

原生质体非对称电融合获得不结球白菜胞质杂种

侯喜林¹ 曹寿椿² 余建明³ 陆维忠³

(¹南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ²南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ³江苏省农业科学院遗传生理所, 南京 210014)

摘 要: 以不结球白菜 OguCMS ‘91H 秋 100’ (不育系) 和 ‘91H 秋 21’ (保持系) 为试材, 研究了不同交流场强、交流频率、直流脉冲场强、直流幅宽及脉冲次数对非对称细胞融合效果的影响。结果表明, 不结球白菜电融合的最适电场条件为交流场强 20 V/cm、交流频率 1500 kHz、直流场强 200 V/cm、直流脉冲幅宽 40 μ s、直流脉冲次数 3 次。融合产物用 KM8P₁ 培养基进行包埋培养, 获得了 383 块小愈伤组织, 其中 32 块分化出芽, 形成 20 株完整植株, 驯化后栽培成活 8 株, ZS₂、ZS₆、ZS₈ 等 3 株不育, 后用保持系花粉授粉, 分别收获种子。对胞质杂种的分子、细胞及生化分析将在其后代中继续进行。

关键词: 不结球白菜; 电融合; 再生植株; 胞质杂种

中图分类号: S 634.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 06 0532-06

经由萝卜胞质不育转育获得的不结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) OguCMS 系统由于苗期低温黄化和花器蜜腺发育不良而难以应用于生产, 且苗期黄化是该 CMS 系应用上的主要障碍, 它主要是因为萝卜胞质中的叶绿体基因组与不结球白菜核之间的不协调而引起的不良反映。芸薹属的 CMS 特性均与线粒体有关, 而线粒体基因组控制的 CMS 性的产生, 使叶绿体 DNA 发生了相应的变化, 因此异源胞质植株上最常见的异常现象就是叶绿素缺乏症和雄性不育, 这些异常可能是核与叶绿体之间功能性不亲和的结果。国内外众多研究者试图通过常规手段从芸薹属作物品种中筛选“缺绿”的“校正基因”和 CMS 性状的恢复基因以改变胞质遗传背景, 结果均告失败。这是因为通过有性杂交, 杂种的细胞质几乎全由母本提供, 其结果必然是要么后代的胞质得不到改变, 要么完全改变, 从而导致不育性的丧失。因此, 必须采用既能保持线粒体不育胞质, 又能使叶绿体基因组与核基因组亲和的特殊手段, 而利用非对称细胞融合获得“胞质杂种”是有希望的手段之一。通过胞质基因组的转移, 与相应的保持系形成“胞质杂种”, 便能向萝卜胞质掺入正常的不结球白菜胞质, 以改善胞质与核的协调性, 从而使其既保持 CMS 特性, 又克服原有苗期低温黄化缺陷, 经过严格的鉴定筛选, 便有希望获得无黄化、有蜜腺的 CMS 系。

叶志彪等曾对核失活的萝卜 OguCMS 与线粒体失活的花椰菜原生质体进行了融合研究, 用化学方法 (PEG) 诱导的融合, 细胞分裂能力弱, 不能再生出植株; 用电融合的原生质体则再生出植株^[1]。在植物细胞融合研究中, 电融合方法操作简单, 无化学毒性, 对细胞损伤小, 融合同步并可可在显微镜下观察融合过程^[2,3]。但对于不同作物, 电融合处

收稿日期: 2001-04-09; 修回日期: 2001-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39170396); “九五”国家科技攻关项目 (9600202-19 003)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

理条件差异较大^[4]。因而需在细胞电融合研究中, 首先找出适宜的融合条件, 以提高融合率及植板率。本研究旨在通过用具有正常叶绿体基因组的不结球白菜(保持系)与带有萝卜胞质(OguCMS)的不结球白菜雄性不育材料进行非对称细胞融合, 探讨不同电融合条件下非对称细胞融合的效果, 为创建不结球白菜胞质雄性不育新种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料的制备

OguCMS 不育材料为‘91H 秋-100’(BC₇), 低温下黄化, 无蜜腺; 保持系为‘91H 秋-21’。采用南京农业大学细胞遗传研究所研制的“南京 CY-II”型细胞融合仪^[5], 交流输出电压 0~40 V, 频率 50~2000 kHz; 直流方波脉冲电压 0~500 V, 脉冲幅宽 5 μ s~2 ms, 脉冲次数 1~9 次可调。电极为一块平行放置的铜片嵌在 25 mm×76 mm 的光滑有机玻璃中, 电极间距为 2 mm, 容积为 100 μ L, 使用时将电极浸泡在 75% 酒精中 30 min, 取出后用无菌重蒸水洗 3 次, 融合液洗 1 次, 备用。OguCMS 下胚轴原生质体及保持系子叶原生质体的制备, 按侯喜林和曹寿椿的方法^[6-9]进行。将获得的 OguCMS 下胚轴原生质体进行核失活处理, 先将其密度调整为 1.5×10^5 个/mL, 分装在小玻璃指形管中(10 滴/管), 以剂量率为 15 Gy/min 的⁶⁰Co 照射。核失活的半致死剂量(LD₅₀)为 140 Gy。保持系子叶原生质体线粒体的失活处理: 将罗丹明(R-6G)溶解于含 10.0 g/100 mL 二甲基亚砜(DMSO)的融合液中, 配成 1 mg/mL 的母液, 抽滤灭菌。处理浓度和时间分别为 40 μ g/mL 和 30 min(包括离心所需时间)。

1.2 电融合处理与观察方法

将核失活的 OguCMS 下胚轴原生质体与线粒体失活后的保持系子叶原生质体按 1:1 的比例混合, 在融合电极间进行融合。进行不同交流场强、交流频率、直流脉冲场强、幅宽及脉冲次数处理。处理后立即在倒置显微镜下观察统计细胞融合及细胞破裂情况, 每个处理观察 10 个视野。将融合处理后的细胞在 25℃ 黑暗条件下, 含有 0.5 mol/L 甘露醇及 2, 4-D 0.5 mg/L、6-BA 0.25 mg/L、NAA 1.0 mg/L 的 KM8P₁ 培养基中培养 48 h 后, 转到含 0.3 mol/L 甘露醇的相同培养基中培养, 以后每隔 48 h 分别将甘露醇降到 0.2 mol/L 和 0.1 mol/L, 1 周左右转移到无甘露醇的培养基中进行液体浅层培养。4 周后调查小愈伤组织发生情况, 统计植板率, 以估计细胞的活力。

原生质体电融合可分为两个过程, 首先是原生质体在交流电场中彼此接触并排成串, 然后在直流脉冲下, 部分彼此接触的原生质体发生融合。由于本试验中不结球白菜保持系子叶含有明显的叶绿体而区别于白色的 OguCMS 下胚轴原生质体, 易于在显微镜下精确地研究融合条件。

1.3 融合产物的培养

融合产物与等量的 2 倍 KM8P₁ 培养基混合后, 进行液体浅层培养和包埋培养, 60 h 左右进行第一次分裂, 前 2 周为暗培养, 之后于散射光下培养, 1 个月后获得肉眼可见的愈伤组织, 并将其增殖, 转移到分化培养基中分化出不定芽。不定芽生根后形成完整幼苗, 经炼苗后转移到钵中栽培。

2 结果与分析

2.1 不同交流场强和频率对细胞成串及融合率的影响

从表 1 可以看出, 交流场强直接影响到原生质体的成串效果和融合频率, 当场强低于 10 V/cm 时, 原生质体不能成串。场强为 20 V/cm, 原生质体串长最大; 以后随着场强的增大, 串长降低。交流场强为 20 V/cm 时 (交流频率为 1500 kHz) 可得到最大的 1 对 1 融合频率 (28.6 %), 而此时的原生质体平均成串为 18 个细胞。

表 1 表明, 随着交流电场的频率升高, 原生质体成串变得容易, 串长也明显增加。当交流频率为 1500 kHz, 融合频率达最高 (26.4 %)。

表 1 不同交流场强和交流频率对原生质体融合的影响
Table 1 Effects of different alternating current field intensity and frequency on the cell fusion

交流场强 Alternating current field intensity (V/cm)	成串细胞数 No. of cells	融合率 Fusion rate (%)	交流频率 Alternating current field frequency (kHz)	成串细胞数 No. of cells	融合率 Fusion rate (%)
5	0	0	100	0	0
10	6	9.4	500	5	11.2
20	18	28.6	1000	9	16.7
30	10	16.9	1500	16	26.4
40	5	8.2	2000	7	21.6

2.2 不同直流场强和幅宽对细胞融合率及植板率的影响

在所有电场参数中, 直流脉冲场强对原生质体融合的影响最为直接。表 2 表明, 随着场强的增大 (50~ 200 V/cm), 融合频率和植板率不断上升, 但场强达到 250 V/cm 后则开始下降, 当场强达 300 V/cm 时, 原生质体就出现破碎现象。可见, 融合频率以 200 V/cm 时最高 (21.4 %)。在本试验中, 场强为 50~ 100 V/cm 时细胞融合率和植板率都很低, 说明直流场强不宜低于 100 V/cm。西尾刚^[10]在甘蓝与白菜的细胞融合中也观察到类似结果。

直流脉冲的幅宽代表了高压直流脉冲作用于原生质体上时间的相对长短。幅宽的增加能显著提高原生质体融合频率, 在 1500 kHz, 20 V/cm 的交流电场和 200 V/cm 的直流场强下, 幅宽从 10 μ s 升到 40 μ s, 融合频率不再升高, 植板率略有增加, 但 50 μ s 的直流幅宽能引起原生质体破碎 (表 2)。本试验中最适直流幅宽为 40 μ s, 处理时间太短, 则影响细胞相互靠近, 从而影响细胞融合率^[11]。

表 2 不同直流场强和直流幅宽对融合的影响
Table 2 Effects of different direct current intensity and pulse width on the cell fusion

直流场强 Direct current intensity (V/cm)	融合率 Fusion rate (%)	植板率 Plating efficiency (%)	直流幅宽 Direct current pulse width (μ s)	融合率 Fusion rate (%)	植板率 Plating efficiency (%)
50	6.3	4.2	5	10.2	5.8
100	10.6	8.2	10	21.6	16.3
150	16.7	19.6	20	20.3	16.6
200	21.4	18.4	30	20.8	17.3
250	13.6	6.6	40	21.4	16.9
300	3.2	0	50	2.6	0

2.3 不同脉冲次数对细胞融合率及活力的影响

不同的直流场强下, 脉冲次数对融合有一定的影响, 低场强下, 重复电击有助于融合频率的升高。表 3 表明, 当直流场强为 200 V/cm, 3 次脉冲处理, 其细胞融合率 (18.6%) 及植板率均较高 (13.8%), 说明脉冲强度与脉冲次数达成最佳组合, 有利于提高融合效率。

2.4 融合产物培养和愈伤组织的形成及植株再生

本研究用 2 种方法对融合产物进行培养。但液体浅层培养未获得再生植株, 这可能是由于培养密度低而带来的结果。用 KM8P₁ 附加 2, 4-D 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.25 mg/L 培养基进行包埋培养, 获得了 383 块小愈伤组织, 愈伤组织增殖后转移到 MS + 6-BA 10.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L 分化培养基上, 其中 32 块分化出不定芽, 形成完整再生植株 20 株。经驯化后, 在温室盆钵中栽培, 成活 8 株, 编号为 ZS₁~₈, 其中 3 株不育 (ZS₂、ZS₆、ZS₈), 5 株可育。ZS₂、ZS₆、ZS₈ 3 株不育株, 在套袋隔离条件下, 用保持系的花粉授粉, 分别收获种子。另 5 株可育株, 采用自交和成对交方法, 分别留种。

表 3 脉冲次数对融合率和植板率的影响

Table 3 Effects of direct pulse number on cell fusion and plating efficiency

脉冲次数 Pulse number	融合率 Fusion rate (%)	植板率 Plating efficiency (%)
1	4.1	4.6
2	10.6	13.4
3	18.6	13.8
4	12.3	7.6

注: 直流场强为 200 V/cm。
Note: The direct current intensity was 200 V/cm.

表 4 细胞融合再生植株后代的田间表现
Table 4 The characters in field of the regenerated plants from cell fusion

再生株编号 No. of plant	调查株数 Total number	田间表现 Charaters in field
ZS ₁	56	全部可育, 不黄化, 蜜腺正常 All fertile, no chlorosis, with normal nectary
ZS ₂ (A)	15	全部不育, 均不黄化, 无蜜腺 All sterile, no chlorosis, no nectary
ZS ₃	28	全部可育, 不黄化, 蜜腺正常 All fertile, no chlorosis, with normal nectary
ZS ₄	14	全部可育, 不黄化, 蜜腺正常 All fertile, no chlorosis, with normal nectary
ZS ₅	10	全部可育, 不黄化, 蜜腺正常 All fertile, no chlorosis, with normal nectary
ZS ₆ (A)	10	全部不育, 均不黄化, 花药、蜜腺有性状分离。其中 6 株的花药为花瓣状 (原始型)、无蜜腺; 另 4 株花药退化正常, 不育度、不育率均为 100%, 2 株无蜜腺, 2 株具 4 个发达的蜜腺。 All sterile, no chlorosis, with seperated charaters of anther and nectary. Six plants with wide type anther and no nectary. Other four plants with degenerated anther and 100% sterile degree and sterile rate. Among them two having no nectary and the other two having four developed nectary.
ZS ₇	5	全部可育, 不黄化, 蜜腺正常 All fertile, no chlorosis, with normal nectary
ZS ₈ (A)	3	全部不育, 均不黄化, 无蜜腺 All sterile, no chlorosis, no nectary
保持系 (CK ₁)	30	全部可育, 不黄化, 蜜腺正常 All fertile, no chlorosis, with normal nectary
OguCMS (CK ₂)	30	全部可育, 叶片黄化, 无蜜腺 All fertile, chlorosis, no nectary

2.5 细胞融合再生植株后代的主要性状表现

表4表明, 5株细胞融合再生出的可育株后代均表现可育, 低温下不黄化, 蜜腺正常, 与保持系完全一致, 在本研究中无利用价值。 $ZS_2(A)$ 和 $ZS_8(A)$ 后代全部不育, 虽叶片不黄化, 但均无蜜腺, 也无利用价值。只有 $ZS_6(A)$ 后代中的2株(完全不育、低温下叶片不黄化、有蜜腺)有利用价值, 编号分别为 $ZS_6(A)_3$ 和 $ZS_6(A)_{10}$; $ZS_6(A)_3$ 全株共调查了360朵花, 全部有4个蜜腺, $ZS_6(A)_{10}$ 共调查了267朵花, 也全部有4个蜜腺。将 $ZS_6(A)_3$ 和 $ZS_6(A)_{10}$ 分别套袋隔离, 用保持系的花粉继续授粉, 单株收获种子, 供进一步进行细胞质鉴定用。

3 讨论

本试验统计的细胞融合率, 包括了2个以上细胞的融合, 在体细胞杂交中, 希望得到两个不同材料来源细胞的融合, 再生植株才可称为体细胞杂种植株。试验中统计的融合率实际上也包括了同一材料来源的细胞融合, 而且有些细胞融合后不久就产生破裂, 因而与实际融合率有一定差异。

因本试验中OguCMS不育材料的种子采用暗培养, 故下胚轴原生质体中没有叶绿体, 而保持系材料的种子采用光照培养, 则子叶原生质体中含有较多的叶绿体。在电融合过程中, 利用上述两者之间的差异, 显微镜下很容易区别开OguCMS自体融合(两个细胞均无叶绿体)、保持系自体融合(两个细胞均有叶绿体)和双亲融合(一个细胞有叶绿体, 另一个细胞不含叶绿体)。本试验未将双亲融合的细胞挑选出来进行单独培养, 是由于双亲细胞在融合前分别进行了 ^{60}Co 照射和R-6G处理, 细胞再生能力受到很大影响, 如果再将融合后的双亲细胞挑选出来(挑选细胞的过程对其细胞再生能力伤害很大)进行培养, 植株再生率极低, 几乎为零。

从育种角度来讲, 在进行体细胞杂交时需注意: ①有目的地选择亲本材料和多注意选择近缘种间的原生质体融合, 这样易于得到具有期望优良性状的杂种后代; ②不仅要利用对称的体细胞杂种, 而且要特别重视利用不对称杂种和胞质杂种。因为不对称杂种只是DNA重组没有额外的染色体, 胞质杂种避免了胞质基因供方的野生性状进入杂种, 其遗传性状稳定地遗传, 是最有希望成为能直接用于育种的简便、有效途径。体细胞杂交可以实现有用性状的转移, 这已被无数次试验所证明, 但野生种某些劣质性能在杂种中也得到表现, 如烟草叶难变黄、烟叶烤后色泽暗、烟叶蛋白质含量偏高等^[12], 通过回交就可以避免这些性状的出现。

在进行植物原生质体融合研究中, 过去往往只重视得到再生植株, 至于再生植株的数量, 是否获得后代重视不够, 并且忽视再生植株后代的观察和育种上的应用。因此, 应提倡生物技术同常规育种相结合, 取长补短, 充分利用宝贵的再生植株为育种工作服务。

形态学特征是判断所获得的体细胞杂种植株是否有利用价值的最基本而又最重要的指标; 细胞染色体数目结合形态学特征可以可靠地证明融合产物的杂种本质; 同工酶的电泳带型多态性分析是鉴定种内体细胞杂种的常规方法; 近年来发展起来的分子生物学鉴定手段, 使鉴定技术更加先进、可靠。对本研究获得的胞质杂种的分子、细胞及生化分析鉴定将在其后代中进行。

参考文献:

- 1 叶志彪, 李汉霞. 人工合成甘蓝 CMS 中影响原生质分裂和融合的因子分析. 华中农业大学学报, 1994, 17 (增刊): 15~ 18
- 2 郑 强. 细胞融合技术的新进展. 生物工程学报, 1989, 5 (3): 185~ 190
- 3 孙勇如. 植物体细胞杂交的进展. 生物工程学报, 1989, 5 (3): 191~ 194
- 4 孙振久. 不同电融合条件对甘蓝与萝卜细胞融合效果的影响. 西北农业学报, 1993, 2 (2): 20~ 22
- 5 周静娴, 姚国顺. 南农 CY-2 型细胞融合仪的研制及其应用. 南京农业大学学报, 1990, 13 (1): 1~ 7
- 6 侯喜林, 曹寿椿, 余建明, 等. 不结球白菜 OguCMS 下胚轴原生质体培养再生植株. 园艺学报, 2000, 27 (6): 449~ 451
- 7 侯喜林, 曹寿椿, 余建明, 等. 不结球白菜子叶原生质体培养再生植株. 南京农业大学学报, 2000, 23 (4): 17~ 20
- 8 侯喜林, 曹寿椿. 不结球白菜原生质体培养及再生植株方法. 中国, 发明专利公报, 99114127 X (CN 1231114A). 1999 10 13
- 9 侯喜林, 曹寿椿. 不结球白菜非对称细胞融合方法及其获得的再生植株. 中国, 发明专利公报, 99114125 3 (CN 1232608A). 1999 10 27
- 10 西尾刚. 電気融合法による Brassica oleracea と Brassica campestris の体細胞雑種の作出. 野菜茶業場試験報告, 1987, AI: 165~ 172
- 11 Yamanaka H. Somatic hybrid production through protoplast fusion between Japanese radish and coulfiflower. Hort. Soc., 1990, 59 (2): 284~ 285
- 12 龚明良, 卜锅章, 丁昌敏, 等. 烟草原生质体融合选育新品种新进展. 见: 简玉瑜主编. 农业科学集刊 (第二集). 北京: 中国农业出版社, 1995. 13~ 19

Synthesis of Cytoplasm Hybrid of Non-heading Chinese Cabbage through Asymmetric Electric Fusion of Protoplast Cell

Hou Xilin¹, Cao Shouchun², She Jianming³, and Lu Weizhong³

(¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

²College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ³Institute of Genetics and Physiology, Jiangsu Agricultural Academic Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: The effects of different electric fields on the asymmetrical cell fusion of non-heading Chinese cabbage was studied by using OguCMS 91 Hqir 100 (sterile line) and 91 Hqir 21 (maintainer line) as materials. The best electric field for electric fusion was as follows: alternating current field intensity (20V/cm), alternating current frequency (1500 kHz), direct current intensity (200 V/cm), direct current pulse width (40 μ s), direct pulse number (3 times). The product of the fusion was embedded and cultured on KM8P₁ medium. 383 calli were obtained. Of these calli, 32 shoots differentiated and 20 plantlets developed. 8 plantlets were successfully transplanted after acclimatization. Three of the plants were sterile. They set seeds after pollination with the maintainer pollen. Molecular, cellular and biochemistry analysis will be made on their progeny.

Key words: Non-heading Chinese cabbage; Electro-fusion; Regenerated plantlet; Cytoplasm hybrid