

从水稻原生质体再生小植株

M. Y. Coulibaly 和 Y. Demarly

(法国南巴黎大学)

水稻原生质体培养方面的工作很多。大多数实验是用已分化的细胞可以诱导第一次分裂,甚至小细胞团和形成愈伤组织。但是,迄今为止未见水稻原生质

体培养、再生植株的成功报告。

用水稻栽培品种“Moroberekan”灭菌后接种在经修改的MS固体培养基上,2,4-D(2 mg/l),

表1 a. 愈伤组织年龄对于原生质体得率的影响。

b. 原生质体的发育。

c. 三次实验的再生率。

a.	愈伤组织年龄 (天数)	3	10	14	21	28
	原生质体密度	3×10^5	1×10^5	9×10^4	5×10^4	3×10^4
b.	植板后培养时间 (天数)	3	7	14	21	28
	原生质体发育期	细胞壁形成	一次分裂	8个细胞	15个细胞	20个以上细胞
c.	实验序号	第一次	第二次	第三次		
	愈伤组织块数	105	60	80		
	再生小植株棵数	10	5	7		

Fe EDTA($10^{-4}M$)。无菌培养三天,愈伤组织出现在胚芽鞘的基部。四天后取下这些愈伤组织,切成1毫米大小,质壁分离3小时(溶液的pH值调整至5.4)。把切块暗培养在110转/分的摇床上,25℃。所用的培养液是与原生质体培养液一样:无机盐采用高氏(KAO)培养基(1975),2,4-D(2 mg/l),Fe EDTA($10^{-4}M$)和BA(0.2 mg/l),附加纤维素酶(1%),果胶酶(1%),崩溃酶(0.6%),甘露醇(5.5%)和山梨醇5.5%,pH 5.4。酶解20小时,原生质体离心收集,洗三次(离心80 g,5分钟)。把原生质体重新悬浮在高氏培养液中,悬浮密度($3 \times 10^4/ml$),每小皿约1毫升浅层培养在28℃、16小时光照(1200 lx)的条件下。在第一个星期末,把此原生质体转移至经修改的MS培养液中,BA(0.1 mg/l)和2,4-D(2 mg/l),pH 6。每星期继代一次。把从原生质体诱导的愈伤组织转移至经修改的MS固体、再生培养基上,Fe EDTA($10^{-4}M$),蔗糖(4%),pH 6。

为了成功地分离处于全能性状态的原生质体,视

愈伤组织的年龄和细胞分化期为最重要的因素。从水稻幼胚芽鞘诱导的愈伤组织能获得大量同质原生质体。细胞壁再生在分离原生质体后3至4天,一星期后见第一次分裂(表1a),培养两期可见两类多细胞结构(约10个细胞):一类似有结构,另一类属少量,具有胚性结构。(表1b)一个月后,能够观察到的多于30个细胞多细胞团,六、七个星期内进一步生长或肉眼可见的愈伤组织。当把这些愈伤组织转移至再生培养基时,则持续旺盛生长。结果诱导出苗,并最终获得小植株。我们首次实验从105块愈伤组织中获得10棵小植株。此后用同样的程序重复了二次上述实验(表1c)。我们研究了器官及其年龄对于原生质体分离和培养的影响。各种实验表明在愈伤组织年龄和原生质体全能性以及从愈伤组织分离所得原生质体的分化之间相互关联的重要性。

(宋永根译自 Z. pflanzenzüchtg 96,
79—81, 1986)

- Shapiro (ed.), 1983. *Mobile Genetic Elements*, pp. 363—406. New York: Academic Press.
- [80] Boveri, T., (ed.) *The Origin of Malignant Tumors*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1929 (translated from the German volume of 1914).
- [81] Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y. K. T., and Varmus, H. 1984, *Nature* 307: 131—136.
- [82] Iwata, K. K., Fryling, C. M., Knott, W. B., and Todaro, G. J. 1985, *Cancer Res.* 44: 2689—2694.
- [83] Fryling, C. M., Iwata, K. K., Johnson, P. A., Knott, W. B., and Todaro, G. J. 1985, *Cancer Res.* 45: 2695—2699.
- [84] Potter, H., Weir, L., and Leder, P. 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 7161—7165.
- [85] Stetten, G., Davidson, R. L., and Latt, S. A. 1977, *Exp. Cell Res.* 108: 447—452.
- [86] Noda, M., Selinger, Z., Scolnick, E. M., and Bassin, R. H. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 5602—5606.
- [87] Der, C. J., and Stanbridge, E. J. 1981, *Cell* 26: 429—438.
- [88] Bicknell, D. C., Sutherland, D. R., Stanbridge, E. J., and Greaves, M. F. 1985, *Hybridoma* 4: 143—152.
- [89] Springer, G. F. T and Tn, 1984, *Science* 224: 1198—1206.

植物组织培养的次生代谢产物

Ⅱ、生物碱(细胞筛选方法)*

桥本 隆

一、利用植物细胞培养筛选生物碱

生物碱主要存在于高等植物和某些微生物中,是一类含氮的碱性化合物,通常具有多环。这类化合物为自然界中所形成的最大一类的次生代谢产物之一,具有多种多样的化学结构。几乎与其它次生代谢产物一样,生物碱是特定器官在一定的发育时期合成的,形态上已脱分化的植物培养细胞可蓄积一系列生物碱与生物合成系列的部分生物碱。能这样生物合成生物碱的培养细胞的发现,可用于二个方面的研究。首先可用作生物碱生物合成系列的酶的研究实验系统,比用植物体有许多优点。长春花(*Catharanthus roseus*)系列,的各种细胞株中单萜类化合物吲哚生物碱的生物合成被从酶水平上加以阐明便是一个很好的例子。将来象类黄酮生物合成系列的酶的研究,对酶活性的机理可期望获得重要的见解。

其次,许多生物碱对人类和动物具有重要的生理活性,现在由于一些生物碱被作为药用,因此发展植物细胞培养来代替植物体生产这些有用物质,就成为医疗药品的新来源。以下将详述能用植物细胞培养系统生产生物碱方面的进展。

二、高产细胞株的筛选

A. 筛选富含生物碱的植物体

若能在一个植物种内得到生物合成能力高的基因型的植物个体,则可预期从该个体诱导出愈伤组织,其产生生物碱的能力高于其它个体诱发的愈伤组织。例如烟草有四个合成烟碱能力不同的基因型(AABB、AA bb 、aaBB、aabb),* 由各不同基因型个体诱导发生各种愈伤组织,其植株中生物碱含量与愈伤组织中的含量成正比,即从高含量植株可得高含量的愈伤组织,从低含量植株则获得低含量的愈伤组织。在长春花细胞培养中来自高含量植物的液体培养系统,每1 ml培养基内吲哚生物碱的产量平均比来自低含量植株的系统高4—5倍。两个系统的细胞生长则并无差异。其它长春花的培养细胞和欧骆驼蓬(*Peganum harm-*

* 本文摘译自山田康之编著(1984年)植物细胞培养マニユアル一书的59~69页

* 生物碱含量低的烟草品种(LA Burley 21),其生物碱总含量由二组纯合隐性基因(aabb)所决定。这一品种与生物碱含量正常的品种(Barley 21)(AABB)杂交,可得多种基因型的生物碱含量不同的植株。