中图分类号：S532　　文献标识码：A　　文章编号：1672-3635（2012）06-0321-04　　遗传育种

二倍体马铃薯体细胞电融合参数的优化

田国奎[1]，蔡兴奎[2]，盛万民[1*]，李凤云[1]，曹淑敏[1]，牛志敏[1]，李庆全[1]，徐洪岩[1]，娄树宝[1]，王海艳[1]

（1. 农业部马铃薯生物学与遗传育种重点实验室，黑龙江　克山　161606；2. 华中农业大学园艺林学学院，湖北　武汉　430070）

摘　要：以有性杂交不亲和的抗虫、抗晚疫病的野生二倍体马铃薯 *Solanum pinnatisecta*（2 n = 2x = 24）和抗晚疫病的二倍体材料 DY4-5-10（2n = 2x = 24）的无菌苗叶片为原生质体来源，进行了电融合的研究，以优化马铃薯高效融合的参数。研究结果表明：其最佳的电融合参数为预融合电压 1.0×10^5 V/m，时间 60 s，脉冲强度 1.8×10^6 V/m，脉冲宽幅 20 μs，脉冲次数 1 次。其有效融合率为 28.89%，破损率为 13.33%。

关键词：二倍体马铃薯；叶肉原生质体；电融合

Optimization for Somatic Electrofusion Parameters of Diploid Potatoes

TIAN Guokui[1], CAI Xingkui[2], SHENG Wanmin[1*], LI Fengyun[1], CAO Shumin[1], NIU Zhimin[1], LI Qingquan, XU Hongyan[1], LOU Shubao[1], WANG Haiyan[1]

(1. Keshan Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China;
2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: This study attempted to optimize the fusion parameters using mesophyll protoplasts isolated from diploid wild species *Solanum pinnatisecta* (2n = 2x = 24), which is sexual incompatible with cultivated tetraploid potatoes and resistant to insect and late blight, and a diploid clone DY4-5-10 (2n = 2x = 24), which is resistant to late blight. The results showed that the optimal parameters for electrofusion were: alternating current (AC) 1.0×10^5 V/m, AC duration 60 s, direct current (DC) 1.8×10^6 V/m, pulse width 20 μs, and number of pulses 1. Under these conditions, the effective fusion rate reached 28.89%, and the breakage rate was 13.33%.

Key Words: diploid potato; mesophyll protoplast; electrofusion

马铃薯普通栽培种（*Solanum tuberosum* L）为同源四倍体，遗传分离复杂，育种效率较低。常规的品种杂交只能产生新的基因组合而不能创造新的基因，从而使得普通栽培种遗传背景狭窄，育种后代的变异停留于近交水平，在品种培育上很难创新。然而作为抗病、耐寒，高淀粉重要基因库的野生种和栽培种因倍性不同，难以杂交，这在很大程度上限制了野生二倍体资源的利用。马铃薯原生质体融合技术可以突破有性杂交不亲和性的界限，为获得远缘杂交新种提供了可能。马铃薯原生质体电融合技术因其易操作、无毒性、过程可控等优点而倍受国际上马铃薯遗传及育种学家的青睐。通过单倍体原生质体自体融合不仅能够迅速实现染色体加倍，获得纯合多倍体植株，而且能避免秋水仙素在加倍过程中引起的倍性嵌合现象。目前，体细胞融合与杂交大多通过电融合方法进行，并得到了许多体细胞杂种植株[1-3]。本研究旨在探求二倍体马铃薯野生种的电融合条件，目的是有效利用野生种中的优质的、杂交不亲和的资源，从而为拓宽马铃薯育种的遗传基础，提供有效的途径。

收稿日期：2012-08-10
基金项目：马铃薯分子定向育种关键技术应用研究与开发（GC10B10）。
作者简介：田国奎（1984-），男，研究实习员，从事马铃薯遗传育种工作。
* 通信作者（Corresponding author）：盛万民，研究员，从事马铃薯遗传育种及种薯繁育研究，E-mail: shengwanmin@163.com。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　材　料

选用黑龙江省农业科学院克山分院马铃薯育种室保存的无菌脱毒苗，有性杂交不亲和的抗虫、抗晚疫病的野生二倍体马铃薯材料 *S. pinnatisecta* 和抗晚疫病的二倍体材料 DY4-5-10，培养后供试。

1.2　方　法

1.2.1　原生质体的制备

将所选材料切成 2~3 mm^2 大小，放于含 13%甘露醇（简称 M）的原生质体清洗液（Cell-protoplast washing, CPW-13 M）中。在 4℃冰箱中暗培养 0.5 h。然后将其转入酶解液中，27℃，在 50 r/min 的摇床上避光酶解。酶解 3 h 后，过滤酶解液，滤液用 CPW-11 M（含 11% M 的 CPW 溶液）溶液洗涤2 次，每次离心 10 min，转速为 500 r/min。沉淀用 2 mLCPW-11 M 溶液混匀，悬浮于 8 mL CPW-25 蔗糖（Sucrose, S）溶液（含 25% S 的 CPW 溶液）中，经转速为 1 000 r/min 离心 6 min。小心吸取两界面处的原生质体，用 8 mL 融合液（12% M + 1.1% $CaCl_2$），经转速 1 000 r/min，离心 5 min，洗涤 2 次。所得原生质体置于融合液中，4℃保存备用（图 1）。

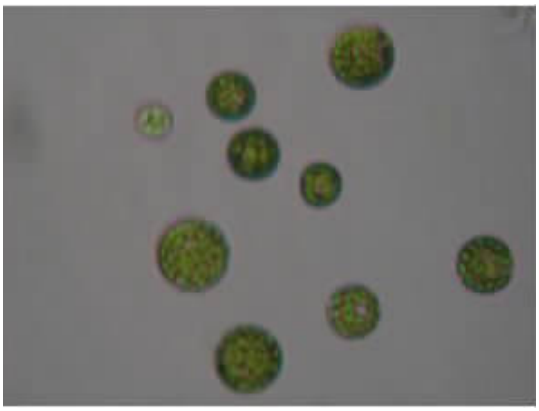


图 1　纯化后的原生质体（× 400）

Figure 1　Purified protoplasts（× 400）

1.2.2　细胞电融合

电融合细胞融合穿孔仪型号为LF 201（日本 NEPA GENE 公司），MS 黄金板电极（0.5 mm 间距，20 μL 上样量），用融合液调节原生质体的密度为 5×10^4 个/mL，室温下进行电融合。总融合率、有效融合率和破损率计算如下：

总融合率（%）=（多细胞融合总数 + 成对细胞融合总数）/（原生质体总数）× 100%

有效融合率（%）=（有活力的成对融合细胞数/原生质体总数）× 100%

破损率（%）=（融合前完整细胞数 - 融合后完整细胞数）/（融合前完整细胞数）× 100%

试验重复3 次，取平均值进行分析。

2　结果与分析

2.1　交流电场（AC）对细胞触合的影响

原生质体在电场作用下相互接触融合见图 2。

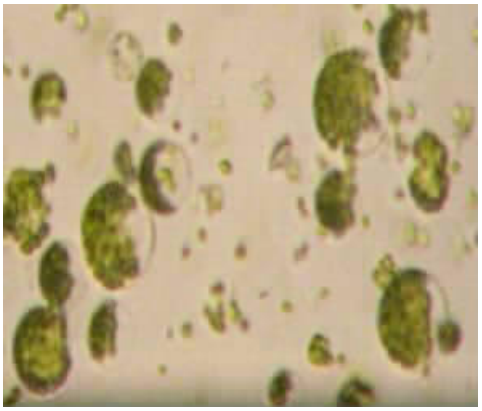


图 2　原生质体在电场中接触融合图（× 400）

Figure 2　Electrofusion course of mesophyll protoplasts（× 400）

2.1.1　AC 强度对细胞融合的影响

在 0~50V 强度范围内，细胞融合率（包括有效融合率及总融合率）变化趋势是随电场强度增加而增加，超出这一范围后，融合率又开始下降。由于本实验的目的是获得较高比率的成对融合子，故选择 50 V 为融合交流电场强度，在该强场下成对融合率较高为 28.03%，总融合率 33.76%（图 3）。

2.12　AC 作用时间对细胞融合的影响

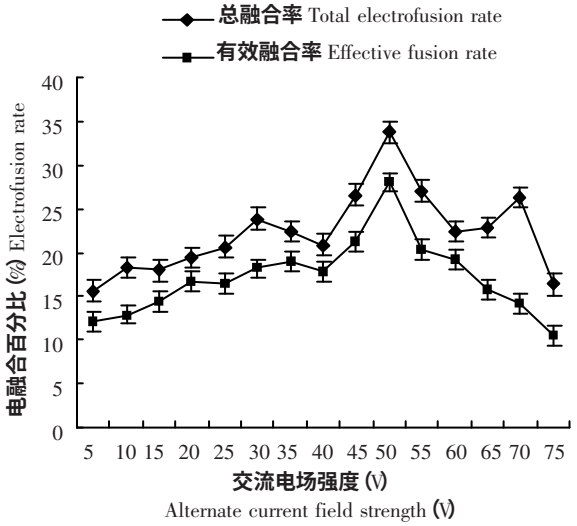
AC 作用时间对总融合率的影响，在 60 s 内，总融合率随时间延长而上升，当 > 60 s 时，总融合率又开始下降。从图 4 中可以看出在 AC 作用时间 60 s 时有效融合率和总融合率有最佳值。此时有效融合率为 25%，总融合率为 28.75%（图 4）。

2.2　直流高压脉冲（DC）对细胞融合率的影响

2.2.1　脉冲强度对细胞融合的影响

当脉冲宽幅为 10 μs，脉冲次数为 1 时，有效融合率随脉冲强度的增加呈先上升后下降的趋势，破

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

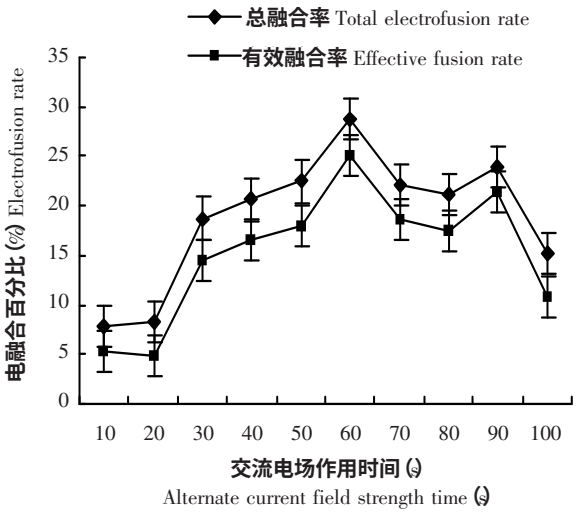


交变电流频率为 1MHz，交流电场作用时间 25 s，直流脉冲电压 500 V，脉冲次数 1 次，脉冲宽幅 10μs。误差线为标准误差。

Alternating current frequency is 1MHz; AC electric field time is 25 s; DC pulse voltage is 500 V; number of pulses is 1; and pulse width is 10 μs. Error bars are standard errors.

图 3　交流电场强度对二倍体马铃薯原生质体电融合的影响

Figure 3　Effects of alternate current field strength on the electrofusion rate of diploid potatoes



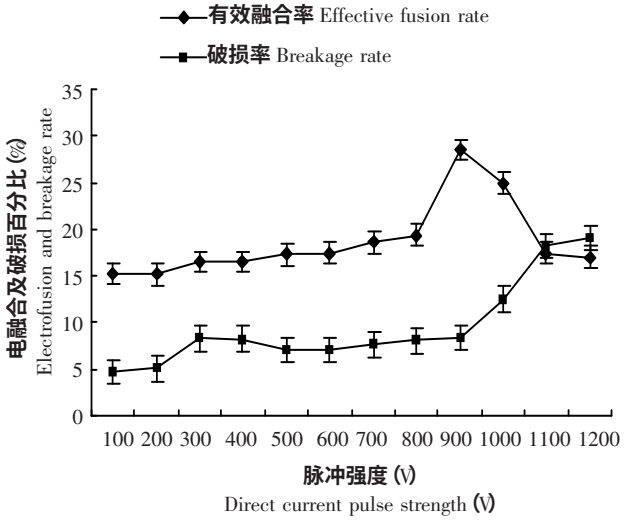
交变电流频率为 1MHz，交流电场强度 50 V，直流脉冲电压 500 V，脉冲次数 1 次，脉冲宽幅 10 μs。误差线为标准误差。

Alternating current frequency is 1MHz; AC electric field strength is 50 V; DC pulse voltage is 500 V; the number of pulses is 1; and pulse width is 10 μs. Error bars are standard errors.

图 4　交流电场作用时间对二倍体马铃薯原生质体电融合的影响

Figure 4　Effects of alternate current field time on electrofusion rate of diploid potatoes

损率则随强度的增加而明显上升。在脉冲强度为 900 V，脉冲次数为 1 时，可得到相对较高的有效融合率 (28.57%)，而此条件下破损率则相对较低为 8.4% (图 5)。



交变电流频率为 1MHz，交流电场强度 50 V，交流电场作用时间 60 s，脉冲次数 1 次，脉冲宽幅 10 μs。误差线为标准误差。

Alternating current frequency is 1MHz; AC electric field strength is 50 V; AC electric field time is 60 s; the number of pulses is 1; and pulse width is 10 μs. Error bars are standard errors.

图 5　脉冲强度对二倍体马铃薯电融合的影响

Figure 5　Effects of direct current pulse strength on electrofusion rate of diploid potatoes

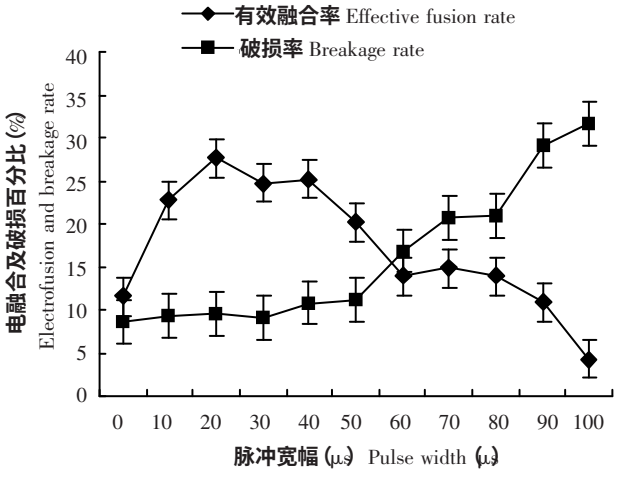
2.2.2　脉冲宽幅对细胞融合的影响

在使用 500 V 交流电场，900 V 的直流脉冲时，不同的脉冲幅宽对原生质体融合率和破损率有显著影响，随着脉冲幅宽的增加，有效融合率逐渐上升，在幅宽 20 μs 时，原生质体有效融合率最高，可达到 27.59%，当脉冲幅宽超过 20 μs 时，有效融合率则明显下降。破损率却随时间的延长持续升高，幅宽 20 μs 时，破损率为 9.48% (图 6)。

2.2.3　脉冲次数对细胞融合的影响

在使用 50 V 交流电场，900 V 的直流脉冲，脉冲宽幅 20 μs 的条件下，对原生质体分别进行 1~10 次脉冲处理，结果发现施加 1 次脉冲时，有效融合率较高 (28.89%)，且破损率相对较低 (13.33%)。继续增加脉冲次数破损率显著升高，有效融合率却迅速下降 (图 7)。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

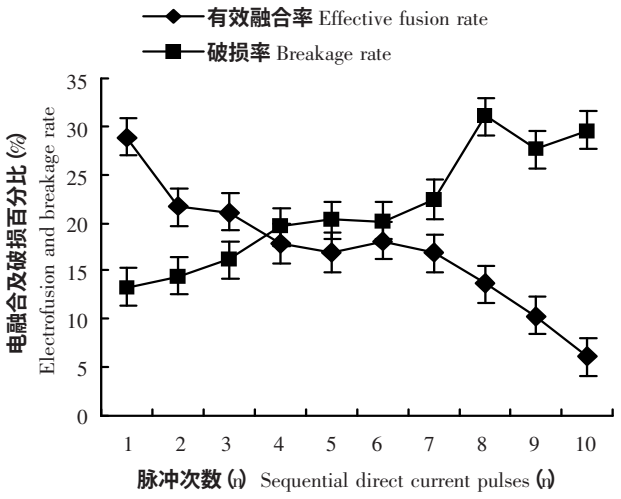


交变电流频率为 1MHz，交流电场强度 50 V，交流电场作用时间 60 s，脉冲次数 1 次，脉冲强度 900 V，误差线为标准误差。

Alternating current frequency is 1MHz; AC electric field strength is 50 V; AC electric field time is 60 s; the number of pulses is 1; and pulse intensity is 900 V. Error bars are standard errors.

图 6　脉冲宽幅对二倍体马铃薯电融合的影响

Figure 6　Effects of pulse width on the electrofusion rate of diploid potatoes



交变电流频率为 1MHz，交流电场强度 50 V，交流电场作用时间 60 s，脉冲强度 900 V，脉冲宽幅 20 μs，误差线为标准误差。

Alternating current frequency is 1MHz; AC electric field strength is 50 V; AC electric field time is 60 s; pulse intensity is 900 V; and pulse width is 20 μs. Error bars are standard errors.

图 7　脉冲次数对二倍体马铃薯电融合的影响

Figure 7　Effects of Sequential direct current pulses on electrofusion rate of diploid potatoes

3　讨　论

原生质体融合技术可以突破有性杂交不亲和性的界限，为获得远缘杂交新种提供了可能。因此，在植物领域已得到广泛应用。电融合技术因易操作、无毒性、过程可控等优点而发展迅速。利用电融合已成功测得多种植物的融合参数。要实现原生质体的融合，首要条件是细胞能够相互接触，而细胞间连接的紧密程度则与交流电压的强度和作用时间密切相关。

结果表明，AC 强度在 50 V (即 1.0×10^5 V/m)，成对融合效果比较好，这与黄家总等[4]在紫罗兰上的研究相似。超过此范围，由于原生质体变形严重，施加直流脉冲后，细胞膜由于发生不可逆击穿而导致融合率下降。交流电场的作用时间在 60 s 内，有效融合率变化不大，但总融合率却显著增加，当作用时间继续增加，由于原生质体被拉伸变形的时间过久，细胞开始崩解从而使融合率下降。对直流脉冲的研究发现，强度在 1.8×10^6 V/m，有效融合率较高。在脉冲次数的实验中，多次脉冲未能提高有效融合率，而胡张华等[5]在研究水稻的电融合时发现，2 次脉冲时有效融合率较高。对脉冲宽幅的研究结果表明，在固定交流电场和直流电场强度的情况下，随着脉冲时间的延长，有效融合率不断升高，但时间过长却使有效融合率下降而破损率上升。经对各实验条件的比较，发现在交流电场强度1.0×10^5 V/m，作用时间 60 s，脉冲强度 1.8×10^6 V/m，脉冲宽幅 20 μs，脉冲次数 1 次时，二倍体马铃薯原生质体的有效融合率可达 28.89%。

[参 考 文 献]

[1] Fish N, Karp A, Jones M G K. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum* [J]. TAG, 1988, 76: 260–266.

[2] Puite K J. Roest S L. Pijnacker P. Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* [J]. Plant Cell Reports,1986, 5: 261–265.

[3] 戴朝曦, 孙顺娣, 李继红. 马铃薯体细胞电融合技术的研究[J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 1994, 30 (增刊): 82–87.

[4] 黄家总, 冈田芳明, 傅家瑞. 紫罗兰与桂竹香原生质体培养及电激细胞融合的研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版,2003,42 (3): 64–68.

[5] 胡张华, 张志宏, 颜秋生, 等. 水稻原生质体电融合适宜条件的研究[J]. 浙江农业学报, 1997, 9(3): 113–117.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net