

利用细胞松弛素 B 分离柑橘及金柑植物微核的研究

付春华 刘继红 邓秀新*

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

Micronucleus Isolation of *Citrus unshiu* Marc. and *Fortunella hindsii* (Champ.) Swingle by Cytochalasin B

FU Chun-Hua, LIU Ji-Hong, DENG Xiu-Xin*

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

提要 采用细胞松弛素 B (CB) 处理结合蔗糖梯度超速离心方法分离柑橘和金柑亚原生质体的结果表明, 柑橘和金柑原生质体的直径为 20~30 μm , 采用蔗糖梯度超速离心分离亚原生质体, 其适宜离心力是 1 400 000 $\times g$; 4',6-二脒基-2-苯基咪唑(DAPI) 的染色效果最好, 细胞核和细胞质可明显区分; 愈伤组织经 CB 处理 36 h 后再分离亚原生质体, 可显著提高微原生质体的产量, 分离的微原生质体直径为 1.8~3.5 μm , 产量达到 $2\sim 3\times 10^4$ 个 $\cdot g^{-1}$ (FW)。

关键词 柑橘; 金柑; 细胞松弛素 B; 微核; 蔗糖梯度超速离心

微核技术(micronucleus technology)是近年兴起的一种新的植物部分基因组转移技术, 它将原生质体融合与染色体操作相结合, 在植物育种中有一定的应用价值(Verhoeven和Ramulu 1991; Emets和Blum 2003)。常用的方法是采用适当浓度的有丝分裂阻抑制剂如秋水仙素(colchicine)、甲基氨基草膦(amiprofos-methyl, APM)等, 使正在分裂的细胞停留在有丝分裂中期, 几小时以后染色体解开螺旋, 形成外包有被膜的微核, 然后通过酶解分离出微核化的原生质体, 再经过离心等技术分离出带微核的原生质体(车建美和赖钟雄2002), 也有用多种试剂复合处理获得微原生质体的报道, 但这种方法操作非常繁琐(Ramulu等1994; Saito和Nakano 2002a, b)。细胞松弛素B (cytochalasin B, CB) 是肌动蛋白聚合的抑制剂, 结合在F-肌动蛋白的正(+)端, 抑制F-肌动蛋白的生长和功能发挥(Sonobe 1990; 曾宪录等1997)。鞠文君等(1996)的研究表明, CB 可使G₀期细胞微丝解聚, 促使细胞提早进入S期, 有促进细胞同步化的作用。宋朝霞等(2000)用光镜和电镜跟踪观察多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)有丝分裂过程的结果表明, CB 影响有丝分裂主要是推迟其启动, 并且推迟各个时期的细胞进入有丝分裂的时间不同, 从而达到同步化。本文以柑橘(*Citrus unshiu* Marc.) 和金柑[*Fortunella hindsii* (Champ.) Swingle]的愈伤

组织为试材, 研究不同处理时间和浓度的CB对细胞活性和有丝分裂同步化以及微核分离的影响, 从而为进一步用微核进行有目的的核基因转移建立基础。

材料与方 法

试材为柑橘‘国庆1号’(*Citrus unshiu* Marc. ‘Guoqing No. 1’)、金柑‘山金柑’[*Fortunella hindsii* (Champ.) Swingle ‘Hong Kong Kumquat’]的胚性愈伤组织, 保存在MT基本培养基上。

胚性悬浮系的建立参照郭文武(1998)的方法, 取保存于基本培养基上的‘国庆1号’、‘山金柑’愈伤组织建立悬浮系, 液体悬浮培养基(MT+0.5 g $\cdot L^{-1}$ 麦芽提取物+1.5 g $\cdot L^{-1}$ 谷氨酰胺)悬浮振荡培养(110 $\times g$), 每2周继代1次, 继代4次后用于实验。用愈伤组织在液体悬浮培养基中生长15~20 d达到对数生长期的细胞进行CB处理。CB用50% DMSO配制成5 mg $\cdot mL^{-1}$ 母液备用。设置20、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB 3种剂量对愈伤组织进行预处理, 未经CB处理的作对照, 每隔4 h 取样1次, 取样后立即用流式细胞仪测其峰值分布, 以确定合

收稿 2006-05-16 修定 2006-08-28

资助 国家自然科学基金(30200189)。

*通讯作者 (E-mail: xxdeng@mail.hzau.edu.cn, Tel: 027-87281712)。

适的CB处理浓度和处理时间。

流式细胞仪倍性分析参照Fu等(2003)方法并适当修改。取约0.05 g愈伤组织置于1个干净的塑料培养皿中,加入400 μL 细胞裂解液(Partec HR-A),刀片切碎,放置3 min,用30 μm 的微孔膜过滤到测试管中,再通过滤膜加入1.6 mL Partec HR-B溶液,染色2 min后上样于Partec倍性分析仪,测定样品单个细胞核的DNA总量。DNA含量的分布曲线由倍性分析仪自动完成。

微核分离参照Bracha和Sher(1981)的方法并稍作改动。在12 mL硝化纤维素试管中使密度递减的溶液依次分层制备成不连续的密度梯度(图1),原生质体纯化后按 7.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度悬浮在A溶液中,于25 $^{\circ}\text{C}$ 下以1 400 000 $\times g$ 超速离心30 min。微原生质体在35%和45%蔗糖的界面上形成一层,胞质体在A液和B液之间形成一层。随后用吸管把微原生质体和胞质体分别吸出,用CPW13盐溶液110 $\times g$ 离心洗涤10 min,再用此溶液重新悬浮。以血球计数板统计亚原生质体的量。

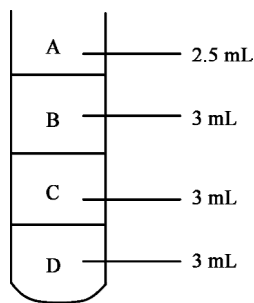


图1 分离亚原生质体的不连续密度梯度溶液

A溶液: CPW13+0.5% DMSO; B溶液: 0.7 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇+50 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ CB+0.5% DMSO; C溶液: 35%蔗糖溶液; D溶液: 45%蔗糖溶液。

染色时,采用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)和石碳酸品红核染料对原生质体、微核进行染色。用戊二醛固定液(0.05%磷酸缓冲液+12.7%甘露醇+2.5%戊二醛)将原生质体于4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜。在洁净载玻片上加1滴原生质体悬浮液(约20 μL)并加入适量DAPI,使其终浓度约为0.5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,染色5~10 min后,盖上盖玻片,以Olympus万能显微镜观察。

测量直径时,加1滴原生质体或亚原生质体悬浮液于洁净的载玻片上,盖上盖玻片后以装有目镜测微尺的Olympus显微镜测量原生质体直径,随机选取3个视野,共测定50个原生质体的直径,取其平均值作为某一品种的原生质体直径。

实验结果

1 柑橘和金柑悬浮系原生质体直径的确定

为确定柑橘亚原生质体分离的合适离心力,我们对‘国庆1号’、‘山金柑’的悬浮系原生质体的直径作了测定。结果表明,‘国庆1号’原生质体的大小不一,直径为15.1~35.3 μm ,平均为24.23 μm ;而‘山金柑’的平均直径为23.02 μm 。根据Watanabe和Yamaguchi(1988)研究所得的原生质体的直径与分离足够数量胞质体所需离心力的关系曲线(图2),可计算出其亚原生质体分离的最适离心力是1 400 000 $\times g$ 。

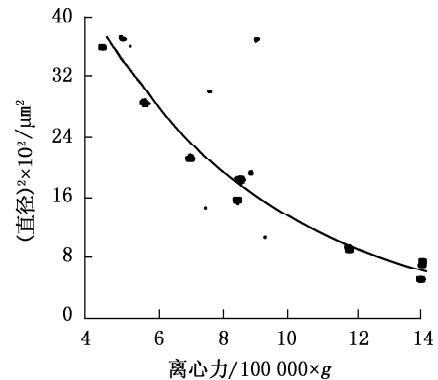


图2 原生质体的直径与分离足够数量胞质体所需离心力的关系曲线(Watanabe和Yamaguchi 1988)

2 适宜染色剂的确定

用石碳酸品红和DAPI核染料对原生质体染色的结果显示,石碳酸品红的染色效果差,核质均可染色,不易区分;DAPI的染色效果好,染色后的核物质在紫外激发光下可发出荧光,胞质则不发荧光(图3)。

3 CB对微核分离的影响

CB是微丝解聚药物,可以解聚G₀期的细胞微丝,促进细胞进入S期,增加DNA的合成。为确定适宜的CB处理浓度和处理时间,以‘国庆

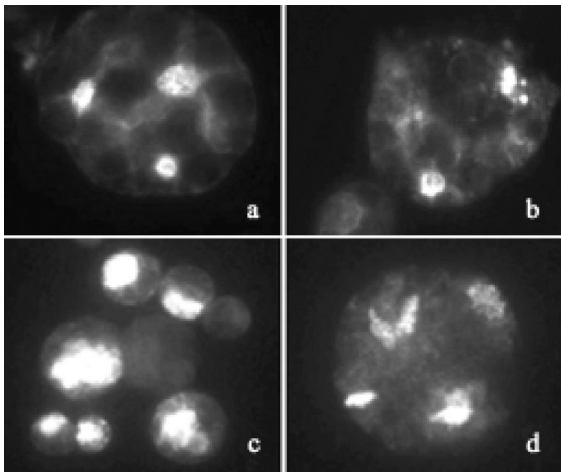


图3 CB处理后形成的微核

a: CB处理36 h含3个微核的原生质体($\times 1800$); b: CB处理36 h形成3个以上微核的原生质体($\times 1800$); c: 未经CB处理的原生质体($\times 720$); d: CB处理后的类减数分裂($\times 1800$)。

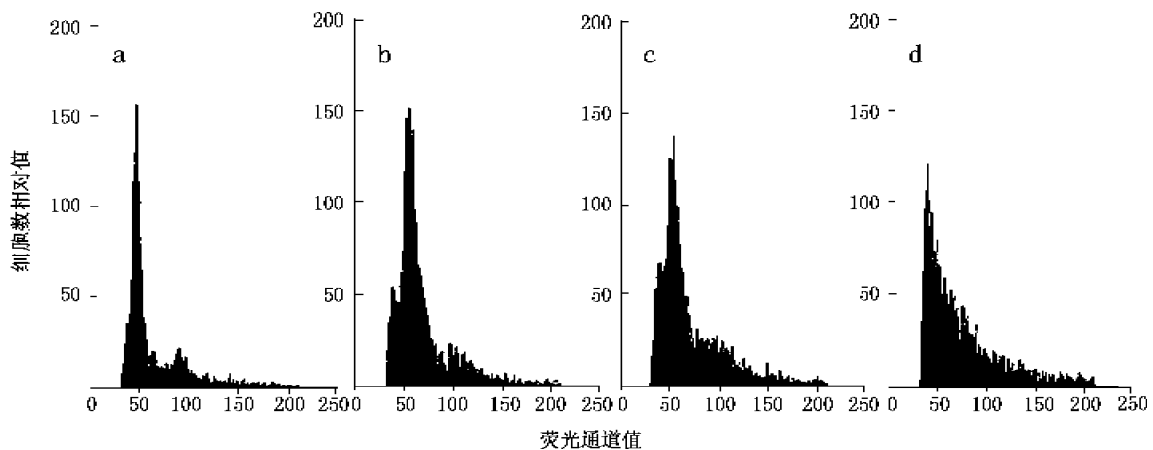


图4 细胞的倍性分析

a: 未经CB处理的愈伤组织悬浮培养36 h的峰形(主峰所处荧光值位于50左右); b: $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理36 h的峰形(主峰所处荧光值位于50左右, 较明显); c: $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理36 h的峰形(二倍体和四倍体之间出现峰值, 主峰所处荧光值位于50左右); d: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理36 h的峰形(主峰不明显, 所处荧光值位于二倍体和四倍体之间)。

以致峰形很乱, 这可能是细胞长期处于S期导致细胞死亡所致。

分别经 50 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理36 h以及未经CB处理的3种愈伤组织分离原生质体。在相同的酶解条件下, 未经CB处理的原生质体产量最高 [20×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理的次之 [15×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理的最低 [8×10^6 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)] (表1), 这似乎也说明CB会导致愈伤组织生活力下降。

实验中还发现, 经CB处理后有微核形成(图

1号’的悬浮系原生质体为试材, 以不同浓度CB分别处理后, 每隔4 h分别取样1次, 样品立即用流式细胞仪测其峰值分布。图4为流式细胞仪对样品进行倍性分析的结果, 横坐标轴峰值的位置反应的是测试样品的倍性。结果表明, 未经CB处理原生质体即使在实验开始后36 h时, 二倍体主峰仍然清晰明了(图4-a); $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理的主峰变化很小, 说明处理浓度太低, 所以效果不明显(图4-b); $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理36 h时, 在二倍体和四倍体之间出现峰值, 二倍体主峰仍然可见(图4-c), 随时间延长其峰值变化不大, 直到48 h时, 二倍体主峰不再明显, 峰形变乱; 而 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理36 h的二倍体主峰不明显, 峰值位于二倍体和四倍体之间(图4-d)。随着处理时间的延长, 愈伤组织的生活力下降, 呈松散状态,

3-a、b), 并见到类似减数分裂的现象(图3-d), 这种现象是否与CB有关, 尚需进一步研究。

4 亚原生质体分离

取相同量(约 1×10^6 个)的经 50 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CB处理过的‘山金柑’、‘国庆1号’2个品种的原生质体, 首先以 $1\ 000\ 000 \times g$ 离心30 min, 这2种处理均在 $0.7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇和35%蔗糖、35%和45%蔗糖界面中各形成一层; 而未经CB处理的此两层非常小, 几乎看不到。然后分别吸出界面上这两层, 经 $110 \times g$ 离心8 min后收集沉淀,

立即用戊二醛固定液固定 5 h 以上。经 DAPI 染色 5 min 后, 在紫外激发光下观察的结果显示, 在 35% 和 45% 蔗糖的界面中为微原生质体(图 5)和少量原生质体及其碎片, 在 0.7 mol·L⁻¹甘露醇和 35% 蔗糖的界面中为原生质体及其碎片, 这与前人的报道(Bracha 和 Sher 1981)是一致的。2 个品种分离得到的微原生质体直径相差不大, 均在 1.8~3.5 μm 之间, 可能与其内所含的染色体数有关(Saito 和 Nakano 2002a)。从‘山金柑’中分离得到的微原生质体纯度要高一些(50%), ‘国庆 1 号’原生质体纯度只有 30%, 这可能是‘山金柑’的原生质体比‘国庆 1 号’的内含物少, 离心时不易破裂所致。与未经 CB 处理的相比, 尽管经 CB 处理后微原生质体的产量有所提高, 但仍比较低, ‘国庆 1 号’为 2×10⁴ 个·g⁻¹ (FW), ‘山金柑’稍高些, 为 3×10⁴ 个·g⁻¹ (FW) (表 1), 远不能满足融合的需要。本文中未见到 CPW13 溶液和 0.7 mol·L⁻¹甘露

醇界面处形成带层, 即未能分离得到胞质体, 把离心转速提高到 1 400 000×g 的结果仍是如此。这表明尚需从梯度方面加以优化, 以求获得足够数量的胞质体和微核用于融合。

讨 论

微核技术不仅在果树育种上有直接应用价值, 而且在果树的基因定位和亲缘关系研究上也有意义。采用微核技术将供体特定的染色体转移给受体细胞时, 可从杂种细胞或由其再生的个体性状表现中, 很容易地确定该染色体带有哪些性状的基因。这对基因定位比较困难的果树来说, 无疑是一条新的值得采用的途径。胞质体-原生质体融合可产生高度非对称的胞质杂种, 这为转移细胞质控制的性状开辟了新的途径, 但目前这 2 种技术的应用还不广泛, 只在少数作物中获得成功, 大多数作物还处在探索阶段, 这主要是因为微核和胞质体的制备还存在技术上的困难。本文尝试采用 CB 处理与超速离心相结合的方法(Bracha 和 Sher 1981)来分离微核和胞质体的结果显示, 分离得到的微原生质体的比例有所提高, 但未能分离到胞质体, 这可能是因为前人与本文中所采用的原生质体的浮力密度不同所致, 前人采用的是叶肉原生质体(浮力密度为 0.3 mol·L⁻¹), 而本研究中采用的是悬浮系原生质体, 其浮力密度为 0.6 mol·L⁻¹。至于胞质体分离目前都是根据细胞组分浮力密度的不同, 主要采用密度梯度超速离心法, 虽然在这方面人们曾作了一定探索(Watanabe 和 Yamaguchi 1988; Saito 和 Nakano 2002a, b; Xu 等 2006), 但由于物种及基因型的不同, 所以采用的密度梯度液的组成以及离心速度和时间也均不同, 迄今还没有形成用于胞质体及微核分离的固定模式, 因而对此尚需继续深入探讨。

参考文献

- 车建美, 赖钟雄(2002). 植物微核技术的原理与应用. 福建农林大学学报(自然科学版), 31 (7): 73~75
郭文武(1998). 柑橘细胞融合及再生植株的遗传变异研究[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学
鞠文君, 尹力, 王端顺(1996). 细胞松弛素 B 促微丝解聚对 DNA 合成的作用. 生物化学杂志, 12 (3): 289~294

表 1 ‘国庆 1 号’和‘山金柑’微原生质体的分离效果比较

CB浓度/ μg·mL ⁻¹	原生质体产量/ 10 ⁶ 个·g ⁻¹ (FW)	微原生质体产量/10 ⁴ 个·g ⁻¹ (FW)	
		‘山金柑’	‘国庆 1 号’
0	20	界面不清晰	界面不清晰
50	15	3	2
100	8	3	2

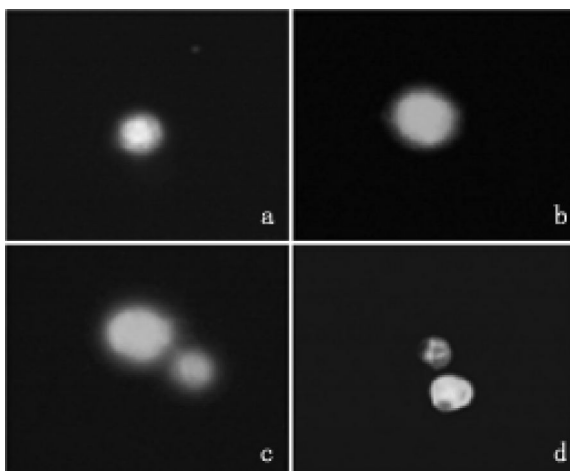


图 5 超速离心后得到的‘山金柑’微原生质体(×1 800)

a: 直径为 2.2 μm 的微原生质体; b: 直径为 3.5 μm 的微原生质体; c: 直径为 3.4 和 2.0 μm 的微原生质体; d: 直径为 1.8 和 2.2 μm 的微原生质体。

- 宋朝霞, 邢苗, 曾宪录 (2000). 细胞松弛素B对多头绒泡菌有丝分裂的影响. 遗传学报, 27 (1): 83~89
- 曾宪录, 焦明大, 王晓光, 郝水 (1997). 肌动蛋白是多头绒泡菌细胞核骨架和染色体骨架的组成成分. 植物学报, 39 (8): 691~696
- Bracha M, Sher N (1981). Fusion of enucleated protoplasts with nucleated miniprotoplasts in onion (*Allium cepa* L.). Plant Sci Lett, 95~101
- Emets AI, Blum Iab (2003). Microprotoplasts as an efficient technique for chromosome transfer between incompatible plant species. Tsitol Genet, 37 (2): 39~48
- Fu CH, Guo WW, Liu JH, Deng XX (2003). Regeneration of *Citrus sinensis* (+) *Clausena lansium* intergeneric triploid and tetraploid somatic hybrids and their identification by molecular markers. *In vitro* Cell Dev Biol Plant, 39 (3): 360~364
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Famelaer I, Cardi T, Verhoeven HA (1994). Cremart: a new chemical for efficient induction of micronuclei in cells and protoplasts for partial genome transfer. Plant Cell Rep, 13 (12): 687~691
- Saito H, Nakano M (2002a). Isolation and characterization of microprotoplasts from propyzamide-treated cell suspension cultures of *Hemerocallis hybrida*. Breed Sci, 52 (1): 51~56
- Saito H, Nakano M (2002b). Preparation of microprotoplasts for partial genome transfer via microprotoplast fusion in *Liliaceous* ornamental plants. Jpn Agricul Res Quarterly, 36 (3): 129~135
- Sonobe S (1990). Cytochalasin B enhances cytokinetic cleavage in miniprotoplasts isolated from cultured tobacco cells. Protoplasma, 155 (1~3): 239~242
- Verhoeven HA, Ramulu KS (1991). Isolation and characterization of microprotoplasts from APM-treated suspension cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. Theor Appl Genet, 82 (3): 346~352
- Watanbe M, Yamaguchi H (1988). The method for isolation of cytoplasts in several crop plants. Jpn J Breed, 38: 43~52
- Xu XY, Liu JH, Deng XX (2006). Isolation of cytoplasts from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplast-protoplast fusion. Plant Cell Rep, 25 (6): 533~539