

普通烟草与黄花烟草原生质体融合产生的种间杂种植株

王培田 陈家玉 赵世民 徐金相

(中国科学院遗传研究所)

引言

Carlson 等 (1972)^[1] 首先报道了粉蓝烟草 (*Nicotiana glauca*) 与朗氏烟草 (*N. longsdorffii*) 通过原生质体融合产生的种间杂种植株。长尾 (1978)^[2] 报道了普通烟草 (*N. tabacum*) 与黄花烟草 (*N. rustica*) 的体细胞杂种。

在中国, 已有一些作者成功地获得了烟草的原生质体植株和矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 原生质体植株^[3-5]。本文是我国获得体细胞杂种植株的首次报道。

材料和方法

1. 材料 普通烟草品种 (*Nicotiana tabacum* var. *Copus yeusuheku* No. 4) 与黄花烟草品种黄花 (*N. rustica* var. *Yellow Flower*) 的种子都是山东烟草研究所提供的。CY₄ 的植株高, 花色深红, 花冠大, 花筒长, 叶片长卵圆形, 无叶柄 (图 1)。黄花烟的植株矮, 花黄绿色, 花冠小, 花筒短, 叶片卵圆形, 有叶柄 (图 2), 它们之间很难杂交。



图1 普通烟草



图2 黄花烟草

本文 1980 年 8 月 30 日收到。

2. 原生质体分离 播种三个月后,取 CY₄ 和黄花烟已伸展的叶片用清水洗涤后,放在 70% 乙醇内几秒钟,再用无菌水洗后,放入 3% 次氯酸钠溶液中灭菌 15 分钟,再用无菌水洗涤三次,撕去叶片的下表皮,将裸露的部分放入 1% 纤维素酶(上海东风试剂厂, No. 79-291), 0.3% 葡聚糖硫酸钾和 0.55M 甘露醇溶液中。在 26℃ 恒温箱中保温三小时后,用 400 目不锈钢网过滤除去残渣,低速离心收集原生质体。用溶液一(0.55M 甘露醇和 0.3% 葡聚糖硫酸钾溶液)洗涤二次,除去纤维素酶,将原生质体悬浮在溶液一中。

3. 原生质体融合 在高国楠(1974)^[6]方法的基础上稍加修改。我们不是用悬滴培养法而是用培养皿沉降法。将两种原生质体的悬浮液密度分别调整为 10⁶/毫升,各取 1 毫升放进直径 6 厘米的培养皿中,充分混合后,用注射器一滴一滴缓缓加入 0.33M 的聚乙二醇(MW 1540) 3 毫升,在 26℃ 左右静置半小时后,慢慢加入 3 毫升溶液二(3.5mM 氯化钙, 0.7mM 磷酸二氢钾, 0.55M 甘露醇, pH5.8)五分钟后,用管口很细的滴管($\phi = 0.5\text{mm}$)轻轻地吸去上清液,再用溶液二洗二次,用稍加修改的 NT (Nagata and Tabake, 1971) 培养基(氯化钙 440mM/升,硫酸镁 370mM/升)洗涤一次,然后加入上述培养基培养(图 3)。

全部操作过程在无菌条件下进行。

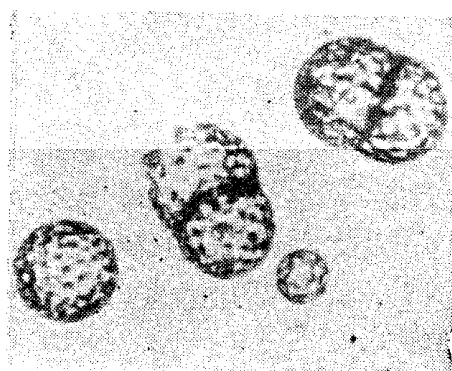


图 3 原生质体及其融合

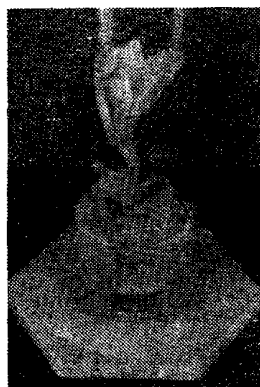


图 4 体细胞杂种植株幼苗

结 果 和 讨 论

由于我们改进了原生质体融合方法,把原生质体的悬浮密度从 10⁴/毫升提高到 10⁶/毫升,用培养皿沉降法代替悬滴法和离心收集法,减少了原生质体的破裂率,提高了成活率及融合率,大约两个月后,得到了六百多个愈伤组织,但其后的幼苗分化比较困难,做了各种处理,但分化的时间仍拖得较长,幼苗畸形较多。其后转移到生根培养基中诱导生根,得到二百余株幼苗(图 4),定植成活了 45 株。到 1980 年 8 月 20 日,已有 44 株开花,它们有三种类型(表 1)。

表 1

叶 型	CY ₄ 型			中 间 型	
花 色	深 色	粉 色	未 开 花	淡 紫	未 开 花
株 数	21	4	1	19	0

其中 21 株和 CY₄ 一样,植株高,花深红色,花冠大,花筒长,叶长卵圆形而无叶柄,有叶托。我们认为都是从 CY₄ 的原生质体长成的植株。19 株表现两个亲本的中间型性状,植株高,花淡紫色,花冠大,花筒中等长,叶片卵圆形而无柄,它们是 CY₄ 的原生质体与黄花烟的原生质体

的体细胞杂种(图5、6、7)。细胞学观察(图8)和过氧化物酶的同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱也显示他们兼有两个亲本的特征(图9)。另外4株来自同一愈伤组织,其花呈粉红色,而其余性状则与CY₄相同,我们推测他们或者是两种原生质体的局部融合的体细胞杂种或者是CY₄的单基因突变体。

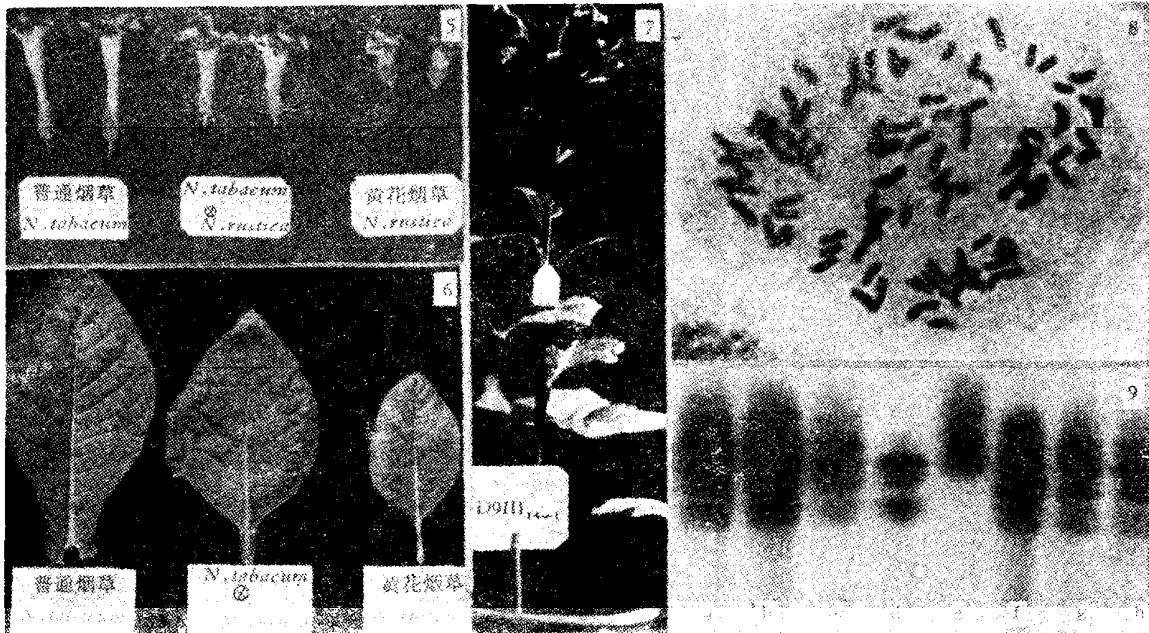


图5 体细胞杂种与其融合亲本花型

图6 体细胞杂种植株与其融合亲本叶型

图7 体细胞杂种植株

图8 体细胞杂种根尖细胞染色体

图9 普通烟草、黄花烟草与其体细胞杂种植株的过氧化物酶同工酶凝胶电泳图谱

d 为普通烟草的过氧化物酶同工酶图谱; e 为黄花烟草的过氧化物酶同工酶图谱; a、b、c、f、g、h 为体细胞杂种植株过氧化物酶同工酶图谱

没有出现像黄花烟草那样的植株,可能是我们所用稍加修改的 NT 培养基不适于黄花烟草的原生质体生长。

尚未开花的1株,从茎叶形态看来,像CY₄那样有长卵形的无柄而有叶托的叶子。简而言之,共有19或23株体细胞杂种。

我们的工作和前人的工作都说明,通过原生质体融合能够获得人工杂交很难成功的种间杂种。

细胞学观察及其它一些性状的比较研究工作正在进行中。

致谢:这项工作得到了我所303组和王联清同志的帮助,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Carlson, P. S. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69** (1972), 2292—2294.
- [2] 长尾照义,日本作物学会纪事, **47** (1978), 491—498.
- [3] 上海植物生理研究所细胞生理组,遗传学报, **4**(1977), 233—241.
- [4] 李文彬、孙勇如、李向辉,遗传学报, **5**(1978), 57—60.
- [5] 孙勇如、李文彬、李向辉,遗传学报, **6**(1979), 427—433.
- [6] Kao, K. N. et al., *Planta*, **120** (1974), 225—227.