

紫罗兰与桂竹香原生质体培养 及电激细胞融合的研究^{*}

黄家总¹, 冈田芳明², 傅家瑞³

(1. 广东农垦科技中心, 广东 广州 510640;

2. 奈良县田原本高等农业学校, 日本, 奈良;

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 采用电激细胞融合的方法, 对紫罗兰 *Matthiola incana* R. Br 与桂竹香 *Cheiranthus cheiri* L. 原生质体培养及电激细胞融合效率导入最适条件作了探讨。紫罗兰的子叶原生质体分裂初期培养最适条件: 培养基为 1/2MS, 培养基组成中, 蔗糖质量分数为 4%、甘露糖醇浓度为 0.6 mol/L。加入谷酰胺酶无机态氮源时, 效果明显。次之, 加入植物生长调节物质 1 mg/L BA 也达到高分裂率。再者, 添加玉米素时效果也甚好。根据原生质分离前的子叶在 5℃预处理分裂率最高, 培养温度 24~30℃为宜。电激细胞融合 (singlepairs) 产生效率高的条件为: 紫罗兰原生质体密度 1×10^6 个/mL, 高周波电强度 1 MHz, 150 V/cm, 脉冲幅 70 μ s; 桂竹香原生质体密度 1×10^6 个/mL 高周波电强度 1 MHz, 100 V/cm, 脉冲幅 30 μ s。

关键词: 紫罗兰 *Matthiola incana* R. Br; 桂竹香; 原生质体; 电激; 细胞融合

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 03-0064-05

紫罗兰 *Matthiola incana* R. Br 原产地中海。属于十字花科植物, 是当今世界花卉销售量中较大切花品种之一。但其花色单调, 仅有白色、浅黄色、青紫色、红紫色系品种。目前价值高, 需求量大的紫罗兰深黄色的切花品种。为了培育深黄色的紫罗兰切花新品种, 日本等国作了大量的研究工作, 尚未见取得成功的报道。

桂竹香 *Cheiranthus cheiri* L. 与紫罗兰同科, 不同属。原产地中海。桂竹香花色为深黄色、橙色。但花茎短作为切花不如紫罗兰。把桂竹香的深黄色花的遗传基因导入紫罗兰, 培育出新花色的属间新品种为本研究目的。

1 材料和方法

1.1 材料

紫罗兰与桂竹香种子由日本 TAKII 种子公司提供。用 $\varphi=1\%$ 次亚盐酸钠 20 min 对紫罗兰种子进行消毒。然后用灭菌水连续 3 次洗净, 采用 1/2 MS 基本培养基, 加入 20 g/L 蔗糖、100 mg/L 肌醇、500 mg/L Kazamino acid、pH 5.5, 在无菌条件下播种。经 3~4 d 后发芽, 7~15 d 子叶完全展开时作为供试材料。

1.2 原生质体的分离及精制步骤

将子叶细切至 1 mm 大小, 放入 0.6 mol/L 甘露糖醇溶液里, 用体积分数为 0.1% cellulase RS、0.1% Macerozyme R-10、0.01% Pectolyse Y23 及 0.5% dextran KHSO₄ 溶解后酶液里浸泡, 在 24℃暗室静置 16~17 h 后分离处理。接着用 40 μ m 尼龙筛过滤, 过滤后从 50%与 20%溶液层的上层中取样 100 g, 离心处理 6 min, 把形成含有原生质体层取出, 置入含有 0.6 mol/L 甘露糖醇的 1/2 MS 培养基, 再进一步取样 100 g 进行离心处理 2 min 后洗净。原生质体培养基采用 1/2 MS + 20 g/L 蔗糖 + 100 mg/L 肌醇 + 500 mg/L Kazamino + 0.6 mol/L mannitol + 1.0 mg/L BA 或 BM 培养基 + NAA 1.0 mg/L。

1.3 培养条件的控制

采用直径 3 cm 的培养皿。培养密度为 5×10^4 个/mL。在 24℃暗室并荧光灯下 3 000 lux 培养。从培养后第 1 周对原生质体分裂状况进行调查, 每处理抽样 2 个培养皿, 每个培养皿最少具有 250 个原生质体以上, 分裂率 = 分裂原生质体/原生质体总数 $\times 100\%$ 。

从 BM 培养基中除去 NH₄NO₃ 分别加入蔗糖、甘露糖醇、谷酰胺酶以及植物生长调节物质等培养观察。

* 收稿日期: 2002-06-16

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (980737)

作者简介: 黄家总 (1956年生), 男, 副研究员; E-mail: hjzong@163.net

1.4 紫罗兰与桂竹香的电激细胞融合法

采用紫罗兰 Little Zemu white 与桂竹香 Alldouble 种子。在无菌播种后 10 d 幼苗叶原生质体分离，取出含有原生质体部分，用 2.5 mmol/L CaCl₂、0.6 mol/L 甘露糖醇（桂竹香 0.7 mol/L）溶液混合，取 100 g 离心处理 2 min 后洗净，作为融合时所用溶液。采用细胞电激融合装置（岛津 SSH-1），及 SHAPP SSH-CO₂（容积 0.4 mL、电极间隔 1 mm）。本实验进行对原生质体融合的影响主要物理条件作探讨。

2 结果和分析

2.1 紫罗兰的子叶原生质体的初期培养

2.1.1 蔗糖质量分数的影响 蔗糖质量分数为 0、1%、2%与 4%的培养基中的结果见图 1。w=4%蔗糖原生质体分裂率最高，达 25.1%。蔗糖的质量分数低，分裂率也低。

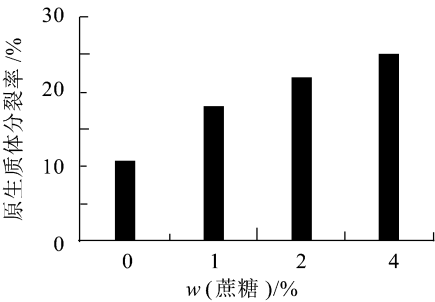


图 1 蔗糖浓度紫罗兰原生质体分裂的影响

Fig. 1 Effects of sucrose on protoplast separation of stock

2.1.2 预处理与培养基的 NH₄NO₃ 及培养温度的影响 结果见图 2。首先，培养基中添加 1/2 浓度 NH₄NO₃ 区比无添加分裂率高，从预处理看在 30 ℃培养条件下无添加 NH₄NO₃ 无预处理分裂率为 0。预处理区分裂率为 10.3%。与其它区比较，预处理比无处理分裂率高 2 倍以上。从培养温度可见，24 ℃的比 30 ℃的分裂率高。用含有 1/2 浓度 NH₄NO₃ 培养基进行预处理，在 24 ℃条件下培养，分裂率为最高，即 17.6%。

2.1.3 预处理温度与甘露糖醇浓度的影响 预处理温度 5 ℃、25 ℃与甘露糖醇浓度 0.6 mol/L、0.8 mol/L 组合处理结果，见图 3。甘露糖醇浓度 0.6 mol/L 比 0.8 mol/L 与 5 ℃比 25 ℃分裂率高约 2 倍。分裂率最高 5 ℃处理、甘露糖醇浓度 0.6 mol/L 培养基中培养，即达 22.9%。

2.1.4 预处理与添加谷酰胺酶及培养光照的影响 添加 30 mol/L 谷酰胺酶培养基的原生质体培养 1 周

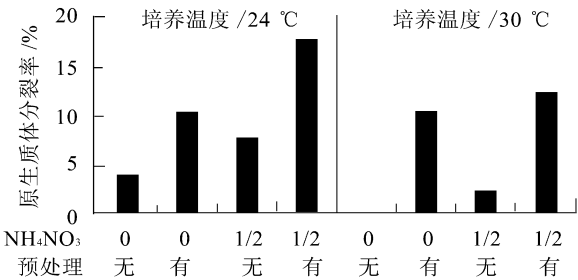


图 2 预处理与培养基的 NH₄NO₃ 及培养温度对紫罗兰原生质体分裂的影响

Fig. 2 Effects of pre-treatment, medium NH₄NO₃ and temperature separation on the protoplast separation of stock

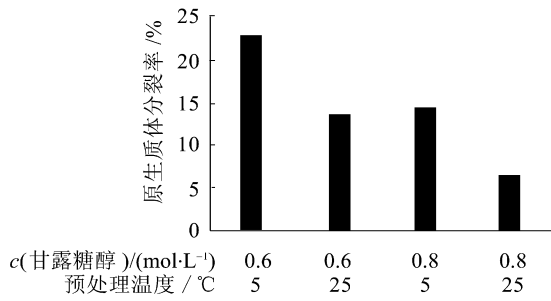


图 3 预处理温度与甘露糖醇对紫罗兰原生质体分裂的影响

Fig. 3 Effects of pre-treatment temperature and mannitol concentration on stock protoplast separation

全部死亡。预处理与添加 10 mol/L 谷酰胺酶，无论是暗室或明室分裂率都超过 20%。无预处理明室条件下，添加谷酰胺酶比无添加的分裂率高。从光照培养可见暗室与明室条件下没有明显差异。用 5 ℃预处理，添加 10 mol/L 谷酰胺酶，在暗室中培养下，分裂率为最高，达 23.3%。

2.1.5 植物生长调节物质的影响 结果见表 1。添加 1.0 mg/L BA 比 5.0 mg/L BA 分裂率高。而添加 0.5 mg/L 玉米素时，与 NAA 的浓度没有关系，其分裂率基本一样，比 5.0 mg/L BA 区分裂率高。最高分裂率区 1.0 mg/L BA 与 0.5 mg/L NAA 组合，达 29.7%。

表 1 BA、玉米素与 NAA 对原生质体分裂的影响
Tab. 1 Effects of BA, Zeatin and NAA on Protoplast separation

项目	ρ(NAA) / (mg·L ⁻¹)		
	0	0.5	1.0
BA(1.0 mg/L)	18.3	29.7	20.4
BA(5.0 mg/L)	12.3	17.3	19.8
玉米素(0.5 mg/L)	23.3	23.3	22.5

2.2 紫罗兰与桂竹香的电激细胞融合法

2.2.1 原生质体密度与高周波电强度对珍珠链 (pearlchain) 状形成的影响 将紫罗兰的原生质体密度分别调整为 5×10^4 个/mL 与 1×10^5 个/mL。高周波使原生质体排列叫 pearlchain, 2 个原生质体并在一起叫 Singlepair。在原生质体密度相同的情况下, pearlchain 形成大致一样。但密度不同的情况下, 密度高的原生质体珍珠链状形成比率高。密度低的情况下 1 个原生质体存在的比率占 60% 左右, 密度高时 40%~50%, 同时 3~4 个长珍珠链状形成明显增加的倾向 (图略)。

根据桂竹香的原生质体密度调整为 1×10^5 个/mL 与 2×10^5 个/mL 的实验结果。桂竹香的子叶原生质体比紫罗兰的小, 所以采用密度高进行, 其结果与紫罗兰同样。

本实验的目的, 希望达到原生质体 1 个与 1 个融合, 形成 singlepair 比率高。紫罗兰原生质体密度 1×10^5 个/mL, 高周波电强度 1 MHz, 150 V/cm。桂竹香原生质体密度 1×10^5 个/mL, 高周波电强度 1 MHz, 100 V/cm 的条件为最佳。

2.2.2 直流高电压脉冲时原生质体融合的影响 结果见表 2, 高压电脉冲条件下, 对紫罗兰原生质体融合与破损的影响, 原生质体融合状况见图 4。同样的脉冲电压情况下, 脉冲幅越长原生质体的融合, 率越高但破损率也高。脉冲电压 2.0 kV/cm, 脉冲幅 70 μ s 条件下, 原生质体破损率达 43.67%。同样的脉幅, 脉冲电压大些, 融合率有高的倾向, 破损率也高。2 个原生质体融合率最高时, 脉冲电压 1.5 kV/cm, 脉冲幅 70 μ s 条件下, 融合率为 3.46%。

表 2 直流脉冲与脉冲幅对紫罗兰原生质体融合与破损的影响
Tab 2 Effects of VDC and PW on fusion and destruction of stock protoplast 1×10^5 个/mL

I ($\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$)	脉冲幅 μs	多细胞融合率/%	2 细胞融合率/%	非融合/%	破损率/%
10	30	0	0.34	84.29	15.36
	50	0.10	0.50	81.00	18.39
	70	0	1.15	73.75	25.10
15	30	0	1.78	67.76	30.46
	50	0	2.68	62.13	35.19
	70	1.18	3.46	65.64	30.71
20	30	0.39	2.33	61.26	36.02
	50	0.19	2.89	55.52	41.67
	70	0.10	2.33	53.90	43.67

桂竹香的原生质体融合状况见表 3。脉冲电压

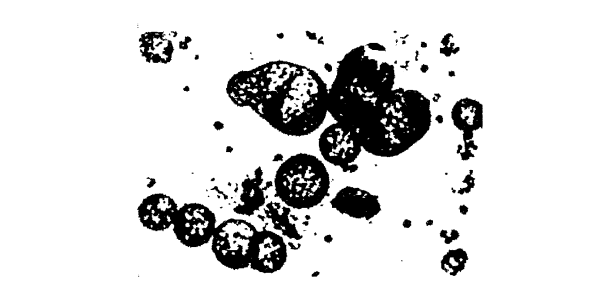


图 4 紫罗兰原生质体的融合状况
Fig 4 The fusion condition of stock protoplast

与脉冲幅大时与紫罗兰的结果同样, 即融合率与破损率高, 但比紫罗兰融合率高, 3 个以上融合比率增加。

在脉电压 2.0 kV/cm, 脉冲幅 70 μ s 条件下, 原生质体破损率达 33.84%, 比紫罗兰低 10%。2 个原生质体融合率最佳条件为脉冲电压 2.0 kV/cm, 脉冲幅 30 μ s, 融合比率达 16.6%。

表 3 直流脉冲与脉冲幅对桂竹香原生质体融合与破损的影响
Tab 3 Effects of VDC and PW on fusion and destruction of wallflower protoplast 1×10^5 个/mL

I ($\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$)	脉冲幅 μs	多细胞融合率/%	2 细胞融合率/%	非融合/%	破损率/%
10	30	2.06	9.35	74.21	14.21
	50	2.16	11.96	68.43	17.45
	70	2.87	13.38	64.44	19.31
15	30	1.63	9.80	57.35	31.22
	50	2.23	10.00	55.67	32.19
	70	1.87	10.40	48.23	39.50
20	30	3.23	16.16	55.15	25.45
	50	3.47	12.37	54.40	29.40
	70	1.72	12.73	54.40	33.81

3 讨论

Hosoki 等关于紫罗兰原生质体再分化的研究报告中结论, 从种子的愈伤组织分离出原生质体, 改变 MS 培养基中 ($200 \text{ mg/L NH}_4\text{NO}_3$) 的大量元素, Ringe. Nitsch 的微量元素, 改变维生素溶液 (0.5 mg/L 烟酸, 0.4 mg/L 维生素 B_1), 添加 0.2 mg/L 、 2.4D 1 mg/L NAA、 1 mg/L BA、 $w = 8.1\%$ 甘露糖醇、 1% 葡萄糖及 1% 蔗糖进行培养, 分裂诱导, 经过细胞团及愈伤组织形成。9%~11% 形成不定芽。本实验中, 蔗糖质量分数为 4% 时, 分裂率高 (图 1)。可见子叶原生质体的初期培养高质量分数的蔗糖是必要的。根据西尾等^[3]的报告, 紫罗兰与同科羽衣甘蓝的叶肉原生质体的培养, 采用 $1/2$ MS 培

培养基添加 NH_4NO_3 质量浓度为 0、100、200、400、800、1 600 及 3 200 mg/L 时, 羽衣甘蓝叶肉原生质体的培养添加 NH_4NO_3 100 mg/L 或 200 mg/L 的分裂率最高。紫罗兰原生质体培养, 添加 NH_4NO_3 400 mg/L 时比无添加分裂率高 (图 2)。培养基中氮源可从 KNO_3 、 NHNO_3 及其之各种氨基酸考虑。根据 Kamada 等^[3] 研究报告, 在诱导红萝卜的愈伤组织不定芽时, 在未含无机态氮源 MS 培养基中改变氨基酸氮源, 添加谷酰胺酶 (0.1、0.5、1.5、10、20 及 30 mg/L), 效果明显。Weatherhead 等^[4] 在马铃薯的花粉培养时, 采用含有谷酰胺酶或天冬酰胺的培养基, 形成不定芽。本实验在无添加谷酰胺酶的 BM 培养基与未含无机态氮 BM 培养基中添加 10 及 30 mol/L 谷酰胺酶比较结果。添加 10 mol/L 谷酰胺酶的培养基分裂率最高。作者认为, 还有其它几种氨基酸 (谷酰胺酶酸、天门冬酰胺、天门冬酰胺酸、丙氨酸等), 对原生质体分裂也有一定的作用效果。

关于预处理结果, 根据 Arai 等^[5] 采用香石竹叶肉原生质体培养研究报告。叶片或植物体自体的 5°C 左右低温处理及用水或 ABA 溶液浸渍预处理, 能促使细胞团形成。所以, 原生质体的分裂活性的原因, 被认为预处理发生膜蛋白的变化。Mokapatra 等^[6] 在苜蓿的实生在低温及 ABA 溶液处理, 进行 2 次电泳研究结果。预处理的各个凝胶体与无处理的实生膜蛋白的的差异发生突变现象, 低温或 ABA 处理, 形成新的多肽酶链。本实验采用水浸渍的方法进行预处理, 结果增强子叶自体的硬度, 容易切割。培养时获得非常高的分裂率。又进一步低温 5°C 预处理比 25°C 处理结果更加明显 (图 3)。

植物生长调节剂物质对原生质体的分裂有明显作用。西尾等^[7] 采用含有 NAA 与 BA 的培养基对椰菜原生质体培养的结果。含有 5 mg/L NAA 与 0.2 mg/L 或 0.5 mg/L BA 的培养基分裂率高。添加 0.2 mg/L NAA 时, 与 BA 浓度没有关系, 未见分裂现象。这说明原生质体分裂率与 NAA 浓度变化相关, 而 BA 浓度影响小。本实验的紫罗兰情况来看, NAA 的影响也比 BA 大 (表 1)。添加 0.5 mg/L NAA 与 1 mg/L BA 分裂率高。

细胞融合育出细胞杂种的技术是常用交配受精不可能组合获得杂种。一般采用长田^[8] 聚乙烯醇 (PEG) 处理方法, 高 pH Ca 法。另有电激融合法, Zimmermann^[9] 曾作过论述。这种方法操作容易, 短时间内可能达到大量融合, 没有毒性, 与 PEG 比较有很多所长的优点。

电激融合法分两阶段操作。首先, 采用高周波

电强度 (一般 0.5 ~ 1.5 MHz, 100 ~ 300 V/cm 的范围), 原生质体珍珠链状形成后再用高电压脉冲作用融合。三浦等^[10] 研究发现, 烟草叶肉原生质体采用固定的电强度 100 V/cm , 用波数 0.25、0.5、1、2 MHz 的改变, 用 0.25 MHz 时原生质体不泳动, 0.5 MHz 时边转动边泳动。1 及 2 MHz 时不转动会泳动, 并形成良好的珍珠链状。本实验采用周波数 1 MHz 固定进行。

根据山口等^[11] 香石竹与翟麦融合结果, 原生质体的悬浊液中对珍珠链状形成影响的抵抗值进行调查, 采用 0.5 mol/L 的甘露糖醇的悬溶液, 1×10^5 个 mL 、1 900 Ω 、 2×10^5 个 mL 、130 Ω 、 4×10^5 个 mL 、1 200 Ω , 珠链状形成良好。采用 0.5 mol/L 的甘露糖醇 + CPW 盐液时, 抵抗值 50 Ω 以下不发生融合。本实验原生质体悬溶液为 2.5 mol/L 氯化钙 + 0.6 mol/L (0.7 mol/L) 甘露糖醇, 紫罗兰原生质体密度 5×10^4 及 1×10^5 个 mL , 桂竹香 1×10^5 及 2×10^5 个 mL 分别融合的结果, 发现原生质体泳动迅速。紫罗兰在 150 V/cm , 桂竹香 100 V/cm 的作用下, 不管哪种密度原生质体配对融合率都最高。本实验对紫罗兰与桂竹香分别进行, 实际上两者的原生质体混合, 电强度低的条件下, 作者认为原生质体受损伤很小, 为下一步两者原生质体融合摸索出成功条件。

珍珠链 (pearlchain) 形成后融合频率取决于高电压脉冲的电强度与脉冲幅。根据西尾等^[2] 椰菜与小松菜原生质体的融合结果, 2.35 kV/cm , 30 μs 的脉冲 2 次作用时融合率较高。形成愈伤组织, 再分化成不定芽。2.35 kV/cm , 30 μs 的脉冲增加 3 次时, 造成原生质体大量破坏。本实验为了达到 2 个原生质体融合的目的。2 个原生质体的融合率最佳条件, 紫罗兰 1.5 kV/cm , 70 μs , 脉冲 1 次; 桂竹香 2.0 kV/cm , 30 μs , 脉冲 1 次。融合时膜破坏的必要电压, 一般与原生质体半径为反比例。桂竹香原生质体比紫罗兰的小, 所以融合时考虑采用高电压脉冲较紫罗兰所需的高。Bate^[12] 根据 *Nicotiana* 属的原生质体融合情况, 高电压脉冲的电强度 1.0 ~ 20 kV/cm 之间融合率无差异, 高电压强度 2.0 kV/cm 原生质体 3 个以上融合率增高。达到目的的 2 个的融合率下降。本实验发现, 桂竹香 2.0 kV/cm 时, 2 个原生质体及 3 个以上的融合率均高。从这方面考虑 2 种原生质体融合的最佳条件, 采用低电强度, 即紫罗兰 1.5 kV/cm 的条件。本实验中桂竹香比紫罗兰融合率低, 作者认为原生质体分离时受到各种因素的影响。所以注意分离技术的严格操作, 同时还可以提高紫罗兰的融合率。

参考文献:

[1] HOSOKI T, ANDO M. Protoplast culture plantlet regeneration in stock (*Matthiola incana* R. Br.) [J] . Plant Tissue Culture Letter, 1989, 6(3): 144—147.

[2] 西尾刚, 渡边建三, 佐藤隆德, 等. 电激融合法 *Brassica oleracea*, *Brassica campestris* 的体细胞杂种的育成[J] . 蔬菜、茶业试验场研究报告(A) , 1987, 1: 165—172.

[3] KAMADA H, HARADA H. Studies on organogenesis in carrot tissue culture II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis [J] . Z Pflanzenphysiol, 1978, 91: 453—463.

[4] WEATHERHEAD M A, HENSHAW G G. The induction of embryoids in free pollen culture of potatoes [J] . Z Pflanzenphysiol, 1979, 94: 441—447.

[5] ARAI M, SUGAWARA Y, MATSUSHIMA H. Enhancement of formation of carnation (*Dianthus caryophyllus*) mesophyll protoplasts by abscisic acid pretreatment[J] . Plant Tissue Culture Letters, 1989, 6(2): 80—84.

[6] MOHAPATRA S S, POOLE R J, DHINDSA R S. Detection of two membrane polypeptides induced by abscisic acid and cold acclimation: Possible role in freezing tolerance[J] . Plant Cell Physiol, 1988, 29: 727—730.

[7] 西尾刚, 山岸博, 高柳谦治. 关于十字花科蔬菜叶肉原生质体的初期培养条件的研究[J] . 蔬菜试验场报告(A) , 1986, 14: 11—19.

[8] 长田敏行. 原生质体的遗传工学[M] . 东京: 讲谈社, 1986: 39—40.

[9] ZIMMERMANN U, SCHEURICH P. High frequency fusion of protoplasts by electric fields[J] . Planta, 1981, 151: 26—32.

[10] 三浦靖高, 十川好志, 山田康之. 关于烟草原生质体的电激融合[J] . 植物组织培养, 1988, 5(2): 101—103.

[11] 山口隆, 北村治滋, 今村仁, 等. 石竹属植物的原生质体培养与电激融合法[J] . 蔬菜、茶业试验场花卉部研究年报, 1989, 2: 24—30.

[12] BATES G W. Electrical fusion for optical formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana* [J] . Theor Appl Genet, 1989, 165: 217—224.

Research into Stock and Wallflower Protoplast and Electrical Cell Fusion

HUANG Jia zong¹, OKADA Yoshiaki², FU Jia rui³

(1. Science and Technology Center of GuangDong Agriculture and Farm, Guangzhou 510507, China;

2. Nara Tabaramoto High Agricultural School, Japan;

3. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Through the electrical cell fusion of the stock and the wallflower, the optimum conditions of the early period cultivation of protoplast and the optimum conditions which lead effectively to cellular fusion. The results were as follows: As a condition of early period cultivation that increases the separation of seedling protoplast of the stock, by cultivation in a basic culture medium that made up 1/2 MS, a sucrose concentration of 4% and a mannitol concentration of 0.6%, it was the most appropriate. In addition, when adding inorganic nitrogen to glutamine, it got an excellent result. And when adding plant growth regulators BA as 1 mg/L it achieved a high rate of separation. Plus, the effects of the addition of zeatin (maize factor) was good. Due to pre treatment of seedlings prior to protoplast separation, the rate of separation achieved was high. The suitable temperature ranged from 24 °C to 30 °C. The conditions which gave rise to a high proportion of single pairs through the medium of electrical cell fusion were stock protoplast density of 1×10^5 , high electrical field intensity of 1 MHz, the pulse voltage in 1.5 kV/cm and pulse width in 70 s; wallflower protoplast density of 1×10^5 units/mL, high electrical field intensity of 1 MHz, 100 V/cm the pulse voltage in 2.0 kV/cm and pulse width in 30 μs.

Key words: *Matthiola incana* R. Br; *Cheiranthus cheiri* L; protoplast; electrical; cell fusion