

# 马铃薯栽培种和野生种叶肉原生质体紫外线辐射效应

何亚文 贺 红 张兰英 李耿光

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

**摘 要** 4 个马铃薯栽培种和 4 个野生种叶肉原生质体黑暗中进行紫外线辐射处理。观察了不同剂量紫外线照射对原生质体分裂生长的影响。*S. demissum*, *S. tuberosum*, *S. bulbocastum*, *S. phureja* 和 *S. brevidens* 最低失活剂量分别为 8min, 5.5min, 4.0min, 2.0min 和 1.5min。3 种紫外线照射方式中,“15w,60cm”照射方式失活效果最好。刚分离的原生质体对紫外线最敏感,随着原生质体培养进程,其紫外线抗性逐渐增强。基因型、倍性水平、原生质体体积对原生质体紫外线失活剂量有影响。

**关键词** 马铃薯,叶肉原生质体,紫外线

学科分类号 Q68

随着植物细胞和原生质体培养技术的发展,离体细胞或原生质体培养结合紫外线辐射诱变处理引起了科技工作者们的广泛关注。目前这种处理在突变体诱导<sup>[1-3]</sup>、饲喂培养<sup>[4]</sup>和 PEG 介导的原生质体遗传转化方面已取得积极进展。近年来,紫外线失活处理应用于原生质体融合也有报道<sup>[5,6]</sup>。本实验有两个目的:一是探索紫外线对马铃薯栽培种叶肉原生质体培养再生的影响,为诱变育种提供依据。二是建立以紫外线辐射马铃薯野生种原生质体为基础的原生质体融合和杂种细胞筛选方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

马铃薯栽培种(*Solanum tuberosum* L.,  $2n=4x=48$ )均来自湖北恩施天池山中国南方马铃薯研究中心,不同品系分别以 N03, N07, N08, N14, N19 表示。野生种 *Solanum phureja* ( $2n=2x=48$ ), *S. brevidens* ( $2n=2x=24$ ), *S. bulbocastanum* ( $2n=2x=24$ ), *S. demissum* ( $2n=6x=72$ )均由美国 Wisconsin 大学 Helgenson 教授惠赠。

### 1.2 方 法

**1.2.1 紫外线照射系统的建立:** 紫外灯管(上海金光灯具厂生产,220V,15W,发射波长 2570nm)安装在水平双人超净工作台内上方。待照射材料平放在超净台的台面上,处于紫外灯管的正下方,灯管与台面的垂直距离为 60cm。

**1.2.2 马铃薯栽培种与野生种叶肉原生质体分离纯化:** 见李耿光等<sup>[7]</sup>的方法。

**1.2.3 紫外线照射:** 纯化后的原生质体用 P3G 培养基稀释至密度为  $5 \times 10^6$ /ml,取

国家“八五”攻关 85-722-02-04-07 专题资助。

收稿日期:1996-11-07,修回日期:1997-06-10。

0.5ml 该原生质体悬浮液,在规格为 60mm×15mm 玻璃培养皿底中央均匀平铺成直径为 40mm 的圆形薄层。盖上皿盖,在超净台上静置 5min,使原生质体在皿底形成单一薄层。去皿盖,黑暗中紫外线照射。照射完毕在隔玻璃板的附近位置开启另一支紫外灯作光源,用吸管将照射过的原生质体转移至离心管中,离心(800r/min, 3min)。弃去上清液,用 P3G 培养基再洗一次,最后用 P3G 调至合适密度,在规格为 20mm×10mm 的培养皿中进行液体浅层培养。原生质体不同发育时期紫外线敏感性实验则采用另一种照射方式:分离纯化后的原生质体用 P3G 培养基调整密度为  $5 \times 10^5$ /ml,取 0.1ml 该原生质体悬浮液小心均匀地铺在 30mm×10mm 的玻璃培养皿中,使其在皿底中央形成一直径为 15mm 的圆形薄层(注意!千万不能让原生质体悬浮液附壁!)静置 5min,紫外线照射后直接置于黑暗中培养,定期加新鲜培养基,同时保持一定的湿度以防挥发。

**1.2.4 原生质体相对直径的测量:**刚分离的原生质体在倒置显微镜下放大相同倍数(320×)照相,然后相同放大倍数(4×)冲洗,最后测量洗出相片上原生质体平均直径的大小。

**1.2.5 观察统计及最低失活剂量的确定:**紫外线照射后的原生质体均培养在黑暗中,植板后定期观察。以对照能正常分裂,而照射后的原生质体不能分裂但又不马上皱缩死亡,大小形态与对照相差不大,或者稍微膨大变透明,但不能变椭圆所需最低紫外线照射剂量称为最低失活剂量(以下简称失活剂量)。两周后统计不同时间照射后分裂了两次以上的小细胞团数,换算成每  $10^5$  个原生质体中小细胞团数,作出照射剂量与小细胞形成频率关系曲线。所有试验均至少重复 3 次,细胞分裂情况的观察均在  $10 \times 32$  放大倍数的倒置显微镜下进行,按 10 个视野的平均值计数。

## 2 实验结果

### 2.1 紫外线辐射对叶肉原生质体分裂生长的影响

以 *S. bulbocastanum* 和 *S. tuberosum* (N19) 叶肉原生质体为材料,分别试验了不同剂量的紫外线照射。照射后的原生质体在黑暗中培养,定期观察,两周后统计小细胞团形成频率,得到如下关系曲线(见图 1)。

从图 1 可以看出:*N19* 失活剂量为 6min, *S. bulbocastanum* 失活剂量为 4min。0.5min 紫外线照射能刺激 *N19* 原生质体分裂;2min 以后随着照射时间的延长,小细胞团形成频率急剧下降;照射时间超过 5min 时能分裂的原生质体已很少了。栽培种叶肉原生质体经失活剂量的紫外线照射,再在黑暗中培养 4d 后,在倒置显微镜下观察,可以看到原生质体不能分裂但能够膨大,变透明,叶绿体集中

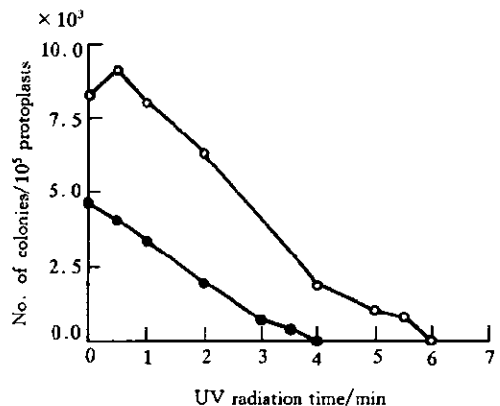


图 1 紫外线剂量对 *S. bulbocastanum* 和 *N19* 叶肉原生质体细胞团形成的影响

Fig. 1 Effect UV dosages on colonies formation of *S. bulbocastanum* and *N19*

—●— *S. bulbocastanum*, —○— *S. tuberosum*

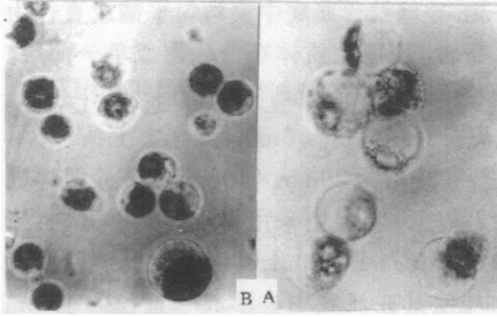


图 2 失活剂量紫外线照射并在黑暗中培养 4d 后的叶肉原生质体

Fig. 2 UV-inactivated potato mesophyll protoplasts after 4 day's culture in dark

A: N19 mesophyll protoplast irradiated by UV for 6min

B: N07 mesophyll protoplast irradiated by UV for 5min

在核周围(图 2A)或原生质体大小与对照相差不多,颜色稍深,形状极圆,内含物聚集于一边形成半透明状(图 2B)。其它品种的紫外线失活剂量见表 1。

从表 1 可以看出:原生质体相对直径  $S. demissum$  (1.05cm) >  $S. tuberosum$  (0.85cm) >  $S. bulbocastanum$  (0.80cm) >  $S. phureja$  (0.67cm) >  $S. brevidens$  (0.58cm)。而相应的紫外线失活剂量也是  $S. demissum$  (8min.) >  $S. tuberosum$  (5.5min.) >  $S. bulbocastanum$  (4min.) >  $S. phureja$  (2min) >  $S. brevidens$  (1.5min.)。原生质体相对直径大小反映了原生质体体积的大小,这种结果表明原生质体体积与其紫外线失活剂量之间存在着一定的相关性。

表 1 马铃薯栽培种和野生种倍性水平、原生质体相对直径、紫外线失活剂量

Table 1 Ploidy level, relative diameter of protoplast, UV inactivation dosage of potato cultivars and wild species

Species	Ploidy level	Relative diameter/cm	UV inactivation time/min
<i>S. demissum</i>	6	1.05	8.0
<i>S. tuberosum</i> (N07)	4	0.85	5.0
<i>S. tuberosum</i> (N08)	4	0.78	6.0
<i>S. tuberosum</i> (N14)	4	0.87	5.0
<i>S. tuberosum</i> (N19)	4	0.91	6.0
<i>S. phureja</i>	2	0.67	2.0
<i>S. brevidens</i>	2	0.58	1.5
<i>S. bulbocastanum</i>	2	0.80	4.0

从表 1 中还可以看出:六倍体  $S. demissum$  失活剂量为 8min,四个四倍体栽培种平均失活剂量为 5.5min,而 3 个二倍体野生种平均失活剂量为 2.5min,叶肉原生质体紫外线平均失活剂量大小与其倍性高低正好相吻合,这说明材料的倍性水平也与叶肉原生质体紫外线敏感性有一定的相关性。

## 2.2 紫外线照射方式对原生质体紫外线失活剂的影响

已知在照射剂量相同时高剂量率(急性照射)的生物学效应(生长抑制,存活率,育性等)大于低剂量率<sup>[8]</sup>。为了达到最佳失活效果,我们通过改变紫外线灯管功率和灯管与被照射材料间的距离实现不同剂量率照射,其中 N07 和  $S. brevidens$  实验结果见表 2。

表 2 灯管功率、灯管与材料间距离和紫外线失活剂量的关系

Table 2 Effects of power of UV lamp, distances between lamp and materials on UV inactivation dosage

Power of UV lamp /W	Distance between lamp and irradiated materials/cm	UV inactivation dosage/min	
		N07	<i>S. brevidens</i>
20	30	1.5	0.5
15	30	--- *	1.0
15	60	5.0	1.5

\* --- :未统计实验数据

从表 2 看出在灯管与材料间距离相同时,灯管功率越大,其失活剂量越小,反之则大。在功率相同时灯管与材料间距离越大则失活剂量越大,其中灯管与材料间距离对失活剂量的影响比灯管功率大。此外,我们还比较了 20W、30cm、1.5min 和 15W、60cm、15min。两种方式照射后原生体的植板培养状况,观察到急性照射(高功率、短距离)条件下 *S. brevidens* 和 *S. phureja* 原生质体的失活状态与完全致死状态难以区分。照射后原生质体存活时间明显缩短,变褐皱缩进程加快。

### 2.3 原生质体发育时期对紫外线的敏感性

细胞所处的不同分裂时期和植物不同发育时期对紫外线敏感性不一样的现象早有报道。我们没有具体研究有丝分裂各个时期紫外线的敏感性,主要根据原生质体的发育进程研究了以下 4 个时期紫外线的敏感性:Ⅰ:新鲜分离的原生质体,Ⅱ:原生质体培养 24h 后,此时原生质体已膨大透明,胞壁已开始形成,但保持较好圆形,Ⅲ:原生质体呈椭圆形,Ⅳ:原生质体在进行第一次分裂时。供试材料为 N07,不同时期照射时间均为 4min,两周后其细胞团形成曲线如图 3。紫外线照射 4min 后 N07 不同时期原生质体分裂频率远低于未照射对照,刚分离的原生质体对紫外线最敏感,随着原生质体培养进程,其紫外线抗性逐渐增强。

除上述因素外,原生质体在接受照射时的密度和原生质体悬浮液铺展厚度也能影响原生质体的失活。照射处理时密度不能太大,否则会出现原生质体附聚现象,以静置 5min 后,原生质体在皿底均匀平铺一层为佳。由于紫外线穿透能力较弱,所以照射时原生质体悬浮液不能太厚。

## 3 讨论

长期以来,由于紫外线的穿透能力相对较弱,加之高等植物的表皮组织和细胞内各种色素对紫外线有很强的反射作用和吸收作用,因而紫外线在作物诱变育种

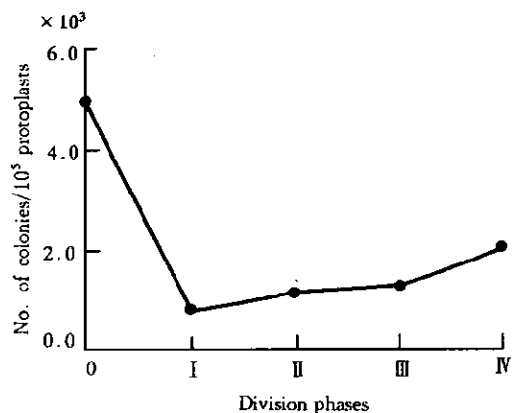


图 3 N07 叶肉原生质体不同分裂时期紫外线辐射对其小细胞团的影响

Fig. 3 Effect of UV radiation in different division phases on colony formation on N07

等应用中受到限制<sup>[8]</sup>。随着原生质体培养技术的发展,原生质体培养结合紫外线照射处理已成为诱发和选择突变体的理想方法<sup>[10]</sup>。一般认为辐射诱变处理以杀死 50%~70% 的细胞为宜。根据我们的实验结果,4 个马铃薯栽培种叶肉原生质体适宜的紫外线辐射诱变剂量应在 3.0~5.0min 之间。

实验观察表明失活剂量的紫外线照射后(如 4.0min 照射 *S. bulbocastanum*)原生质体不能进行细胞分裂,但能够膨大,变透明,且这种状态能持续一段时间。紫外线的这种“温和”的辐射失活作用在原生质体融合中具有重要的价值。一方面,失活的原生质体具有生理活性,与另一方融合后不影响融合细胞的分裂生长,而且未融合的失活原生质体能够象活细胞一样对融合细胞初期分裂生长起到饲喂作用。另一方面,失活后的原生质体不能分裂,也就不能再生植株,从而大大简化了杂种植株的筛选程序,提高杂种植株的筛选频率。

Stadler 等<sup>[11,12]</sup>也报道过多倍体较抗辐射的实验结果,但是他们的报道结论都是基于整体植株或某一器官或某一组织辐射的结果。我们以叶肉原生质体为紫外线照射对象,从单细胞水平进一步证实了这一结论。多倍体中多条染色体控制相同性状可能是多倍体更抗紫外线的主要原因,因为紫外线在某一条染色体上诱导的遗传损伤可以被多倍体中的其它染色体所补偿<sup>[13]</sup>。

倍性水平并不是影响叶肉原生质体紫外线辐射敏感性的唯一因素。因为在 4 个四倍体栽培种和 3 个二倍体野生种中,尽管其倍性水平相同,但紫外线失活剂量却不一样,有的甚至相差较大,这说明原生质体紫外线敏感性可能与其材料的基因型有关。

60 年代初 Sparrow 等<sup>[14]</sup>报道过 23 种二倍体草本植物茎分生组织细胞核体积和  $\gamma$  射线辐射敏感性之间有相关性:细胞核越大,对辐射就越敏感。我们没有测量各原生质体核体积,以原生质体相对直径作为原生质体体积的量度,发现原生质体体积与其紫外线敏感性之间存在着一定的相关性:原生质体体积越大,其紫外线失活剂量也越大。从六倍体 *S. demissum* 到栽培种,再到野生种,随着原生质体体积的减小,其紫外线失活剂量逐渐降低。这种相关性的原因尚待进一步探讨。

细胞所处的分裂时期和作物发育阶段对紫外线敏感性不一样的现象早有报道,其结果也是多种多样的,甚至有相互矛盾的结论<sup>[15~17]</sup>。失去胞壁保护的原生质体非常敏感,是诱发和选择突变体的理想材料,但理想的诱变系统应该是在引入目的突变的同时尽可能少地改变原有优良性状。根据图 3 的结果,刚分离的原生质体对紫外线太敏感,紫外线对细胞膜及膜内结构可能会有较大的损伤,时期Ⅳ的原生质体已处于分裂状态,细胞壁已完全形成,可能会削弱紫外线的诱变效率。因此时期Ⅱ可能是比较理想的诱变时期。

## 参 考 文 献

- 1 Bourgin J P, Chupeau M C, Missonier C. In: Earle E D eds. Variability in plants regenerated from tissue culture. New York: Praeger, 1986, p. 163
- 2 Grandbastien M A, Bourgin J P, Caboche M. Genetics, 1985, 109: 409
- 3 Jagger J. Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N J. 1967
- 4 Horsch R B, Jones G E. In *Vitro*, 1980, 16: 103~108

- 5 Jain S M, Shahin E A, Sun S. In: Puite K J eds. Progress in Plant Protoplast Research, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987: 221~223
- 6 Hall R D, Krens F A, Rouwendal G J A. Physiologia Plantarum, 1992, 85: 319~324
- 7 李耿光, 张兰英. 植物学报, 1988, 30: 21~24
- 8 顾瑞奇. 朱壬保主编. 辐射生物学, 北京: 科学出版社. 1987: 704~712
- 9 Niemann E G. Biological and Environment Effect of Low-Level Radiation, IAEA & WHO, 1976, I: 141~146
- 10 缪树华. 孙敬三编, 植物生物技术和作物改良, 北京: 中国科学技术出版社, 1990, 150
- 11 Stadler L J. Proc Nat Acad Sci USA, 1929, 15: 876~881
- 12 Krumbiegel G. Environ Exp Bot, 1979, 19: 99~103
- 13 Fujii T, Matasumura S. Japanece J Breed, 1959, 9: 245~254
- 14 Sparrow A H. Radiat Bot, 1965, 5: suppl., 101~131
- 15 Wertz E. Strahlentherapie, 1940, 67: 307~321, 536~550, 700~711
- 16 Brewen J G. Genetics, 1964, 50: 101~107
- 17 Yamaguchi H, Tataru A. Japanece J Breed, 1973, 23: 221~230

## Effects of UV Irradiation on the Mesophyll Protoplasts of Potato Cultivars and Wild Species

He Yawen He Hong Zhang Lanying Li Genguang

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650)

**Abstract** Mesophyll protoplasts from 4 potato cultivars and 4 wild species were irradiated by ultraviolet (UV) in the dark. The influences of UV irradiation on the division and growth of the protoplasts were investigated. The minimum UV irradiation dosages (MUI) of *S. demissum*, *S. tuberosum*, *S. bulbocastanum*, *S. phureja* and *S. brevidens* were 8min, 5.5min, 4.0min, 2.0min and 1.5min, respectively. Among the three ways of UV irradiation, "15W, 60cm" showed the most effective inactivation. Freshly isolated protoplasts were most sensitive to UV irradiation, after that their sensitivities decreased gradually. The UV inactivation dosage could be affected by ploidy level, genotype, volume of protoplast.

**Key words** Potato cultivars and wild species, mesophyll protoplast, UV irradiation