

马铃薯叶肉原生质体碘乙酰胺、罗丹明 6G 失活研究

何亚文 李耿光

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

摘 要 马铃薯生产种和野生种叶肉原生质体碘乙酰胺和罗丹明 6G 的失活浓度以及影响其失活的因素。结果表明:不同种(或品种)其碘乙酰胺和罗丹明 6G 失活浓度不一样,野生种失活浓度普遍较生产品种高。影响失活的主要因素包括:材料的基因型,失活剂处理时间,处理液的 pH 和成份等。采用高于失活浓度的处理浓度有利于融合后杂种细胞的准确筛选。

关键词 马铃薯,叶肉原生质体,碘乙酰胺,罗丹明 6G

近年来,失活处理在原生质体融合中受到广泛关注。碘乙酰胺(Iodoacetamide, IOA),罗丹明 6G(Rhodamine 6G, R6G)是常见的两种失活剂。Bottcher 等(1989)^[1]用 IOA 处理融合一方,用 R6G 处理另一方,单独培养均不能分裂,融合后杂合体由于发生代谢互补恢复分裂,并得到杂种植株。这种方法操作简便,杂合体筛选准确,且无需融合双方带有任何选择标记,在体细胞杂交育种上具有很大的应用价值。此外,IOA 或 R6G 失活处理结合 χ -射线或 γ -射线辐射失活在胞质杂种产生上也具有独到的价值,目前运用此方法已得到芸苔属、烟草属、稻属和胡萝卜属胞质杂种^[2~4]。在马铃薯原生质体融合中除 γ -射线外^[5],尚未见到其它失活剂应用的报道。本文以马铃薯生产品种和野生种叶肉原生质体为材料,研究了 IOA 和 R6G 的失活浓度和条件,对影响失活的因素作了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

马铃薯生产品种(*Solanum tuberosum*)均来自中国南方马铃薯研究中心,不同品系以 N07、N08、N14 和 N19 表示,马铃薯野生种 *Solanum phureja* ($2n = 2X = 24$), *Solanum brevidens* ($2n = 2X = 24$), *Solanum bulbocastanum* ($2n = 2X = 24$)均由美国 Wisconsin 大学植物病理学 Helgeson 教授惠赠,碘乙酰胺和罗丹明 6G 均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 原生质体分离和培养: 见李耿光等^[6]报道的方法。

1.2.2 碘乙酰胺失活处理: 碘乙酰胺粉末溶解在含 0.45mol/L 山梨醇的缓冲液^[7]中配成 4.0mmol/L 母液,调 pH 至 5.7,过滤灭菌,冰箱保存。处理时量取不同量的碘乙酰胺母液同改良 K_8P 培养基^[7](简称 P_3G)配成一系列不同碘乙酰胺浓度的处理液。原生质体分离纯化后,在 4℃ 黑暗条件下用上述处理液处理 30min,处理时每隔 10min 取出轻轻晃动离心管,以免原生质体沉积影响处理效果,处理后离心(800r/min, 3min),收集下部原

本文于 1995 年 9 月 8 日收到。

生质体,缓冲液洗涤两次,P₃G 培养基洗涤一次,最后用 P₃G 培养基悬浮调至合适密度进行液体浅层培养。

1.2.3 碘乙酰胺失活浓度的确定: 植板后定期观察统计,处理后的原生质体如能够膨大变透明并开始分裂,则视为处理不足,需继续提高处理浓度;植板培养后,对照能正常分裂而处理过的原生质体不能分裂但又不马上皱缩死亡,大小和形态与初培养时变化不大,或者稍稍膨大变透明但不能变椭圆,这种状态我们称之为一种临界状态,此时对应的碘乙酰胺浓度称之为最低失活浓度(以下简称失活浓度);继续提高碘乙酰胺处理浓度,观察其植板情况。以培养 3 个星期后分裂了一次以上所形成小细胞团为标准,计算出 10⁵ 个原生质体中小细胞团形成频率,确定出不同品种的失活浓度。

1.2.4 罗丹明 6G 失活处理及失活浓度确定: 罗丹明 6G 先配成 40μg/ml 母液,过滤灭菌,冰箱保存。R6G 处理方式有两种:一种同碘乙酰胺,原生质体分离钝化后 4℃ 黑暗条件下处理 30min。另一种处理方式是将 R6G 溶解在酶解液中,叶片酶解与 R6G 处理同步进行,25℃ 恒温黑暗条件下处理过夜(12h)。处理后的原生质体培养同前,R6G 失活浓度确定同碘乙酰胺。

1.2.5 原生质体融合方法: 采用 PEG 高 Ca²⁺ 高 pH 融合法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 碘乙酰胺

前人文献[1~4]曾有碘乙酰胺、碘乙酸和碘乙酸钠 3 种形式失活剂报道。从他们发表的结果来看,碘乙酰胺处理浓度普遍比碘乙酸高,但没有人比较这两种失活剂差别。我们首先以 N07 叶肉原生质体为材料,比较了不同浓度的碘乙酸和碘乙酰胺对原生质体的失活效果,结果表明:在 4℃ 黑暗条件下,各处理 30min, N07 叶肉原生质体碘乙酸失活浓度为 0.25mmol/L,碘乙酰胺失活浓度为 0.4mmol/L,0.25mmol/L 碘乙酸失活处理后的原生质体有破裂现象,皱缩褐化时间快,PEG 处理后这种现象更明显。这种结果和现象说明碘乙酸失活作用较强,它除了具备与碘乙酰胺相似的失活效果外,还对原生质膜及其它结构有一定损伤作用,因而出现部分原生质体破裂和皱缩褐化。为了避免这种不利影响,后续实验中均采用碘乙酰胺作为失活剂。

2.1.1 碘乙酰胺处理方式的改进: 去壁后的原生质体十分敏感,培养基的 pH、离子强度和渗透压等都影响其活力,为了尽可能减少这些非失活剂因素引起的不利影响,我们比较了不同 IOA 处理液、处理温度、失活时间和失活处理的 pH,结果见表 1。Sidorov, Terada 等^[9,10]在烟草、水稻原生质体失活处理时采用 W₅ 溶液作为失活处理液 Cella 等^[11]在进行胡萝卜原生质体失活处理时认为 pH 值影响其失活效果,并得到 pH4.7 对原生质体失活最有利。从表 1 可以看出,对马铃薯叶肉原生质体而言,在 1/2buffer + 1/2 P₃G 培养液中 IOA 失活效果较好,处理 30min 比处理 15min 失活效果好,室温处理和 4℃ 下处理区别不大,碘乙酰胺处理液 pH 值应与培养基 pH 保持一致,pH5.7 最佳,太高或太低均导致原生质体破裂。

2.1.2 马铃薯叶肉原生质体经不同浓度碘乙酰胺处理后植板培养和分裂情况: 原生质体经不同浓度碘乙酰胺处理后植板培养,12h 内与对照区别不大。低浓度碘乙酰胺处理

表 1 碘乙酰胺不同处理方式比较

Table 1 Comparison of different methods of IOA inactivation

	W ₅	Inactivation conc. of IOA/		Rupture of protoplasts*
		mol·L ⁻¹	Division frequency /%	
Medium	1/2buffer + 1/2 P ₃ G	—	7	+++
Treatment time	15 min	—	11	+
(IOA 0.5mmol/L)	30 min	—	7.2	+
T	4℃	0.5	0	+
	25℃	0.5		+
pH	4.7	0.1		+++
	5.2	0.5		+
	5.7	0.5		+
	6.2	0.3		+

* Rupture of protoplasts; * very few; ** moderate; *** serious

能刺激原生质体分裂,这种现象尤以 N14, N19 和 *S. brevidens* 表现突出。当处理浓度为最低失活浓度时,原生质体或者外形和大小与对照差别不大,颜色稍深,或者能稍膨大,变透明,但不能变椭圆和分裂,不同品种这种状态持续时间不一,最终都会皱缩死亡。当碘乙酰胺浓度高于失活浓度时则会出现膜皱缩,有出芽现象,不久即变棕褐色和不规则圆形直至破裂。失活浓度的碘乙酰胺处理后原生质体有一段时间存活期,这种现象在原生质体融合中特别有用,因为 IOA 的作用是专一抑制胞质中的一种酶,对其它代谢活动尤其是核内功能影响不大,有利于双失活处理后融合体分裂能力的恢复。

2.1.3 不同种(或品种)叶肉原生质体碘乙酰胺失活浓度: N19 为一原生质体培养时分裂频率较高品种,我们以它为材料,详细研究了不同浓度碘乙酰胺处理后其小细胞团形成频率,得到图 1 曲线,其它品种失活浓度见表 2。

从图 1 可以看出:马铃薯原生质体碘乙酰胺失活存在着浓度效应,0.125mmol/L IOA 处理能刺激原生质体分裂,在一定范围内随着处理浓度升高,原生质体存活率降低,当处理浓度超过 0.5mmol/L 后细胞团形成频率大幅度下降,1.00mmol/L 为 N19 的失活浓度,

表 2 马铃薯栽培种和野生种叶肉原生质体
碘乙酰胺失活浓度和存活天数

Table 2 IOA inactivation concentrations and
survival time of protoplasts from potato cul-
tivars and wild species

Materials	Inactivation Conc. of IOA /mmol·L ⁻¹	Survival time/d
<i>S. tuberosum</i> (N07)	0.40	2
<i>S. tuberosum</i> (N08)	0.75	3
<i>S. tuberosum</i> (N14)	0.50	2
<i>S. tuberosum</i> (N19)	1.00	4
<i>S. brevidens</i>	0.75	3
<i>S. phureja</i>	0.70	2
<i>S. bulbocastanum</i>	1.00	4

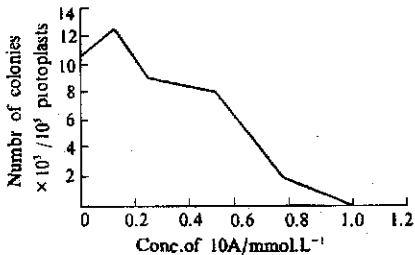


图 1 IOA 浓度对 N19 小细胞团形成的影响

Fig. 1 Effect of IOA concentrations on colon for-
mation of N19

超过该浓度处理均无小细胞团形成。从表 2 可以看出不同品种其碘乙酰胺失活浓度有差别,同属四倍体栽培种不同品种其失活浓度也不一样,而且有的差别很大,如 N07 为 0.4mmol/L,而 N19 却达 1.0mmol/L,野生种碘乙酰胺失活浓度多数高于栽培种,这说明基因型与失活浓度有很大关系。失活处理后不同品种其存活天数不完全相同,栽培种与野生种无多大明显差异。同有关文献中的碘乙酰胺失活浓度相比较,马铃薯叶肉原生质体的失活浓度普遍偏低,经分析可能有如下一种或几种原因:①基因型本身差异,前人文献中被处理对象为水稻、小麦、胡萝卜、甘蓝头等^[3,4,11]而我们处理对象是马铃薯。②原生质体来源不同,已发表的文献中被处理的原生质体多来自胚性愈伤组织或细胞悬浮系或下胚轴^[3,4],一般认为胚性愈伤组织或细胞悬浮系来源的原生质体抗逆性较强。③处理时间不一样,文献中处理时间有 15min, 20min 和 30min,我们统一采用 30min,处理时间越长则其失活浓度就应越低。④失活浓度与处理浓度不同,在已有文献中为了避免由于看护效应(Nurse effect)而引起的“逃逸”现象,更加准确筛选杂合体,往往在最低失活浓度基础上人为提高处理浓度,使用的浓度往往都高于失活浓度^[1,3,10]。

2.2 罗丹明 6G

同碘乙酰胺相比,原生质体经 R6G 失活处理后其存活天数明显缩短,处理后的原生质体被染成浅黄色。文献中 R6G 处理一般都是在酶解分离原生质体时进行的^[11],我们除这种方式外,还在原生质体分离纯化后采用类似碘乙酰胺的失活处理方式。图 2 为野生种 *S. bulbocastanum* 在两种处理方式下其失活曲线,其它几个品种 R6G 失活浓度见表 3。

从图 2 和表 3 可以看出,两种处理方式中 R6G 失活也存在浓度效应,随着 R6G 浓度

表 3 马铃薯栽培种和野生种 R6G 失活浓度

Table 3 R6G inactivation concentration of potato cultivars and wild species

Materials	Inactivation conc. of R6G/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	
	Inactivation during the overnight enzymolysis	Inactivation treatment after purification
<i>S. tuberosum</i> (N07)	1.25	6.25
<i>S. tuberosum</i> (N08)	2.5	7.5
<i>S. bulbocastanum</i>	6.25	1.5
<i>S. phureja</i>	3.5	10
<i>S. brevidens</i>	3.5	10

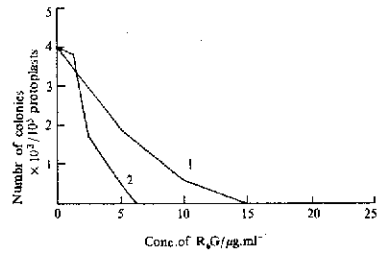


图 2 R6G 浓度对 *S. bulbocastanum* 小细胞团形成的影响

Fig. 2 Effect of R6G concentrations on colonies formation of *S. bulbocastanum*

- 1. Inactivation during the overnight enzymolysis
- 2. Inactivation after purification

升高其原生质体小细胞团形成频率逐渐降低,不同种其 R6G 失活浓度不完全一样,野生种失活浓度普遍比生产品种高,纯化后处理失活浓度明显高于酶解时处理的失活浓度,产生这种差别的根本原因是处理时间不一样。

2.3 原生质体失活处理后混合培养与融合处理

在已发表的有关文章中常有以下两种现象:1. 融合一方

失活处理后单独培养不能分裂,但它们与未失活处理的另一方简单混合后,失活的原生质体又恢复了分裂,提高处理浓度可以避免这种现象发生^[10]。2. 融合双方都失活处理,失活处理后的原生质体单独培养均不能分裂,但在融合后的假定杂种植株中却发现来自融合一方的原生质体再生植株,加大失活剂的处理浓度可以提高杂种植株的准确筛选频率^[1,3,10]。在栽培种 N03 和 N19 内融合中我们也发现这种现象, N03 经 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R6G 失活, N19 经 1.0 mmol/L IOA 失活,单独培养均不能分裂,简单混合后少数失活了的 N19 原生质体又恢复了分裂,上述失活处理的 N03 和 N19 经 PEG 法融合后,在假定的杂种植株中大多是 N19 单独再生而来的,极少数是杂种植株。将 N19 的处理浓度提高至 1.5 mmol/L 则此现象消失。但 1.0 mmol/L IOA 处理过的 N19 原生质体与 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R6G 失活的 *S. bulbocastanum* 原生质体简单混合后 N19 却没有恢复分裂,似乎这种代谢互补效应只发生在亲缘关系近的品种之间。因此采用比失活浓度高的处理浓度将有利于杂种植株准确筛选。根据上述实验确定的失活浓度我们用 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R6G 失活 N03 和 N13, 用 1.5 mmol/L IOA 失活 N19 和 N20 后,通过 PEG 高 Ca^{2+} 高 pH 融合法已得到了 N03 和 N19、N13 和 N20 之间体细胞杂种植株, N19 与野生种 *S. bulbocastanum* 之间也得到假定的杂种愈伤组织,其杂种特性有待进一步鉴定。

参 考 文 献

- [1] Botcher U, Aviv D, Galun E. *Plant Sci*, 1989, **63**: 67~77.
- [2] Aviv D, Chen R, Galun E. *Plant Cell Rep*, 1986, **3**: 227~230.
- [3] Ichikawa H, Tanno-Suenaga L, Imamura J. *Theor Appl Genet*, 1987, **74**: 746~752.
- [4] Akagi H, Sakamoto M, Negishi T *et al.* *Mol Gen Genet*, 1989, **215**: 501~506.
- [5] Xu Y S, Murto M, Dunckley R *et al.* *Theor Appl Genet*, 1993, **85**: 729~734.
- [6] 李耿光, 张兰英. *植物学报*, 1988, **30**: 21~24.
- [7] Kao K N, Michayluk M R. *Planta*, 1975, **126**: 105~110.
- [8] Kao K N, Michayluk. *Planta*, 1974, **115**: 355~367.
- [9] Sidorov V A, Menczel L, Nagy F *et al.* *Planta* 1981, **152**: 341~345.
- [10] Terada R, Yamashita Y, Nishibayashi S *et al.* *Theor Appl Genet* 1987, **73**: 379~384.
- [11] Cella R, Carbonera D, Iadarola P. *Z Pflanzenphysiol Bd*, 1983, **112**: 449~457.

Studies on Inactivation of Potato Mesophyll Protoplast by Iodoacetamine and Rhodamine 6G

He Yawen Li Gengguang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract The inactivation concentrations and the factors affecting the inactivation were studied when mesophyll protoplasts of potato cultivars and wild species were inactivated with iodoacetamide and rhodamine 6G. The results showed that all species differed in their inactivation concentrations the inactivation concentrations of wild species were generally higher than those of cultivars. The factors affecting protoplasts inactivation mainly included: genotype of materials, time of treatment, pH and composition of the incubation medium. In order to select properly the hybrid plant it is suitable to treat protoplasts with concentration of IOA or R6G higher than its inactivation concentration.

Key words Potato, mesophyll protoplast, iodoacetamine an, rhodamine 6G, inactivation