

应用原生质体融合技术获得茄子种间体细胞杂种

连 勇^{1,2} 刘富中¹ 冯东昕¹ 宋 燕¹ 陈钰辉¹ 张松林¹ Darasinh Sihachakr²

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 法国巴黎 11 大学植物形态与发育实验室, 法国 ORSAY CEDEX BAT. 360, 91405)

摘 要: 应用原生质体电融合技术, 获得了茄子近缘野生种 *Solanum torvum*、*S. aethiopicum* 与栽培种 *S. melongena* (六叶茄, Dourga) 的种间体细胞融合四倍体再生植株。染色体检测表明该植株为四倍体 ($2n = 4x = 48$), 荧光免疫检测证明为种间体细胞杂种, 青枯病抗性鉴定表明带有抗病基因, 田间生长表现为倾向野生亲本的中间类型。

关键词: 茄子; 原生质体; 融合; 体细胞杂种

中图分类号: S 641.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 01-0039-04

Using Protoplast Electrofusion Technology to Obtain Interspecific Somatic Fusion Hybrid of Eggplant

Lian Yong^{1,2}, Liu Fuzhong¹, Feng Dongxin¹, Song Yan¹, Chen Yuhui¹, Zhang Songlin¹, and Darasinh Sihachakr²

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Morphogenese Vegetale Experimentale, Universite Paris Sud, Bat. 360, 91405 orsay cedex, France)

Abstract: We obtained regenerated tetraploid plants from the protoplast electrofusion between *Solanum melongena* (Dourga) and *S. torvum* or *S. aethiopicum*. The ploidy level was confirmed by chromosome detection. Fluorescent immunoassay proved that the plants were regenerated from interspecific somatic fusion. Inoculation with *Pseudomonas solanacearum* indicated that the somatic hybrids carried the resistance gene from the wild relatives. The somatic hybrids were more like the wild relatives in the open field.

Key words: Eggplant; Protoplast; Fusion; Somatic hybrid

茄子青枯病、黄萎病为世界性重要病害, 严重影响茄子产量和品质。青枯病在我国南方造成茄子减产 30%~100%, 黄萎病在北方部分地区造成减产 40%~100%。这些病害很难根除, 采用化学防治为主的综合防治措施也只能收到 40%~50% 的防治效果, 通过抗病育种培育优良抗病品种才是防治该病的有效手段。国内外的研究表明, 茄子抗病种质资源十分匮乏, 高抗材料均为野生种^[1]。茄子的一些近缘野生材料中带有抗病基因, 如 *Solanum aethiopicum* 和 *S. torvum* 就带有抗青枯病、黄萎病和根结线虫病的基因^[2]。但是这些野生材料与栽培种杂交不结果或无籽, 无法直接利用。应用原生质体融合技术获得体细胞杂种, 可以克服其种间杂交不育的缺点, 可以同时将野生植物中的核控制和胞质控制的优良品质、农艺性状及抗性基因转入栽培种中^[2]。作者试图通过原生质体融合技术获得茄子种间的体细胞杂种, 为茄子抗病育种提供新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 1999~2001 年分别在法国巴黎 11 大学和中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验地进行。供

收稿日期: 2002-12-24; 修回日期: 2003-07-25

基金项目: 国家‘863’资助项目 (2002AA244011-1); 欧盟资助项目 (ICA4-CT-2001-10064)

试材料茄子近缘野生种为 *Solanum torvum* 和 *S. aethiopicum*; 栽培种 (*Solanum melongena* L.) 为法国品种 'Dourga'。供试材料种子经表面消毒, 接种在 MS 基本培养基上试管培养、扩繁, 取生长 3~4 周的试管苗叶片待用。

1.2 原生质体融合及植株再生

采用 Sihachakr 等^[2]报道的方法, 用含有 CPW 无机盐、甘露醇 9.1 %、纤维素酶 RS 0.5 %、果胶酶 0.5 %和 EMS [2-(N-吗啡啉) 乙磺酸] 0.05 %的消化酶液, 从受伤的叶子上分离原生质。将可移动的多电极放入培养皿盛装的两亲本原生质的混合液中, 利用 230 V/cm、1 MHz 的交流电 15 s 使原生质排列, 1.2 kV/cm 的直流电 1~3 个脉冲电击使原生质体融合。

融合后的原生质体在含有聚乙二醇 (PEG) 250 mg/L、2,4-D 0.2 mg/L、玉米素 0.5 mg/L、-萘乙酸 (NAA) 1 mg/L、葡萄糖 6.5 %的 KM 培养基中培养, 形成愈伤颗粒后转移到含有蔗糖 2 %、玉米素 2 mg/L、吲哚乙酸 (IAA) 0.1 mg/L 和琼脂 7 g/L 的 MS 再生培养基上, 获得原生质再生植株。

1.3 再生植株杂合性及青枯病抗性鉴定

再生植株染色体倍性检测采用铁矾—苏木精染色法^[3], 植株杂合性检测采用温室栽培植株形态观察和 DAPI、IFTC 染色等方法。

青枯病抗性鉴定采用沾根接种法。植株 3~4 片真叶展开时接菌, 伤根后在菌液中 (10^8 cfu/mL) 沾根 20 min, 高温高湿条件下培养, 15 d 后调查, 根据病情指数判定抗病性。

2 结果与分析

2.1 植株再生

培养密度为 5×10^4 /mL 融合后的原生质体, 暗培养 7 d 细胞开始分裂, 转入 27 °C, 12 h/d 光照条件下培养 10~15 d 后稀释 10 倍, 此时的培养物中有微型愈伤粒形成。3~5 周后将形成的愈伤团转入再生培养基, 5~6 周在愈伤组织上形成不定芽。将不定芽转入生根培养基获得再生植株 (图 1, C)。

2.2 再生植株的倍性及杂合性

再生植株试管苗根尖染色体检测结果表明, 再生植株有大量的二倍体和非整倍体, 四倍体植株近一半 (图 1, A)。经 DAPI、IFTC 染色鉴定约有 20 %的四倍体为杂种植株 (图 1, B)。

2.3 杂合植株的田间表现

不同株系的杂种植株田间表现不同, 但共同之处是形态特征倾向野生种亲本, 植株高大, 生长势旺盛, 多花序, 花淡紫色, 部分植株在北京的气候条件下不结果, 而结果植株的果实绿色、圆形, 果小, 幼果带深绿色条纹, 生理成熟果实桔红色, 含有成熟的种子; 叶片有缺刻。(图 1, D 和 E)。

2.4 杂种植株对青枯病的抗性

细胞融合四倍体植株的抗青枯病表现与野生亲本并不一致。以 *S. torvum* 为融合亲本的, 其杂种植株均表现高抗。以 *S. aethiopicum* 为融合亲本的, 不同株系的杂种植株间表现不同抗性 (表 1)。

表 1 茄子近缘野生植物及其体细胞杂种植株抗青枯病鉴定结果

Table 1 The resistance of some wild species and their somatic hybrids with eggplant to *Pseudomonas solanacearum*

鉴定材料 Materials	病情指数 Disease index	抗病性 Resistance type	鉴定材料 Materials	病情指数 Disease index	抗病性 Resistance type
Sa	31.6	MR	SH+DSi-5	2.7	HR
Sa2	71.2	HS	SH+DSa2 (6a)	27.3	R
St	2.1	HR	SH+DSa (110)	34.8	MR
Sti	4.3	HR	SH+DSa (122)	36.7	MR
SH+DSi-1	1.0	HR	SH+DSa (97-1a)	11.7	HR
SH+DSi-3	1.4	HR	SH+DSa (97-16)	47.0	S

注 Note: Sa = *S. aethiopicum* groups *aculeatum*, Sa2 = *S. aethiopicum* groups *gilo*, St = *S. torvum* (美国 America), Sti = *S. torvum* (印度尼西亚 Indonesia), D = *S. melongena* 'Dourga' (法国 France), SH = Tetraploid hybrid (4x=48)。

0 < HR < 15, 16 < R < 30, 31 < MR < 45, 46 < S < 60, 61 < HS

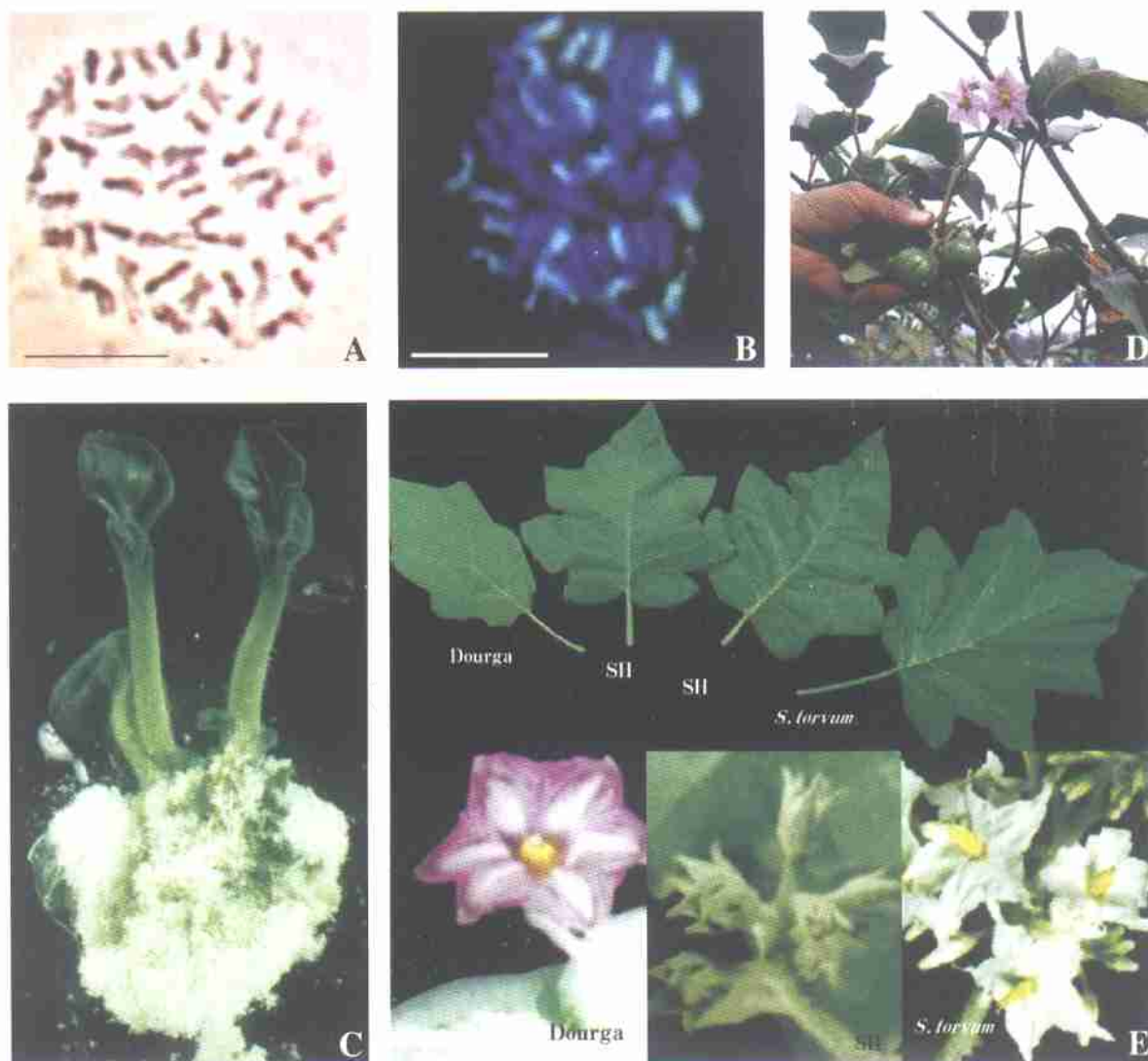


图 1 应用原生质体融合技术获得茄子种间体细胞杂种

1. 四倍体杂种植株染色体 (*Solanum aethiopicum* 和 'Dourga' 体细胞融合后代, $2n=4N=48$);
2. 四倍体杂种植株染色体荧光染色 (蓝色为 DAPI 染色的 *S. aethiopicum*, $2n=24$, 黄色为 IFITC 荧光的栽培种 'Dourga', $2n=24$); 3. 再生植株; 4. 四倍体杂种植株田间结果表现;
5. 四倍体杂种及其双亲植株叶片和花的比较 (D 为 Dourga, St 为 *S. torvum*, SH 为四倍体杂种)。

Fig. 1 Using protoplast electrofusion technology to obtain interspecific somatic fusion hybrid of eggplant

1. Chromosome of the tetraploid hybrid; 2. Fluorescent immunoassay of interspecific somatic fusion hybrid [(Blue (DAPI) is 'Dourga', Yellow (IFITC) is *S. torvum*)]; 3. The regenerated plant; 4. Tetraploid hybrid plant in field; 5. The leaves and flowers of tetraploid hybrid and parents (D = 'Dourga', St = *S. torvum*, SH = Tetraploid hybrid).

3 讨论

茄子是我国大众消费的主要蔬菜之一, 我国 2000 年的茄子栽培面积达 636,862 hm^2 , 总产量大约为 1200 万 t, 占世界总产量的 54.5%。近年随着保护地茄子的栽培面积不断扩大, 青枯病、黄萎病已成为茄子栽培中主要病害, 急需优质抗病茄子品种。本试验通过原生质体融合技术获得茄子种间的体细胞杂种, 为茄子抗病育种创造出新的种质资源材料。

本试验获得的四倍体融合再生植株包含大量的同源融合后代, 种间杂合体细胞融合后代相对较小。要提高种间细胞融合率需要进一步调控电流和电压参数及原生质密度, 实际操作时为最大限度地减少工作量, 需要进一步研究早期杂合植株筛选技术。

本试验所获得的种间体细胞杂种植株, 田间生长形态特征上倾向其野生亲本, 部分植株已能在北京茄子栽培季节开花结果, 说明这种四倍体为带有抗病基因的杂合材料, 通过花药或小孢子培养降倍成二倍体, 经进一步改良有望获得高抗材料, 用于抗病种质资源创新和抗病育种。

体细胞杂种综合了双亲全部的优良性状和不良性状, 双亲所有的遗传物质都会影响杂种后代的表现, 因此对体细胞杂种后代的改良也是一个艰巨的工程。采用近年来发展起来的不对称融合技术有望减轻这一工程的工作量, 可能会解决对称融合倍性增加和劣性性状均进入杂种的问题^[4]。

参考文献:

- 1 易金鑫, 陈静华. 茄子抗黄萎病育种研究进展. 中国蔬菜, 1998, 6: 52 ~ 55
- 2 Sihachakr D, Daunay M C, Serraf I, et al. Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1994, 27: 255 ~ 278
- 3 Gossner J W, Gmitter F G. Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breed Rev., 1990, 8: 339 ~ 374
- 4 刘继红, 邓秀新. 原生质体融合于柑桔遗传改良. 见: 朱德蔚主编. 植物组织培养与脱毒快繁技术. 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 94 ~ 100

“全国观赏植物多样性及其应用研讨会” 征文通知

本次会议由中国园艺学会观赏园艺专业委员会(包括花卉种苗球分会)主办, 上海植物园承办, 将于2004年8月23~25日在上海市召开, 并准备正式出版论文集。1. 征文范围: (1) 观赏植物种质资源调查、收集、引种和研究等(包括少量的综述); (2) 新花卉种类的研究与利用; (3) 生物技术和常规育种技术; (4) 种子、种苗、种球的繁殖技术、进出口贸易及相关政策问题; (5) 高档盆花、鲜切花的规模化生产技术、栽培生理、花期调控、设施栽培、进出口贸易问题; (6) 观赏植物在园林中的应用; (7) 观赏植物对环境改善的研究; (8) 采后生理及处理技术; (9) 病虫害防治技术; (10) 园艺治疗方面, 如花香、花色对人体的生理和心理的影响等。2. 格式要求: 研究论文3000~5000字, 综述不超过8000字。格式请严格按照《园艺学报》要求。稿件请采用Word 7.0以上版本打印, 一式两份, 通过邮局挂号投稿, 同时报送软盘, 也可以通过电子邮件投稿。3. 截稿日期: 2004年6月20日前。4. 邮寄地址: 北京林业大学10号信箱, 邮政编码: 100083; 联系人: 吕英民; E-mail: Luyingmin@sohu.com; 电话: 010-82376017-602, 010-62338305; 传真: 010-62338305。

中国园艺学会观赏园艺专业委员会 2004年2月1日

关于召开蔬菜分子育种研讨会的预备通知

为了及时总结和交流蔬菜分子育种技术的研究进展和应用情况, 中国园艺学会蔬菜专业委员会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所决定共同举办蔬菜分子育种研讨会。1. 会议时间: 2004年6月(暂定), 会期2天。2. 地点: 北京(暂定)。3. 研讨内容: (1) 种质资源的分子特性; (2) 分子遗传图谱的构建; (3) 重要农艺性状的分子标记、基因定位; (4) 优质、抗病、抗逆基因的分离与克隆; (5) 蔬菜病害的分子检测; (6) 寄主与病原物互作的分子机理; (7) 基因转化技术与再生体系建立; (8) 分子标记辅助育种策略; (9) 分子标记在品种鉴别和品种保护上的应用。4. 参会人员: 请科研单位、大专院校相关研究人员和种子企业从事蔬菜育种的技术人员踊跃参会, 届时将邀请科技部、农业部、基金委有关部门领导到会指导。5. 交流形式: (1) 集中和分组交流(多媒体幻灯); (2) 编印论文集, 但不正式出版, 不影响以后正式发表。6. 参会费用: 会议费每人500元, 交通、食宿费用自理。7. 联系人: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所科研处 徐利群 胡鸿; 电话: 010-68919531, 68975140; 传真: 010-62174123; E-mail: ivfcaas@public3.bta.net.cn; 中国园艺学会 张彦 张松林; 电话、传真: (010) 68919528; E-mail: yuanyixh@263.net。

中国园艺学会蔬菜专业委员会 中国农业科学院蔬菜花卉研究所

2004年2月15日