

甘蓝型油菜与芝麻菜体的细胞杂交

张传利^{1,3}, 杨志新², 桂雪梅^{1,4}, 刘雅婷¹, 毛孝强¹, 厦国银¹, 林良斌¹

1 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201

2 云南农业大学资源与环境学院, 昆明 650201

3 云南热带作物职业学院, 普洱 665000

4 云南普洱市种子管理站, 普洱 665000

摘要: 为拓宽油菜育种的基因资源库, 改良油菜品种, 以甘蓝型油菜(*Brassica napus*)花油 3 号下胚轴和芝麻菜(*Eruca sativa*)下胚轴为材料分离制备原生质体; 然后采用 PEG-高 Ca^{2+} -高 pH 法进行原生质体融合, 当 PEG 浓度为 35%, 原生质体融合密度为 5×10^5 个/mL 时, 融合 25 min 时, 融合率可达 18.2%。融合后在培养密度为 1×10^5 个/mL 时, 以附加 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 200 mg/L 肌醇 + 300 mg/L 水解酪蛋白的改良的 KM8p 为融合体培养基, 以 0.1 mol/L 蔗糖 + 0.2 mol/L 葡萄糖 + 0.2 mol/L 甘露醇作渗透稳定剂进行液体浅层培养, 效果较好, 愈伤组织再生率最高为 6.8%。将融合体再生的小愈伤组织转移至培养基(B₅ 无机盐 + 0.087 mol/L 蔗糖 + 0.2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA + 0.2 mg/L 6-BA + 0.5% Agar, pH 5.8)上增殖培养, 待愈伤组织长至直径为 3~5 mm 时, 及时将其转至分化培养基(MS 无机盐 + 0.087 mol/L 蔗糖 + 0.1 mg/L IAA + 0.8 mg/L 6-BA + 0.8% Agar, pH 5.8)中诱导不定芽再生, 芽分化率为 35.7%。当不定芽长为 2~3 cm 时, 将其切下转入附加 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L 6-BA 的 1/2MS 生根培养基中诱导生根, 14 d 左右即可形成再生植株, 生根率可达 88%。同时, 以紫外线(60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)照射芝麻菜原生质体, 进行不对称融合, 照射 2 min 的获得了愈伤组织和再生植株, 照射 4 min 的只获得愈伤组织, 而照射 5 min 以上的没有获得愈伤组织, 但其愈伤组织再生、增殖及植株再生均不如对称融合。从细胞学鉴定的 21 块杂种愈伤组织上再生出 16 株杂种植株。

关键词: 甘蓝型油菜, 芝麻菜, 原生质体融合, 不对称融合, 植株再生

Somatic Hybridization between *Brassica napus* and *Eruca sativa* Mill

Chuanli Zhang^{1,3}, Zhixin Yang², Xuemei Gui^{1,4}, Yating Liu¹, Xiaoqiang Mao¹, Guoyin Xia¹, and Liangbin Lin¹

1 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2 College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

3 Yunnan Vocational College of Tropical Crops, Pu'er 665000, China

4 Yunnan Pu'er Seeds Management Station, Pu'er 665000, China

Abstract: In order to expand gene resources and improve *Brassica napus* cultivars, protoplasts isolated from hypocotyls of *Brassica napus* cv. Huayou No. 3 and *Eruca sativa* were fused by PEG-high Ca^{2+} -high pH. Fusion frequency was up to 18.2% when fusion

Received: October 19, 2007; **Accepted:** November 22, 2007

Supported by: the Yunnan Natural Science Fund (No. 2004C0035M).

Corresponding author: Liangbin Lin. Tel: +86-871-5227731; E-mail: linliangbin-63@163.com

云南省自然科学基金(No. 2004C0035M)资助。

system contained 5×10^5 protoplasts/mL, and when PEG concentration of fusion agents were 35% and when fusion time was 25 min. Then the fused protoplasts were cultured by the method of thin liquid layer at the density of 1×10^5 protoplasts/mL in improved KM8p medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA, 200 mg/L inositol, 300 mg/L protein hydrolysate, and the combinations of 0.1 mol/L sucrose and 0.2 mol/L glucose and 0.2 mol/L mannitol for osmotic regulator, the frequency of callus regeneration was up to 6.8%. When the micro-calli transferred to the proliferation medium that contained B₅ salts, 0.087 mol/L sucrose, 0.2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA, 0.2 mg/L 6-BA and 0.5% Agar, pH 5.8, have grown up to 3~5 mm of diameter, the calli were transferred to the differentiation medium that contained MS salts, 0.087 mol/L sucrose, 0.1 mg/L IAA, 0.8 mg/L 6-BA, 0.8% Agar, pH5.8, the shoots were regenerated in 4 weeks and its frequency was up to 32.8%. Then 2~3 cm shoots were transferred to 1/2 MS medium with 0.5 mg/L IBA+0.2mg/L 6-BA, plantlets were obtained in 14 days and the plantlet frequency was up to 88%. When the protoplasts of *Eruca sativa* were treated with UV radiation for 2 minutes calli and plantlets have been regenerated, treated for 4 min only calli have been regenerated, and treated for more than 5 min calli have not been regenerated. The callus regeneration and callus proliferation and plant regeneration from symmetric fusion were more than from asymmetric fusion. 16 hybrid plantlets have been regenerated on 21 piece of hybrid calli identified by cytology method.

Keywords: *Brassica napus*, *Eruca sativa*, protoplast fusion, asymmetric fusion, plant regeneration

油菜是我国重要的油料作物,是世界食用植物油和植物蛋白的主要来源之一,提高其产量、品质及抗性是关系到国计民生的大事。但由于油菜栽培种遗传基础狭窄、抗逆性差,尤其易感多种病虫害在很大程度上已经限制了油菜育种工作。而在芸薹属或其近缘属植物中可利用的基因资源十分丰富,这为通过芸薹属的种间杂交或属间杂交创造油菜新种质提供了条件。芝麻菜(*Eruca sativa* Mill) 又名芸芥,是十字花科(Cruciferae)芝麻菜属(*Eruca* Mill)一年生草本植物,是世界干旱半干旱地区的重要油料作物^[1],也是迄今为止人们发现的最为抗旱耐瘠的十字花科油料作物,具有许多抗(耐)病、耐盐碱等有益基因,且种子富含对人体有益的 4-methyl thiobutyl glucosenolates 和生产工业润滑油原料棕榈^[2]。

可见,芝麻菜是改良芸薹属油料作物乃至整个十字花科植物育种的宝贵遗传资源。但由于油菜和芝麻菜属于十字花科的不同属,两者之间的遗传关系相对较远,远缘有性杂交高度不亲和^[1],这就严重限制了这些近缘属有益基因资源的利用。体细胞杂交可克服物种间的不亲和性,获得种间、属间、科间杂种植株^[3],是拓宽作物育种的基因资源,创造新的育种材料进行作物品种改良的新途径。目前, Faleson 与 Sikdar 利用原生质体融合技术分别将甘蓝型油菜和芥菜型油菜的下胚轴原生质体与 *E. sativa* 的叶肉原生质体融合,获得了杂种植株^[4,5],但至今还没有以甘蓝型油菜的下胚轴与芝麻菜的下胚轴为材料,进行原生质体融合,获得杂种植株的报道。本研究以甘蓝型油菜(*Brassica napus*)花油 3 号和芝麻

菜(*Eruca sativa*)为材料,对其下胚轴原生质体融合进行研究,旨在建立起融合再生的技术体系,并获得杂种植株,为通过细胞工程技术利用芝麻菜的优良基因改良油菜品种奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

花油 3 号(*Brassica napus* cv. Huayou No. 3), 种子由云南省农科院生物技术所提供;

芝麻菜(*Eruca sativa* Mill), 种子由云南农业大学生物技术系提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗体系的建立

将籽粒饱满、大小均一的花油 3 号和芝麻菜种子在水中浸泡 0.5 h 后,用 75%(V/V)酒精表面消毒 1 min,然后在 0.1%(W/V)升汞溶液中消毒 10 min,无菌水冲洗 4 次,分别接种于不含任何激素的 MS 与 B₅ 固体培养基上^[6],萌发出苗。

1.2.2 原生质体的分离与纯化

芝麻菜下胚轴原生质体的分离和纯化参照张传利等^[7]的方法;花油 3 号原生质体的制备方法类似芝麻菜的,差别在于材料为培养 8 d 无菌苗的下胚轴,酶液为 1.0% Celluase Onozuka R-10+0.5% Macerozyme Onozuka R-10+3mmol/L MES+CPW-10M(pH 5.6),酶解 12 h,滤液用 500 r/min 离心 5 min,用 CPW-9M(含 9%甘露醇和 CPW-21S(含 21%蔗糖)悬浮沉淀。两者原生质体产量均用血球计数板记数,原生质体活力测定用 0.1%的伊文斯蓝染色检测,以未染色

的原生质体占观察总数原生质体的百分数表示。

1.2.3 原生质体融合、培养及植株再生

将制备好的花油 3 号和芝麻菜原生质体用洗液 (0.6 mol/L mannitol+10.5 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 悬浮调至一定的密度, 采用 PEG-高钙-高 pH 法、PEG 法和高钙高 pH 法三种方法按如下组合进行原生质体融合。对于不对称融合, 需要在混合之前将供体(芝麻菜)原生质体放紫外灯 (60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) 下照射。

本实验设以下融合组合:

I、甘蓝型油菜原生质体(B)(+)芝麻菜原生质体(E)

II、甘蓝型油菜原生质体(B)(+)芝麻菜原生质体(E)(UV, 2 min)

III、甘蓝型油菜原生质体(B)(+)芝麻菜原生质体(E)(UV, 4 min)

IV、甘蓝型油菜原生质体(B)(+)芝麻菜原生质体(E)(UV, 5 min)

V、甘蓝型油菜原生质体(B)(+)芝麻菜原生质体(E)(UV, 6 min)

VI、甘蓝型油菜原生质体(B)(+)芝麻菜原生质体(E)(UV, 8 min)

其中 I 为对称融合, II-VI 为不对称融合。每次实验重复 3 次, 每一组合以培养单独的双亲原生质体作对照, 融合物和对照皆用 KM8p 培养基浅层培养。

每皿加入 2 mL 培养基进行悬浮, 原生质体密度为 5×10^5 个/mL, (26 \pm 1) $^\circ\text{C}$ 黑暗培养, 每周加 0.5 mL 新鲜培养液。培养开始后每天观察融合体的分裂和生长状况。待融合体再生细胞完成几次分裂后, 移于弱光(200 lx)下培养, 当培养皿中出现肉眼可见的愈伤组织后, 统计植板率, 并将愈伤组织连同液体培养基一起转入 IB^[8](B₅ salts + 0.087 mol/L sucrose + 0.2 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L NAA + 0.2 mg/L 6-BA + 0.5% agar, pH 5.8) 固体培养基中。待愈伤组织长至直径为 3~5 mm 时, 将其转至 NB 分化培养基^[8](MS salts + 0.087 mol/L sucrose + 0.1 mg/L IAA + 0.8 mg/L 6-BA + 0.8% agar, pH 5.8) 中诱导不定芽的分化。当不定芽长至 2~3 cm 时将其切下, 插入含有 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L 6-BA 的 1/2MS 生根培养基中诱导生根, 14 d 左右即可形成再生植株。

1.2.4 再生愈伤组织的鉴定

(1) 形态学分析: 观察融合后再生愈伤组织的

色泽、颗粒大小、质地等形态学特征, 并与亲本的进行比较鉴定杂种。

(2) 染色体分析: 挑取生长旺盛的双亲及转出的每个再生融合克隆的愈伤组织于 10 mL 的离心管中, 在 0~4 $^\circ\text{C}$ 下低温处理 24 h, 再加入 5 mL 0.1% α -溴萘溶液, 处理 4 h。然后 500 r/min 离心 5 min, 弃取上清液后, 加蒸馏水悬浮、离心 5 min, 重复 3 次, 加入卡诺氏固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)固定 20 h, 再用蒸馏水离心洗涤 3 次, 用 1N 盐酸 60 $^\circ\text{C}$ 的解离 12 min, 用蒸馏水洗净后卡宝品红染色液染色 3 min, 压片, 镜检并照相, 对染色体进行观察、记数、统计、分析。

1.2.5 再生植株的鉴定

(1) 形态学鉴定: 主要对再生植株的叶型及其厚薄、叶脉、株型等营养器官进行观察, 并与亲本进行比较鉴定杂种。

(2) 细胞学鉴定: 待再生植株的根长 1~2 cm 时, 取其根尖, 用 0.1% α -溴萘处理 4~5 h, 漂洗后用卡诺氏固定液固定 24 h。然后用蒸馏水漂洗根尖 5 次, 再用 1N 盐酸 60 $^\circ\text{C}$ 的解离 12 min, 蒸馏水洗净后用卡宝品红染色液染色 3 min, 压片, 镜检并照相, 对染色体进行观察、记数、统计、分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜花油 3 号和芝麻菜的原生质体融合

2.1.1 融合方法对原生质体融合的影响

花油 3 号与芝麻菜下胚轴原生质体融合采用高钙高 pH 法、PEG 法和 PEG-高钙-高 pH 法三种融合方法, 不同融合方法的融合效果不同(图 1), 从总融合率、二源融合率、多源融合率来看, PEG-高钙-高 pH 法最高, 其中二源融合率、多源融合率分别为 18.2%、5.3%, 高钙高 pH 法最低, 二源融合率、多源融合率分别为 3.8%、1.2%, PEG 法介于两者之间, 二源融合率、多源融合率分别为 11.4%、3.8%。以上结果表明, 聚乙二醇与高钙-高 pH 液相结合来诱导原生质体融合可以显著提高融合率(主要是提高二源融合率)。因此, 三种融合法中, 以 PEG-高钙-高 pH 法进行花油 3 号与芝麻菜下胚轴的原生质体融合最佳。

2.1.2 PEG 6000 浓度对原生质体融合的影响

在原生质体融合时, PEG 的浓度对融合效果有

着直接的影响。结果表明(图 2), 随着 PEG 浓度从 25%增加到 40%, 原生质体二源融合率由 12.8%增加到 20.3%, 且多源融合率也相应增加(2.2%~9.3%), 而多源融合为无效融合。但 PEG 浓度提高至 45%时, 二源融合率开始降低, 多源融合率还在增加。此后, 多源融合率也开始下降。实验中观察到大量原生质体集聚变形, 紧密粘连, 且大多数原生质体破碎形成絮状漂浮物。用高钙高 pH 液洗涤, 一些原生质体不能恢复。由于 PEG 本身对原生质体有毒性, 为了减少 PEG 对异核体进一步分裂的副作用, 从综合效果来看, 35% PEG 是花油 3 号和芝麻菜原生质体融合的适宜浓度。此时, 二源融合率和多源融合率分别是 17.9%与 4.8%, 且多数为一对一融合。

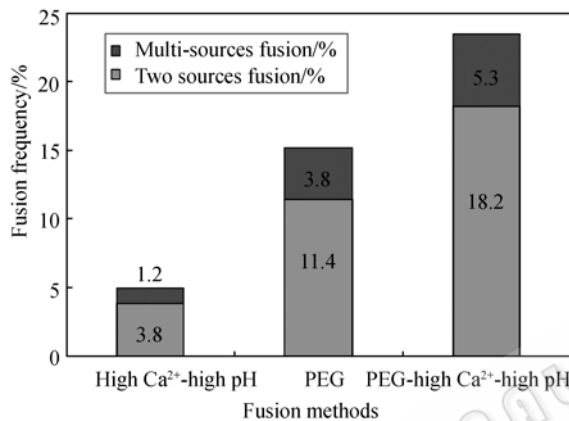


图 1 融合方法对原生质体融合的影响

Fig. 1 Effects of fusion methods on the protoplast fusion
Fusion time: 25 min; PEG 6000 concentration: 35%

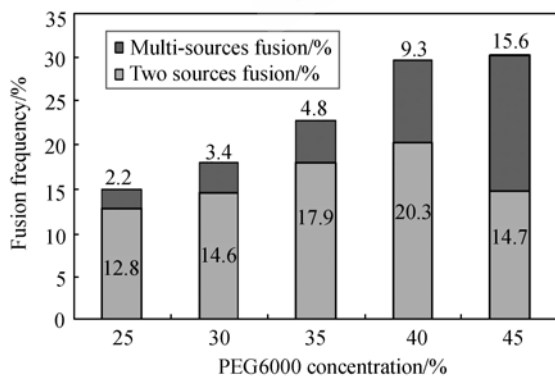


图 2 PEG 浓度对原生质体融合的影响

Fig. 2 Effects of PEG concentration on the protoplast fusion
Fusion method: PEG-high Ca²⁺-high pH; time: 25 min

2.1.3 原生质体不同密度对融合率的影响

原生质体融合率除了与原生质体质量有直接关系外, 还与原生质体的密度成正相关关系, 即随着

原生质体的密度增加, 融合率也逐渐加大。结果表明(图 3), 当原生质体的密度低于 1×10^5 个/mL 时, 融合率较低(二源融合率仅为 3.3%), 而当密度为 5×10^6 个/mL 以上时, 尽管融合率很高, 但多数为多源融合体。原生质体的密度为 5×10^5 个/mL 与 1×10^6 个/mL 时相比, 两者二源融合率相近, 但后者多源融合率比前者要高的多。综合考虑上述因素, 原生质体融合的适宜密度为 5×10^5 个/mL。

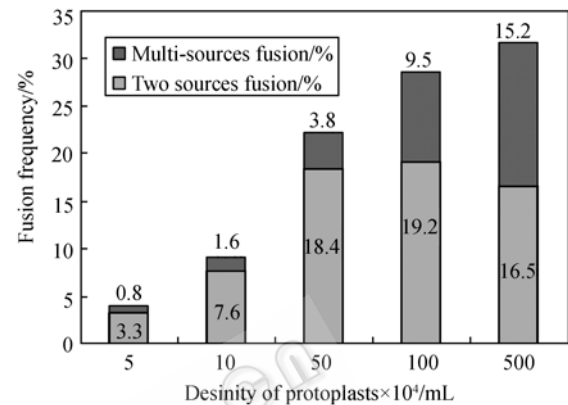


图 3 原生质体的不同密度对融合率的影响

Fig. 3 Effects of different density of protoplasts on frequency of fusion

Fusion method: PEG-high Ca²⁺-high pH; time: 25 min

2.1.4 融合时间对融合率的影响

提高 PEG 浓度和延长处理时间都可提高融合率, 但过高的浓度和过长的处理时间又会导致融合细胞活力的下降。本实验分别处理 10、15、20、25、30 min, 其融合率(图 4)随着处理时间的延长逐渐提高, 但处理时间超过 25 min 后, 聚集体总数增多, 但二源融合比例没有增加, 多源融合比例增多。当 PEG 浓度为 35%, 处理时间为 30 min 时, 融合体的分裂能力明显下降。从二源融合率、多源融合率两方面综合考虑, 花油 3 号和芝麻菜下胚轴原生质体融合的最佳时间为 25 min。此时, 二源融合率和多源融合率分别为 18.2%与 3.8%。

2.2 融合体的培养

2.2.1 融合体培养的早期分裂

刚刚游离得到的花油 3 号和芝麻菜下胚轴原生质体有大有小, 但花油 3 号下胚轴原生质体较芝麻菜下胚轴原生质体大, 两者原生质体相对较易区别。

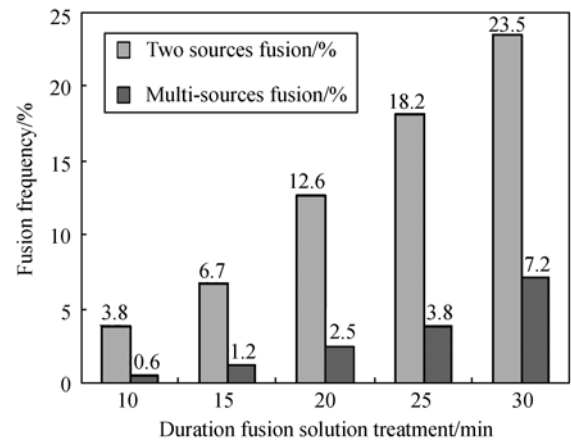


图 4 融合液处理时间对融合率的影响
Fig. 4 Effect of duration fusion solution treatment on frequency of fusion
Fusion method: PEG-high Ca^{2+} -high pH; time: 25 min

各组合经 PEG 处理并用改良的 KM8p 培养基进行液体浅层培养，融合体在培养 1 d 后，在倒置显微镜下可以观察到部分细胞间消失的异源融合体，体积增大。培养 2~3 d 后，细胞开始变形，有的呈椭圆形，再生细胞壁，4 d 后细胞发生第一次分裂，20 d 左右形成小细胞团，细胞团继续培养分裂 3 周后形成肉眼可见的小愈伤组织。对照中单独培养的花油 3 号下胚轴原生质体在本实验条件下不分裂；芝麻菜原生质体在培养 2 d 后就发生变形、膨大，3 d 后发生第一次细胞分裂，但分裂数较少，再生的愈伤组织数少。实验中观察到，胞质较浓的融合体细胞比胞质稀少的融合体细胞容易发生分裂和形成愈伤组织，而胞质稀少的融合体仅能分裂两三次，然后褐化死亡。在培养过程中发现融合体经常发生集聚、粘连而沉降于培养皿底部，因此，在培养过程中要每天定时缓慢摇 3 次。

2.2.2 影响融合体培养的因素

(1) 基本培养基对融合体培养的影响：以液体浅层培养法，比较了 KM8p、DPD 和 B₅ 培养基对融合体培养的影响。由表 1 可知，三种培养基的分裂频率都在 10% 以上，第一次分裂时间相差不大且分裂相对较早(3~4 d)，但 KM8p 和 DPD 培养基的分裂频率和再生细胞团数要比 B₅ 培养基高的多，且培养到 40 d 时，只有 KM8p 培养基可以培养出较多的直径约为 2 mm 的愈伤组织。从综合情况考虑，采用改良的 KM8p 培养基来培养融合体较适宜。

表 1 基本培养基对融合体的影响
Table 1 Effects of basic media on the hybrids of protoplasts

Basic media	Initiation time of first division/d	Division frequency after 8 d in culture/%	No. of cell colonies after 20 d in culture	No. of callus formation after 40 d in culture
KM8p	3	14.2	+++	++
DPD	3	13.6	+++	+
B5	4	10.2	++	+

Every medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA, 200 mg/L inositol, 300 mg/L protein hydrolysate, and the combinations of 0.1 mol/L sucrose and 0.2 mol/L glucose and 0.2 mol/L mannitol for osmotic regulator. “+++”: most, “++”: more, “+”: few, “-”: nothing. Follows the same tables

(2) 不同渗透压稳定剂组合及浓度对融合体培养的影响：渗透压稳定剂对于保持细胞的稳定性和细胞的持续分裂起着重要的作用，不同的渗透压稳定剂组合及浓度对融合体培养效果不同。由表 2 可知，从分裂时间、分裂频率和植板率等综合考虑，0.1 mol/L 蔗糖、0.2 mol/L 甘露醇和 0.2 mol/L 葡萄糖与 0.2 mol/L 蔗糖和 0.2 mol/L 葡萄糖的组合要好于其它组合，且不含不含或含量较低葡萄糖组合的分裂频率可能较高，但植板率相对都不高。这可能是由于在融合体的培养的过程中，葡萄糖能够通过降解自身，从而达到降低渗透压，保证了细胞的持续分裂。

表 2 不同的渗透稳定剂对融合体培养的影响
Table 2 Effect of different osmoticum on the cell division and colonies formation

Sucrose /(mol/L)	Mannitol /(mol/L)	Glucose /(mol/L)	Time of first division /d	Division Frequency /%	Plating efficiency /%
0.3	0	0	4	14.0	3.2
0.2	0.2	0	5	5.6	0
0.1	0.3	0.1	4	9.4	2.8
0	0.4	0.2	4	10.2	3.3
0	0.3	0.3	3	11.8	4.2
0	0.2	0.4	3	10.6	3.7
0.1	0.2	0.2	3	13.8	5.2
0.2	0	0.2	3	14.3	4.8

At the density of 1×10^5 protoplasts/mL in improved KM8p medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA, 200 mg/L inositol, 300 mg/L protein hydrolysate.

以改良的 KM8p 为培养基培养融合体，培养基中不同的激素组合和浓度对细胞分裂有很大的影响(表 3)。从表中可知，1.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L NAA 和 0.5 mg/L 6-BA 效果最好，分裂频率高达 14.2%。

培养基中不含 NAA 对细胞分裂的频率影响不大,但在不含 2, 4-D 的培养基中,细胞分裂的频率较低(4.9%),且持续分裂形成小细胞团的能力也较差。单独使用 2, 4-D 时分裂频率较好,且随着 2, 4-D 浓度(0.5~1.0 mg/L)升高,细胞分裂频率也相应增高(8.4%~9.2%),但细胞团数和再生愈伤组织数相对 2, 4-D、NAA 和 6-BA 组合较少,这就要求在形成细胞团或小愈伤组织时要降低 2, 4-D 的浓度。而在不含 6-BA 的培养基中分裂频率都很低,因此,在融合体培养中所用激素必须是生长素(含 2, 4-D)和细胞分裂素按一定比例的组合。

表 3 激素对融合体培养的影响

Table 3 Effect of plant hormone on the hybrids of protoplasts in culture

Hormone composition/(mg/L)			Divion frequency/%	No. of cell colonies	No. of callus
2, 4-D	NAA	6-BA			
0.5	—	—	8.4	+	+
0.5	0.5	0.5	6.8	++	++
0.5	1.0	0.5	7.2	++	+
—	1.0	0.5	4.9	—	—
1.0	—	—	9.2	++	++
1.0	0.5	0.5	14.2	+++	+++
1.0	1.0	0.5	10.8	++	++
1.0	1.0	—	8.5	+	—
1.0	—	0.5	9.6	++	++

At the density of 1×10^5 protoplasts/mL in improved KM8p medium supplemented with 0.1 mol/L sucrose and 0.2 mol/L glucose and 0.2 mol/L mannitol for osmotic regulator

(4) 不同培养密度对融合体培养的影响: 融合体培养的密度原生质体的分裂频率有很大影响。由表 4 可知,当培养密度低至 2×10^4 个/mL 时,原生质体开始分裂的时间较长且分裂频率较低,不能形成愈伤组织。随着融合体培养密度的增大,分裂频率逐渐增高,但密度过高,融合体易于集聚、粘连,导致融合体过早褐化、死亡。本实验中,较适宜的融合体培养密度为 1×10^5 个/mL。

2.3 愈伤组织再生及植株再生

在实验所设计的几个融合组合中,融合培养物的发育状况不同(表 5)。其中对称融合(融合组合 I)再生的细胞团数目多,生长快,培养 40d 左右形成较多的小愈伤组织,愈伤组织再生率最高为 6.8%;而不对称融合产物生长较慢,产生的愈伤组织较对称融合少。从获得的再生愈伤组织的数目及生长速

度来看,对称融合大于紫外融合大于对照双亲融合;融合产生的愈伤组织的生长速率快于花油 3 号原生质体和芝麻菜原生质体单独培养的生长,且生长势较好,表现出杂种优势。紫外融合组合中只有紫外线照射 2 min 和 4 min 的组合 E 能够获得再生愈伤组织。将得到的小愈伤组织转移到 IB 固体培养基上,在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16 h/d 弱光(500 lux)增殖培养;对称融合再生的愈伤组织增殖比不对称融合再生的愈伤组织快。

表 4 培养密度对融合体分裂的影响

Table 4 Effect of different culture density on the cell division and colonies formation

Density of culture/ $\times 10^4$ 个/mL	Time of first Division/d	Division frequency/%	Plating efficiency/%	Browning
2	6	3.8	0.0	no
5	4	8.6	3.2	no
10	3	14.0	5.3	no
30	3	15.8	3.4	a little
50	3	17.2	2.7	obvious

In improved KM8p medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA, 200 mg/L inositol, 300 mg/L protein hydrolysate, and the combinations of 0.1 mol/L sucrose and 0.2 mol/L glucose and 0.2 mol/L mannitol for osmotic regulator.

表 5 原生质体预处理对融合的影响

Table 5 Effects of protoplasts pretreatment on protoplasts fusion

	Time of first Division /d	No. of cell colonies after 20 d	No. of callus formation after 40d Size Number	Callus differentiation
<i>Brassica napus</i> cv. Huayou No.3 Protoplasts	—	—	—	—
<i>Eruca sativa</i> Protoplasts	2-3	+	1-0.5	+
Fusion combination I	3-4	+++	1	+++
Fusion combination II	4-5	++	1-0.5	++
Fusion combination III	4-5	++	1-0.5	++
Fusion combination IV	5-6	+	—	—
Fusion combination V	6-8	—	—	—
Fusion combination VI	—	—	—	—

增殖培养后,将直径为 3~5 mm 的愈伤组织及时转至 NB 分化培养基中诱导芽的分化。转移过早,愈伤组织小于 2 mm,一周内褐化死亡,转移过晚,愈伤组织失去分化能力。不同融合组合增殖后的愈伤组织在分化培养基中的表现也大不相同。对称融

合组合的愈伤组织转至分化培养基上一周左右便开始分化。从融合至完整绿苗长出只经过 3 个月的时间。从统计数字看, 在 49 个再生克隆中, 有 8 个克隆再生出多株完整绿苗(占 16.3%), 27 个克隆有一定的分化能力, 分化出绿色的芽点、根或无根的白花苗, 占 55.1%, 有 14 个克隆不分化, 占 28.6%。紫外融合组合中只有紫外线照射 2min 和 4min 的融合组合获得了再生的愈伤组织, 但照射 4min 的融合组合在分化培养基上继代 6 个月后仍未出现分化的迹象。从对照中混合的双亲原生质体融合得到的再生愈伤组织转至增殖培养基上, 其生长速度较慢。

2.4 愈伤组织的形态学分析和染色体分析

甘蓝型油菜的愈伤组织由淡黄色细小颗粒组成, 疏松易碎, 记为 B 型; 芝麻菜愈伤组织有黄白色的较大颗粒组成, 坚硬致密, 记为 E 型。对称融合再生的愈伤组织表型均为中间型, 不对称融合再生的愈伤组织多偏向 B 型(见表 6)。

表 6 融合产物的形态学、细胞学分析
Table 6 The analysis of morphology and cytology

Fusion combination	The morphology of calli	The range of chromosomes number
I -1	M	42-56
I -2	M	41-50
I -3	M	38-52
I -4	M	40-48
II -1	M	43-52
II -2	B	41-49
II -3	B	40-50
III -1	M	38-50
III -2	M	42-48

The No. I-1 means calli origin from fusion combination I with No.1 and the follows. M: mediate morphology calli; B: *Brassica napus* morphology calli; E: *Eruca sativa* morphology calli

再生愈伤组织的染色体分析见表 6, 对称融合再生愈伤组织的染色体数目接近双亲染色体数目之和; 不对称融合再生愈伤组织的染色体数目从总体看少于对称融合再生愈伤组织, 且只有紫外照射 2 min 融合组合 II 得到的再生的愈伤组织能够分化形成再生植株, 紫外照射 4 min 融合组合 III 得到的再生愈伤组织不能分化。

为了探讨杂种细胞的遗传物质在继代培养过程中的稳定性, 对杂种愈伤组织在不同的继代时间内的染色体进行了观察。由表 7 可知, 杂种细胞的染

色体数目在培养过程中有变化, 随着培养时间的延长, 染色体数目范围减少。这可能是染色体在继代过程中进行了重建, 使得双亲的染色体行为达到了逐步同步。而花油 3 号和芝麻菜融合细胞染色体数目不稳定的原因可能是由于体细胞不亲和而导致的亲本之一染色体的部分丢失。

表 7 不同继代愈伤组织的染色体分析
Table 7 Analysis of chromosome in different time of subculture of hybrid calli

Time of subculture	The range of chromosomes numbers
3	38-60
5	40-52
7	38-46

2.5 再生植株的鉴定

2.5.1 形态学鉴定

亲本花油 3 号植株的叶片呈椭圆形, 叶边缘呈锯齿状, 叶片较大, 植株茎秆较高, 表面光滑; 亲本芝麻菜植株的叶片较长, 呈羽状裂片形, 植株茎秆较小; 在再生植株中, 有一些再生植株的叶片、茎秆高度及其形状介于两亲本之间, 紫外融合中得到的再生植株的形态大多数类似于亲本花油 3 号, 且这些再生的植株都是从杂种愈伤组织中得到的。可以初步认为再生植株为花油 3 号与芝麻菜的属间体细胞杂种。

2.5.2 细胞学鉴定

选择 21 块染色体条数介于 38-60 条的不同愈伤组织进行植株再生、生根, 最后得到 16 株再生植株。细胞学鉴定发现有 3 株染色体条数为 38 条, 1 株为 40 条, 2 株为 41 条, 2 株为 42 条, 1 株为 44 条, 3 株为 48 条, 2 株为 50 条, 2 株为 52 条。染色体为 38 条的植株很可能是染色体进一步被排斥所造成的, 其它再生植株中仍保留了某些芝麻菜的染色体。由于再生植株都来源于杂种愈伤组织, 因此, 即使染色体数为 38 条的再生植株也是杂种植株, 正如周光宇教授提出的“远缘杂交中 DNA 片段交换假说”, 在杂种细胞染色体排斥过程中可能发生了遗传物质的交换。

3 讨论

3.1 影响甘蓝型油菜和紫罗兰原生质体融合的因素

本实验试用了高 Ca^{2+} -高 pH 法、PEG 法和 PEG 结合高 Ca^{2+} -高 pH 法三种不同的融合方法。结果发

现, 高 Ca^{2+} -高 pH 法的融合率最低, PEG 法次之, 而 PEG 结合高 Ca^{2+} -高 pH 法的融合率最高。从目前成功的细胞融合的资料来看, 绝大多数也都是以 PEG 与高 Ca^{2+} -高 pH 液相结合来诱导原生质体融合为主, 这说明了此项技术的可行性与适应性。但在应用此法时, PEG 的分子量、浓度、纯度、 Ca^{2+} 的浓度以及 pH 等都会影响融合体的“质”和“量”^[9]。另外, PEG 诱导植物原生质体聚集和融合的机理目前尚不清楚, 在这种情况下, 只有进行实验设计和大量重复实验才有可能找到合适的融合条件。

原生质体的浓度对融合效果主要表现在二源融合与多源融合的比例以及融合体的活力等方面。本研究表明, 随着原生质体的浓度增大, 原生质体易于聚集、粘连, 融合率逐渐增高, 但同时多源融合率也提高, 并且比例逐渐多于二源融合率。因此, 过高的原生质体密度并不适宜于原生质体的融合。

3.2 融合体培养的影响因素

本实验中探讨了培养基种类、融合体培养密度和渗透压稳定剂以及激素对花油 3 号和芝麻菜融合体培养的影响。培养基种类直接影响融合体的分裂频率、植板率和愈伤组织的形成等。甘蓝型油菜原生质体的培养和融合体的培养大多采用 KM8p 培养基、DPD 培养基和 B₅ 培养基, 而芝麻菜的融合体培养也采用了 KM8p 培养基。在实验中试用的三种基本培养基中, 以改良的 KM8p 和 DPD 培养基培养融合体效果最好。在融合体培养中也要注意融合体的密度, 只有适宜的培养密度才能保证融合体的分裂和生长。这是因为融合体培养密度过低, 融合体不启动分裂, 最终全部死亡, 而密度过高, 融合体易于集聚、粘连, 导致融合体过早褐化、死亡。本实验中, 较适宜的融合体培养密度为 1×10^5 个/mL。用于融合体培养的培养基中必须含有一定渗透压稳定剂以维持无细胞壁的融合体内外渗透压平衡, 其中多数为蔗糖、葡萄糖和甘露醇中的一种或其组合。本实验中, 对于甘蓝型油菜与芝麻菜下胚轴原生质体融合的融合体培养来说, 一定量的蔗糖、葡萄糖和甘露醇作渗透压稳定剂组合要好与单独使用, 这与有关学者研究结果不相一致^[10,11]。这可能是由于该组合的渗透压浓度即满足了融合体起使分裂时所需要相对较高的渗透压, 也起到了细胞培养过程中降低渗透压的要求, 以维持细胞的持续分

裂和进一步形成愈伤组织。融合体培养基中必须加入一种或几种生长调节物质, 才能启动和促进细胞的分裂和生长。本实验中发现, 融合体细胞的分裂和生长对生长素的需求较大, 单独的 2, 4-D 就可以诱导细胞的分裂, 而细胞分裂素对细胞分裂频率的提高没有显著影响, 但可明显提高细胞的植板率。生长素和细胞分裂素的配合使用对花油 3 号与芝麻菜下胚轴原生质体融合体培养中细胞分裂起到良好的效果。

3.3 再生愈伤组织的形态、生长和分化及与杂种性质的关系

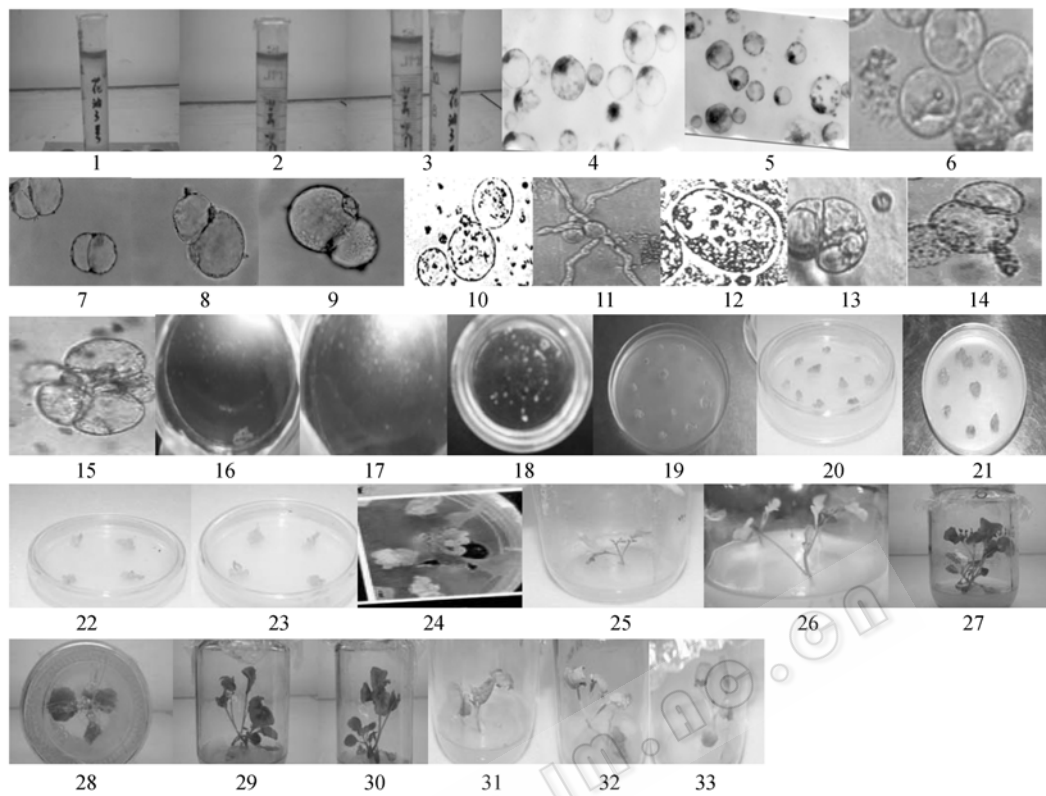
本实验中不同融合组合的再生愈伤组织主要有两种形态: 一种是介于双亲之间的中间型; 另一种是与亲本花油 3 号相似的甘蓝型。从融合后再生愈伤组织的速率来看, 对称融合比不对称融合快。对称融合是不经预处理原生质体之间的融合, 而不对称融合是一方亲本(供体)原生质体经过了 UV 射线处理的融合。供体细胞的自身修复以及带有断裂或缺口的染色体或染色体断片与受体基因组的整合, 可能是使不对称融合愈伤组织再生速度减缓的原因之一。鉴定结果表明, 多数中间型愈伤组织为融合体来源。同样, 有些亲本型愈伤组织也为融合体来源。这说明愈伤组织的表型并不能确切反应其基因型。再生愈伤组织的颜色、颗粒大小、结构可作为杂种鉴定的参考, 这种方法较直观, 但有局限性。对染色体条数介于 38~60 条的 21 块不同愈伤组织进行植株再生、生根, 最后得到 16 株再生植株。细胞学鉴定发现有 3 株染色体条数为 38 条, 1 株为 40 条, 2 株为 45 条, 2 株 42 条, 1 株为 44 条, 3 株 48 条, 2 株为 50 条, 2 株为 52 条。染色体为 38 条的植株很可能是染色体进一步被排斥所造成的, 其它再生植株中仍保留了某些芝麻菜的染色体。由于再生植株都来源于杂种愈伤组织, 因此, 即使染色体数为 38 条的再生植株也是杂种植株。

3.4 UV 辐射对融合体培养的影响

一定辐射剂量的紫外线处理, 可以引起融合中供体染色体的断裂和消减, 但辐射剂量过大也会造成供体基因过度损伤, 对融合杂种产生不良的影响。本实验中采用了 5 种剂量(UV2 min, UV4 min, UV5 min, UV6 min, UV8 min)处理芝麻菜供体。处理 2 min 的得到愈伤组织和植株; 处理 4 min 仅得到少

数愈伤组织, 在分化培养基上不能再生出植株; 处理 5 min 以上的没有得到愈伤组织。这说明随着 UV

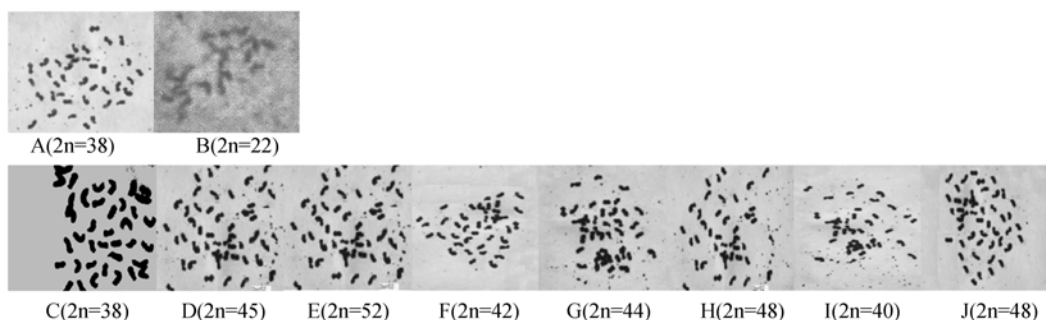
辐射处理时间的增加, 影响融合体的培养和再生。类似现象在其他作物中也有发现^[12]。



图版 I 甘蓝型油菜与芝麻菜原生质体融合

Plate I Protoplasts fusion of *B.napus.HuayouNO.3* and *E.sativa*

1: purified protoplasts of HuayouNo.3; 2: purified protoplasts of *Eruca sativa*; 3: comparison protoplasts of HuayouNo.3 and *Eruca sativa*; 4: protoplasts isolated from hypocotyls of HuayouNo.3; 5: protoplasts isolated from hypocotyls of *Eruca sativa*; 6: 10 min after protoplasts fusion of one to one; 7: 15 min after fusion; 8: 20 min after fusion; 9: 25 min after fusion; 10: Increases volume of fused protoplasts; 11: regeneration of fused protoplasts; 12: forms the new wall the ellipse cell; 13: the fission of homologous fusion cell; 14: the fission of heterogeneous fusion cell; 15: the cell group after splits many times of protoplasts; 16~18: micro-callai of different period of fusion cell; 19: amplification of calli; 20~23: shoots of differentiation; 24: seedlings of differentiation; 25: parent of *Eruca sativa*; 26: regenerated plantlet from fused protoplasts; 27: parent of HuayouNo.3; 28: shoots of regenerated plantlet; 29~33: regenerated plantlet of UV-fusion (2 min)



图版 II 杂种再生愈伤组织和再生植株染色体分析

Plate II Hybrids chromosome analysis of regenerated calli and plantlets

A: chromosome of parent of HuayouNo.3; B: chromosome of parent of *Eruca sativa*; C,D,E: chromosome of from combination I; F, G, H: chromosome of from combination II; I, J: chromosome of from combination III

4 结论

(1) 优化出甘蓝型油菜、芝麻菜下胚轴原生质体分离制备的最佳条件。取 8 d 苗龄(2500 lx、14 h/d, 25°C)的花油 3 号下胚轴, 用 1.0% 纤维素酶 R-10 + 0.5% 离析酶 R-10+5 mmol/L MES+CPW-10 mol/L 酶组合处理约 12 h, 经“过滤-离心-漂浮”纯化后, 产量为 1.82×10^6 个/g-FW, 活力达 84.2%; 取 10 d 苗龄(15°C 黑暗萌发 4 d, 然后 2500 lx、14 h/d, 25°C, 培养约 6 d)的芝麻菜下胚轴, 用 1.0% 纤维素酶 R-10+0.7% 离析酶 R-10+5mmol/L MES+CPW-9M 酶组合处理约 10 h, 经“过滤-离心-漂浮”纯化后, 产量为 1.78×10^6 个/g-FW, 活力达 87.2%。

(2) 建立了甘蓝型油菜与芝麻菜原生质体融合的体系。用 PEG-高钙-高 pH 法, 当 PEG 浓度为 35%(W/V), 原生质体密度为 5×10^5 个/mL, 融合 25 min 时, 融合率可达 18.2%。

(3) 建立起融合体的培养体系。在培养密度为 1×10^5 个/mL 时, 以附加 1.0 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+200 mg/L 肌醇+300 mg/L 水解酪蛋白的改良的 KM8p 为融合体培养基, 以 0.1 mol/L 蔗糖+0.2 mol/L 葡萄糖+0.2 mol/L 甘露醇作培养基的渗透压稳定剂, 进行“液体浅层”培养, 效果最好。

(4) 紫外线(60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)照射芝麻菜原生质体 2 min 的不对称融合获得了愈伤组织和再生植株。

(5) 首次获得甘蓝型油菜与芝麻菜的体细胞杂种植株, 即从细胞学鉴定的 21 块杂种愈伤组织上再生出 16 株杂种植株。

REFERENCES

- [1] Sun WC, Guan CY, Li X, *et al.* Intergeneric crosses between *Eruca sativa* Mill. and *Brassica* species. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, **31**(1): 36–42.
孙万仓, 官春云, 李恂, 等. 芸芥(*Eruca sativa* Mill.)与芸薹属(*Brassica* L.)3 个油用种的远缘杂交. *作物学报*, 2005, **31**(1): 36–42.
- [2] Kumar PR, Tsunoda S. Variation in oil content and fatty acid composition among seeds from *Cruciferae*. In: Tsunoda S, ed. *Brassica crops and wild allies*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1980, 235–252.
- [3] Sundberg E, Gimelius K. A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci*, 1986, **43**: 155–162.
- [4] Faleson J, Lagercrantz, Mouras U, *et al.* Characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Eruca sativa* using species-specific repetitive sequences and enomic *in situ* hybridization. *Plant Science*, 1997, **123** (1-2): 133–142.
- [5] Sikdar SR, Chatterjee G, Das S, *et al.* Erussica, the intergeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam. and *Brassica juncea* L. Czen. *Theor Appl Genet*, 1990, **79**: 561–567.
- [6] Zhang CL, Lin LB. Callus induction and plant regeneration of *Eruca sativa* Mill. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2006, **21**(5): 560–564.
张传利, 林良斌. 芝麻菜愈伤组织的诱导及植株再生. *云南农业大学学报*, 2006, **21**(5): 560–564.
- [7] Zhang CL, Gui XM, Lin LB, *et al.* Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of *Eruca sativa* Mill. *Journal of South China Agricultural University*, 2008, in press.
张传利, 桂雪梅, 林良斌, 等. 芝麻菜下胚轴原生质体的分离培养及植株再生. *华南农业大学学报*, 2008, 待发表.
- [8] Garcia-Sogo B. Morfogenesis in cultivar on vitro demelon: regeneration de plantas con alta eficacia a partir de celulas protoplasts. PhD Thesis, Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad de Valencia, Spain, 1990.
- [9] Kao KN. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Plant (Berl.)*, 1974, **120**: 215–227.
- [10] Muhlbach HP. Different regeneration of mesophyll protoplasts from cultivated and a wild species of tomato. *Planta*, 1989, **148**: 89–96.
- [11] Cheng ZD, Wei ZM, Xu ZH. Study on hypocotyl protoplast culture of rapeseed. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1994, **10**(1): 30–33.
程振东, 卫志明, 许智宏. 甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究. *生物工程学报*, 1994, **10**(1): 30–33.
- [12] Xing FN, Xia GM, Zhou AF. Asynthetic somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and *Bromus inermis*. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **41**(5): 458–462.
向凤宁, 夏光敏, 周爱芬. 普通小麦与无芒雀麦不对称体细胞杂交的研究. *植物学报*, 1999, **41**(5): 458–462.