

小麦与新麦草及高冰草属间不对称体细胞杂交的植株再生*

夏光敏 王 槐 陈惠民

(山东大学生物系, 济南 250100)

关键词 小麦 新麦草 高冰草 不对称体细胞杂种植株 紫外线

在植物体细胞杂交研究中, 供体-受体不对称融合方法近年来倍受重视. 人们常用 X-或 γ -射线辐射一方亲本作融合供体, 以获得胞质杂种或不对称核杂种. 但至今紫外线在不对称融合中的应用还未见报道. 禾谷类的体细胞杂交, 在水稻上已有较大进展, 但在小麦进展缓慢, 仅有小麦与多年生黑麦草^[1]及小麦与裸燕麦^[2]的原生质体融合获杂种愈伤组织的报道: 近年来, 我们曾以小麦与⁶⁰Co- γ 射线处理的簇毛进行体细胞杂交, 首次获得小麦不对称体细胞杂种植株^[3]. 现在我们报道小麦与紫外线照射的新麦草 (*Psathyrostachys juncea* (Fisch) Nevski $2n = 14$) 和高冰草 (*Agropyron elongatum* (Host) Nevski $2n = 70$) 的属间体细胞杂交也获得成功.

新麦草属野麦亚族, 新麦草属, 具有耐干旱、耐盐碱的特性; 高冰草属小麦亚族, 冰草属, 抗旱、抗寒, 抗小麦多种病害, 是小麦育种的重要野生资源. 本实验用紫外线照射新麦草和高冰草原生质体作为供体; 以普通小麦济南 177 原生质体为受体, 用 PEG 法诱导融合获不对称核杂种植株; 并再次观察到小麦属间体细胞杂交中植株再生能力互补的现象^[3,4]. 我们希望此报道能有利于小麦体细胞杂交工作的进一步开展.

1 材料与方法

用来源于小麦济南 177 幼胚的愈伤组织建立悬浮细胞系^[5], 此悬浮系继代两年以上已丧失再生完整植株的能力, 分离其原生质体^[5]作为融合受体.

融合供体为来源于新麦草(种子由中国农业科学院作物研究所资源室提供)和高冰草(种子由山东省农业科学院提供)悬浮细胞系(由继代两年的愈伤组织建立)的原生质体. 新麦草及高冰草的愈伤组织诱导、悬浮系建立及原生质体分离等同小麦^[5]. 分离的原生质体经纯化后以 1×10^6 /mL 悬浮于冲洗液(0.6 mol/L 甘露醇 + 5 mmol/L CaCl_2)中, 每个 3.5 cm 培养皿中放入约 1 mL 悬浮液, 在皿底成一薄层, 用强度为 $380 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线分别照射 30 s、1 min、3 min 及 5 min 后备用.

将供体和受体以 1×10^6 mL 密度按 1:2 的体积比混合均匀, 用 PEG 法(同文献[3])诱导

1995-08-08 收稿, 1996-02-28 收修改稿

* 国家自然科学基金及山东省科委基金资助项目

融合. 融合各组合见表 1, 并设各组合的相应对照. 融合物与对照皆用 P_5 培养基^[5]浅层培养.

表 1 不同组合融合产物的生长和分化^{a)}

融 合 组 合	融合产物移出培养皿前 的生长情况	GE 及 Ca 的分化	分化频率
I T(+)P(UV, 1 min)	生长迅速的 GE 及 Ca	完整植株	7/18
II T(+)P(UV, 3 min)	生长慢的 Ca	—	0
III T(+)P(UV, 5 min)	生长慢的 Ca	—	0
IV T(+)A(UV, 30 s)	生长迅速的 GE 及 Ca	完整植株	6/14
V T(+)A(UV, 1 min)	生长迅速的 GE 及 Ca	小植株未生长	1/9
VI T(+)A(UV, 3 min)	生长缓慢的 Ca	—	0
VII T(+)A(UV, 5 min)	生长缓慢的 Ca	—	0

a) T 为小麦, P 为新麦草, A 为高冰草, GE 为球形胚, Ca 为愈伤组织, — 为未分化, 分化频率为再生植株的愈伤组织数/用于再生的 GE 及 Ca 数

当融合处理及对照培养物再生的小愈伤组织长到 1~1.5 mm 大小时转至含 2, 4-D 0.5 mg/L + ZT 0.5 mg/L 的 MB 培养基^[5]上增殖, 20~30 d 后再转至 IAA 0.5 mg/L + ZT 0.5 mg/L 的 MB 培养基上分化. 再生植株长至 5 cm 左右时移栽至土中.

对再生植株作根尖染色体计数和叶片同工酶分析, 染色体制片按文献[6], 同工酶分析按文献[7].

2 实验结果及讨论

1. 在不同组合中融合开始时可见到原生质体的聚合体, 随后成为融合体. 在小麦(+)高冰草的各种组合中异源二聚体(图 1(a))及异源融合体(图 1(b))较易被识别, 因为融合双方原生质体差别明显. 融合培养物在培养 4d 左右出现一次分裂, 15~20 d 形成肉眼可见的小愈伤组织, 其中一部分生长明显较对照快. 第 30~60 d 中, 分批挑取直径 1~1.5 mm 的小愈伤组织进行增殖和分化. 只有小麦(+)新麦草(UV 照射 1 min)和小麦(+)高冰草(UV 照射 30 s)培养皿中部分生长快的再生愈伤组织分化出完整植株(见表 1), 其余的未获得再生植株. 相应对照均不能再生植株.

对不同克隆的部分再生植株作形态、染色体和同工酶分析. 在植株外形上, 小麦(+)新麦草幼苗不均一, 少数介于双亲之间(图 1(c)); 多数偏向小麦, 小麦(+)高冰草植株偏向小麦(图 1(d)). 植株根尖染色体数目小麦(+)新麦草植株为 40~44, 含断片(图 1(e)); 小麦(+)高冰草植株为 40~46, 亦含有断片(图 1(f)). 小麦原生质体再生愈伤组织染色体数目 90% 以上在 31~38 条之间. 酯酶和过氧化物同工酶分析表明: 融合再生植株均含有双亲谱带, 有的有新带(图 1(g), 图 1(h)). 以上结果证明我们获得了小麦(+)新麦草和小麦(+)高冰草的不对称杂种植株.

从融合组合 I(T+)P, UV1') 获 7 株杂种植株, 移至土中成活了 3 株, 有两株抽穗但未能结实. 由融合组合 IV(T+)W, UV30") 具再生能力的 6 个克隆中再生了 29 株杂种植株, 移栽至土中成活 5 株, 其中 4 株抽穗未结种子. 以上杂种幼穗的外型均像小麦, 在这些穗子的部分

花中具有外形正常的一个雌蕊(具有 3 个羽毛状柱头)和 3 个雄蕊(图 1(i)). 其不育性是由于遗传上的障碍还是生长条件的不宜或其它原因有待继续研究.

2. 我们首次用紫外线处理供体获得高度不对称杂种植株. 此种处理有操作安全、设备简单、价格低廉等优点, 在一般实验室即可进行. 与我们用 ^{60}Co - γ 射线照射供体的不对称融合比

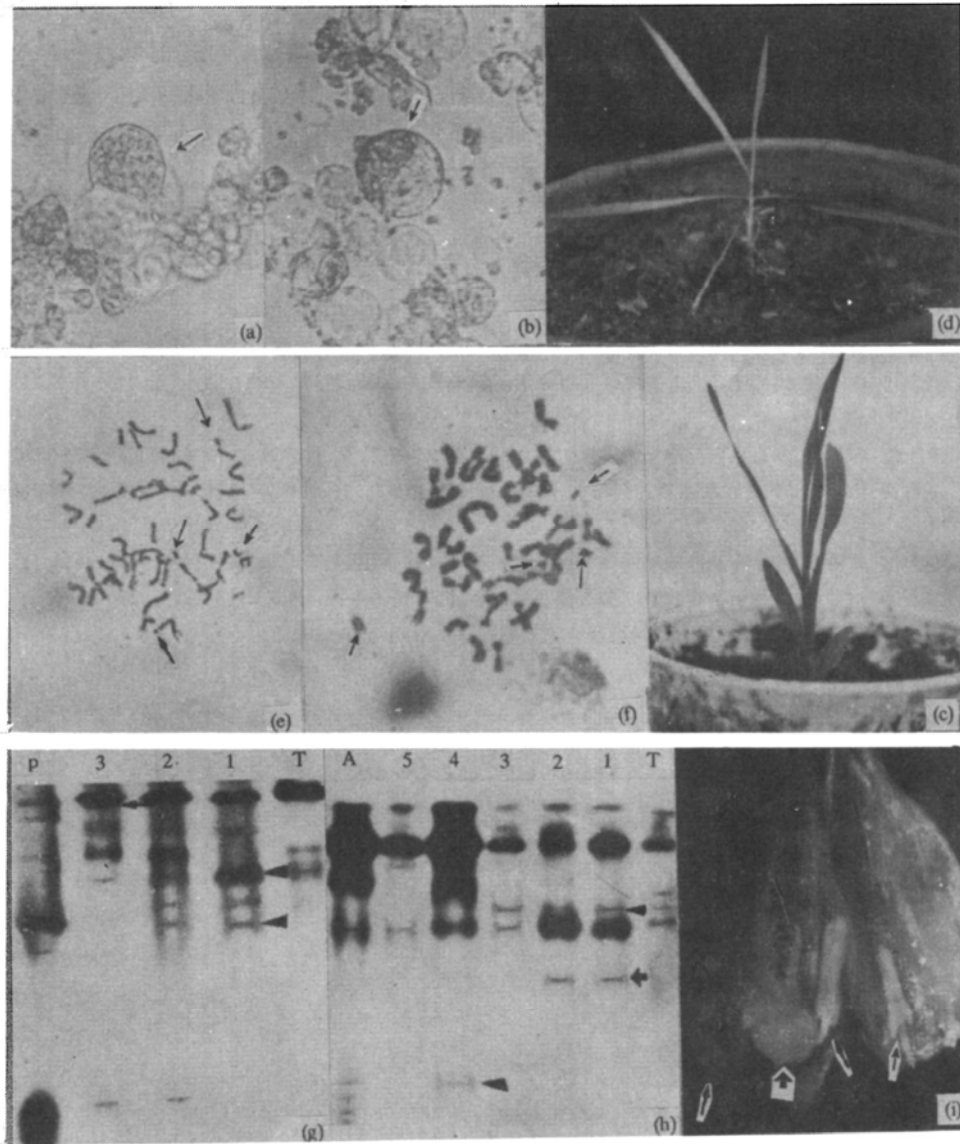


图 1 小麦与新麦草及高冰草属间不对称体细胞杂交的植株再生

(a)小麦与高冰草原生质体经融合处理形成的异源二聚体, $\uparrow$:高冰草原生质体, $\times 360$; (b)小麦(+)高冰草原生质体异源融合体 $\uparrow$, $\times 360$; (c)小麦(+)新麦草融合再生植株, $\times 0.63$; (d)小麦(+)高冰草融合再生植株, $\times 0.63$; (e)小麦(+)新麦草杂种 3 号植株根尖染色体, $\uparrow$:断片, $\times 200$; (f)小麦(+)高冰草杂种 2 号克隆植株根尖染色体, $\uparrow$:断片, $\times 180$; (g)小麦(T), 新麦草(P)及杂种 1~3 号植株过氧化物酶同工酶谱, $\blacktriangle$:特异带, $\uparrow$:新带, $\times 0.63$; (h)小麦(T), 高冰草(A)及杂种 1~5 号克隆再生植株过氧化物酶同工酶谱, $\blacktriangle$:特异带, $\uparrow$:新带, $\times 0.63$;

(i)小麦(+)新麦草杂种植株的一朵花, $\uparrow$:具有 3 个柱头的雌蕊, $\blacktriangle$:花药, $\times 18$

较,它不仅也能引起供体染色体的断裂及数目削减,而且削减程度更高,故它有可能成为植物不对称体细胞杂交中更方便、更有效的辐射来源。

3. 小麦属间体细胞杂交中一个有意义的现象是丧失分化能力的双亲由于体细胞杂交可恢复再生植株能力。这一现象我们已作报道^[3,4],本实验也再次见到。这种在融合中出现的再生能力互补的效应,使它自身就具有对杂种筛选的作用,故对小麦原生质体的失活处理就不再是必需的,并且也不必一定要保持小麦培养体系的再生植株能力,而这正是目前限制小麦体细胞杂交进展的主要因素,因而它极大地便利于小麦属间体细胞杂交,正如在上述几个实验中所见到的那样。但是还有许多有关问题,例如影响此效应的因素,包括小麦或禾草基因型、小麦原生质体再生能力丧失的程序等均需作进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈文品,吴琴生,刘大均.通过电融合普通小麦与多年生黑麦草体细胞杂交形成愈伤组织.植物学报,1992,34:284~290
- 2 刘 宝,刘大均.通过“供体-受体”原生质体融合将裸燕麦部分核基因组转移给普通小麦.实验生物学报,1995,28(1):95~101
- 3 周爱芬,夏光敏,陈惠民.普通小麦与簇毛麦的不对称体细胞杂交再生植株.科学通报,1995,40(6):575~576
- 4 夏光敏,陈惠民,王 槐.小麦与高冰草的体细胞杂交及植株再生能力的互补恢复.山东大学学报,1995,30(3):325~330
- 5 夏光敏,李忠谊,周爱芬等.小麦悬浮细胞系的结构与原生质体植株再生.生物工程学报,1995,11(1):63~66
- 6 陈瑞阳,宋文琴,刘秀兰.一种制备植物有丝分裂染色体的新方法.植物学报,1979,21(3):297~298
- 7 胡能书,万国贤.同工酶技术及应用.长沙:湖南科学技术出版社,1985.96~104