棉花原生质体“供-受体”双失活融合产生种间杂种植株及其鉴定

付莉莉, 杨细燕, 张献龙*, 王志伟, 冯常辉, 刘传祥, 江培勇, 张金龙

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: xlzhang@mail.hzau.edu.cn

2009-01-18 收稿, 2009-05-05 接受

国家棉花产业技术体系和国家重大基础研究计划(批准号: 2004CB117301)资助项目

摘要 采用“供-受体”双失活融合模式, 以陆地棉品系 YZ-1 原生质体为受体, 以野生棉 *G. davidsonii* 原生质体为供体, 开展不对称融合. 融合前, 陆地棉品系 YZ-1 原生质体经过 0.5 mmol/L 碘乙酰胺(IOA)室温下处理 20 min, 野生棉 *G. davidsonii* 原生质体经过 38.7 J/cm² 的紫外线(UV)处理 30 s, 能有效地抑制亲本原生质体的生长. 将上述条件下分别钝化处理的双亲原生质体采用电诱导融合后进行培养, 获得再生植株. 对获得的杂种植株进行形态学、细胞学及分子标记检测. 大部分再生植株表现出新形态, 部分表现亲本中间型, 少数偏向受体亲本. 融合植株的染色体数目在 40~73 之间. 随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)和简单重复序列(SSR)分析证实了再生植株的杂种真实性. 而细胞质基因组的酶切扩增多态性序列(CAPS)和叶绿体 SSR(cpSSR)分析结果显示, 杂种的线粒体和叶绿体发生了重组. 本研究是棉花中开展“供-受体”双失活融合模式的首次报道, 是继对称融合和基于紫外线处理的不对称融合之后在棉花原生质体融合方面又一新的进展.

关键词

棉花
“供-受体”融合
碘乙酰胺
原生质体
紫外线

原生质体融合能克服有性杂交不亲和性, 将野生种有利性状转移到栽培种中. 这种方法不仅可以提高作物的抗逆性和改良品质^[1,2], 还可能产生新的种质资源用于育种^[3,4]. 近几年来, 棉花中先后成功报道了对称和不对称融合^[1,2,5,6], 证实了原生质体融合在棉花中的可行性. 然而, 对称融合产生的植株在拥有双亲有利性状的同时也遗传了不利性状^[3,7]. 处理一方亲本的不对称融合虽减少了不利基因的转移, 但融合后代的筛选工作却很复杂. 为了在减少不利基因转移的基础上简化融合后代的筛选, “供-受体”双失活融合模式^[8,9]得到越来越广泛的应用. 这种融合模式是指供体亲本的原生质体经辐射处理使细胞核失活, 受体亲本的原生质体经代谢抑制剂处理

使细胞质失活, 分别经过处理的双亲原生质体再融合的方式.

在“供-受体”双失活融合模式中, 研究者一般采用碘乙酰胺(IOA)处理受体原生质体^[10,11], 影响细胞代谢, 抑制细胞分裂, 对细胞造成不可逆的伤害. 供体细胞核失活常用的方法是融合前利用X或γ射线辐射原生质体^[12~14], 但这两种射线比较危险, 且操作程序繁琐. 近年来, 紫外线(UV)逐渐被用于不对称融合^[6,15~17]. Hall等人^[16]发现在相同剂量下, UV造成断裂的染色体比γ射线要多. 但是由于UV辐射引起的染色体丢失程度不同, 导致杂种中供体染色体含量的不同. 一般情况下, 处理过的双亲原生质体单独培养时, 不能正常生长发育, 但由于双亲原生质体的遗传

引用格式: 付莉莉, 杨细燕, 张献龙, 等. 棉花原生质体“供-受体”双失活融合产生种间杂种植株及其鉴定. 科学通报, 2009, 54: 2219~2227

Fu L L, Yang X Y, Zhang X L, et al. Regeneration and identification of interspecific asymmetric somatic hybrids obtained by donor-recipient fusion in cotton. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0517-4

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-15-2219>

或生理互补, 杂种细胞会恢复生长。

原生质体融合再生植株可以通过植株形态、染色体数目、随机扩增多态性DNA标记(RAPD)、简单重复序列(SSR)、叶绿体SSR(cpSSR)和酶切扩增多态性序列(CAPS)分析检测。杂种与亲本在形态和染色体数目上的差异都可以用于检测杂种。RAPD和SSR则用于研究杂种细胞核基因组。不对称杂种因为只有少量的染色体或是DNA片段从供体转移到受体, 因而需要研究杂种线粒体和叶绿体的遗传, 分析细胞质基因组的转移情况。一种常用的研究线粒体和叶绿体DNA遗传的技术是Southern杂交, 但是这种技术昂贵, 费时, 而且需要线粒体和叶绿体探针^[18], 但是棉花中没有可用的线粒体和叶绿体探针^[1,6]。所以我们选择其他可行的方法来检测杂种, 例如, CAPS就被证实是检测细胞质基因组有效、可靠的方法之一^[19,20]。另外, cpSSR也可以用来检测杂种的叶绿体^[21,22]。

本实验室在获得第一例对称融合杂种后^[1], 成功获得了未处理的陆地棉和UV处理的野生棉(*G. klotzschianum*)不对称融合杂种^[6]。而本文报道的则是“供-受体”融合产生的完全不对称杂种, 这是棉花原生质体融合研究的新进展。

1 材料与方法

() 原生质体分离与纯化。利用本实验室保存的YZ-1和*G. davidsonii*胚性愈伤悬浮系制备原生质体。悬浮系的建立采用本实验室已报道的方法^[1]。原生质体分离与纯化根据Yang等人^[6]的方法修改。取悬浮继代培养3~5 d的悬浮细胞悬浮于过滤灭菌的酶液中, (28±1) 轻微振荡(4×g) 16~20 h分离原生质体。酶液成分如下: 1.5%(质量体积比)纤维素酶Onozuka R-10, 1%(质量体积比)离析酶Macerozyme R-10和2%(质量体积比)半纤维素酶溶解于原生质体洗液CPW9M (CaCl₂·2H₂O 10 mmol/L, KH₂PO₄ 0.2 mmol/L, KNO₃ 1.0 mmol/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 mmol/L, CuSO₄·5H₂O 0.1 μmol/L, KI 10 μmol/L, 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid 15.37 μmol/L, 9%(质量体积比) mannitol, pH 5.6)。酶解后的原生质体经孔径为100和38.5 μm双层不锈钢网过滤, 80×g离心5 min, 使原生质体沉于离心管管底; 沉淀物用1 mL CPW9M悬浮, 并轻轻加入到含有3 mL CPW25S (将CPW9M中的9%的甘露醇换成25%的蔗糖)的新管中, 80×g离心6 min, 原生质体在两液面间形成一条带,

将原生质体轻轻地吸出, 转入另一离心管, 80×g离心5 min, 收集, 悬浮于不同的溶液中(CPW9M和电融合液)备用。

() 原生质体预处理、活力检测及流式细胞仪检测。融合前, 用IOA处理YZ-1原生质体, UV处理*G. davidsonii*原生质体。IOA溶解于CPW9M溶液, 配成5 mmol/L母液, 用1 mol/L NaOH调pH为5.8, 抽滤灭菌, 冰箱保存。使用时, 用CPW9M溶液将IOA配成不同的浓度(0.1, 0.3, 0.5, 1.0和1.5 mmol/L)。将纯化的YZ-1原生质体分别悬浮于不同浓度的IOA溶液中, 在室温下处理20 min (包括离心所需的5 min), 处理时每隔5 min取出轻轻晃动离心管, 以免原生质体沉积影响处理效果, 处理后离心(80×g, 5 min), 收集底部原生质体, 再用液体培养基洗涤2次, 调整培养密度为10⁶/mL, 采用液体浅层培养^[2]。UV辐射参照Yang等人^[6]的方法, 需要处理的原生质体悬浮液置于30 W紫外灯(辐射强度为1290 μW/cm²)下10 cm处, 照射时间分别为0, 10, 30, 60和90 s, 相应的辐射剂量分别为0, 12.9, 38.7, 77.4和116.1 J/cm²。照射完后用液体培养基洗涤2次, 液体浅层培养。所有的实验重复3次。未处理的原生质体作为对照。

利用荧光素双醋酸酯(FDA)染色检测原生质体活力。FDA的贮存液(2 mg FDA溶于1 mL 丙酮)稀释50倍。原生质体和FDA等量混合, 静置5 min, 然后在荧光显微镜(Leica DM2500, Leica, Bensheim, Germany)下观察。发绿色荧光的是有活力的原生质体。统计培养7天内的原生质体活力(暗视野中发绿色荧光的原生质体数占同一明视野中总原生质体数的比例), 培养第7天的分裂频率(同一视野下分裂的原生质体个数占总原生质体个数的比例)和培养1个月的植板率(同一视野下细胞团的个数占总原生质体的个数的比例)。每个样品取10个视野, 所有实验都重复3次。数据用SAS软件做邓肯氏新复极差测验(SAS Institute, Cary, N.C.), 差异显著性水平是5%。

参照Cheng等人^[20]的方法, 采用流式细胞仪检测不同浓度IOA处理的YZ-1原生质体和不同辐射剂量UV处理的*G. davidsonii*原生质体在培养当天、第3天和第5天的DNA含量。在待检测的原生质体中加入100 μL Partec HR-A溶液, 混匀静置5 min, 经30 μm直径尼龙膜过滤。过滤后, 用500 μL Partec HR-B溶液染色。1 min后上样于流式细胞仪, 测定样品单个细胞核的DNA含量。YZ-1是四倍体, 相关DNA含量设

置在 100; 二倍体 *G. davidsonii* 的 DNA 含量设置在 50. 每次测量的细胞数目不少于 10000 个细胞, 重复 4 次. DNA 含量的分布曲线由流式细胞仪自动生成.

() 原生质体电融合和培养. 经过IOA和UV处理的原生质体离心后悬浮于电融合液中, 等量混匀, 密度调至 $10^6/\text{mL}$, 进行电融合, 电融合参数根据Yang等人^[6]修改: 交流电场强度 100 V/cm, 作用时间 10 s; 直流电场强度 1250 V/cm, 作用时间 30 μs ; 脉冲次数为 3 次. 融合后原生质体静置 20 min, 以便球形化. 混合液转移到 10 mL离心管中 $80\times g$ 离心 5 min. 收集原生质体, 调节密度至 $10^6/\text{mL}$, 培养于 KM_8P 培养基^[23]. 每两个星期添加 2 mL新鲜培养基以降低渗透压, 有利于细胞分裂和愈伤形成.

() 再生植株细胞学观察. 染色体数目统计采用压片的方法. 亲本和杂种再生愈伤、胚状体和根尖分别置于饱和的对二氯苯溶液中, 室温下预处理 3.5~4 h, 然后转移到卡诺固定液(无水乙醇比冰醋酸 = 3:1), 4 固定 24 h 以上. 随后用蒸馏水清洗, 再用 6 mol/L HCl 解离 30 min, 最后用 5%的卡宝品红染色 5 min, 压片, 普通显微镜放大 1000 倍观察染色体数目. 每个样品至少需要观察 3 个细胞.

() 再生植株分子检测. 采用CTAB法^[24]从双亲和再生植株叶片中抽提总DNA进行RAPD, SSR, cpSSR和CAPS分析. 100 对RAPD引物由上海生工合成(<http://www.sangon.com/>), RAPD分析参照Sun等人^[1]的方法. RAPD反应为 20 μL 体系: 50 ng模板DNA, 2 μL 引物 (2.5 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL dNTPs (10 mmol/L), 1.2 μL

MgCl_2 (25 $\mu\text{mol/L}$), 1 U *Taq* DNA聚合酶, $1\times$ 反应缓冲液. 扩增程序为: 94 3 min; 94 1 min, 36 1 min, 72 90 s, 35 个循环; 72 10 min; 4 保存. PCR产物用 1.4%的琼脂糖胶分离. 5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭 (EB)染色, 紫外灯下照相. 150 对SSR引物则是根据棉花数据库序列合成(<http://www.cottonmarker.org/>), 实验方法参照文献^[25]的方法. PCR扩增反应为 10 μL 体系: 25 ng模板DNA, 1.6 μL 引物(2.5 $\mu\text{mol/L}$), 0.2 μL dNTPs (10 mmol/L), 0.8 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 0.5 U *Taq* DNA聚合酶, $1\times$ 反应缓冲液. 扩增程序为: 94 3 min; 94 1 min, 55 55 s, 72 1 min, 35 个循环; 72 10 min; 4 保存. SSR扩增产物采用 6%聚丙烯酰胺变性凝胶分离, PCR产物变性凝胶电泳前要变性 5 min. 凝胶采用银染的方法, 室温下干燥后照相.

cpSSR用来检测叶绿体基因组, 本实验采用了其他作物的 4 对叶绿体引物^[26], 实验方法与SSR实验方法一样. 采用其他作物中的 5 对叶绿体引物和 3 对线粒体引物^[20]进行CAPS扩增反应, 检测细胞质基因组 (表 1). PCR扩增反应为 50 μL 体系: 100 ng模板DNA, 5 μL 引物(2 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL dNTPs (10 mmol/L), 3 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 2 U *Taq* DNA聚合酶, $1\times$ 反应缓冲液. 扩增程序为: 94C 3 min; 94 50 s, 55 45 s, 72 90 s, 35 个循环; 72 10 min; 4 保存. 取大约 5 μL PCR产物, 经 5 U限制性内切酶(*EcoR*, *Hind*, *Sac*, *Sal*, *Msp*, *Rsa*, *Mse* 和 *Hae*)于 37 酶切 4 h. 酶切产物经 2.0%琼脂糖胶电泳 1.5 h, 5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭(EB)染色, UV灯下照相.

表 1 CAPS 和 cpSSR 所用引物序列

	引物 1	引物 2
叶绿体引物	<i>RbcL</i> 5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGT-3'	<i>RbcL</i> 5'-CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTCAGGACTCC-3'
	<i>RbcL</i> 5'-TTTGGTGGAGGAACCTTAGGACACCCTTGGGG-3'	<i>PSAI</i> 5'-GCAATTGCCGGAATACTAAGC-3'
	<i>TrnH</i> 5'-ACGGGAATTGAACCCGCGCA-3'	<i>TrnK</i> 5'-CCGACTAGTTCGGGGTTCGA-3'
	<i>TrnD</i> 5'-ACCAATTGAACTACAATCCC-3'	<i>TrnT</i> 5'-CTACCACTGAGTTAAAGGG-3'
	<i>TrnK</i> 5'-AACCCGGAAGTCTCGGATG-3'	<i>TrnK</i> 5'-TCAATGGTAGAGTACTCGGC-3'
线粒体引物	<i>nad1</i> exon B 5'-GCATTACGATCTGCAGCTCA-3'	<i>nad1</i> exon C 5'- GGAGCTCGATTAGTTTCTGC-3'
	18S rRNA 5'-GTGTTGCT-GAGACATGCGCC-3'	5S rRNA 5'-ATATGGCGCAAGACGATTCC-3'
	<i>nad4</i> exon 1 5'- CAGTGGGTTGGTCTGGTATG-3'	<i>nad4</i> exon 2 5'- TCATATGGGCTACTGAGGAG-3'
cpSSR 引物	NTCP9 5'-CTTCCAAGCTAACGATGC-3'	NTCP9 5'-CTGTCTATCCATTAAGACAATG-3'
	NTCP18 5'-CTGTTCTTTCCATGACCCCTC-3'	NTCP18 5'-CCACCTAGCCAAGCCAGA-3'
	NTCP30 5'-GATGGCTCCGTTGCTTTAT-3'	NTCP30 5'-TGCCGAGAGTTCCTTAACAATA-3'
	NTCP40 5'-TAATTTGATTCTTCGTCGC-3'	NTCP40 5'-GATGTAGCCAAGTGATCA-3'

2 结果

2.1 IOA 和 UV 处理对原生质体的影响

用不同浓度 IOA 处理 YZ-1 原生质体后, 发现原生质体活力随着处理浓度升高而降低(表 2). 未处理的原生质体经培养可再生植株; 用 0.1 mmol/L IOA 处理, 原生质体也能再生成植株. 而 IOA 浓度为 0.3 mmol/L 时, 原生质体能再生愈伤, 却未能再生植株. 当浓度达到 0.5 mmol/L 时, 原生质体未见再生愈伤. 用更高浓度(1 和 1.5 mmol/L)处理, 原生质体逐渐褐化, 形状不规则直至破裂. 另外, 处理过的原生质体第一次分裂比未处理的原生质体要晚, 分裂频率和植板率要低(表 2). 实验还发现, 用 0.5 和 1.0 mmol/L IOA 处理时, 原生质体在培养 7 d 后可见部分分裂. 而 1.5 mmol/L IOA 处理完全抑制了原生质体的分裂. 流式细胞仪分析表明, 不同浓度 IOA 处理的原生质体在培养当天的 DNA 含量没有明显变化, 随着培养时

间的延长, IOA 处理的原生质体的 DNA 含量(图 1(b))相对于未处理的原生质体的 DNA 含量(图 1(a))有明显变化, 0.5 mmol/L IOA 处理 20 min 后培养第 5 天的原生质体出现倍性漂移的现象. 而当用更高剂量 IOA 处理原生质体的时候, 流式细胞仪无法显示细胞核 DNA 的含量, 可能是因为细胞质的钝化引起细胞生长能量得不到供应, 从而间接影响细胞核, 导致染色体的丢失. 综上所述, 我们选用 0.5 mmol/L 为 IOA 最低失活浓度用于后面的原生质体融合实验.

UV 对 *G. davidsonii* 原生质体的影响主要表现在原生质体活力、分裂频率和植板率三方面(表 3). 实验发现, 原生质体活力、分裂频率和植板率随着辐射剂量的增加而降低. 未辐射的原生质体和 12.9 J/cm² 辐射的原生质体分别在第 2 和第 3 天时开始第 1 次分裂, 之后不断分裂, 15 天左右形成细胞团, 而后形成愈伤组织和植株. 38.7 J/cm² 辐射的原生质体第一次分裂在培养后 5 天, 随后形成少量的小细胞团, 未见形成愈伤组

表 2 不同碘乙酰胺浓度对 YZ-1 原生质体的影响^{a)}

IOA 浓度/mmol·L ⁻¹		0	0.1	0.3	0.5	1	1.5
原生质体活力(%)	第1天	90.86±5.44A	86.6±0.8AB	82.99±1.65B	82.54±3.51B	81.98±2.3BC	76.8±0.96CD
	第2天	83.54±0.33A	81.92±0.95A	77.39±2.12B	76.85±1.86B	53.66±3.5C	22.69±1.97D
	第3天	77.44±0.32A	74.47±0.43A	71.79±3.39AB	66.71±1.22B	47.5±10.68C	0D
	第4天	76.16±2.97A	73.06±2.61A	63.72±2.94B	61.33±1.15B	43.56±2.03C	0D
	第5天	74.49±3.37A	65.14±1.71B	62.32±1.28B	55.89±5.88C	37.41±1.87D	0E
	第6天	71.94±4.83A	63.73±0.85B	49.52±2.85C	41.76±1.77D	33.72±2.28E	0F
	第7天	50.83±1.24A	46.45±0.43A	27.41±3.02B	21.45±6.41B	13.46±5.64C	0D
分裂频率(%)	第7天	29.73±3.67A	24.63±3.77B	19.92±4.29BC	18.67±2.08C	8.92±1.69D	0E
植板率(%)	第30天	8.31±1.17A	5.89±1.23B	3.91±0.73C	3.52±0.47C	1.24±0.18D	0D

a) 数据进行邓肯氏新复极差测验, 差异显著性水平为 $P \leq 0.05$. 字母 A, B, C, D, E 表示同一天不同浓度 IOA 处理的原生质体活力差异水平. 数据统计为平均数 ± 标准差, $n = 3$. 原生质体活力是指暗视野中发绿色荧光的原生质体数占同一明视野中总原生质体数的比例; 分裂频率是指同一视野下分裂的原生质体个数占总原生质体个数的比例; 植板率是指同一视野下细胞团的个数占总原生质体的个数的比例

图 1 IOA处理的YZ-1原生质体和UV处理的*G. davidsonii*原生质体在培养第5天的DNA相对含量

(a) 未经 IOA 处理的 YZ-1 原生质体; (b) 0.5 mmol/L IOA 处理 20 min 的 YZ-1 原生质体; (c) 未经 UV 辐射的 *G. davidsonii* 原生质体; (d) 38.7 J/cm² 的 UV 辐射 30 s 的 *G. davidsonii* 原生质体

表3 紫外线辐射剂量对 *G. davidsonii* 原生质体的影响^{a)}

UV 辐射剂量/ $J \cdot cm^{-2}$	0	12.9	38.7	77.4	116.1
原生质体活力(%) 第1天	83.57±0.38A	79.53±2.14A	78.04±7.83A	66.45±1.15B	60.45±0.27B
第2天	80.43±1.83A	72.57±0.43B	71.72±1.57B	50.62±1.05C	38.59±0.65D
第3天	78.75±1.38A	71.28±0.38B	65.28±2.36C	44.75±1.69D	24.63±2E
第4天	74.43±1.04A	55.78±1.87B	52.65±0.95C	34.44±1.23D	23.37±0.78E
第5天	72.44±3.8A	51.69±1.81B	49.17±0.63B	23.96±1.38C	13.27±1.39D
第6天	67.26±2.87A	56.16±0.78B	43.46±2.46C	18.31±1.17D	10.77±3.74E
第7天	63.47±1.31A	26.49±1.3B	20.77±1.88C	15.86±1.04D	5.08±1.59E
分裂频率(%) 第7天	38.58±1.12A	16.53±1.98B	11.04±2.42C	4.83±1.05D	0.49±0.28E
植板率(%) 第30天	8.53±0.57A	6.11±1.81B	5.69±0.49B	0C	0C

a) 数据进行邓肯氏新复极差测验, 差异显著性水平为 $P \leq 0.05$ 。字母 A, B, C, D, E 表示同一天不同 UV 剂量辐射的原生质体活力差异水平。数据统计为平均数±标准差, $n = 3$ 。原生质体活力是指暗视野中发绿色荧光的原生质体数占同一明视野中总原生质体数的比例; 分裂频率是指同一视野下分裂的原生质体个数占总原生质体个数的比例; 植板率是指同一视野下细胞团的个数占总原生质体的个数的比例

织; 77.4 J/cm^2 辐射的原生质体早期还比较正常, 有少量的分裂, 但 10 d 后就逐渐破碎直至死亡; 116.1 J/cm^2 辐射的原生质体在第一次分裂后停止生长。流式细胞仪分析表明, 各剂量处理的原生质体在培养当天的 DNA 含量没有明显变化, 随着培养时间的延长, UV 辐射的原生质体的 DNA 含量(图 1(d))相对于未处理的原生质体的 DNA 含量(图 1(c))发生明显变化, 38.7 J/cm^2 辐射 30 s 后培养第 5 天的原生质体出现倍性漂移的现象。而当用更高剂量 UV 处理原生质体的时候, 流式细胞仪无法显示细胞核 DNA 的含量, 可能是因为高剂量的 UV 处理引起原生质体 DNA 大部分断裂。因此, 我们选择 38.7 J/cm^2 为 UV 致死剂量用于不对称融合实验。

2.2 细胞融合、植株再生和形态观察

处理过的双亲原生质体经电融合后转入培养基中进行培养^[2]。融合原生质体第一次分裂是在培养的第 3 天, 比处理过的双亲原生质体要早, 培养 50~60 d 可见再生愈伤。选择活力较好的 300 个单个愈伤块采用看护培养的方法培养于 MS 培养基上^[6], 得到不同来源的再生小植株。大部分再生植株表现与双亲不同的形态。三角瓶中生长的亲本 YZ-1 是掌状叶, 茎干幼嫩而且细, 叶片和茎干上有少量的表皮毛(图 2(a)); *G. davidsonii* 的叶片是心形的, 茎干很细, 叶片和茎干光滑无毛(图 2(d))。而大部分融合再生植株叶片是心形的, 茎干较粗, 叶片和茎干上都有很多的表皮毛(图 2(b))。再生植株中也有形态介于双亲之间的(图 2(c)), 还有呈现簇生状态的, 有少量偏向于受体亲本的。在培养基中, 融合再生植株的根很容易褐化以至死亡, 为了正常生长, 杂种的芽可以嫁接到海岛棉砧木上(图 2(b))^[27]。

2.3 再生植株染色体数目分析和分子检测

收集融合再生愈伤、体胚和新鲜的根做染色体数目分析。染色体数目在 40 到 73 之间变化(图 2(e)~(n)), 杂种染色体数目比双亲之和要少, 甚至有些还要少于亲本 YZ-1 的染色体数目, 染色体数目变化范围相对于基于 UV 处理的不对称融合杂种^[6]的染色体数的变化范围要大得多。

RAPD 和 SSR 用于分析 10 个形态上和细胞水平上确定的杂种的细胞核基因组。100 对 RAPD 引物中, 12 对引物在双亲之间有多态性。融合双亲的一条或多条特征带或是新的带型出现在再生植株的扩增图谱中都可以表明再生植株为体细胞杂种。当亲本和再生植株的基因组 DNA 经 S1019 (5'-GGCAGTTCTC-3')和 S1038 (5'-TCGCGGAACC-3')引物扩增时, 融合双亲和再生植株的扩增图谱差异明显。再生植株经引物 S1038 扩增出多个条带, 其中 3 条来自亲本 YZ-1 (约 400, 550, 700 bp), 2 条来自亲本 *G. davidsonii* (约 400, 900 bp)(图 3(a))。一些再生植株扩增图谱(图 3(a), 第 2 和第 3 道)仅观察到亲本 YZ-1 的特征带, 这意味着供体 *G. davidsonii* 的染色体可能发生大片段的丢失。还有一些再生植株扩增图谱(图 3(a), 第 1, 4, 5, 6, 9, 10 道)观察到 *G. davidsonii* 全部的特征带或是部分 YZ-1 的特征带, 说明 YZ-1 的染色体也有可能发生大片段的丢失。一个杂种植株扩增图谱只有部分 YZ-1 特征带(图 3(a), 第 7 道)。再生植株扩增图谱出现新的带型则说明再生植株染色体可能发生重组(图 3(a); 地 8 道)。S1019 引物扩增在双亲 YZ-1 和 *G. davidsonii* 中同时产生 3 条带, 分别为 600, 850, 1000 bp 和 450, 900, 1050 bp (图 3(b)), 这很容易就能证实

图 2 原生质体融合再生杂种植株及杂种染色体计数

(a) YZ-1 原生质体培养再生植株; (b)和(c) 体细胞杂种植株; (d) *G. davidsonii* 原生质体培养再生植株; (e)~(n) 体细胞杂种染色体计数. (e) $2n = 66$; (f) $2n = 40$; (g) $2n = 62$; (h) $2n = 68$; (i) $2n = 54$; (j) $2n = 46$; (k) $2n = 73$; (l) $2n = 64$; (m) $2n = 60$; (n) $2n = 61$. 标尺示 $50 \mu\text{m}$

图 3 再生体细胞杂种植株 RAPD 和 SSR 检测

(a)~(b) RAPD 引物 S1038 和 S1019 扩增图谱. (c)和(d) SSR 引物 DPL511 和 DPL322 扩增图谱. Y, YZ-1; D, *G. davidsonii*; 1~10, 杂种再生植株; M, 100 bp DNA Marker

再生植株的杂种真实性. 150 对 SSR 引物中, 36 对在双亲之间有多态性. 引物 DPL511 (F: 5'-TACATGCAGT

GCTACAGAAGAACA-3'; R: 5'-CTTGTATGCCATCA TTAACCCTTC-3')和 DPL322 (F: 5'-AAACCTCGTAG TCATAGGCTCAAA-3'; R: 5'-AACTATGCACACAGA TTTGGTACG-3')能明显区分亲本和杂种(图 3(c), (d)). 分析的 10 个杂种中, YZ-1 和 *G. davidsonii* 特征带的有无和新带型的出现都能进一步证实植株的杂种真实性, 进一步验证了 RAPD 分析结果.

cpSSR 和 CAPS 分析用于杂种细胞质基因组的鉴定. cpSSR 检测杂种叶绿体基因组(图 4(a)), 杂种植株经引物 NTCP40 扩增, 亲本各产生一条特征带, 有些杂种结合了双亲的叶绿体 DNA (图 4(a), 第 3, 4, 6, 7, 8, 10 道), 有些则只含有 YZ-1 的叶绿体 DNA (图 4(a), 第 1, 2 道)或是只含有 *G. davidsonii* 的叶绿体 DNA (图 4(a), 第 5, 9 道). CAPS 分析表明, 叶绿体和线粒体引物扩增的 PCR 产物经限制性内切酶酶切后, 融合亲本间出现多态性位点. 叶绿体引物和酶的组合 *RbcL-RbcL/Hae* 对于区分双亲和杂种植株是可行的

图4 再生体细胞杂种植株 cpSSR 和 CAPS 检测

(a) cpSSR 引物 NTCP40 扩增图谱. (b)和(c) 叶绿体和线粒体 CAPS 扩增图谱. (b) 多态性引物/酶组合 *RbcL-RbcL/Hae* 产生的 cpDNA 扩增酶切图谱; (c) 多态性引物/酶组合 *nad4* exon 1 - *nad4* exon2/*Mse* 产生的 mtDNA 扩增酶切图谱. Y, YZ-1; D, *G. davidsonii*; 1~10, 杂种再生植株; M, 100 bp DNA Marker

(图 4(b)). 线粒体引物和酶组合 *nad4* exon 1-*nad4* exon2/*Mse* 在双亲之间有明显的多态性, 并且在杂种植株扩增图谱中发现不同于双亲的新的带型(图 4(c), 第 2, 3 道), 这说明杂种线粒体基因组的某些区域可能发生了重组.

3 讨论

本研究中, 我们就 IOA 和 UV 对原生质体的影响进行了详细的研究. IOA 钝化细胞质, 通过阻断细胞能量供应来抑制细胞生长, 有效地简化了体细胞杂种的筛选工作^[28]. 本研究结果表明, 高于最低失活浓度 0.5 mmol/L 的 IOA 处理会使原生质体完全失活且单独培养不成功. 但是 Terada 等人^[29]研究发现, 高于最低失活浓度的 IOA 处理的原生质体仍然能够生长, 可能是由于未处理原生质体的看护作用. 植板率为 0 的时候, 活力不一定为 0, 这可能是因为原生质体钝化后尚存活的原生质体密度比培养所需的临界密度要低. 如果给予一定的培养条件, 原生质体会形成细胞团. 所以我们在选择 IOA 处理的最低失活浓度时, 应该选择活力为 0 的浓度, 而不是植板率为 0 的浓度. 此外, 从流式细胞仪检测结果来看(图 1(a)~(b)), IOA 钝化细胞质会引起细胞核染色体的丢失. UV 常常用于细胞核染色体的断裂和片段化^[6,7,15,16,30]. 辐射剂量是 UV 处理的一个重要因素. 本研究从 UV 处理的原生质体活力、分裂频率、植板率和流式细胞仪检测等方面分析, 认为染色体丢失与辐射剂量之间存在正相关的关系, 类似的结果以前也报道过^[6,30,31]. 由此可见, 染色体丢失是一个相当复杂的过程, 目前还没

有完全弄清楚染色体丢失最根本的原因, 但可能与很多因素有关, 如基因型、辐射源、辐射剂量、融合亲本亲缘关系的远近、亲本和融合产物的倍性、培养条件等^[6,32].

本研究采用“供-受体”双失活融合模式获得了 IOA 处理的 YZ-1 原生质体和 UV 处理的 *G. davidsonii* 原生质体融合再生植株, 而处理过的双亲均未获得再生植株, 这可能是因为处理的双亲原生质体的遗传或生理互补而使杂种细胞恢复生长. 在形态学和细胞学初步鉴定后, 我们采用 RAPD 和 SSR 检测再生植株的细胞核基因组, cpSSR 和 CAPS 两种标记检测再生植株细胞质基因组. cpSSR 是一种新型的检测杂种叶绿体基因组的有效方法^[21,22]. 因其具有保守特性, 我们可将其他物种的 cpSSR 分析技术用来分析棉花体细胞杂种叶绿体基因组的重组特性, 并发现引物 NTCP40 在双亲和杂种间多态性比较明显(图 4(a)). CAPS 是近年来才应用于高等植物体细胞杂种细胞质遗传的检测, 是一种非常有效的检测手段^[20,33]. 本研究 CAPS 分析结果表明杂种植株的线粒体和叶绿体某些区域发生了重组.

这是棉花原生质体“供-受体”双失活融合模式产生杂种植株的首次报道, 这种融合模式是棉花遗传改良和创造新种质的一种新方法. 棉花陆地棉和野生棉原生质体培养, 对称融合和基于紫外线处理的不对称融合在我们实验室都有详细报道^[1,2,5,6]. 陆地棉和野生棉对称融合杂种染色体数目几乎为双亲之和, 含有双亲全部的 DNA, 结合了双亲所有的性状. 而基于紫外线处理的不对称融合染色体数目少于双亲之和, 但比陆地棉亲本染色体数目要多, 杂种发生染色体丢失的现象, 转移野生棉部分性状, 从而减少了不利性状的转移. 而本研究的“供-受体”双失活融合模式再生杂种染色体数目变化范围更大, 染色体数目少于双亲之和, 有的甚至少于陆地棉染色体, 杂种染色体丢失现象更严重, 在转移有利性状的同时减少了不利性状的转移^[3], 还可以简化融合后代的筛选工作, 更容易获得高度不对称的杂种. 然而, 大多数情况下杂种形态异常和不育, 可能是因为杂种中来源于双亲的基因组仍然存在着高度不协调造成的. 随着“供-受体”融合技术的不断完善, 这种完全不对称融合方式有望在棉花新种质创造方面发挥重要作用.

致谢 感谢宗周同学在流式细胞仪检测方面给予的帮助.

参考文献

- 1 Sun Y Q, Zhang X L, Nie Y C, et al. Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss) via electrofusion. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 472—479
- 2 Sun Y Q, Zhang X L, Nie Y C, et al. Production of fertile somatic hybrids of *Gossypium hirsutum* + *G. bickii* and *G. hirsutum* + *G. stockii* via protoplast fusion. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2005, 83: 303—310[doi]
- 3 Binsfeld P C, Schnabl H. Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. *Plant Cell Rep*, 2002, 21: 58—62[doi]
- 4 Wardrop J, Fuller J, Powell W, et al. Exploiting plant somatic radiation hybrids for physical mapping of expressed sequence tags. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 343—348[doi]
- 5 Sun Y Q, Nie Y C, Guo X P, et al. Somatic hybrids between *Gossypium hirsutum* L. (4×) and *G. davidsonii* Kellog (2×) produced by protoplast fusion. *Euphytica*, 2006, 151: 393—400[doi]
- 6 Yang X Y, Zhang X L, Jin S X, et al. Production and characterization of asymmetric hybrids between upland cotton Coker 201 (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 89: 225—235[doi]
- 7 Wang M Q, Zhao J S, Peng Z Y, et al. Chromosomes are eliminated in the symmetric fusion between *Arabidopsis thaliana* L. and *Bupleurum scorzonrifolium* Willd. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008, 92: 121—130[doi]
- 8 Liu J H, Deng X X. Production of hybrid calluses via donor-recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1999, 59: 81—87[doi]
- 9 朱永生, 陈葆棠, 余舜武, 等. 不对称体细胞杂交转移疣粒野生稻对水稻白叶枯病的抗性. *科学通报*, 2004, 49: 1395—1398[doi]
- 10 Hansen L N, Earle E D. Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1293—1300
- 11 Varotto S, Nenz E, Lucchin M, et al. Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 950—956[doi]
- 12 Gleba Y Y, Hinnisdaels S, Sidorov V A, et al. Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by "gamma-fusion". *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 760—766[doi]
- 13 Hinnisdaels S, Bariller L, Mouras A, et al. Highly asymmetric intergeneric nuclear hybrids between *Nicotiana* and *Petunia*: evidence for recombinogenic and translocation events in somatic hybrid plants after "gamma"-fusion. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 609—614
- 14 McCabe P E, Dunbar L J, Guri A, et al. T-DNA-tagged chromosome 12 in donor *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* is retained in asymmetric somatic hybrids with recipient *Solanum lycopersicoides*. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 377—382
- 15 Hall R D, Rouwendal G J A, Krens F A. Asymmetric somatic cell hybridization in plants. I. The early effects of (sub) lethal doses of UV and gamma radiation on the cell physiology and DNA integrity of cultured sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Mol Gen Genet*, 1992, 234: 306—314
- 16 Hall R D, Rouwendal G J A, Krens F A. Asymmetric somatic cell hybridization in plants. II. Electrophoretic analysis of radiation-induced DNA damage and repair following the exposure of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts to UV and gamma rays. *Mol Gen Genet*, 1992, 234: 315—324
- 17 Xia G M, Li Z Y, Wang S L, et al. Asymmetric somatic hybridization between haploid common wheat and UV-irradiated *Haynaldia vilosa*. *Plant Sci*, 1998, 137: 217—223[doi]
- 18 Cabasson C M, Luro F, Ollitrault P, et al. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in *Citrus* hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 604—609
- 19 Fu C H, Guo W W, Liu J H, et al. Regeneration of *citrus sinensis* (+) *clausena lansium* intergeneric triploid and tetraploid somatic hybrids and their identification by molecular markers. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2003, 39: 360—364[doi]
- 20 Cheng Y J, Guo W W, Deng X X. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 445—451
- 21 Cheng Y J, Guo W W, Deng X X. cpSSR: a new tool to analyze chloroplast genome of *citrus* somatic hybrids. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 906—909
- 22 Cai X D, Fu J, Deng X X, et al. Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy *Citrus* cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 90: 275—283[doi]
- 23 Kao K N, Michayluk M R. Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 1975, 126: 105—110[doi]
- 24 Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extration of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP

- and PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122—127[[doi](#)]
- 25 Lin Z, He D, Zhang X, et al. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fiber quality using SRAP, SSR and RAPD. *Plant Breeding*, 2005, 124: 180—187[[doi](#)]
- 26 Wills D M, Burke J M. Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Hered*, 2006, 97: 403—408[[doi](#)]
- 27 Jin S X, Liang S G, Zhang X L, et al. An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2006, 85: 181—185[[doi](#)]
- 28 Zhao Z G, Hu T T, Ge X H, et al. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1611—1621[[doi](#)]
- 29 Terada R, Yamashita Y, Nishibayashi S, et al. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Theor Appl Genet*, 1987, 73: 379—384
- 30 Forsberg J, Lagercrantz U, Glimelius K. Comparison of UV light, X-ray and restriction enzyme treatments as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 1178—1185[[doi](#)]
- 31 Vlahova M, Hinnisdals S, Frulleux F, et al. UV irradiation as a tool for obtaining asymmetric somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Lycopersicon esculentum*. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 184—191[[doi](#)]
- 32 Liu J H, Xu X Y, Deng X X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2005, 82: 19—44[[doi](#)]
- 33 Guo W W, Prasad D, Cheng Y J, et al. Targeted cybridization in citrus: Transfer of satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 752—758[[doi](#)]

· 动态 ·

第四届国际理论化学、分子模拟和生命科学研讨会在长春举行

2009年7月28日~31日,第四届国际理论化学、分子模拟和生命科学研讨会在长春国际会展中心召开。此次会议由吉林大学和北京宏剑公司共同主办,特别邀请了吉林大学理论化学计算国家重点实验室孙家钟院士、北京大学化学学院黎乐民院士、吉林大学校长展涛、吉林省副省长刘淑莹、长春市委副书记钱龙生、北京宏剑公司董事长高宏、国家自然科学基金委员会化学部杨俊林、美国 Materials Design 公司总裁 Erich Wimmer 博士等人参加。

国际理论化学、分子模拟和生命科学研讨会是由徐光宪先生倡导和发起的,其宗旨是为了推动中国理论化学、分子模拟和生命科学理论的研究,为研究工作者提供一个高水平的学术讲坛和交流机会。从2003年第一届举办以来,此次已经是第四届。几次研讨会均受到了国内外广大理论化学及理论生命科学工作者和专家们的热烈响应。

本次会议主题是“理论计算和分子模拟技术在化学、材料和生命科学领域的创新研究中的应用”。国内外近200人参加了此次会议,收到论文120篇。得益于计算机学科和技术的飞速发展,20世纪70年代出现了计算化学—分子模拟技术。自创始起分子模拟技术就在化学、生物和制药材料等领域扮演着重要的角色。由于有极大的应用前景和商业价值,自20世纪90年代起,化学和生物模拟的软件陆续在美国等先进国家商业化,并逐渐形成庞大的产业规模。中国的科研单位每年花费过亿经费购买这些软件的使用权。

本次大会的主办方之一北京宏剑公司是一家经营和

开发各种分子模拟软件的中国本土企业,致力于开发具有中国独立知识产权的分子模拟软件产品。该公司一直努力推进理论计算资源的社会共享,为用户提供超级计算能力,为科研单位的高性能计算中心提供用户需要的解决方案。目前,公司已与北京大学、北京师范大学、北京理工大学、厦门大学、吉林大学、南京大学、香港大学、杜克大学等诸多科研单位建立了合作关系。此次会议上,高宏董事长特别指出,“自主创新是我们时代的主旋律,我们在加强分子模拟领域国际合的同时,努力实现软件的自主创新和谐发展”。

在本次会议上,《中国科学:化学》的黎乐民主编向与会代表介绍了《中国科学》和《科学通报》近年来的改革举措。简单概括了《中国科学》和《科学通报》的发展历史;详细介绍了“两刊”的改革进展,学术管理体系、编委会组成、政策和经费支持以及编辑部建设等内容;阐述了《中国科学:化学》的定位、办刊宗旨、栏目设置、编委会情况、出版和网络传播等情况。黎先生指出,办好“两刊”是我国科技事业发展的要求,《中国科学》和《科学通报》应该成为开放的、代表我国高端科研水平的、在国际上有声望和有重要影响的科学期刊,成为展示我国科技进步与知识创新水平的窗口。

艾星涛

(《科学通报》编辑部)