

一种机械分离马铃薯异核体改进的培养方法

[德] T. Hein and O. Schieder

摘 要

把不同马铃薯双单倍体基因型间融合原生质体进行微滴的液体培养。如果这些融合了的原生质体, 通过气相与其它活细胞接触, 便能明显地看到它的分裂和持续的发育。影响这种效应的因子尚不清楚, 然而在这种培养条件下, 从马铃薯各种融合异核体中获得再生体细胞杂种的愈伤组织是可能的。

选育体细胞杂种有许多方法。而在获得具有农艺性状良好的体细胞杂种时, 选择是一大障碍。要求某种突变体如白化体或抗营养缺陷型体系胞系的选择方法不适宜于农业生产, 因这样的突变体对每种植物来说并不是都能获得, 即使能够获得也不容易。此外, 诱变处理可能对有意义的植物育种材料起相反的影响。据报道的其它选择方法是机械分离在微滴里培养的融合原生质体 (Kao (1977, Gleba和Hoffmonm1978)或机械分离在白化体培养基中培养的融合原生质体 (Menczel等, 1978)或机械分离在营养缺陷型原生质体培养基中培养的融合原生质体 Henczel等, 1983)。微滴培养的融合原生质体 (Hein等, 1983)。微滴培养融合原生质体需要一个高密度的长期预培养时间 (可达7天)。培养后, 鉴别融合的异核体和非融合的原生质体是比较困难的。本文介绍的方法是在微滴里培养新近分离马铃薯异核体, 并仅通过气相与其他活细胞或原生质体接触, 开始它们的分裂活动。

1 材料和方法

制备原生质体

从无菌的马铃薯嫩稍叶肉细胞或愈伤组

织制备数系的双单倍体的原生质体 (来自Max-Planck研究所采集的材料)。把这些嫩梢培养物在25°C、每日光照16小时 (2000~4000勒克斯)、无激素的MS培养基上培养。由切叶获得的原生质体培养在下列酶液中旋转的培养瓶里5小时, 该液是由1%纤维素酶10 (Onozuka)和0.2%混合酶R10溶合在用KOH调整pH值为5.5的0.6M甘露醇中。愈伤组织培养在25°C、黑暗条件下、含有5毫克/升2.4D和5%椰子乳的MS琼脂培养基上。由愈伤组织材料温育在含有溶解于0.6克分子甘露醇中的1%纤维素、0.2%混合酶和0.05%果胶酶Y23组成的酶液中16小时得到了原生质体。所有其他的物理条件如叶肉细胞原生质体培养所描述的情况一样, 收集产生的原生质体, 并按介绍的方法冲洗 (Hein等1983)。

原生质体的融合和异核体的分离:

从马铃薯两个双单倍体品系的原生质体获得的叶肉细胞和愈伤组织, 以1:1的比例混合, 进行如前所述的融合过程 (Hein等1983), 但要对融合液添加10%DMSO (二甲基亚砷) (Menczel和Wolfe, 1984)。添加DMSO, 可增加融合物的数量达15%之多。融合后, 把原生质体转移到无硝酸铵的

原生质体再生培养基V—KM中 (Binding和Aehls, 1977), 并放入直径5厘米的塑料培养皿里。如别处所介绍的一样, 用小铲分离异核体 (Hein, 等1983)。将这些分离的异核体一起播放在2 μ l V—KM培养基后, 经8~24小时, 一次收集50个异核体。此时易于发现异核体是居间的表现型: 从叶肉细胞来的绿色叶绿体和从愈伤组织原生质体来的浓厚细胞质。

分离异核体的培养:

把融合的原生质体放在Falcon培养皿2 μ l微滴里 (Type 3037)。这些培养皿直径为6厘米, 6里面小室直径为3厘米。当外室充2ml V—KM培养基或含有大约2 \times 15, 马铃薯或烟草原生质体或愈伤组织细胞的2ml V—KM培养基时, 把含有异核体的微粒放入内室。用帕拉塑料密封培养皿, 培养在27 $^{\circ}$ C中, 以弱光持续照明。培养1周后, 在微滴里添加10 μ l新鲜V—KM培养液。3周后把肉眼可见的克隆转移到含0.4% Sea Plaque琼脂糖的半固体培V—KM培养基上。再过3周, 把它们转移到固体琼脂培养基上。

再分化试验:

为研究茎叶的再生能力, 选择了可能为杂种的克隆, 为此, 将这些可能为杂种克隆转移至诱导培养基上。这些培养基是由各种激素组合的MS基本培养基、二分之一浓度MS培养基或V—KM培养基组成。所用的激素有0.5~2mg/L的BAP(6-氨基嘌呤(或有0.5~3mg/L玉米素的0.1mg/升IAA(萘乙酸)的组合。也可以用各种浓度的6-苄氨基嘌呤—核糖甙、激动素、赤霉素和玉米素—核糖甙素测试。愈伤组织培养在液体培养基上或培养在补充0.8%琼脂或琼脂糖培养基上。这类培养试验大多数在培养室做, 但也有的试验在黑暗或在很微弱的照明条件下进行。

乙烯试验:

AVG (氨基乙烯基甘氨酸)即一种乙烯

生物合成的抑制剂(Adams和Yang, 1979), 被加入Falcon培养皿外室原生质体或细胞效中, 其浓度为 10^{-2} ~ 10^{-6} 克分子。乙烯也被用来测试。它是一种引起与乙烯有同样效果的化合物(Mackenzie和Street, 1970)。把浓度为 10^{-3} 到 10^{-6} 克分子这种化合物加入培养器外室培养基中, 但不含原生质体或细胞, 在这两种情况下, 调查微滴里异核体的生存和发育情况, 检测原生质体各个发育时期乙烯生成的实验。把每0.5ml悬浮原生质体(10^{-5} /ml)转移到2ml真空器皿(Brand)中, 并在培养器里培养。1~7天后后用气体色谱仪(Varian aerographs 1800, chemisorb column分析气相未确定乙烯含量。

同功酶的研究:

在丙烯酸胶体上观察酯酶和过氧化物酶的同功酶电泳情况, 进一步研究中选克隆的特性。为此目的, 把中选杂种愈伤组织和相应亲本的愈伤组织, 放在含5mg/L 2,4D和5%椰子乳MS琼脂培养基上再培养。用10%胶体研究同功酶系, 用50毫伏的恒定电压进行5小时的分离, 采用Brewbaker等(1968)常用两种酶系的染色方法。

2 结果

培养两天后, 在微滴里机械分离的异核体90%是活的, 但经历了形态的变化和叶绿体含量的减少。3~4天后, 不管异核体保持在何种培养条件下, 可见到原生质体第一次分裂。5~6天, 依异核体被处理的情况, 它的行为发生了剧烈变化。培养在Falcon培养器内室微滴里的体细胞杂种原生质体, 仅用注入外室的V—KM培养基处理时开始死亡, 而在外室用悬浮面V—KM培养基中的细胞或原生质体处理的那些确能进一步地分裂。10~14天后, 仅用V—KM培养基处理的微滴里没有活的细胞, 但其他处理的培养基里, 这些小克隆已经发育了。最初

分离异核体形成的克隆达15%，并被转移到固体琼脂培养基中。当原生质体或细胞作用于异核体时，使它活跃生长，才能察觉这些刺激效应。在培养器外室原生质体或细胞的刺激效应，不仅换过异核体而且也通过马铃薯非融合原生质体、烟草非融合原生质体和 *Atrops* 颠茄种间异核体观察到。一个种的原生质体或细胞亦能刺激另一个种的原生质体也是很明显的。例如，用烟草细胞处理马铃薯异核体，就象用马铃薯细胞本身处理异核体一样良好地发育。只有通过气相对存活个体和原生质的发育有明显作用，因为含异核体的微滴放在 Falcon 培养器内室，与该器外室的原生质或细胞没有液相接触。近来在20多种不同融合组合中，双单倍体马铃薯异核体通过这种饲喂的方法成功地形成愈伤组织。把这些愈伤组织再转移到诱导器官形成培养基上，以研究茎叶的再生能力，然而，没有获得茎叶的再生组织。通过同功酶的研究，展示出25种测试中有24种愈伤组织有亲本带杂种带居于两个亲本的中间状态。我们根据这些数据推论，中选的克隆96%是体细胞杂种。

通过实验证实，高于 10^{-4} 克分子AVG浓度对细胞和原生质体有毒害作用。如果给 Falcon 培养器外室的原生质体或细胞低于这个浓度的处理，则没有发现AVG对微滴里异核体的发育有不良影响。也可观察到AVG的毒害浓度使异核体不能发育，可与该器外室的细胞没有分裂或仅用培养基的情况相比相反，培养器外室培养基中乙烯利采用任意浓度，对异核体的发育不表现任何明显的良好效应。同样，把乙烯利加入异核体的微滴里，对真存活也没有良好的反应。用气体色谱法分析的结果，原生质体头3天的确释放乙烯，但以后没有发现进一步生成。再者，乙烯的产生和被用来激活异核体的原生质体发育阶段之间，未见任何联系。被用于激活作用之前，培养3天或更长时间的原生质体

在任何发育阶段导致异核体的分裂。

3 讨论

早就有人报道过原生质体释放乙烯 (Guy和Kende, 1984)，所以认为乙烯是影响培养器内室异核体发育的主要因素。但是本试验结果没有进一步证实这个设想。AVG即乙烯生物合成抑制剂在浓度高于 10^{-4} M时，导致在培养器外室的原生质体以及异核体的死亡。若AVG浓度较低未发现不良效应。相反，用乙烯利处理，对活跃生长的细胞或原生质体没有取得良好效应。众所周知，大多数植物的原生质体没有取得良好效应。众所周知，大多数植物的原生质体再生能力最适宜的密度大约是每毫升 10^4 到 10^5 个 (Gleba和Sytenik, 1984)，较高或较低的原生质体密度导致了原生质体的发育减慢或完全不能生长。Nagata和Takebe (1971)，报道乙烯利不能补偿这种异构催化作用的效应。这和我们实验结果是相一致的。在原生质进行单独培养的实验中，最适密度的原生质体悬浮液要预先培养，最长可达1周它们才可单独培养 (Kao 1977, Gleba和Hoffmann 1978)。而经过如此长期的预先培养，根据异核体表型与未融合的原生质的体不同分离异核体是有疑问的。Koop (1983) 报道另一种有意义的培养单一原生质体的方法。他们把容微滴的原生质体放进石蜡中而成功地获得细胞克隆，不能排除一个激活原生质体所必须的气态化合物是不溶于石蜡中的，因在这样的培养条件下单个原生质体能激活它们自己。总之，这些试验还没弄清楚哪个化合物对异核体的激活所起的作用。与其他报道相一致的是，乙烯似乎不是这个育活剂。

同功酶的研究表明，多数来自异核体所得到的愈伤组织，具有体细胞杂种特性。由于再分化茎叶和植株的试验未成，可能原生

(下转179页)

Feddes等的SWACRO模型也是一个比较大的综合生长模型。这一模型是由土壤水分平衡模型(SWATER)和作物生长模型两个亚系统组成,主要用于描述作物水分管理的变化对马铃薯呼吸作用和产量的影响。

5.4 块茎大小分布模型

澳大利亚的Sands和Regel(1983)定义马铃薯块茎的重量函数为不同重量等级的块茎产量的频率分布,并且假定在一个成熟的马铃薯作物群体中,块茎的重量成正态分布,这样,他们建立了一个预测马铃薯块茎重量函数的经验模型:

$$G(\omega, \mu, \sigma) = [N(\hat{\omega} - \hat{\mu}) - N(-\hat{\mu})] / [1 - N(-\hat{\mu})]$$

在这里, $G(\omega, \mu, \sigma)$: 块茎重量函数, 其平均数 μ 和标准差 σ ; $\hat{\omega}$, $\hat{\mu}$: 以标准差 σ 为单位的块茎重量和平均重量; $N(x)$ 可由“累积正态分布 $F_N(x)$ 值表”查出。

该模型仅涉及两个输入数据: 块茎的平均重量与其标准差, 因而使用十分方便。

1987年, Travis以块茎体积为基础(块茎体积由通过一定孔径的筛网来确定), 研究了马铃薯块茎的大小分布。他假定块茎体积的分布亦为正态分布, 因而也只涉及平均体积(μ)和标准差(σ)两个数据。

笔者(未发表资料)在马铃薯块茎大小及其控制的研究中发现, 按重量分级的块茎, 其块茎的数目呈指数分布:

$$F(b) = 1 - e^{-\lambda b}$$

在这里, F : 块茎数量分布的频率; b : 重量级别中的上限; λ : $1/\text{块茎平均重量}$ 。

因为已发现块茎的数量和平均重量与密度、品种及某些栽培环境条件有关, 亦可进行预测, 或者通过现场取样调查获得这两个数据, 所以上述块茎重量的分布模型具有一定的实用价值。

对马铃薯病虫害发生、流行以及与产量损失的关系的模型也有不少报道(Ward and Radinge, 1984; Cupsa, Panfil and Lgnat, 1984)。数学模型在马铃薯作物上的应用与研究正逐步走向深入。

通过回顾数学模型在作物方面的研究与发展, 我们可以看到, 20多年来, 数学模型经历了一个由简单到复杂再到简单的过程。这主要是因为大型的计算机模拟模型运转比较复杂, 设备费用昂贵, 不适于大范围的推广应用。同时, 比较简单的数学模型有时也可达到研究的目的, 解决生产上的实际问题, 并且只要一般的计算器即可, 各种数据的取得亦比较简单, 容易理解, 容易计算, 便于推广, 因而这类模型目前呈发展趋势。

(上接190页)

质体的来源是重要的。众所周知, 在愈伤组织和细胞致悬浮液中染色体的高度畸形是导致减弱细胞再分化能力的原因。在未来马铃薯杂交试验中, 只有叶肉细胞的原生质体才能被融合。已经提出了一个产生马铃薯体细胞杂种的体系, 在这个体系中, 只有表现型相

似、来自不同亲本的叶肉细胞原生质体, 并结果电刺激融合法才能被应用(Schieder等, 1986)。

朱克寅 译 李雅志 校
译自《Plant Breeding》
1986, 97 (3) 255~260