

LpDH活性作为一种遗传标记在体细胞融合中的转移

李向辉, O. Schieder* 黄美娟, 李文彬

(中国科学院遗传研究所, 北京) (*西德马普植物育种研究所, 科隆)

用具有LpDH活性,但不能分化植株的烟草冠瘿瘤B6S3为亲本的原生质体,和与之有相反特点的正常烟草Xanthi品种叶肉原生质体间融合,由融合处理的原生质体形成了愈伤组织并再生了植株。对56株叶片的LpDH活性电泳分析表明,有75%植株含有不同程度的LpDH活性,即能合成章鱼碱。随植株发育成长,一些植株的LpDH活性有减弱或丢失现象。但叶片形态具有双亲部分特征,表明烟草冠瘿瘤的LpDH活性标记可通过原生质体融合转移到烟草Xanthi细胞中。

关键词: 原生质体融合, 烟草LpDH活性

冠瘿瘤是由根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的Ti质粒引起的一种植物肿瘤病^[1],由不同类型的Ti质粒引起的冠瘿瘤组织中分别含有相当数量的特异氨基酸衍生物,如章鱼碱(Octopine)、胭脂碱(Nopaline)及农杆菌碱(Agropine)等。已查明,它们是由定位于Ti质粒的T-区域上的基因编码的^[2]。但是只有在被它转化了的植物细胞中才能表达。因此,合成章鱼碱的LpDH及合成胭脂碱的NpDH酶也只在冠瘿瘤组织中产生^[2]。所以,这些酶活性的存在可以认为是根癌农杆菌Ti质粒的DNA片段存在于植物细胞的结果。也是研究遗传转化或细胞杂种的一个有用的遗传标记^[4,5]。

通常LpDH活性发生在用活菌感染植物产生的瘤组织中,是否可能在没有细菌的情况下转移这种遗传标记?本文报道利用冠瘿瘤细胞和正常烟草细胞原生质体间融合转移LpDH酶活性的实验结果。

材料和方法

(一) 材料

采用西德马普植物育种所提供的烟草冠瘿瘤B6S3细胞系,它是由根癌农杆菌B6S3菌株诱导白肋烟草产生的瘤组织。它含有合成章鱼碱的LpDH(Lysopine脱氢酶)活性,但是不能分化成植株。另一种材料是烟草Xanthi品种,它是正常植物,不含合成章鱼碱的LpDH酶,但是它的原生质体在培养中有分化植株的能力。前者是在实验室继代培养近8年的白色冠瘿瘤组织;后者是生长在温室条件下的绿色植株。

(二) 方法

1. 原生质体的分离:烟草冠瘿瘤B6S3继代培养的瘤组织在离析酶(Macerozyme R-10)和纤维素酶(Onozuka R-10)的混合酶液中分离原生质体^[4]。烟草Xanthi品种植株幼令展开的叶片在0.2%离析酶和1%纤维素酶及0.5M甘露醇的混合酶液中分离原生质体。

2. 融合:按1:1比例取两亲本等量原生质体悬浮液,密度为 1×10^8 /ml,混匀后,滴入培养皿中的盖玻片上,静置5 min后,加入两滴PEG融合液,它含有

本文于1984年9月29日收到,

0.075M PEG6000, 10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.7mM KH_2PO_4 及0.1M山梨醇。静置10-15min后, 再加入两滴高 Ca^{2+} 高pH液, 它含有0.2M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.05M NaOH及0.05M甘氨酸, pH为10.5。待10min后加入清洗液, 它含有0.55M甘露醇, 10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.7mM KH_2PO_4 , pH为5.7。此后每隔5min加一次清洗液, 共加4次, 5min后吸出加入的各种溶液, 再用 D_2a 培养基⁽⁶⁾洗一次, 之后加入一层 D_2a 培养基, 用Parafilm封口, 在人工培养箱中27°C, 1000—2000 Lux光照下培养。长成细胞团后转到 D_2b 固体培养基⁽⁶⁾上, 使之长大。分化培养是在 B_6 培养基⁽⁷⁾上进行的。同时设有双亲分别未融合处理的对照培养。

3. LpDH酶活性的电泳: 取茎中部叶片及亲本叶片或瘤组织(对照), 用微量电泳法测定LpDH酶活性。取2—5mg组织物加入等体积的Tris-HCl蔗糖混合缓冲液, 捣碎、离心之后, 取6—10 μl 上清

中染色20min, 取出吹干, 在336nm波长的紫外光下观察并照像。合成章鱼碱的LpDH酶的白色荧光点跟在精氨酸的荧光点之后。

4. 形态观察: 观察移栽在花盆中, 生长在温室条件下的再生植株及亲本烟草Xanthi植株的叶片及植株形态。

结果和讨论

由烟草冠瘿瘤B6S3组织分离出大量白色带有明显细胞核的原生质体(图1)。从烟草Xanthi品种叶肉细胞分离的原生质体含有密集的叶绿体。两者具有明显颜色和形态上的区别(图2)。

在四个独立的融合试验中进行融合频率观察。于融合处理8h后按上述原生质体的颜色、形态鉴别异源融合体(图3), 约占12%。由于融合处理后的原生质体容易附着在培养皿中的玻璃盖片上, 所以在 D_2a 培养基中培养7天后, 可见到由异源



图1 烟草冠瘿瘤B6S3的新鲜原生质体
Fig.1 Fresh protoplasts from tobacco tumor B6S3



图2 烟草Xanthi品种的叶内原生质体
Fig.2 Isolated protoplasts from mesophyll of Tobacco xanthi

液放入10 μl 酶反应液(它含有精氨酸, 丙酮酸钠和NADH, 在25°C下反应1h后, 取2 μl 点样在瓦特曼3号滤纸上, 在由甲酸和乙酸和水组成的电泳液中电泳, 约1—1.5h后取出吹干, 在非醌和酒精的染色液

融合体中再生细胞的分裂。两周后可形成有几十个细胞的细胞团(图4)。融合后第四周将细胞团转到 D_2b 培养基上, 逐渐发育成小愈伤组织。其中约有500多块愈伤组织逐渐转为绿色, 约60块愈伤组织保

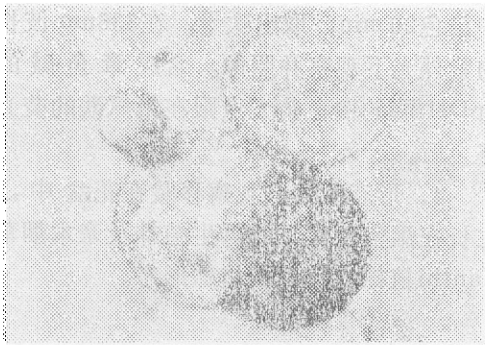


图 3 异源融合体

Fig. 3 Heterofusion body between Tobacco tumor B6S3 and Tobacco xanthi
黑色部分为Xanthi, 白色部分为B6S3;

持原来的白色。把两者分别转移到 B₅ 培养基上, 一个月后, 由绿色愈伤组织中再生出约135株有绿色叶片的芽 (图 5)。然而白色愈伤组织和对照烟草冠 瘿瘤 B6S3 组织没有出现分化。绿色芽转在 不含生长激素的Nagata与Takebe 培养基^[8]上, 生长迅速, 一些芽下部分化出小根, 或在茎基部发育出不定根, 有些芽茎则不易生根。转移到花盆土壤中发育成完整植株。

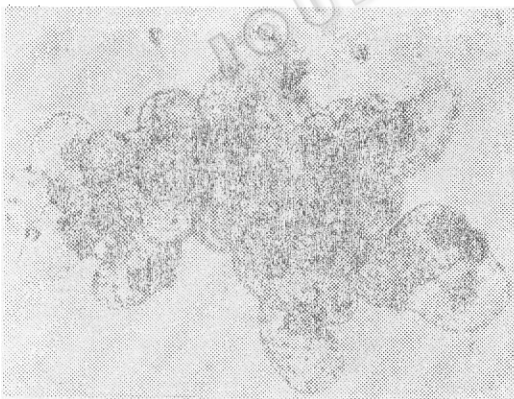


图 4 原生质体融合后再生的细胞团

Fig. 4 Regenerated cell cluster after fusion of protoplasts

由有不定根或有卷曲叶片的再生植株上取叶片, 它的提取液, 在精氨酸、丙酮酸钠和NADH液中反应后、电泳、染色后在紫外光下观察, 融合后再生的56个植株中

有42株, 占总测定植株数75%的植株叶片含有荧光白点(图6), 表明具有 Lysopine

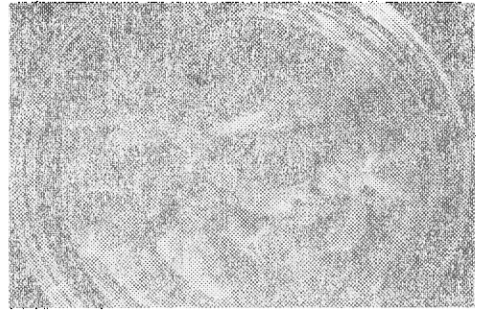


图 5 融合后由细胞团再生的小植株

Fig. 5 Regenerated plants from calli after fusion

脱氢酶活性, 有形成章鱼碱的能力。随着植株生长发育重复取样 2—7 次(每次间隔约有一周)进行电泳分析, 这种LpDH活性有不断减弱或丢失趋势。但在后来测定的22株中有13株仍含有不同程度的LpDH活性(表1)这反应了LpDH活性的不稳定现象。然而个别植株, 如1-25-1a, 3-2-15, 3-2-18, 3-2-17, 18等株在多次重复测定LpDH活性电泳中都表现稳定。这种现象在用活菌诱发双子叶植物产生的冠瘿瘤组织中也出现丢失现象。特别是在畸胎瘤(Teratoma)中常常在长到成熟状态时就测不出明显的LpDH反应。但是在8年继代培养的未分化的烟草瘤组织B6S3中却仍然保持LpDH活性反应, 说明在分化过程中, 或有性繁殖的减数分裂过程中常易丢失这种能力^[4,10]。对这种不同植株的LpDH活性强弱不等, 逐渐减弱及丢失现象的可能解释, 在很大程度上和编码LpDH酶的基因拷贝数量多少或丧失表达能力有关。另一种可能性是这个基因所插入的受体细胞染色体的稳定性不同造成的。

形态学观察表明, 一些含有LpDH酶活性的植株为近似烟草 Xanthi 品种的叶形。有绿色中肋, 狭长叶, 叶柄短而且带

有叶耳。说明烟草瘤B6S3细胞中为 LpDH 编码的 T-DNA 片段通过融合过程转移到烟草 Xanthi 品种的细胞中, 而且能随细胞的增殖而复制、表达。也说明这种再生植株具有杂种性质。另一些含有 LpDH 酶活性的植株具有双亲中间型的叶片, 如叶片

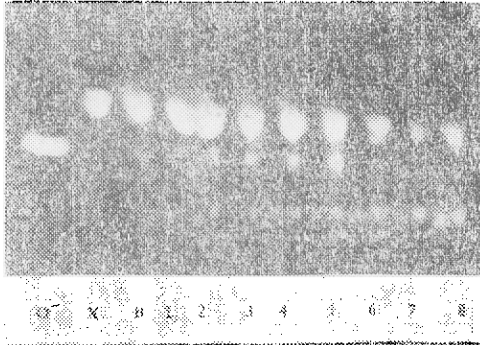


图 6 再生植株叶片及亲本的 LpDH 电泳图谱
 Fig. 6 Pattern of LpDH electrophoresis of regenerated plants and parents
 O: 章鱼碱 Octopine
 A: 精氨酸 Arginine
 B: 烟草冠瘿瘤 B6S3 Tobacco tumor B6S3
 X: 烟草 Xanthi Tobacco xanthi
 1-8: 融合后再生植株 Regenerated Plants after fusion

宽卵形, 带有长的叶柄(白肋烟草的性状) 没有叶耳, 但有绿色的中肋 (Xanthi 烟草性状) (图 7), 为杂种类型。但是, 它结籽很少, 它们的后代有待研究。

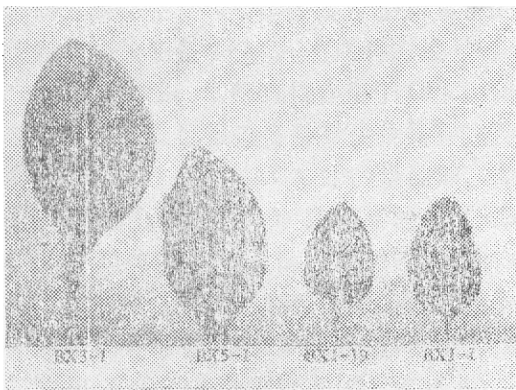


图 7 融合杂种植株叶形差异
 Fig 7 Defferent shapes of leaves from hybrid plants

表 1. 融合再生植株的 LpDH 活性
 Table 1. Activity of LpDH of regenerated hybrid plants

植株号 No. of plants	LpDH 酶活性 (重复项序) Actiy of lysopine Dehydrogenase							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1-25-1a	+++	+++						
1-0-a	+	+	++	++	+			
1-0-b	+	+	+	++	+			
1-0-c	+	+	++	++	+			
4-1	++	++	+					
3-2-3	+	+	++	+				
3-2-15	+	+	+	-	+	+	++	
3-2-17	+	+	++	++	++	++	++	++
3-2-11	++		+	+	+			
3-2-18	+++	++	++	++	++	++		
18	+++	++	++	++	+++			
2-3	++	++	++	++				
2-2-3	++	+	++	+	+	++	+	
4-8-0a	-	-	-					
4-8-0b	-	-	-					
4-8-0c	-	-	-					
4-5-0a	-	-	-					
4-5-0c	-	-	-					
4-6-0a	-	-	-					
4-7-0a	-	-	-					
1-4	-	-	-					
1-1	-	-	-					

参 考 文 献

[1] Van Iacebeke, et al.: *Nature* (London), 252:169-170, 1974.
 [2] Genetello, C. et al.: *Nature* (London), 265:561-563, 1977.
 [3] Schell, J. and Van Montagu, M.: in *Genetic Enteraction and Gene Transfer*, Brookhaven Symposia in Biology, 29:36-49, 1977
 [4] 李向辉等: *中国科学, B辑*, 3:223-230, 1982.
 [5] Davey, M. R., and E. C. Cocking: *Plant Science Letters*, 18:307-313, 1980.
 [6] Li Xianghui (李向辉), *Theor. Appl. Genetics*, 60:345-347, 1981.
 [7] Grambow, H. J. et al.: *Planta*, 103: 348-355, 1972.
 [8] Otten, L. A., and R. A. Schilperoort: *Biochem. Biophys. Acta*, 572:497-500, 1978.
 [9] Nagata, T. and I. Takebe: *Planta*, 92:301-305, 1970.
 [10] Yang, F. M., et al.: *Mol. Gen. Gent.*, 177: 704-714, 1980.

THE TRANSFER OF LpDH ACTIVITY AS MARKER IN SOMATIC HYBRID PLANT BETWEEN TOBACCO TUMOUR B6S3 AND NORMAL TOBACCO XANTHI

Li Xianghui Schieder, O.* Huang Meijuan Li Wenbin

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing*)
(*Max-Planck-Institute für Züchtungsforhung Köln, F.R.G.*)

The protoplasts from tobacco tumor B6S3 containing activity of LpDH but no regeneration have been fused with mesophyll protoplasts from normal *Tobacco xanthi* with traits contrary to the tobacco tumor. The regenerated calli from fused protoplasts have regenerated into whole plants. The results of electrophoresis for LpDH activity assayed from 65 plants suggested that 76% of the plants contained octopine spot with different degree. In some plants,

the LpDH activity is reduced or totally lost during the course of development. Morphology of leave has partial traits from both parents, suggesting that the genetic marker-LpDH activity of the tobacco tumor was possibly transferred into normal cell of *Tobacco xanthi* and formed somatic hybrid.

Key words

Fusion of protoplast; Tobacco; LpDH activity