培养优于固体培养;表 3 例举了水稻原生质体培养和植株分化的条件。

### 四、原生质体愈伤组织的植株再生

分化培养前多选用 MS0 和 N60 培养基做为水稻原生质体的生长培养基。生长培养两周左右愈伤组织生长到一定体积后转移到 MS 或 N6 培养基中进行分化培养。一般原生质体愈伤组织生长培养基相同,选用另一种培养基进行分化培养植株再生频率有所提高。另外原生质体培养时间过长或过短都会使植株再生频率下降。目前植株再生频率最高的达 20%~36.7%(李国甫 1993)。

### 五、水稻原生质体的应用

#### (一)原生质体培养的诱变效应

水稻原生质体培养后由于激素作用或产生自发融合现象能够产生一定的变异,但变异的数较低。H. OGVRA(1987)观察了水稻原生质体再生植株的染色体数目,后代中大约有 30% 的正常二倍体,其他为三倍体或四倍体,植株的整齐度很高。而后又分析了 4 个水稻品种原生质体再生植株自交一代的农艺性状。其中越光后代植株的出穗期晚了 5 天,植株高度减少 10cm。其他品种与亲本无差异。后代穗长、株高的变异系数比对照亲本小,表现整齐度高。与体细胞和花药培养相比原生质体培养的诱变效应很低,使后代植株尽量保持了亲本优良性状。目前日本已从水稻品种越光原生质体植株后代首次培育出了抗白叶枯病,抗倒伏品质优良的水稻新品种(初梦)。

表2 几种水稻原生质体培养基 单位:mg/L

	LB	RY-2	NO <sub>3</sub>	B <sub>5</sub>	KM	KPR	AAKP	KR	Y8G	Y8S	AA
<b>大量元素</b>											
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.025	440	150	150	600	600	600	600	440	440	440
CaCl <sub>2</sub>	450	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	360	—	—	—	—	660	—	600	300	300	—
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	2500	2500	2500	1900	—	1900	1900	1900	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	260	170	—	—	—	170	170	170	170	170	170
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	370	250	250	300	300	300	300	370	370	—
KCl	—	—	—	—	—	300	300	300	—	—	2940
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	67	—	134	134	—	—	—	67	67	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	—	—	—	150	150	—	—	—	—	—	—
<b>微量元素</b>											
KI	—	0.83	0.75	0.75	0.75	0.75	0.83	0.75	0.83	0.83	0.83
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	—	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	6.2	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	6.25	6.25	6.2
Na <sub>2</sub> MoSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	10	10	10	10	10	10	22.3	22.3	22.3
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10	8.6	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	8.6	8.6	—
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	13.9	—	27.8	27.8	27.8	—	—	—	—	—	27.85
Na <sub>2</sub> EDTA	18.7	—	37.3	37.3	37.3	—	—	—	—	—	37.25
sequestrene 300Fe	—	—	—	—	—	28	28	28	—	—	—
EDTA-Na-Fe	—	19.25	—	—	—	—	—	—	19.25	19.25	—
<b>氨基酸</b>											
甘氨酸	2	—	—	—	—	—	75	—	—	—	75
谷氨酸	—	—	—	—	—	—	877	—	—	—	877
天冬氨酸	—	—	—	—	—	—	266	—	—	—	266
精氨酸	—	—	—	—	—	—	226	—	—	—	226
色氨酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	—
<b>维生素</b>											
肌醇	—	100	—	—	160	100	100	100	100	100	100
烟酸	0.5	—	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	—	—	0.5
烟酰胺	—	1.0	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—
盐酸吡哆素	0.5	1.0	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—	1.0
盐酸硫胺素	1.0	10.0	—	—	10.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	5.0
D-泛酸钙	—	0.5	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	—	—
叶酸	—	0.2	—	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	—	—
β-氨基苯甲酸	—	0.01	—	—	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	—	—
氯化胆碱	—	0.5	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	—	—
核黄素	—	0.1	—	—	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—
抗坏血酸	—	1.0	—	—	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	—	—
维生素H	—	0.005	—	—	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	—	—
维生素A	—	0.005	—	—	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005	—
维生素D <sub>3</sub>	—	0.005	—	—	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	—
维生素B <sub>12</sub>	—	0.005	—	—	0.02	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	—
<b>有机酸</b>											
丙酮酸钠	—	5	—	—	20	20	20	20	5	—	—
柠檬酸	—	10	—	—	40	40	40	40	10	—	—
苹果酸	—	10	—	—	40	40	40	40	10	—	—
延胡索酸	—	10	—	—	40	40	40	40	10	—	—
<b>糖类</b>											
蔗糖	10000	—	20000	20000	250	250	250	20000	10000	13700	—
葡萄糖	1000	0.5M	—	—	68400	100000	100000	100000	64000	125	—
甘露醇	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
果糖	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
核糖	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
木糖	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
纤维二糖	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
鼠李糖	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
山梨醇	—	—	—	—	250	250	250	250	125	—	—
水解酪蛋白	250	—	—	—	250	—	—	—	—	125	—
小牛血清	—	8.0	—	—	—	—	—	—	10.0	10.0	—
椰子水	—	25	—	—	20	20	20	20	25	25	—
<b>激素类</b>											
2,4-D	1.0	0.5	1.0	1.0	0.2	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	2.0
6-BA	0.5	—	—	—	0.5	—	—	—	0.05	0.05	—
NAA	—	—	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	0.75	0.75	—
KT	—	—	0.2	0.2	—	—	—	—	—	0.25	0.2
GA <sub>3</sub>	—	—	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—	0.1
ZT	—	—	—	—	—	0.5	0.5	0.2	0.25	—	—
三苄基甲酸	—	—	—	—	—	—	—	—	0.25	—	—
MES	—	1.0	—	—	—	—	—	—	1.0	1.0	—
pH	5.6	5.6	5.8	5.8	—	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.8

注:AA为悬浮细胞培养基

表3 诱导水稻原生质体分裂和植株分化条件

文献	原生质体来源	基本培养基	渗透压	激素水平	pH	培养方法	温度(°C) 光照	诱导分化条件
Y. YAMADA (1986)	悬浮细胞	RY-2	肌醇 100mg/L 葡萄糖 0.5M	2.4-D 2 BA 0.1	5.6	液体培养	25 暗培养	N <sub>6</sub> 液体培养后转入 LS 固体培养 25°C, 3500Lx, 分化出植株
M. Y. COULIBALY (1986)	悬浮细胞	先 KM 后 MS	蔗糖 250mg/L 葡萄糖 68g/L	2.4-D 2 BA 0.1	6	液体培养	28 弱光	MS 培养基, 分化出小植株
李家新 (1990)	悬浮细胞	KPR	蔗糖 250mg/L 葡萄糖 100g/L	2.4-D 0.5 NAA 1.0 ZT 0.5	5.6	固体培养	28 暗培养	MSO, N <sub>6</sub> . 固体分化培养分化出植株
M. KANDA (1988)	愈伤组织	MS	蔗糖 3%	2.4-D 1 NAA 1	5.8	固体培养	25 弱光	MS 及改良 MS 培养基分化出植株
王光远 (1987)	愈伤组织	N <sub>6</sub>	蔗糖 0.6M	2.4-D 2 6-BA 0.2	5.8	液体培养	28 暗培养	MS 培养基 KT2, ZT 0.2mg/L 分化出植株
K. TORIYAMA (1988)	悬浮细胞	NO <sub>3</sub> B5-3	蔗糖 20g/L	2.4-D 1 KT 0.2 GA <sub>3</sub> 0.1	5.6	液体培养	25 弱光	N <sub>6</sub> 固体培养 (KT1, IAA0.2mg/L, 分化出植株
杨世湖 (1990)	悬浮细胞	Y8G	蔗糖 15g/L 葡萄糖 64g/L	2.4-D 1 KT 0.25 BA 0.05 NAA 0.75 三碘苯甲酸 0.25	5.6	看护培养	30 暗培养	N <sub>6</sub> 培养基 (KT2-6, 6-BA1, NAA0.1mg/L 分化出植株

## (二) 水稻与其他植物的原生质体融合

进行原生质体融合是克服水稻与其他具有优良农艺性状的远缘植物杂种不亲合的有效方法。由于融合的原生质体中核基因、线粒体基因的重组及叶绿体和线粒体的独立分离, 可以实现有性杂交不可能得到的有用遗传组合, 但是这些组合非常复杂。细胞融合主要有 PEG 和电融合两种方法。现已得到了水稻和稗草、水稻和野生稻的原生质体融合小植株或成熟植株。详见表 4。

Rie TERASDA (1987) 采用电融合法进行水稻和稗草的原生质体的融合。融合前先将二者原生质体分别在 25mM 的碘乙酸中 40°C 下处理 15 分钟, 然后将混合原生质体悬浮在 0.4M 甘露醇、0.1% MES, pH 5.8 的溶液中进行融合。通过酯酶同功酶和染色体分析证实原生质体融合成杂种的细胞。其中观察到 4 个细胞的染色体数目 60 条 (稻  $2n=24$ , 稗  $2n=36$ ), 含水稻和稗草各一个细胞核的整套染色体。还发现了含 84, 95, 62, 124 等条染色体的杂种细胞。含 84 条染色体的为两个水稻细胞和一个稗草的细胞。由于在融合过程中发生染色体缺失, 出现了非整倍数现象。融合的杂种细胞经培养形成小植株, 但均为白化苗, 没能发育成完整植株。

Hayashi Y. (1988) 应用电融合与看护法培养得到了水稻和四个野生稻种的体细胞杂种植株。经染色体组型, 形态学和同功酶分析证实了后代植株的杂种特性。染色体有 48, 72 条不同数目。其中栽培稻和紫穗野生稻的体细胞杂种自交结实产生一代植株, 在植株和种子形态上表现了双亲中间状, 1989 年赤木宏守将梗稻 (农林 8 号) 的原生质体破坏, 将另一胞质不育的粳稻的原生质体破坏细胞核后使二者融合, 得到了大量可遗传的胞质不育杂种。

Minoru N. (1981) 应用 PEG 法进行水稻和大豆的原生质体融合, 得到了杂种细胞。杂种细胞的愈伤组织与水稻和大豆原生质愈伤组织在外观上有明显区别。1992 年同一学者应

用 PEG 法将水稻原生质体和苜蓿原生质体融合诱导出不对称体细胞杂种的愈伤组织。观察到了水稻和苜蓿的染色体缺失片段,确认了杂种愈伤组织中发生了线粒体 DNA(mtDNA)的重组。水稻和大豆、苜蓿的体细胞杂种愈伤组织的形成,为水稻和双子叶植物的细胞杂交展示了美好的前景。

表 4 水稻同其他植物的细胞融合

文 献	融合植物	方 法	融合条件	结 果
M. NILIZEKI (1981)	大 豆	PEG	33.3%PEG,10mM $\text{CaCl}_2$ 0.7mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.1 葡萄糖, pH10,25℃	杂种细胞
M. NILIZEKI (1992)	苜 蓿	PEG	同 上	杂种愈伤组织
Rie TERADA (1987)	靛 草	电融合	AC 脉冲 4000KHz,250V/cm10 秒 DC 脉冲 3-4KV/cm,30 微秒	杂种小植株
Y. HAYASHI (1988)	野生稻	电融合看护法	同 上	成熟植株

### (三)水稻原生质体转基因技术的应用

目前将原生质体作为受体,向其中直接导入外来基因成为生物工程育种创造新资源的一项有前途手段。原生质体经 PEG 等化学剂或电脉冲处理后细胞膜发生可逆性破坏,外来质粒 DNA 等化合物可经膜上可逆孔进入原生质体,从而引入新的基因。这一技术在水稻的应用取得了可喜进展(表 5)。

H. M. Zhang(1988)采用电导法将 NPTII(新霉素磷酸转移酶)基因导入水稻原生质体,获得转基因植株。用含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的培养基筛选转基因的水稻原生质体愈伤组织。没有 NPTII 基因存在的原生质体不能生长,而含有 NPTII 基因的能够分裂生长,表现对卡那霉素的抗性活力。经分离转基因植株和愈伤组织中的 DNA 与含有 NPTII 基因的 PcaMVNEO 的 DNA 片段 K<sub>b</sub>BamHI 杂交,证实卡那霉素抗性植株和愈伤组织中存在外源 DNA。同年康乃尔大学的 W. zhang 等应用 PEG 法成功地将细菌的 GUS( $\beta$ -葡萄糖苷酸酶)基因导入水稻原生质体,获得转基因植株。W. zhang 认 DNA-DNA 杂交法比分析酶活性更能有效地检验转基因植株。目前用来转移的外源 DNA 均为 NPTII 或 GUS 基因,尚不能进行具有优良农艺性状的高等植物的基因转移。

表 5 水稻原生质体转基因植株实例

文 献	外来基因	方 法	条 件	筛 选
Toriyama K. (1988)	NPTII	电导基因法	22 $\mu\text{F}$ 电容器 750V/cm,4 毫秒	G418 22 $\mu\text{g}/\text{ML}$
Zhang H. M. (1988)	NPTII	电导基因法	40nF 电容器 2000V/cm,68 微秒脉冲 3 次,热击	卡那霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
原田聪 (1988)	GUS	电导基因法	方形波 450V/cm 脉冲 20-25 毫秒	潮霉素
W. zhang (1988)	GUS	PEG 法	热击,直链质粒	染色法筛选 DNA-DNA 杂交法鉴定

## 六、结 语

水稻原生质体培养及应用已取得了可喜的成果。但有许多问题制约着其更广泛的应用与发展。首选建立适于原生质体分离的细胞悬浮系时间过长,半年或更长时间,浪费人力,物

力和时间。挑选适当品种,选择分散性好的起始愈伤组织是在短时间建立理想细胞悬浮系缩短周期的最有效方法。今后应更多选择具有优良性状的水稻品种进行培养,以便使水稻原生质体培养更直接地应用于水稻育种和创造新资源。水稻原生质体培养基日趋完善,今后应筛选更好的培养基提高原生质体植板率。在细胞杂交融合方面虽然得到了水稻和野生稻种的细胞杂种植株,这只是亲源关系很近的种间细胞融合,对于亲源远的大豆、苜蓿的融合还停留在杂种细胞水平。筛选同时适合两亲本原生质体生长的培养基是杂种细胞生长、分化和再生植株的有效方法之一。原生质体融合涉及了双亲全部的细胞核与细胞质的全部遗传组成,它们相互作用,非常复杂,从理论上不利分析亲代和子代的遗传规律,不能有目的地使某一优良性状独立引入。向水稻原生质体导入外来基因目的性强,利于克服上述矛盾。今后应扩大外来基因数目,特别是具有可利用的优良性状作物的基因数目,完善杂种细胞和植株的检验手段。

### 参 考 文 献

- [1]Deka p. c. ,Mol. Gen. Genet. ,1976,145:239~243.
- [2]蔡启贵:水稻原生质体分离与培养的进一步研究,《植物学报》,1978,20:97~102.
- [3]Minoru NILZEKI;Fumijik, Japan. J. Breed. ,1981,31(2):161~167.
- [4]Li-Feihui, Wan-Longhai, Plant Tissue Culture, 1982.
- [5]Kinya TORIYAMA, Plant Science, 1985, 41:179~183.
- [6]J. A. Thompson, E. C. Cocking, Plant Science, 1986, 47:123~133.
- [7]Y. YAMADA, Yang Z. Q. , plant eell Report, 1986, 5:85~88.
- [8]M. Y. COULIBAU, Y. DEMARLY, Z. pflangenguecht, 1986, 96:79~81.
- [9]kinya TORIYAMA, Theor. Appl. Genet. , 1986, 73:16~19.
- [10]H. OGURA, J. KYOZUKA, Theor. Appl. Genet. , 1987, 74:670~676.
- [11]J. KYO: UKA. et. , mol, Gen Gemet. , 1987, 206:408~413.
- [12]雷 鸣等:水稻原生质体的植株再生,《科学通报》,1986,22:1727~1731.
- [13]王光远等:水稻原生质体再生小植株,《植物生理学通讯》,1986,4:49.
- [14]王光远等:水稻原生质体再生成熟植株,《实验生物学报》,1987,20(2):253~254.
- [15]李良材等:水稻原生质体培养及再生植株的研究《遗传学报》,1988,15(5):321~328.
- [16]颜昌敬等:水稻原生质体培养,《农业生物技术信息》,1988,12:1.
- [17]孙宝林等:籼稻原生质体高频分裂及植株再生,《科学通报》,1989,15:1177~1179.
- [18]朱 楦等:水稻原生质体的高密度培养与植株再生,《植物生理学通讯》,1990,4:50.
- [19]李家新,范云六等:中国高产抗病新品种原生质体植株再生,《生物工程学报》,1990,6(2):112~115.
- [20]杨世湖:籼稻原生质体培养和植株再生,《实验生物学报》,1991,24(2):127~132.
- [21]杨剑波等:籼型水稻原生质体再生植株,《生物工程学报》,1992,8(1):60~64.
- [22]Lei Ming: plant Regeneration From Protoplast of Rice. KE×UE TONGBAO, 1987, 32(20):1427~1430.
- [23]Kinya TORIYAMA, 水稻原生质体的植株再生,《遗传》,1986,40(6):32~37.
- [24]J. KYOZUKA, E. OTOO, Theor, APPI. Genet. , 1988, 76:887~890.
- [25]Jenes B. , Plant Science, 1989, 63:187~198.
- [26]Wang D. Y. , Plant Cell Reports, 1989, 8:329~332.
- [27]Lee L. , Plants, 1989, 178:325~333.
- [28]Chu Qiren, ACTA Agriculture Shanghai, 1991, 7(1):9~14.
- [29]Mirhie KANA. Ipn. J. Genet. , 1988, 63:127~136.
- [30]RieTERADA, J. KYOZUKA, MOL. Gen. Genet. , 1987, 210:39~43.
- [31]Yasuyuki HAYASHI, J. KYOZUKA, MOL. Gen. Genet. , 1988, 214:6~10.
- [32]H. Yang. H. M. zhang. E. C. Cocking, Plant Cell Reports, 1988, 7:421~425.

子播种得到的实生苗嫁接育苗,也可采用一年生枝蔓嫁接育苗。近几年来,黑龙江省提倡用山葡萄实生苗绿枝高接育苗,可以适应那里的酷寒条件。

山葡萄生根能力差,硬枝扦插要进行药剂处理。抗根瘤蚜能力差,易染霜霉病等,都是它的缺点。

贝达,是荷兰葡萄和美洲葡萄的杂交种。生长势强,生长期短。虽然其抗寒力较山葡萄差,但其发根容易,嫁接亲和力强,抗病,所以当前我省葡萄育苗大都用它做砧木。

(上接第14页)

- [33]W. zhang and R. Wu, Theor. APPL. Genet., 1988, 76: 835~840.  
 [34]H. M. zhang, H. Yang, Plant Cell Reports, 1988, 7: 379~384.  
 [35]K. TORIYAMA, 水稻导入外来基因的原生质体法和粒子枪法,《组织培养》, 1989, 15(7): 16~19.  
 [36]Kinya TORIYAMA, Japan. J. Breed., 1985, 35: 449~452.  
 [37]Masako OHSIMA, Japan. Jour. Crop science, 1989, 58(1): 103~110.  
 [38]SuSuMu TOYAMA, Japan. Jour. Crop Science, 1989, 58(4): 635~640.  
 [39]Kao K. N. Michaylak, planta, 1975, 126: 105~110.  
 [40]H. OGURA, Japan. Jour. of Breeding, 1989, 39: 47~56.  
 [41]Baset. A., Plant cell Reports, 1991, 10(4): 200~203.  
 [42]赤木宏守, 水稻胞质杂种的育成,《组织培养》, 1989, 15(11): 358~362.  
 [43]Minoru NILIZEKI, Japan. J. Breed. 1992, 42: 803~809.  
 [44]李国甫等, 高频水稻原生质体植株再生,《植物学报》, 1993, 35(2): 234~237.

## PROGRESS IN RICE PROTOPLAST CULTURE AND ITS APPLICATION

Wang Jingyu Jin Yunzhou

(Rice Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences)

### ABSTRACT

The development of rice protoplast culture and its use in distant hybridization, cell fusion and gene transformation were reviewed for the last decade and the medium, and cultural methods for rice protoplast culture were discussed. Great achievements have been obtained in Japonica, Indica, Javanica and Wild Rice protoplast culture since 1985. Many varieties and strains for protoplast culture have been selected. With the development of rice protoplast culture, it has been widely used in somatic hybridization between rice and other plants (such as Soybean, Barnyard Grass, Wild Rice). Transgenic plants have been obtained by introducing foreign DNA into rice protoplast using PEG or Electroporation methods.

**Key words:** Rice (*Oryza sativa* L.), Protoplast Culture, Cell fusion, Gene transformation