

吖啶橙失活处理应用于不对称融合初步探讨

何亚文 李耿光 张兰英

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 马铃薯栽培种和野生种叶肉原生质体经过吖啶橙(AO)处理后, 暗培养两天, 再光照4h而失活。失活程度取决于AO处理时间、AO浓度、光照时机等。四倍体失活浓度高于二倍体, 处理后马上光照失活效果最强烈, 8d后光照其小细胞团同未光照处理相差不大。AO失活的栽培种№7同罗丹明6G(R6G)失活的 *Solanum bulbocastanum* 融合后可以发生代谢互补恢复分裂, 已得到假定的杂种小愈伤组织。

关键词 马铃薯; 吖啶橙; 失活处理; 原生质体融合

INACTIVATION OF MESOPHYLL PROTOPLASTS USING ACRIDIN ORANGE FOR ASYMMETRIC PROTOPLAST FUSION

He Yawen Li Gengguang Zhang Lanying

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

Abstract Inactivation of mesophyll protoplasts from potato cultivars and its wild species was achieved by treatment with acridin orange(AO), under dark culture for 2 days and then exposure to light for 4h. The extent of this inactivation depend on the duration of AO treatment, the AO concentrations and the occasion for light treatment. The inactivation concentrations of tetraploid were higher than those of diploid. Immediate exposure to light after AO treatment showed strongest inactivation effect. Culture exposed to light after 8 days showed almost the same division pattern as control AO-treated in the dark. Small calli formed after fusion of protoplasts in rhodamine (R6G) inactivated potato (*Solanum tuberosum*) and AO-treated *Solanum bulbocastanum*.

Key words Potato; Acridin orange; Inactivation treatment; Protoplast fusion

随着原生质体融合技术应用研究的深入, 不对称融合越来越受到育种学家们的欢迎。目前产生不对称杂种主要是通过 γ -射线或 χ -射线辐射失活, 但所得到的不对称杂种要么供体基因组完全消除, 要么杂合体中仍保留中等到大部分供体基因组^[1-2]。而且 γ -射线或 χ -射线发射装置复杂, 造价高, 操作繁琐, 不是一般实验室能配备的, 这也大大限制了他们的应用。我们试图寻找一种操作简便, 容易得到又能替代 γ -或 χ -射线作用的新型失活剂。吖啶橙(Acridin orange, AO)是一种光敏剂, 曾被用作核染色剂, 它能与DNA相结合成AO-DNA复合体^[3], 光

能诱导这种复合体降解,形成单链或双链碎片^[4]。Pedersen^[5]曾在一篇论文摘要中报道过碘乙酰胺失活后的甜菜原生质体与AO处理过的原生质体单独培养均不分裂,PEG法融合后杂合体发生代谢互补得到假定的杂种小愈伤,但未见进一步报道。本文以马铃薯叶肉原生质体为材料研究了AO失活条件以及初步融合结果。

1 材料与方法

四倍体马铃薯栽培种(*Solanum tuberosum*)来自中国南方马铃薯研究中心,不同品系以№7、№8、№19表示,二倍体野生种*S. brevidens*和*S. bulbocastanum*是由美国Wisconsin大学植物病理系Helegenson教授惠赠。吡啶橙系Sigma公司产品。

叶肉原生质体分离,纯化和培养 见李耿光等^[6]的方法。

吡啶橙处理 方法一:AO溶解在K₃分离液中配成400mg L⁻¹母液(简称K₃A),过滤灭菌,冰箱保存。叶片酶解时通过调节K₃A, K₃分离液和酶液量配成不同浓度AO的酶解液,在酶解期间AO失活处理。方法二:在原生质体分离纯化之后进行,AO溶解在改良K₈P培养基(简称0.55mol/L P₃G)^[4]中配成400mg L⁻¹母液,处理时用0.55mol/L P₃G培养基稀释成不同浓度的吡啶橙处理液,在4℃黑暗条件下处理2h。处理后的原生质体用0.45mol/L缓冲液洗涤两次,再用0.55mol/L P₃G洗涤一次,最后用0.55mol/L P₃G悬浮并调至合适密度在黑暗中液体浅层培养,培养两天后取出用无菌培养皿罩住,在3000 Lx的光照强度下光照4h,再置于黑暗中培养。三个星期后观察统计小细胞团形成频率。

吡啶橙最低失活浓度的确定 如果一定浓度的AO处理后原生质体仍能膨大变透明进而启动分裂则视为处理不足,继续提高处理浓度。如处理后植板培养对照能分裂而处理过的原生质体不能分裂,但又不马上皱缩死亡、保持与初培养时相似的大小和形态,这种状态我们称之为最低失活状态,所对应的AO浓度称为最低浓度(简称失活浓度,下同),则继续提高AO浓度,观察植板培养情况。

原生质体融合 采用PEG高Ca²⁺高pH法^[6]。

2 实验结果

根据AO失活原理,在叶肉原生质体AO失活研究中主要考虑两个因素:光照和AO浓度。

2.1 光照处理对AO失活的影响

光对原生质体初期培养不利,为避免这种影响,我们首先以新鲜分离的№7叶肉原生质体和培养两天后的№7叶肉原生质体为材料,在3000Lx光照强度下作2、4、8h光照处理,确定AO处理后的光照时间。结果表明:刚分离的原生质体对光较敏感,培养两天后的原生质体光照2h、4h对其分裂频率影响不大,因此后续光照时间均采用4h。在此基础上,以50mg L⁻¹AO,按处理方式二叶片酶解过程处理,处理后的原生质体用0.45mol/L缓冲液洗涤两次,0.55mol/L P₃G洗涤一次,再用0.55mol/L P₃G悬浮调至合适密度,平均分为五等份,分别在5个直径为30mm的玻璃培养皿中薄层培养,随后这五皿分别作不同时期光照处理。处理I:AO处理后不

光照，一直在暗中培养。处理 II：AO 处理后马上光照 4h，再转入黑暗中培养。处理 III：AO 处理后暗中培养 2d 再光照 4h。处理 IV：4d 后光照。处理 V：8d 后光照。三周后观察统计结果如图 1。

从图 1 可见：① AO 失活处理后辅以光照能显著降低原生质体活力。没有 AO 处理的对照，三周后其细胞团形成频率可达 11%，50 mg L⁻¹ AO 处理后不光照一直在暗中培养，其小细胞团形成频率已降至 3.5%，这种下降是由 AO 本身失活所引起的。AO 失活处理后光照处理 4h，其细胞团形成频率已降至 0，这种下降是由光照引起的。因此，我们认为 AO 对原生质体的失活效应应包括两个过程：黑暗中 AO 本身对原生质体失活作用和光诱导引起的失活作用。② AO 处理后的曝光时机很重要，从图 1 看出 50mg L⁻¹ AO 处理后马上光照，失活效应最明显，原生质体全部死亡；2d 后光照则有极少量细胞团形成；4d 后光照则小细胞团形成频率已有上升；8d 后光照 4h 其小细胞团形成频率已同黑暗中培养的对照相差不大。这说明曝光时机很重要：处理后马上光照失活效应最强，8d 后光照则失活效果最差；暗培养时间越长也即光照时机越迟，则其失活效果越差。鉴于处理后马上光照对原生质体伤害作用太大，会影响到后续融合后杂合体分裂能力的恢复，因此我们在后续实验中全部采用 AO 处理后暗培养两天再光照处理。

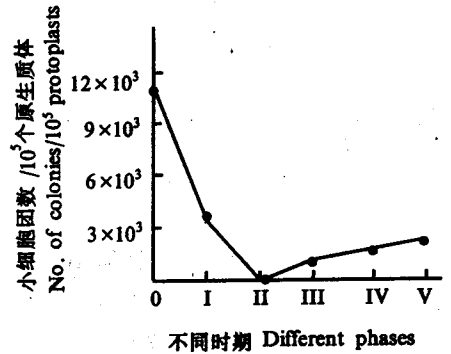


图 1 AO 处理后不同时期光照对小细胞团形成的影响

Fig. 1 Effect of different phases of light exposure after AO treatment on colonies formation of №7

2.2 叶肉原生质体 AO 失活处理

根据以上光照处理方式，我们以 №7 为材料实验了两种在 AO 处理方式下不同 AO 浓度与其小细胞团形成频率的关系，得到表 1 和图 2 结果。

从图 2 可以看出：№7 叶肉原生质体两种失活处理方式中均存在着典型的浓度效应，在原生质体纯化后再进行 AO 失活处理方式中，极低浓度 AO 处理，如 25 mg L⁻¹，能刺激原生质体分裂，在一定浓度范围内随着 AO 浓度升高，小细胞团形成频率逐渐降低，AO 浓度超过 250 mg L⁻¹ 则无小细胞团形成。同一品种，原生质体纯化后 AO 处理，其失活浓度比酶解时处理大得多，这主要是失活处理时间不同造成的。比较表 1 还可以看出：四倍体比二倍体失活浓度高，同为四倍体栽培种，其失活浓度也不一样，这说明材料本身的基因型对 AO 失活也有影响。

表 1 马铃薯及其野生种叶肉原生质体 AO 失活浓度

Table 1 AO inactivation concentrations of mesophyll protoplasts from potato and its wild species

材料 Materials	AO 失活浓度 AO inactivation concentrations (mg L ⁻¹)	
	酶解时失活处理 Inactivation treatment during the overnight enzymolysis	原生质体纯化后失活处理 Inactivation treatment after purification
Potato cultivar № 7	100	250
Potato cultivar № 8	120	260
Potato cultivar № 19	100	225
<i>Solanum brevifolius</i>	75	200
<i>S. bulbocastanum</i>	75	200

同一品种，原生质体纯化后 AO 处理，其失活浓度比酶解时处理大得多，这主要是失活处理时间不同造成的。比较表 1 还可以看出：四倍体比二倍体失活浓度高，同为四倍体栽培种，其失活浓度也不一样，这说明材料本身的基因型对 AO 失活也有影响。

2.3 融合处理

根据上述得到的结果,我们以失活浓度的罗丹明 6G(Rhodamine 6G, R6G)($15\mu\text{g L}^{-1}$)处理马铃薯野生种,以 100mg L^{-1} AO 在酶解过程中处理№7 原生质体,单独培养不能分裂,将他们简单混合后培养也未见分裂,而这些失活处理后的原生质体经 PEG 高 Ca^{2+} 高 pH 化学法融合,在改良 K_8P 培养基上培养,两天后在 3000Lx 光照强度下光照 4h,三周后得到肉眼可见的小愈伤组织。但这些假定的杂种小愈伤生长缓慢,不久会部分死亡,尚不能作杂种特性鉴定。

3 讨论

在一定浓度范围内 AO 是一种移码突变剂,它们能嵌入 DNA 分子中间使一对(或少数几对)核苷酸增加或缺失,引起这以后的整个密码移动造成移码突变。当这些突变不足以引起死亡时,其失活效应便不表现出来。随着浓度升高,大量的 AO 与 DNA 结合形成 AO-DNA 复合体,这些复合体在光诱导下能发生降解造成染色体断裂,片断化,导致细胞失活^[4,9]。因此在 AO 失活过程中存在着浓度效应。四倍体栽培品种的 AO 失活浓度比二倍体高,这可能主要是因为 AO 是直接作用于核 DNA 的,四倍体核 DNA 含量应该比二倍体含量高,尤其象马铃薯这样的同源四倍体,每一个位点基因都有四个成员,AO 诱导的遗传损伤可以被多余的遗传物质所补偿或掩盖,因而并不马上表现出来,也就更抗 AO 失活处理。光照处理能增强失活效果,主要是因为光照诱导 AO-DNA 复合体降解。8d 后光照效果差,可能是因为在黑暗中 AO 处理不足以使原生质体失活,光照之前原生质体已经开始分裂,随着培养的进行原生质体修复也可能加强,因此 AO 失活效果弱,但 AO 此时仍然可以起到突变剂作用。马铃薯叶肉原生质体经 AO 处理后,可以看到核被染成浅黄色,随着叶肉原生质体分裂,该黄色逐渐消失,这种颜色标记在原生质体融合初期是一个极好的选择标记。R6G 失活的叶肉原生质体与 AO 处理过的原生质体融合后能恢复分裂,这可能主要是因为 AO 专一作用于核 DNA,而 R6G 只是特异地作用于胞质系统线粒体,因而杂合体才发生代谢互补恢复分裂。这种筛选杂合体方法不但可以避免融合双方引入筛选标记,而且具有筛选准确、效率高等特点。杂种愈伤组织生长缓慢可能是因为融合双方都经过了失活处理。如果将 AO 失活后的原生质体与未失活处理的原生质体融合可能会克服这种现象。AO 对染色体断裂作用效果有待进一步调查杂种愈伤组织和低浓度 AO 失活处理后的原生质体再生愈伤组织的细胞学行为。

参考文献

- 1 Bates G W. Molecular analysis of nuclear genes in somatic hybrids. *Physiologia Plantarum*, 1992, 85:308-314
- 2 Wijbrandi J, Zabel P, Koornneef M. RFLP analysis of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and

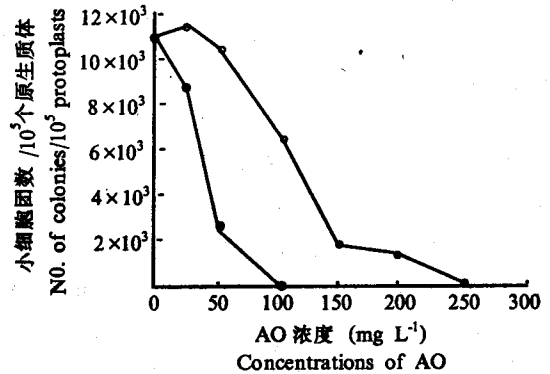


图2 AO 浓度对№7 小细胞团形成的影响

Fig. 2 Effect of AO concentrations on colonies formation of №7

- 纯化后处理 Inactivation treatment after purification
- 酶解时处理 Inactivation treatment during enzymolysis

- irradiated *L. peruvianum*: evidens for limited donor genome elimination and extensive chromosome rearrangement. *Mol Gen Genet*, 1992, 222:270-277
- 3 Gupta H S, Deepesh N. *Proc Ind Nat Sci Acad*, 1983, B49. 6:653-660
 - 4 Dhar A, Chaudhuri U. *Arch Biochem Biophys*, 1974, 162:310-312
 - 5 Pedersen H C et al. Inactivation of sugarbeet protoplasts using acridin orange, an agent for late selection of fusion products. In: Puite K J et al. eds. *Progress in Plant Protoplast Research*. Kluwer Academic Publishers, 1988. 265
 - 6 李耿光, 张兰英. 马铃薯叶肉原生质体再生植株的研究. *植物学报*, 1988, 30: 21-24
 - 7 Kao K N, Michayluk M R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a low population density in liquid medium. *Planta*, 1975, 126:105-110
 - 8 Kao K N, Michayluk M R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 1974, 115:355
 - 9 缪树华. 植物抗性突变体的发生、选择和应用. 见: *植物生物技术和作物改良* (孙敬三等编). 中国科学技术出版社, 1990, 149