

# 原生质体非对称融合获得胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 种内胞质杂种

司家钢 朱德蔚 杜永臣 赵志伟

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 用紫外线辐射处理胡萝卜雄蕊瓣化型不育材料 708 (供体) 的原生质体, 与经 15 mmol/L 碘乙酰胺预处理的来源于可育材料 663 的原生质体 (受体) 电融合, 获得了 33 株再生植株。所有再生植株营养体形态特征与受体亲本一致, 染色体数目为 18 条, 是二倍体。RAPD 分析表明, 所有再生植株核基因型与受体亲本一致; 线粒体特异性引物-STS<sub>4</sub> 引物 PCR 扩增中, 所有再生植株均得到了与供体亲本一致的谱带, 而与受体亲本不同, 认为 33 株再生植株均为胞质杂种。对 4 株再生植株进行花期形态学鉴定, 全部为雄蕊瓣化型不育株, 进一步证实获得的为胞质杂种, 雄蕊瓣化型细胞质不育性已由 708 供体转移到受体可育材料 663 中。

**关键词:** 胞质杂种; 胡萝卜; 非对称原生质体融合; 细胞质雄性不育性

**中图分类号:** S 631.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-353X (2002) 02-0128-05

胡萝卜雄性不育性属核质互作细胞质遗传, 通过常规回交转育一般需要 8~10 年, 而原生质体非对称融合提供了缩短这个过程的可能性。利用原生质体非对称融合已获得了胡萝卜与欧芹<sup>[1]</sup>、水稻<sup>[2]</sup>、烟草<sup>[3]</sup>等的远缘非对称体细胞杂种以及 *Daucus apillifolius* 的种间胞质杂种<sup>[4]</sup>。Tanno Suenaga 等<sup>[5,6]</sup>进行了胡萝卜种内原生质体非对称融合研究, 获得了种内胞质杂种, 成功利用非对称融合方式实现了“褐药型”和“瓣化型”不育性的转育。本试验旨在对 Tanno Suenaga 的研究程序进一步改进, 建立非对称原生质体融合转育胡萝卜雄性不育性的体系, 为其杂种优势利用创造有利条件。

## 1 材料与方法

以雄蕊瓣化型胡萝卜雄性不育材料 708 为细胞质供体, 可育自交系材料 663 为受体。

**原生质体分离与纯化:** 以幼苗下胚轴为外植体, 诱导愈伤组织, 建立细胞悬浮系。悬浮系继代培养 2~3 次后, 以继代培养 3~5 d 的胚性悬浮愈伤为材料, 采用 Kisaka 等<sup>[2]</sup>的酶液配方, 酶解 10~12 h, 分离胡萝卜原生质体。分离和纯化的步骤参照刘继红<sup>[7]</sup>柑橘原生质体分离和提纯的方法。

**紫外线 (UV) 辐射:** 参照刘继红<sup>[7]</sup>紫外线处理柑橘原生质体的方法, 融合预处理为辐射 8 min。辐射处理后 1 000 r/min 离心 5 min, 原生质体沉淀用电融合液 (甘露醇 0.5 mol/L + CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5 mmol/L pH 5.7) 洗两次, 最后用电融合液将原生质体密度调至  $5 \times 10^5$  个/mL。

**碘乙酰胺 (IOA) 处理:** 用终浓度 15 mmol/L 的 IOA 钝化处理受体原生质体, 融合预处理时间为 10 min。处理后 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤和稀释原生质体。

**原生质体活力测定:** 取 0.5 mL 纯化的原生质体, 加入 12  $\mu$ L FDA (5 mg FDA 溶于 1 mL 的丙酮), 荧光染色 5 min 后在万能显微镜 (Olympus AH-3) 下观察, 检测荧光。活力用暗视野中发黄绿色荧光的原生质体数占同一明视野原生质体总数的比例表示, 每个处理统计 5 个视野。

**原生质体融合:** 将预处理的供体和受体原生质体按 1:1 的比例混合, 混合液的原生质体最终浓度

收稿日期: 2001-04-19; 修回日期: 2001-06-01

基金项目: 农业部植物遗传与生理实验室项目; 中国农科院院长基金项目; 华中农大作物遗传改良国家重点实验室资助项目

前期工作得到了华中农业大学邓秀新、郭文武、刘继红、付春华等老师和同学的指导与帮助。

调整为  $5 \times 10^5$  个/mL, 取原生质体混合液, 放在 FTC-04 电融合池中进行电融合。电融合参数是: 交流电场强度 (AC) 70 V/cm, 作用时间 60 s; 直流电场强度 (DC) 1 500 V/cm, 5 次脉冲, 间隔 1 s, 直流脉冲施加时间 50  $\mu$ s。融合完成后, 将融合的原生质体以 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀悬浮于原生质体培养基中, 并稀释至  $1 \times 10^5$  个/mL。

原生质体培养与植株再生: 融合后的原生质体采用液体浅层培养法, 27℃暗培养, 培养密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 原生质体培养基为含山梨醇 0.3 mol/L、2,4-D 0.1 mg/L 的 MS 液体培养基。在融合原生质体培养的同时, 在同样培养基上培养经 UV 和 IOA 预处理的供体和受体原生质体作为对照, 以确定预处理的效果。培养 1 个月左右, 将形成的胚状体或胚性愈伤组织转入含山梨醇 0.1 mol/L, 无 2,4-D 的 MS 液体培养基中降压培养 14 d, 然后将液体培养基与培养物一起转到固体无激素的 MS 培养基上, 形成液固双层培养。待上层的液体培养基干燥后, 继续在无激素的 MS 固体培养基上继代培养, 当愈伤组织变为鲜亮的米黄色时, 转到含 KT 1 mg/L 的 MS 培养基上分化培养, 直至分化出幼小的子叶苗。转移子叶苗到含 0.1% 活性炭的 1/2 MS 生根培养基上生根, 生根后再生植株移栽到盛有新鲜蛭石的苗盘中。降压培养完成后, 培养物在 25℃, 16 h/d 光照下培养。

染色体数目检查: 取胡萝卜直根顶芽, 参照李懋学的压片法进行染色体数目检查。

RAPD 引物检测核基因型: 取幼嫩鲜叶提取总 DNA, 以总 DNA 为扩增模板, 参照 Nakajima 等<sup>[8]</sup>的方法进行 RAPD 扩增和电泳。利用从 100 个随机引物筛选获得的 5 个双亲谱带差异明显的随机引物鉴定杂种核基因型。5 个随机引物是北京鼎国试剂公司提供的 opa08, ope5, ope12, opc01, opc07。

STS (Sequence Tagged Site) 标记引物检测杂种胞质基因型: 以总 DNA 为扩增模板, 参照 Nakajima 等<sup>[8]</sup>的方法进行 STS 引物扩增和电泳。引物采用 Nakajima 等<sup>[8]</sup>发表的 STS<sub>4</sub> 线粒体特异性引物组合。STS<sub>4</sub> 上游引物为: AGAGGAATGGGAACGAAACA; 下游引物为 TATATGCCCCACAAGCTAA。

形态学鉴定: 营养生长期对再生植株的地上部和地下部形态学进行观察和记载; 花期对再生植株的花期形态学进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 UV 对原生质体活力和再生的影响

以胡萝卜雄性不育材料 7-08 分离纯化的原生质体为材料, 进行不同时间的 UV 辐射处理, 从图 1 中可以看出, 所有紫外线辐射处理都使供试材料的原生质体活力明显下降, 并随着辐射时间的延长, 活力下降增多。除 0.5 min 的处理外, 其他处理的原生质体活力比对照下降超过了 50%。说明胡萝卜原生质体对紫外线辐射处理较为敏感。

对上述所有紫外线处理的原生质体进行培养, 培养密度为  $1 \times 10^5$  个/mL。利用倒置显微镜进行观察, 0.5 ~ 5 min UV 辐射的处理, 原生质体均在培养中有细胞分裂, 7~9 d 开始第一次细胞分裂, 培养 15 d 左右, 倒置显微镜下可观察到多细胞团, 培养 25 d 左右可以发现肉眼可见愈伤组织或胚状体, 但随着辐射时间的延长, 植板率明显下降。7 min 的 UV 辐射处理, 仅在培养中发现了少数几次细胞分裂, 未见有多细胞团形成。长于 7 min UV 辐射处理的均未发现细胞分裂以及多细胞团和胚状体的形成, 说明长于 7 min 的 UV 辐射处理可以达到钝化供体原生质体的目的。

### 2.2 IOA 对原生质体生长的影响

取胡萝卜材料 66-3 的纯净原生质体, 加入等量体积 30 mmol/L 的碘乙酰胺 (IOA) 分别处理 5、10、15、20 min, 然后调整原生质体的密度达  $1 \times 10^5$  个/mL 进行培养。除 5 min 处理发现少数细胞分裂外, 其他处理均未发现细胞分裂。除对照外, 所有处理培养 1 个月均未发现愈伤组织和胚状体形成。说明 10 min IOA 处理足以能够钝化胡萝卜受体原生质体, 这与 Ichikawa 等<sup>[2]</sup>的结果相同。

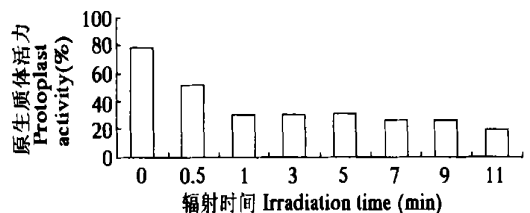


图 1 紫外线辐射 (UV) 对胡萝卜原生质体活力的影响  
Fig. 1 The irradiation effect of UV on carrot protoplast activity

2.3 胡萝卜融合体的愈伤再生及胚状体形成

供体和受体原生质体分别用紫外线和 IOA 处理后，采用电融合方式实现原生质体的融合。融合物培养后 2 h 可以观察到原生质体的聚集；第 6 天发现第一次细胞分裂，在第 7、8 天发现第 2、3 次细胞分裂（图版，1），第 14 天就可以观察到分裂形成的细胞团，25~ 30 d 形成了肉眼可见的胚性愈伤和胚状体（图版，2、3）。预处理后作为对照的供体、受体原生质体培养过程中未发现细胞分裂和细胞团形成。培养 1 个月也未形成肉眼可见的胚性愈伤组织或胚状体。说明 UV 处理和 IOA 处理抑制了供体、受体原生质体的分裂和生长，融合培养物再生获得的愈伤组织或胚状体来源于融合杂种细胞。

2.4 胡萝卜融合体植株再生

将再生获得的胚状体和愈伤组织降压培养后，原来的球形胚和心形胚继续发育形成了子叶胚，胚性愈伤组织得到增殖。将它们转移到固体培养基上进行液固双层培养，胚性愈伤组织进一步增殖，而子叶胚却没有进一步发育形成子叶苗，子叶胚只是略有变长。在固体无激素 MS 培养基上继代培养时，胚性愈伤增殖加快，子叶胚可能由于一起培养的胚性愈伤的诱导作用，没有进一步发育，而是脱分化形成了新的愈伤组织。在同样的固体培养基继代培养一次后，培养物的颜色由乳白色变为米黄色，形成了颗粒状胚性愈伤组织。但是继续培养，培养物仍保持同样状态增殖，不能分化成苗。将米黄色胚性愈伤组织转移到含 1 mg/L 激动素（KT）的固体 MS 培养基上培养，培养 2 周后组织开始变绿并迅速增殖。将变绿的组织在含同样浓度 KT 的 MS 培养基上继代培养，继代 2 周后即分化出子叶苗。说明激动素具有促进胡萝卜胚性愈伤组织进一步发育成苗的作用，这与邵俊明等<sup>[12]</sup>的研究结果一致。将子叶苗转到生根培养基上培养 15~ 20 d，即获得生根并具 2~ 3 片真叶的再生幼苗。

2.5 再生植株营养体形态学鉴定及染色体数目鉴定

调查了再生植株及其双亲地上部和地下部的形态特征（表 1）。通过比较发现，融合细胞再生植株的营养体形态特征，如叶形、叶柄、根色、直根顶部侧芽多少等性状均与受体一致。因此初步认为，所获再生植株核基因型可能与受体亲本一致。

取获得的 33 株再生植株的顶芽，显微镜下对染色体数目进行鉴定，全部为二倍体，染色体为 18 条，与其双亲的倍性完全相同（图版，4、5、6）。

表 1 胡萝卜原生质体非对称融合再生植株及双亲的形态学比较

Table 1 Comparison between the somatic cell hybrids and their parents on morphology

材料	调查株数	叶裂	叶柄	根色	短缩茎侧芽
Materials	Number of plants	Delamination	Leaf stalk	Root color	Lateral buds of short stem
66 3	5	浅 Shallow	短 Short	鲜红 Red	多 Many lateral buds
7 0 8	5	深 Deep	长 Long	桔红 Orange	无 No lateral buds
7 0 8+ 66 3	30	浅 Shallow	短 Short	鲜红 Red	多 Many lateral buds

2.6 RAPD 标记鉴定核基因型

利用 5 个双亲差异明显的随机引物 opa08, ope05, ope12, opc01, opc07 进行 RAPD 扩增，发现所有融合再生植株的 RAPD 谱带与受体亲本完全一致，与供体亲本不同。如图 2，opc07 和 ope05 两个随机引物共扩增出 8 条多态性谱带，其中受体亲本特异性谱带 n2, n5, n6 在所有融合再生植株中都有出现，而供体亲本的特异性谱带 n1, n3, n4, n7 和 n8 均没有在融合再生植株中出现。因此认为所有融合再生植株的核基因型与受体亲本一致。

2.7 mtDNA 的 STS<sub>4</sub> 标记鉴定

STS<sub>4</sub> 标记鉴定结果表明，所有单株均扩增出与供体亲本完全一致的一条 1.1 kb 的 DNA 带，与受体线粒体 DNA 的带型完全不同。结合前述结果，可以初步推断，利用非对称原生质体融合获得的再

生植株全部为胞质杂种。

### 2.8 融合植株的花期形态学鉴定

将融合再生植株及其双亲的直根在2℃冰箱中人工春化45 d，于2001年3月22日定植于田间。由于春化处理期间冰箱温度不稳定，大部分胡萝卜直根遭受冻害，植于田间后，只有4株融合再生植株成活并开花。对4株再生植株进行花期鉴定，均为瓣化型不育。4株再生单株花器形态基本一致，但与供体亲本不同。供体亲本为绿色瓣化型不育，而融合再生植株为粉白色瓣化型不育，而且雄蕊瓣化的形态也不同，再生植株的雄蕊瓣化形状如舌状，而供体亲本雄蕊瓣化成锯齿型（图版，7、8、9）。推测其原因可能是核质互作的结果，即不同核背景的影响。至此，可以确定，通过原生质体非对称融合获得了胡萝卜种内胞质杂种，并成功将胡萝卜瓣化型细胞质不育性由不育系材料7-0-8转移到可育材料663中。

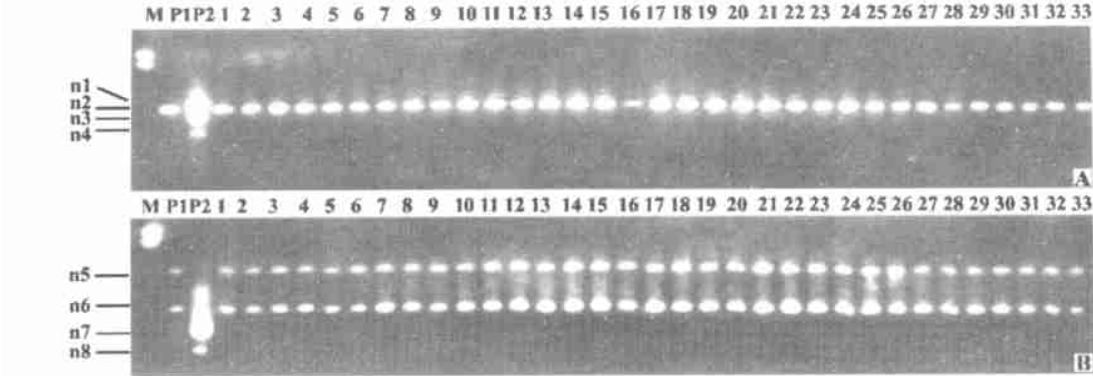


图 2 胡萝卜融合再生植株及其双亲 *opc07* (A) 和 *opc05* (B) 引物 PCR 扩增检测结果

P1: 受体 663; P2: 不育供体 7-0-8; 1~ 33: 融合再生植株; M: PCR 分子量标记。

Fig. 2 PCR amplification results of the somatic hybrids and their parents with *opc07* primer (A) and *opc05* primer (B)

P1: Recipient 663; P2: Donor 7-0-8; 1- 33: Regenerated plants from protoplast fusion; M: PCR Marker.



图 3 胡萝卜融合再生植株及其双亲 *STS<sub>4</sub>* 线粒体特异引物 PCR 扩增检测结果

P1: 受体 663; P2: 不育供体 7-0-8; 1~ 33: 胡萝卜融合再生植株; M: PCR 分子量标记。

Fig. 3 PCR amplification results of the somatic hybrids and their parents with mtDNA primer *STS<sub>4</sub>*

P1: Recipient 663; P2: Donor 7-0-8; 1- 33: Regenerated plants from protoplast fusion; M: PCR Marker.

## 3 讨论

通过本研究，对 Tanno Suenaga 等人的原生质体非对称融合体系进行了改进，将 X- 射线处理供体原生质体改为紫外线辐射处理，使处理的设备简化，并由于胡萝卜对紫外线辐射处理敏感，处理时间较短，使融合的整体操作过程缩短 1h 左右，保证融合时原生质体仍处于高活性状态；用电融合代替 PEG 融合减少了 PEG 对融合细胞的化学伤害，融合细胞再生更为容易。

融合胚性愈伤再生植株和再生植株的移栽成活，是本次研究的两个重要环节。可能由于基因型的关系，本融合组合不能在无激素的 MS 培养基上直接形成子叶苗，仅保持在胚性愈伤的状态，只有在激动素的促进下才能成苗。再生植株的移栽成活与周围环境的温、湿度有直接关系。相对低温的秋、冬季有利于再生植株的移栽成活，夏季不利于移栽。

融合原生质体液体浅层培养 1 个月我们即获得了球形胚和心形胚, 也获得了胚性愈伤组织。接下来的培养中没有将两类再生体分开单独培养, 而是将它们转移到同一培养基上一起培养。可能由于愈伤组织增殖较快, 成为后来培养物的主体, 愈伤分泌产生的激素类物质促进了胚状体的脱分化, 从而终止了胚状体的进一步发育, 使胚状体没有发育成子叶苗。本融合组合形成米黄色胚性愈伤组织后不能成苗, 可能也与胚性愈伤组织自身分泌激素的调控有关。

本次研究中成功利用原生质体非对称融合获得了胡萝卜种内胞质杂种, 并实现了胡萝卜瓣化型雄性不育性的转育。从融合开始到花期形态学鉴定, 大约 15 个月。这相比回交转育胡萝卜雄性不育性, 大大缩短了时间。

本次研究, 结合形态学、细胞学和分子生物学技术对融合杂种进行鉴定, 结果准确可靠。将 STS<sub>4</sub> 线粒体特异性引物鉴定结果与融合单株花期形态学鉴定结果对照, 二者一致性强。因此 STS<sub>4</sub> 引物可以与 RAPD 引物结合在融合获得再生愈伤组织时期提前进行杂种筛选, 可大大减少后期培养和鉴定的工作量。此外, STS<sub>4</sub> 引物还可以用于胡萝卜一代杂种的纯度鉴定。

## 参考文献:

- 1 Dudits D, Fejer O. Intergeneric gene transfer mediated by plant protoplast fusion. *Molec. Gen. Genet.*, 1980, 179: 283~ 288
- 2 Kisaka H, Lee H, Kisaka M, et al. Production and analysis of asymmetric hybrid plants between monocotyledon (*Oryza sativa* L.) and dicotyledon (*Daucus carota* L.) *Theor. Appl. Genet.*, 1994, 89: 365~ 371
- 3 Smith M A, Pay A, Dudits D. Analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs in asymmetric somatic hybrids between tobacco and carrot. *Theor. Appl. Genet.*, 1989, 77: 641~ 644
- 4 Ichikawa H, Tanno Suenaga L. Selection of *Daucus* cybrids based on metabolic complementation between X-irradiated *D. capillifolius* and iodoacetamide treated *D. Carota* by somatic cell fusion. *Theor. Appl. Genet.*, 1987, 74: 746~ 752
- 5 Suenaga L T, Ichikawa H, Imamura J. Transfer of the CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-recipient protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 76: 855~ 860
- 6 Suenaga L T, Nagao E. Transfer of the petaloid type CMS in canot by donor-recipient protoplast fusion. *Japan. J. Breed.* 1991, 41: 25~ 33
- 7 刘继红. 柑橘原生质体对称和非对称融合研究: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 1999. 78 页
- 8 Nakajima Y, Yamamoto T. Genetic variation of petaloid male sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence tagged sites (STSs) *Theor. Appl. Genet.*, 1999, 99: 837~ 843
- 9 Stein M, Notnagel Th. Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.) *Plant Breeding.*, 1995, 114: 1~ 11
- 10 郭文武, 邓秀新, 史永忠. 柑橘细胞电融合参数选择及种间体细胞杂种植株再生. *植物学报*, 1998, 40 (5): 417~ 424
- 11 王 槐, 夏光敏. 紫外线对小麦原生质体分裂及染色体变异的影响. *植物生物学学报*, 1994, 4 (1): 69~ 72
- 12 邵俊明, 米景九, 刘育乐. 胡萝卜悬浮细胞原生质体的培养及植株再生研究. *北京农业大学学报*, 1990, 16 (4): 387~ 392

## Intraspecific Cybrids in Carrot (*Daucus carota* L.) Obtained from Asymmetric Protoplast Fusion

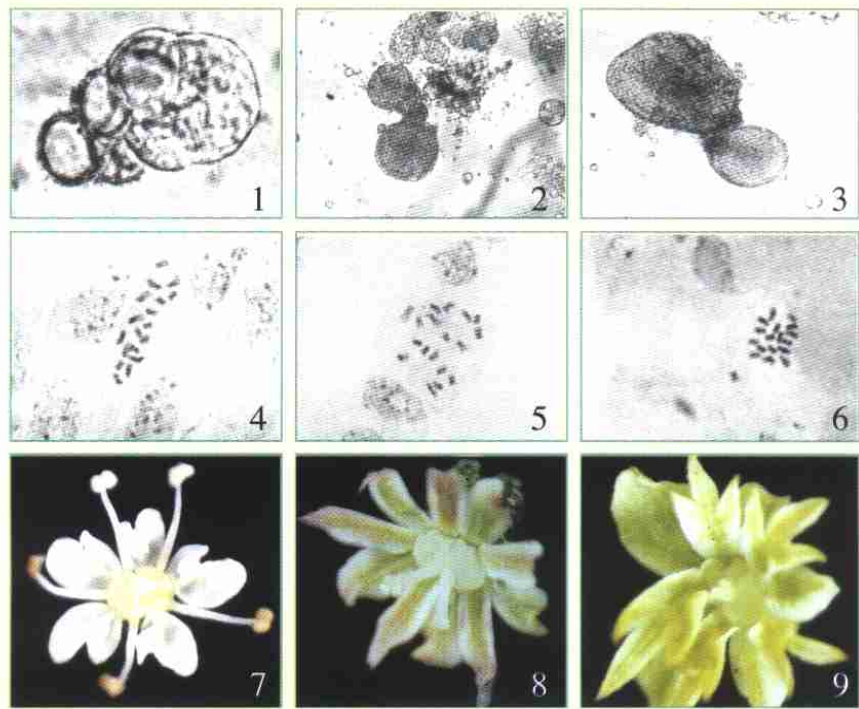
Si Jiagang, Zhu Dewei, Du Yongchen, and Zhao Zhiwei

(Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract:** UV-irradiated protoplasts (donor protoplasts) isolated from petaloid cytoplasmic sterile line 7-0-8 were fused with 15 mM iodoacetamide treated protoplasts (recipient protoplasts) isolated from fertile material 66-3 by using electronic fusion method, 33 plants were regenerated from fusion cells. All regenerated plants were diploid with chromosome number of 18, and they possessed the identical vegetative morphology to the recipient parent 66-3. In PCR amplification with mtDNA specific primers (STS<sub>4</sub> primer combination), all regenerated plants obtained one same specific band which was identical to donor parent and different from recipient parent. The results indicated that all regenerated plants were cybrids. In this experiment, 4 plants identified for their flower morphology were petaloid male sterile, which proved that intraspecific cybrids in carrot were obtained by asymmetric protoplast fusion and carrot petaloid cytoplasmic male sterility was successfully transferred from donor parent line 7-0-8 to fertile line 66-3.

**Key words:** Cybrids; Carrot (*Daucus carota* L.); Asymmetric protoplast fusion; Cytoplasmic male sterility

司家钢等：原生质体非对称融合获得胡萝卜 (*Daucus carota* L.)种内胞质杂种  
Si Jiagang, et al. Intraspecific Cybrids in Carrot (*Daucus carota* L.) Obtained from Asymmetric Protoplast Fusion



图版说明：1. 原生质体第三次细胞分裂 (3.3×4)；2. 融合体再生获得的胚状体和愈伤组织 (3.3×4)；3. 融合体再生获得的球形胚和心形胚 (3.3×4)；4. 7-0-8茎尖细胞染色体 $2n=18(3.3\times100)$ ；5. 7-0-8+66-3胞质杂种茎尖染色体 $2n=18(3.3\times100)$ ；6. 66-3茎尖细胞染色体 $2n=18(3.3\times100)$ ；7. 胡萝卜材料66-3的可育花；8. 融合再生植株的瓣化型不育花；9. 不育供体亲本的不育花。  
**Explanation of plates:** 1. The third cell division of carrot protoplast(3.3×4); 2. The calli and embryoid formed fusion cells(3.3×4); 3. Globular embryoid and heart embryoid from fusion cells(3.3×4); 4. Chromosome number of the donor parent 7-0-8,  $2n=18(3.3\times100)$ ; 5. Chromosome number of the cybrid,  $2n=18(3.3\times100)$ ; 6. Chromosome number of the recipient parent 66-3,  $2n=18(3.3\times100)$ ; 7. Fertile flower from plant of recipient parent 66-3; 8. Petaloid male sterile flower from regenerated plant; 9. Petaloid male sterile flower from the plant of donor parent 7-0-8.

柴敏等：番茄多茸毛基因  $Wo^{mz}$  的遗传表现及其利用价值  
Chai min, et al. Inheritance of Tomato  $wo^{mz}$  Gene and the Value of the Gene in Tomato Breeding

