

不同电场条件对黄瓜与黑子南瓜子叶原生质体对称融合的影响

郭德章¹, 鄢 锋¹, 赖钟雄², 林庆良², 王家福²

(1. 福州市农业科学研究所, 福建 福州 350014; 2. 福建农林大学亚热带果树研究所, 福建 福州 350002)

摘 要: 从小黄瓜和黑子南瓜的幼嫩子叶分离的原生质体在不同交流电场及直流脉冲参数诱导下进行对称融合的试验结果表明, 采用含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露醇溶液作为融合液, 在交流场强 $25 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、交流频率 2000 kHz 、直流脉冲强度 $200 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、幅宽 $40 \mu\text{s}$ 、脉冲次数 3 次的条件下, 能获得最佳融合效果; 融合产物经液体浅层培养再生成大量愈伤组织。该文同时对愈伤组织的遗传鉴定及植株再生进行了评述。

关键词: 电场条件; 黄瓜; 黑子南瓜; 对称融合

中图分类号: Q 813.2

文献标识码: A

Effects of different current field condition on the symmetrical fusion of cotyledonary protoplasts between *Cucumis sativus* L. and *Cucurbita ficifolia* Bouche

GUO De-zhang¹, YAN Zheng¹, LAI Zhong-xiong², LIN Qing-liang², WANG Jia-fu²

(1. Fuzhou Institute of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350014, China; 2. Institute of Subtropical Fruit Trees, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The studies of symmetrical fusion of protoplasts isolated from Cuixiu mini cucumber (*Cucumis sativus* L.) and fig-baf gourd (*Cucurbita ficifolia* Bouche) were carried out. The results indicated that the conditions could lead to the best effect of cell fusion were using $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol as fusional solution and setting the alternating current field intensity at $25 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, the alternating current frequency at 2000 kHz , the direct current intensity at $200 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, the direct current pulse width at $40 \mu\text{s}$ and 3 direct pulse times. After cultured in shallow-layer liquid medium, large numbers of callus were regenerated. The genetic identification of callus and the plant regeneration were also evaluated.

Key words: Current field condition; *Cucumis sativus* L.; *Cucurbita ficifolia* Bouche; Symmetrical fusion

黄瓜和南瓜都是葫芦科主要的栽培作物, 因南瓜抗逆性强, 长势旺盛, 对蔓枯病、灰霉病、枯萎病等主要土传病害有很强的免疫性, 生产实践中, 常用南瓜作砧培育黄瓜嫁接苗。20 世纪 80 年代以来, 随着黄瓜离体成苗及遗传转化技术的日益成熟, 不少学者尝试通过各种手段将一些有价值的优良性状转入栽培黄瓜中, 其中以黄瓜的遗传转化研究居多^[1]。除了基因工程研究, 黄瓜与南瓜的原生质体融合被认为是黄瓜抗性改良的一个极具应用潜力的细胞工程手段。但到目前为止, 有关黄瓜种间及属间体细胞杂交研究的报道, 都仅限于融合技术的研究, 而对融合条件及培养效率的详细研究则鲜见报道^[1,2]。本研究利用具有高效再生能力的黄瓜子叶原

生质体与黑子南瓜子叶原生质体进行对称融合, 探讨了提高黄瓜与南瓜属间体细胞杂交效率的适宜技术程序, 并通过诱导培养获得大量再生愈伤组织。

1 材料与方法

1.1 材料

用于进行融合研究的两个亲本分别是云南黑子南瓜 (*Cucurbita ficifolia* Bouche) 和无刺型小黄瓜 (水果黄瓜) ——翠秀 (*C. Sativas* cv. Cuixiu)。原生质体融合杂交操作在宁波新芝科学器材研究所研制的 CRY-3 型细胞电融合仪上进行。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的分离及纯化 黄瓜子叶的培养

收稿日期: 2003-08-23

作者简介: 郭德章 (1970-), 男, 高级农艺师, 主要从事园艺植物生物技术研究。

基金项目: 福州市科技基金资助项目 (97-24)。

及原生质体的分离纯化参见郭德章等^[3]的方法。黑子南瓜种子洗净后,于 28~30℃ 的温水中浸种 6~8 h,沥干水分,在无菌条件下将种壳轻轻夹开,用镊子小心取出种胚。取出的种胚在含 2% 次氯酸钠的安替福明液中消毒 10 min 后,用无菌蒸馏水冲洗 5 遍。无菌播种采用附加 20 g·L⁻¹蔗糖、8 g·L⁻¹琼脂、大量元素减半的 MS 培养基,播种后于 (27±1)℃ 催芽,胚萌发后转入 (23±1)℃ 培养。选指数生长前期的子叶 1 g,切成 0.5~1.0 mm 宽的细条,加入 10 ml 的混合酶液后进行保温酶解。酶液组成为:1.5% Onozuka R-10 纤维素酶,0.5% Mecerozyme 离析酶、0.5% PVP、0.5 mol·L⁻¹的甘露醇及 CPW 盐类。黑子南瓜原生质体分离纯化的其余步骤同黄瓜^[3]。

1.2.2 原生质体的电融合 分离纯化的黄瓜、南瓜原生质体经离心沉淀后,往离心管中加入融合液,700 r·min⁻¹离心洗涤 1 次,最后将原生质体重悬于融合液中,将原生质体密度调至 1×10⁵ 个·ml⁻¹。选用 Ag 平行电极,两电极间距 2 mm,融合室容积为 100 μl,电极使用前经紫外线照射 2 h 灭菌。制备好的原生质体以 1:1 的比例混装于离心管中,用 100 μl 移液枪移入融合室中,打开电源调好融合电参数后,开启成串交流脉冲,脉冲电压 5~40 V、频率 100~2 000 kHz。原生质体成串后立即激发直流高压脉冲,直流场强 150~450 V、直流幅宽 10~50 μs、脉冲次数 1~4 次。原生质体成串及融合效果的观察在 XSZ-D2 倒置显微镜上进行,每个电融合参数处理作 5 个重复的观察和记录。每次融合操作完成后,将融合物依次移入事先装有 1 ml 等量双倍浓度的培养液的 5 ml 离心管中,待管中悬浮液达 2 ml 时,立即将悬浮液小心吸出浅层植板于 6 cm 培养皿中。融合产物的培养方法参见水果黄瓜原生质体的培养^[3]。试验结果的数据为 3 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 融合液组分对原生质体成串的影响 本研究先后采用了 3 种类型的融合液:①含 0.5 mol·L⁻¹的甘露醇的 CPW 盐类溶液;②含 1~5 mmol·L⁻¹的 CaCl₂+0.5 mol·L⁻¹甘露醇的溶液;③含 0.5 mol·L⁻¹的甘露醇溶液。用于原生质体成串试验。在融合仪可调节的电参数范围内,前两种融合液均无法使原生质体在电场作用下排列成串,而 0.5 mol·L⁻¹的甘露醇溶液却极易使原生质体在电场作

用下迅速成串(图 1-C)。说明适宜的融合液组分是促成原生质体成串的先决条件,融合液中无机盐的存在能形成较高的电介质浓度环境,不利于原生质体在电场作用下形成偶极子,进而影响原生质体的成串。应当使用电导率较低的等渗液作为融合介质。

2.2 交流场强、频率对原生质体成串及融合率的影响 将交流场强及频率两种电参数中的一种设为适当值(场强 25 V·cm⁻¹、频率 2 000 kHz)时,另一种参数均可单独对原生质体串长及融合频率产生显著影响(图 2)。在一定范围内,交流场强与串长、融合率,交流频率与串长、融合率均呈正相关关系,但两种参数都有一个最适的峰值,场强和频率超过最适峰值时,原生质体串长及融合率将急剧下降。场强 25 V·cm⁻¹、频率 2 000 kHz 是最佳的融合参数值。

2.3 方波脉冲强度和幅宽对原生质体融合率及植板率的影响 方波脉冲在原生质体融合中的作用是使原生质膜产生可修复性击穿,进而诱发原生质体产生融合,脉冲参数的正确调整是原生质体融合成败的关键。从图 3 可以看出,在一定范围内,随着场强的增大,融合率呈上升趋势,当场强超过 200 V·cm⁻¹后,融合率开始下降,当场强达到 300 V·cm⁻¹时,原生质体开始大量破裂。另一方面,随着电流强度的不断增大,细胞分裂频率呈明显的下降趋势。融合试验表明,场强太低时,细胞膜无法被有效击穿,融合率无法达到要求,但场强太高将因细胞分裂频率低而无法获得足够多的融合克隆,以 150~200 V·cm⁻¹为宜。类似的结论在十字花科蔬菜的细胞融合中也曾有报道^[4,5]。

大量的融合试验研究证实,幅宽的适当增加(20 μs 以上)能通过方波作用时间的延长得到较高的原生质体融合频率^[4,6~8]。本试验在适宜的交流电场和直流场强下,方波直流幅宽从 10 μs 升到 40 μs,融合频率不断升高,细胞分裂频率略有下降,当幅宽达 80 μs 时,原生质体易出现破裂现象。以 40 μs 为较适的幅宽(图 3),幅宽过大易对原生质体造成伤害;则会因细胞没有充分接近而影响融合率^[9]。

2.4 脉冲次数对原生质体融合率的影响 侯喜林等^[4]在白菜原生质体电融合中认为,在低场强下,重复电击有助于融合频率的提高。图 4 表明,采用 200 V·cm⁻¹的方波直流、3 次脉冲的处理,能获得最高的融合率。脉冲次数超过 3 次时,易使原生质体被过度电击而崩溃。因此,脉冲次数不可过多,以 2~3 次较为理想。

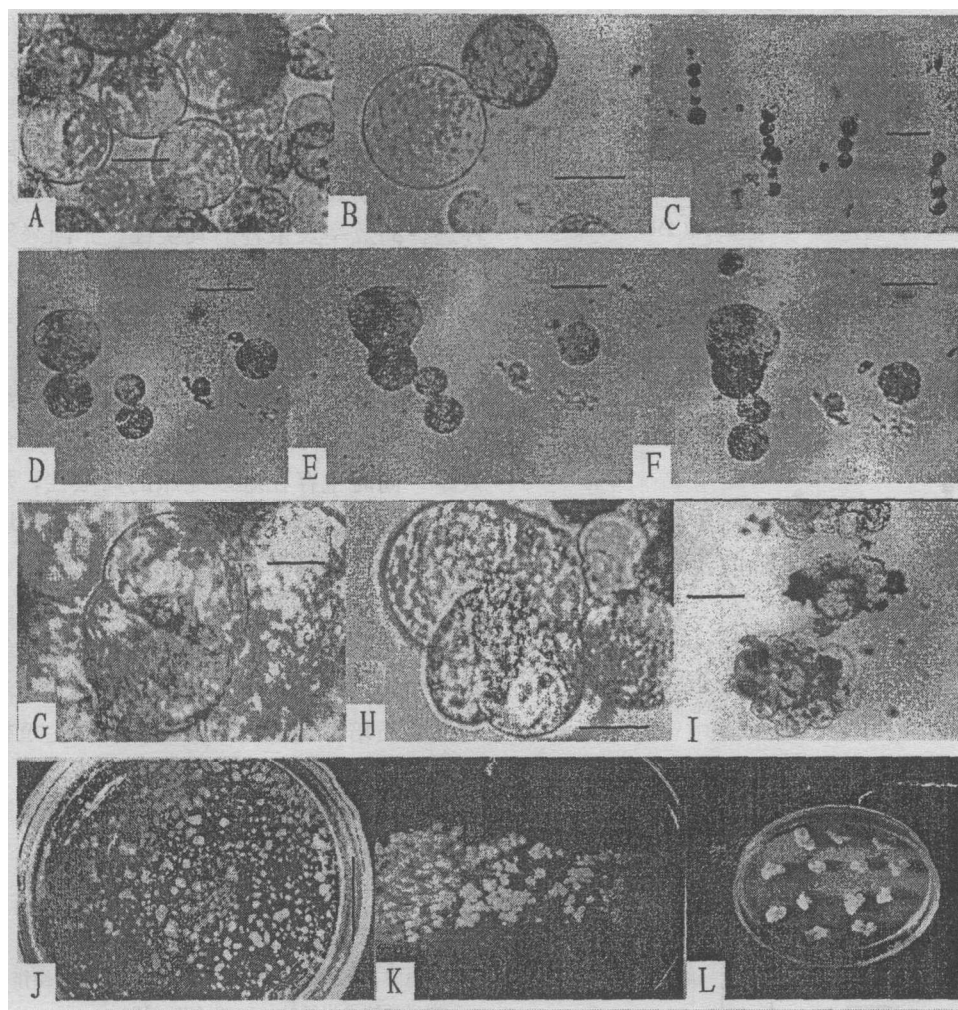


图1 黑子南瓜与黄瓜原生质体的融合及愈伤组织的再生

Fig. 1 Protoplast fusion between *Cucumis sativus* and *Cucurbita ficifolia* Bouche and callus regeneration

注: A. 等体积混合后的黄瓜及黑子南瓜子叶原生质体, 标尺=10 μm ; B. 典型的黄瓜与黑子南瓜原生质体, 体积较大、颜色较浅的是黄瓜原生质体, 直径较小、颜色较深的是黑子南瓜原生质体, 标尺=10 μm ; C. 双亲原生质体在电场作用下成串的情形, 标尺=50 μm ; D. 未施加直流脉冲的双亲原生质体, 标尺=30 μm ; E. 施加直流脉冲后的瞬间, 标尺=30 μm ; F. 2 min 后胞质融合的情形, 标尺=30 μm ; G. 融合产物的首次分裂, 标尺=20 μm ; H. 融合产物的二次分裂, 标尺=40 μm ; I. 体细胞克隆的形成, 标尺=100 μm ; J. 培养后 25 d 形成的小愈伤组织, 标尺=1 cm; K. 培养 45 d 的愈伤组织; L. 转入平板 3 周后的愈伤组织。

2.5 融合产物的培养及愈伤组织的再生 镜检显示, 在适宜的融合参数下, 黄瓜及黑子南瓜原生质体在方波直流作用的瞬间, 原生质膜被击穿后即开始双方胞质的融合, 数分钟内可形成一个完整的融合子(图 1-D、E、F)。在悬浮液中, 黄瓜子叶原生质体呈浅亮绿色, 直径较大; 黑子南瓜子叶原生质体呈暗绿色, 直径较小(图 1-B), 可以通过目测加以鉴别。融合产物按水果黄瓜子叶原生质体的培养方法植板于 mKM8p 培养基中, 在第 3 d 后即可观察到大量分裂(图 1-G、H), 12 d 后出现肉眼可见

的细胞克隆(图 1-I、J), 4 周后形成直径 1~2 mm 的愈伤组织(图 1-K)。通过对再生产物的观察发现, 培养皿中的愈伤组织可分为两种形态: 一种类型呈白色至浅黄色, 表面粗糙, 增殖速度较快; 另一种类型呈黄色至黄绿色, 表面具奶油光泽, 增殖速度明显较慢。在倒置显微镜下可观察到: 前者的细胞较均一, 组成、形态和水果黄瓜十分相似。而后的细胞在形态及组成上变化较大, 推测其可能是真正的杂种细胞。本研究将两种类型的再生产物分开培养, 进行了植株分化的诱导, 但截至目前, 两种

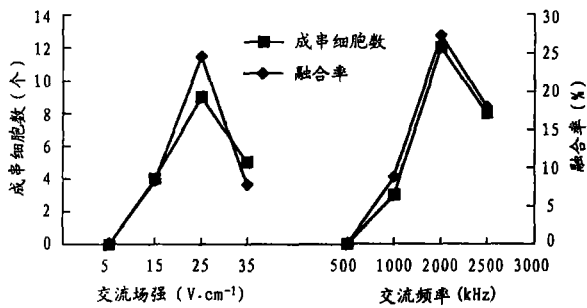


图 2 不同交流电场参数对原生质体融合率的影响

Fig. 2 Effects of different parameter of alternating current field on the protoplast fusion

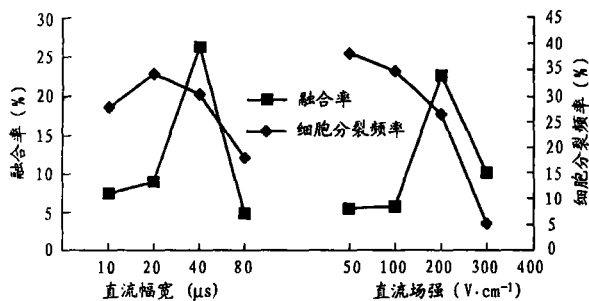


图 3 不同直流脉冲参数对原生质体融合率的影响

Fig. 3 Effects of different parameter of direct current pulse on the protoplast fusion

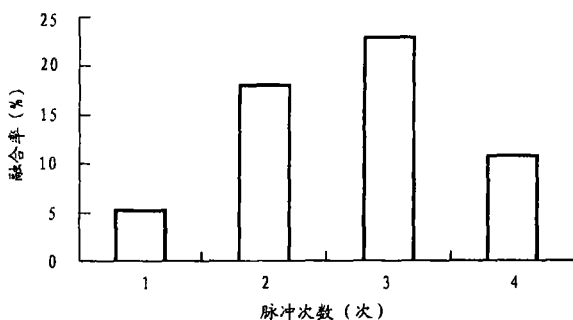


图 4 脉冲次数对原生质体融合率的影响

Fig. 4 Effects of direct pulse number on cell fusion rate

培养物在 30 多种诱导培养基上还未见植株的分化。

3 讨论

借鉴水果黄瓜原生质培养总结的一套高效培养技术, 本研究相继获得了南瓜子叶原生质体和黄瓜与黑子南瓜体细胞对称融合后培养再生的愈伤组织, 在葫芦科作物中细胞工程的应用做了有益的尝试, 为今后黄瓜的遗传操作提供了科学依据。但本研究所获得的培养物离进入实用验证阶段仍有一定

距离。首先, 我们在融合效果判断、融合子鉴定、融合子检出过程中, 主要依靠常用的基于形态学描述的感观指标为手段, 还未引入荧光染色、同工酶、DNA 多态性分析等细胞学、分子生物学手段对融合过程及融合产物进行监测, 这使得在对融合培养物的早期判断及评价上缺乏遗传学依据, 从而影响杂种选择的效率及杂种的真实性。张国兴等曾采用诺丹明 6G (R6G) 及碘乙酸 (IOA) 分别对黄瓜及南瓜子叶原生质体进行灭活处理, 利用双亲原生质体融合后能产生生理补偿效应的原理建立了黄瓜与南瓜融合子的选择系统, 并成功获得了体细胞杂种愈伤组织^[2]。这种选择方式能相对提高融合子选择的效率, 同时也存在难以克服的局限性, 那就是代谢抑制剂 R6G 和 IOA 的使用将难以避免地使原生质体的活力及融合率降低, 不利于大量融合产物的获得。另一方面, 融合培养物中出现了一类与来源于其亲本之——黄瓜子叶原生质体的愈伤组织相似的愈伤组织, 实验证明, 此类愈伤组织无法通过与黄瓜原生质培养类似的方法培养出再生植株。这间接说明了融合产物在生理特征、遗传背景等方面的复杂性。也就是说, 杂种植株的最终获得可能还需要更多新的技术措施。

参考文献:

- [1] 许志宏, 卫志明. 植物原生质体培养和遗传操作 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997. 175—179.
- [2] 张兴国, 刘佩英. 黄瓜和南瓜原生质体融合研究 [J]. 西南农业大学学报, 1998, 20 (4): 293—297.
- [3] 郭德章, 鄢铮, 赖钟雄, 等. “翠秀” 黄瓜原生质体的高效培养及植株再生 [J]. 园艺学报, 2003, 30 (2): 227—228.
- [4] 侯喜林, 曹寿椿, 余建明, 等. 原生质体非对称融合获得不结球白菜胞质杂种 [J]. 园艺学报, 2001, 28 (6): 532—537.
- [5] 西尾刚. 電気融合法による *Brassica oleracea* と *Brassica campestris* の体細胞雜種の作出 [C]. 野菜茶業場試験報告, 1987, AI: 165—172.
- [6] Liu J H, Deng X X. Regeneration of hybrid calluses via donor-recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 59: 81—87.
- [7] Xia G M, Chen H M. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* and *Leymus chinensis* [J]. Plant Sci, 1996, 102: 197—203.
- [8] 赖钟雄, 陈振光. 龙眼荔枝属间原生质体电融合 [J]. 福建农业大学学报, 2001, 30 (3): 347—352.
- [9] Yamanaka H. Somatic hybrid production through protoplast fusion between Japanese radish and coulfiflower [J]. Hort Soc, 1990, 59 (2): 284—285.