中国科学(C 辑)
第26卷 第1期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1996年2月

普通小麦与簇毛麦不对称体细胞杂交的研究*

周爱芬** 夏光敏*** 陈惠民
(山东大学生物系,济南 250100)

摘要 以不同浓度(0 ~ 2.5 mmol/L)碘乙酰胺(IOA)处理的小麦(*Triticum aestivum* L.)原生质体为受体,以经6 krad(130 rad/min) ^{60}Co-γ 射线处理的继代后4~5 d期簇毛麦(*Haynaldia villosa*)愈伤组织原生质体为供体,使用PEG法诱导细胞融合. 融合细胞经培养形成细胞团、愈伤组织或植株. 通过形态学比较、染色体检查及同工酶分析,确认了得到的愈伤组织和再生植株为体细胞杂种.

关键词 小麦 簇毛麦 不对称融合 再生杂种植株

1972年美国Carlson将两种不同的烟草原生质体融合首先得到了体细胞杂种. 近年来,不对称融合方法的确立,即通过射线或其它化学因素的处理,使亲本供体一方仅以胞质基因或部分核基因转移到受体一方,从而直接获得胞质杂种或不对称核杂种,为在远缘不亲和的种间或属间的体细胞杂交创造了有利的条件,增加了获得可育再生植株的可能性[1].

小麦(*Triticum aestivum* L.)是重要粮食作物,但至今尚未见到融合再生植株的报道. 其原因一方面在于小麦原生质体再生植株困难,另一方面可能和融合时双亲原生质体的内外因素及处理条件有关. 本研究用不同浓度IOA处理后的小麦原生质体(受体)与 γ- 射线辐照后的簇毛麦愈伤组织原生质体(供体)进行了不对称融合. 通过事先调查不同剂量 γ- 射线对簇毛麦细胞分裂及染色体变异的影响,选择了适宜的辐照时期及剂量,结果获得了小麦与簇毛麦的属间体细胞杂种植株,并发现融合促使再生能力的提高.

簇毛麦属于小麦亚族簇毛麦属,具有小麦缺乏的高抗病性、高蛋白含量和高分蘖能力等优点. 由于普通小麦与簇毛麦的属间有性杂交十分困难[2,3],我们希望本工作对不对称体细胞杂交所涉及的基础理论研究及小麦的远缘杂交育种实践有所裨益.

1 材料与方法

1.1 小麦原生质体的来源

小麦品种为济南177,原生质体来自悬浮细胞. 悬浮细胞的培养及原生质体的制备方法见文献[4].

1995-07-05收稿
* 山东省"八五"重点攻关项目
** 现在地址:中国人民解放军济南医学高等专科学校生化教研室. 济南 250100
*** 联系人

1.2 小麦原生质体的失活处理

将IOA按不同比例加入用洗液(0.6 mol/L 甘露醇+5 mmol/L)洗过1次的原生质体悬液中(用洗液悬浮),IOA最终浓度分别为2.5, 1.5, 1.0 mmol/L, 室温(23～25℃)处理15 min(包括离心5 min). 处理后的原生质体用洗液洗3次后备用.

1.3 簇毛麦愈伤组织的建立

簇毛麦愈伤组织是从1992年接种的幼胚诱导产生的. 诱导方法和培养基同小麦[4]. 经过1年的继代和筛选,形成了生长较快的愈伤组织用与小麦相同的酶液分离原生质体.

1.4 簇毛麦愈伤组织在游离原生质体前的处理

经预试,取继代后4～5 d的愈伤组织进行^{60}Co-γ射线辐照,剂量为6 krad, 剂量率130 rad/min. 取辐照当天及辐照后1～3 d的愈伤组织切碎,于25℃下酶解4～5 h, 原生质体用洗液洗1次后备用.

1.5 小麦与簇毛麦原生质体的融合与培养

细胞融合按文献[5]的程序(稍加修改,PEG分子量为6 000)进行. 共设计了4种组合的融合. A: 未经IOA处理的小麦原生质体⊕经辐照处理的簇毛麦愈伤组织原生质体; B: 2.5 mmol/L IOA处理的小麦原生质体⊕经辐照处理的簇毛麦愈伤组织原生质体; C: 1.5mmol/L IOA处理的小麦原生质体⊕经辐照处理的簇毛麦愈伤组织原生质体; D: 1.0 mmol/L IOA处理的小麦原生质体⊕经辐照处理的簇毛麦愈伤组织原生质体. 每个组合分别培养双亲原生质体及混合的双亲原生质体作为对照. 培养方法及培养基同小麦[1].

将对照以及融合后再生的愈伤组织转至含1 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L玉米素的MB[1]固体培养基上增殖,并在含0.5 mg/L IAA和0.5 mg/L玉米素的培养基上分化. 待小苗长至2～3 cm高时,转至壮苗培养基上(含多效唑1～3 mg/L及不同浓度的NAA或NAA+IBA). 每日光照12 h以上,光强约2 000 lx, 温度4～12℃,3～4个月后移栽至温室土中.

1.6 杂种愈伤组织及植株的鉴定

(1)染色体检查: 愈伤组织用去壁低渗火焰干燥法[6]制片; 植株取根尖或幼叶基部用涂片法[6]制片. (2)同工酶分析: 取愈伤组织或植株叶片蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳. 样品的提取及凝胶染色参见文献[7]. 愈伤组织鉴定酯酶同工酶; 植株鉴定酯酶和淀粉同工酶.

2 实验结果

2.1 碘乙酰胺(IOA)对小麦原生质体活性的影响

1.0 mmol/L IOA处理15 min不能使小麦原生质体完全失活. 处理后第9天观察时发现少量4细胞的小细胞团生成,但小细胞团没有继续发育下去. 1.5 mmol/L IOA处理可使原生质体失活. 部分原生质体稍有膨大,未见分裂. 2.5 mmol/L IOA处理后2～3 d之内小麦原生质体完全失活,原生质体颜色变暗,呈无活性状. 对照组的小麦原生质体在培养后第2 d便开始变形,第3～4天出现第1次分裂,培养半个月即可形成直径1 mm左右的小愈伤组织和类似胚的结构.

2.2 ^{60}Co-γ射线对簇毛麦愈伤组织细胞的影响及辐照条件的选择

取继代后2,4,5,7和10 d的愈伤组织进行^{60}Co-γ射线辐照,剂量分别为1,2,3,5,6,7,10和30 krad, 剂量率为130 rad/min. 由于染色体片段出现的频率直接关系到与受体染色体重组的

1) 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,1996(待发表)

机会，我们着重调查了辐照后染色体的片段化率(染色体发生断裂的分裂细胞数占总的分裂细胞数的百分数)．结果表明，6 krad 辐照继代后 4～5 d 的愈伤组织可得到较高的染色体变异率(染色体发生变异的分裂细胞数占总的分裂细胞数的百分数)和染色体片段化率(分别为 97.7% 和 89.9%)，同时细胞仍有较高的分裂能力．因此，该辐射条件被定为最适辐射条件．

2.3　融合最佳时期的选择

用以上辐射条件辐照簇毛麦的愈伤组织后游离其原生质体进行融合．随着辐照后时间的延长，原生质体不仅产率下降，同时机械强度降低，在融合操作中大量破碎．实验结果表明，在辐照的当天到辐照后 2 d 之内进行融合可得到较多的再生愈伤组织．同时由于该时期在辐照后簇毛麦细胞分裂的高峰期(在上述最适辐照条件下簇毛麦细胞的分裂高峰期为辐照后第 3 天)之前，选定此时期进行融合还有益于增加异源核融合的频率．

2.4　小麦与簇毛麦原生质体的融合和培养

新游离出的小麦原生质体胞质内含物丰富，体积较大；簇毛麦原生质体体积较小．经 PEG 处理并培养 1 d 后，可观察到胞间界限消失了的融合体．在实验设计的几个融合组合中，融合细胞的生长发育状况明显不同．融合组合 A 培养后再生的细胞团生长较快，部分融合细胞的生长速度比对照的小麦原生质体或双亲混合培养的原生质体还要快．培养 1 个月后，即可观察到致密的愈伤组织．将最先形成的 1.5～2 mm 大小的愈伤组织分别转到增殖培养基上后，甚多愈伤组织上有紫红色的色素出现．愈伤组织表型多为中间型，少数类似于簇毛麦愈伤组织或小麦原生质体再生的愈伤组织．将增殖后的愈伤组织转至分化培养基上，1 个月后，16 个细胞系中有 9 个细胞系再生出植株(图 1)．其中仅 4 号细胞系就分化出 70 多株健壮的苗，部分已移栽成活．

融合组合 B 培养后第 6 天才见到 1 次分裂，且频率很低．分裂后形成的细胞团颜色较深，没有继续分裂下去的迹象，最终未能形成肉眼可见的愈伤组织．

融合组合 C 的再生细胞团可持续分裂．培养 40 d 后形成了直径约 1 mm 的小愈伤组织．其中大部分呈紫红色．转至固体培养基上增殖时，生长速度缓慢，半年多来只获得了 3 个可增殖的细胞系，但在分化培养基上未能分化出苗．

融合组合 D 培养 40 d 后，有直径 2 mm 的愈伤组织形成，并已增殖获得 5 个细胞系．将这些细胞系转至分化培养基上后，有 1 个细胞系分化出苗，但植株很弱．

作为对照，未经 IOA 处理的小麦原生质体培养 3～4 d 后即出现 1 次分裂，15 d 时便有大量的细胞团和小愈伤组织形成．但经增殖并转至分化培养基上后，有的只能分化出绿点或不足 0.5 cm 的小叶，有的只生根，未能长成植株．

簇毛麦原生质体在本实验条件下不能分裂．新诱导出的簇毛麦愈伤组织在组培过程中分化能力迅速下降．继代 1 年后用作体细胞杂交材料时其分化频率仅在 10% 左右．在本实验中，当融合细胞形成愈伤组织并分化植株时，簇毛麦的愈伤组织已不能分化．

未经融合处理的双亲原生质体机械混合后进行培养能形成大量的愈伤组织．其外观基本类似于作为对照培养的未经 IOA 处理的小麦愈伤组织，但未能分化出植株．

2.5　杂种愈伤组织的鉴定

参见表 1．

2.5.1　形态比较　通过对增殖后的亲本愈伤组织及融合后再生的早期愈伤组织进行形态学观察，发现融合产物多数为介于两亲本间的中间型(M)．M 型愈伤组织颜色淡黄或紫红，

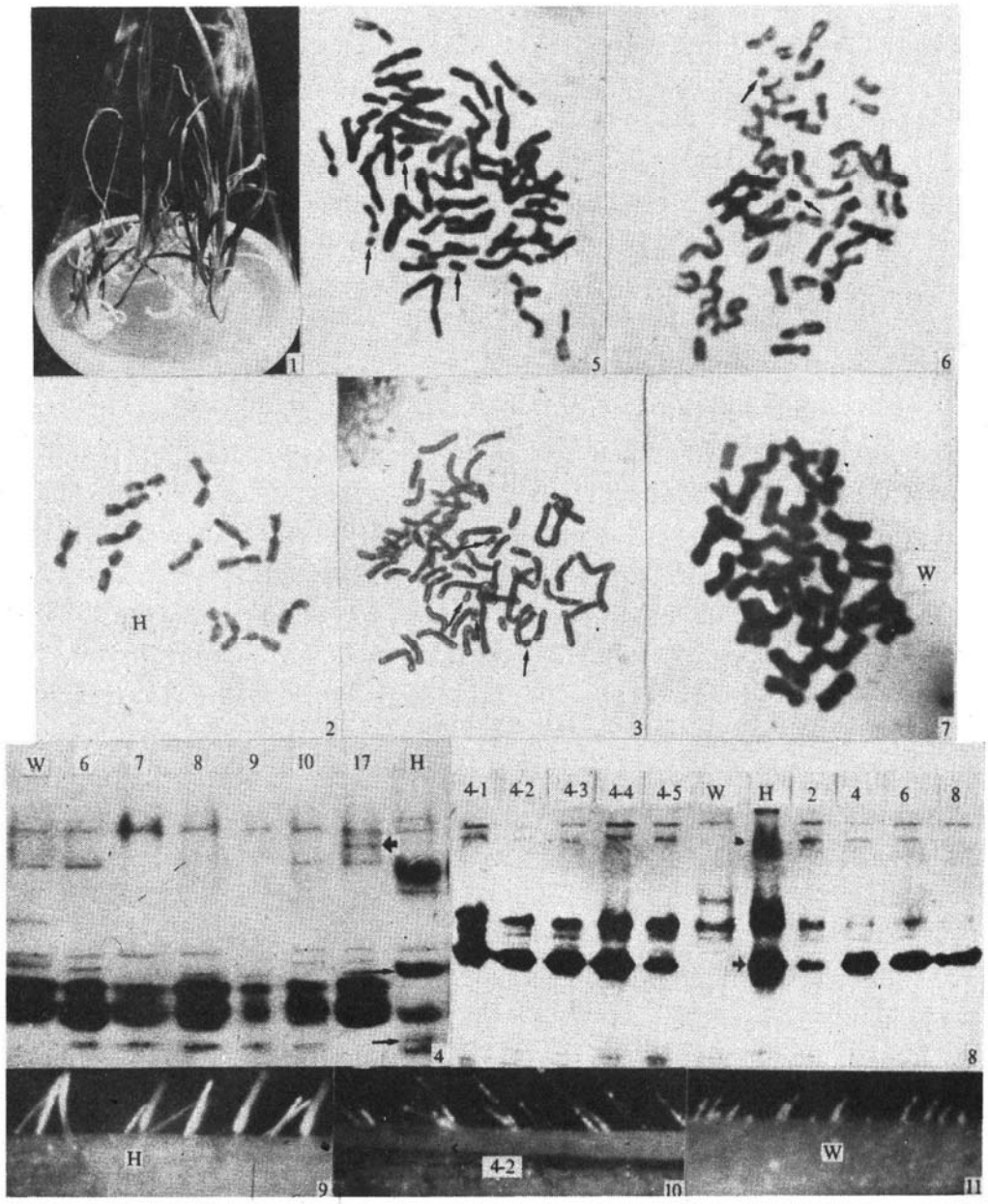


图 1

1. 2号细胞系的再生植株，×0.56; 2. 正常的簇毛麦愈伤组织染色体($2n=14$)，×1 920; 3. 1号细胞系的染色体，染色体数目为52，“↑”示断片，×2 400; 4. 再生愈伤组织的酯酶同工酶谱，“·↑”示簇毛麦特异带，“↑”示新带，×0.56; 5. 4-2号植株的根尖染色体，53条，“↑”示断片，×3 040; 6. 2号植株幼叶基部的染色体，49条，“↑”示断片，×3 040; 7. 小麦幼叶基部的染色体，$2n=42$条，×3 200; 8. 再生植株的同工酶谱，“↑”示簇毛麦的特异性带，×0.52; 9,10,11. 簇毛麦(H)、4-2号再生植株、小麦(W)叶片，“↑”示表皮毛，×4.0

表 1　融合产物的形态比较、染色体数目、同工酶分析结果及植株再生情况[a)]

胞系编号	融合组合	愈伤组织形态	染色体数目	酯酶同工酶	植株再生情况
1	A	M 有紫红色	42～56	P	再生完整植株
2	A	M 有紫红色	42～56	P	再生完整植株
3	A	M 有紫红色	45～48	P	再生完整植株
4	A	M 有紫红色	48～56	P	再生完整植株
5	A	M	43～56 或更多	P	再生完整植株
6	A	M 有紫红色	48～56 或更多	P	再生完整植株
7	A	M	约 48	P	再生完整植株
8	A	M	50～51	P	再生完整植株
9	A	H	20～42	P	未再生植株
10	A	M 有紫红色	43～48	P	未再生植株
11	A	M 有紫红色	—	P	未再生植株
12	A	M	24～39	P	再生植株
13	A	M	22～37	T	未再生植株
14	A	M	22～25	T	未再生植株
15	A	T	16～29	T	—
16	A	T	— [a)]	T	—
17	D	M	28	P N	未再生植株
18	D	M	26～35	P	再生植株
19	C	M 有紫红色	28～43	P	未再生植株

a)"— "表示未分析；愈伤组织形态：M —— 中间型，T —— 小麦型，H —— 簇毛麦型；同工酶谱：P —— 含部分的双亲谱带，N —— 含新带，T —— 小麦谱带

颗粒大小在 1～1.5 mm 之间．而双亲中小麦原生质体产生的愈伤组织(T 型)大多数为黄白色，较松散，颗粒大小约 0.5 mm．簇毛麦原生质体在本实验条件下不分裂．供分离原生质体的簇毛麦愈伤组织(H 型)颜色亦比小麦淡，颗粒较大，约为 1.5 mm.

2.5.2　染色体数目　对照小麦原生质体再生的愈伤组织细胞的染色体数目 99% 以上在 31～39 条之间，极个别为 42 条．簇毛麦染色体的正常数目为 $2n=14$(图 1(2))．辐照后簇毛麦染色体发生变异，完整染色体的数目绝大多数少于 14 条．在经融合处理后培养形成的愈伤组织中，M 型愈伤组织占据多数，其细胞的染色体数目多在 42～56 条之间，且含染色体断片(图 1(3))．与此相比，少量形成的 T 型和 H 型愈伤组织细胞的染色体数目都较少．

2.5.3　同工酶分析　本研究对再生愈伤组织进行了酯酶同工酶分析．在已分析的 19 个融合再生细胞系中，除 4 个细胞系与小麦相同外，其余均具有双亲的部分谱带，且有 1 个细胞系出现了新带(图 1(4))．凡具有双亲谱带的细胞系，其染色体数目一般比只有小麦谱带的细胞系多，也比对照小麦多．

2.5.4　由愈伤组织的再生能力推断杂种的产生　如上所述，本实验所制备的小麦原生质体只有分化长出绿点，小绿叶或根的能力．簇毛麦原生质体在本实验条件下不分裂．机械混合的双亲原生质体也不能再生植株．而本实验早期得到的融合再生细胞系多数都能分化出植株(占 50% 以上，表 1)，且有的细胞系分化能力特别强．如由 4 号细胞系衍生的愈伤组织至今已再生出 70 多株健壮幼苗．因此可以认为这些愈伤组织并非来自任一亲本．

2.6　再生植株的鉴定

本研究对部分再生植株作了染色体检查、同工酶分析及形态学比较，结果如表 2 所示．

可以看到，再生植株的染色体数目在 40～53 条之间，且含有数目不等的断片(图 1(5)，

(6)); 酯酶同工酶谱均为含有双亲部分谱带的P型(图1(8)), 淀粉酶同工酶亦然; 表皮毛有的类似于簇毛麦(图1(9～11)), 有的仍同小麦. 上述结果表明, 本研究获得的再生植株应该是小麦与簇毛麦的不对称体细胞杂种植株.

表2 部分再生植株的形态学比较、染色体检查及同工酶分析结果[a)]

细胞系	植株编号		染色体来源及数目	同工酶		叶片表皮毛
				酯酶	淀粉酶	
2	2		幼叶基部 43～46条, 含3～5个断片	P	P	似簇毛麦
4	4-1		根尖 40～42条, 含3～4个断片	P	P	似簇毛麦
	4-2		根尖 46～53条, 含2～3个断片	P	P	似簇毛麦
	4-3		幼叶基部 40～43条, 含断片	P	P	似簇毛麦
	4-4		—	P	P	似簇毛麦
	4-5		—	P	P	似簇毛麦
6	6		—	P	P	似小麦
8	8		—	P	P	似小麦
对照	簇毛麦		幼叶基部, 14条	H	H	表皮毛长而稀疏
	小麦	1	幼叶基部, 42条(图1(7))	T	T	表皮毛短而密
		2	根尖, 42条	T	T	

a) "P"表示含双亲谱带, "H"表示簇毛麦同工酶谱, "T"表示小麦同工酶谱

3 讨论

3.1 供体原生质体的来源

通常融合工作中供体原生质体多来源于悬浮细胞或叶片, 但禾谷类悬浮细胞系的建立常非易事. 本实验直接由愈伤组织制备原生质体, 手续较简. 此外, 在不对称融合实验中, 用离子射线直接处理供体原生质体时, 如果实验条件下供体原生质体不能分裂, 就不容易确定适宜的辐照条件. 因此采取了辐照供体愈伤组织的方法. 该方法有利于分析射线对供体细胞的影响及融合结果. 同时, 愈伤组织经1次处理后可在一段时间内分次获得供体原生质体来做实验比较. 所以, 用射线处理供体愈伤组织是一种既有利于实验条件的摸索也省时省力的方法.

3.2 杂种细胞系的旺盛生长

实验中发现, 融合产物往往比对照生长更快, 从而形成数目虽较少而体积较大的愈伤组织(对照为数目较多而体积较小的愈伤组织). 分析早期形成的细胞系(结果见表1), 发现多数为杂种, 说明异源融合的细胞系比其它细胞系生长更旺盛. 这种杂种细胞旺盛生长的现象前人也有报道[8], 其原因可能是融合导致了内源激素或代谢物合成的互补或平衡.

3.3 融合中双亲分化能力的互补

本实验中一个很有意义的现象是分化能力都很低的双亲, 融合后却产生出较多分化能力很高的愈伤组织. 这个事实说明双亲原生质体在分化能力上可以互补, 而且只有经过原生质体的融合才有这种效应, 机械混合的双亲并不发生此种效应.

我们还注意到凡是具有双亲同工酶谱(P型)的愈伤组织大多具有再生能力, 而具小麦同

工酶谱(T 型)的愈伤组织均不能再生植株．与酶谱相对应，T 型愈伤组织染色体数目都较少．这可能是因为簇毛麦染色体没有进入小麦或进入很少，以致带有与小麦分化能力互补的基因的染色体未能参加到融合事件中．

具有 T 型同工酶谱的愈伤组织在形态上有时也呈 M 型(编号 13,14)，这说明愈伤组织的形态并不能确切反映基因型．

融合后分化能力互补的现象在小麦与高冰草(*Agropyron elongatum*)的融合工作中也发生过．我们用长期继代、分化能力较低的济南 177 原生质体与来源于高冰草愈伤组织而不能分裂的原生质体融合，获得了高频率分化(70%以上)、外型偏向于高冰草的再生植株(夏光敏等)．以上融合中再生能力互补的现象过去尚未见到报道，但 kameya[9] 在两种烟草的融合中曾见到在花芽发生上的互补现象．融合对分化发育产生的重要作用，不仅在理论研究中十分有意义，而且对融合的实际工作也会带来更多的成功机会．

3.4　受体失活程度与融合产物生长发育的关系

在我们的实验中观察到：受体的失活程度愈轻，融合产物的生长发育愈好(表 3)．

表 3　小麦原生质体(受体)失活程度与融合产物生长发育的关系

IOA 浓度	小麦原生质体失活情况	融合产物的发育
2.5	2～3d 后死亡	小细胞团(组合 B)
1.5	部分原生质体膨大，不分裂	生长缓慢的小愈伤组织(组合 C)
1.0	分裂 1～2 次，但不能持续分裂下去	能分化出完整植株，但分化频率较低，植株很弱(组合 D)
0	培养后 3～4d 出现 1 次分裂，分裂旺盛	高频率地分化出大量健壮植株(组合 A)

由此可见，在不对称融合工作中，不但供体的处理需要合适的条件，受体的失活程度也是获得再生植株的关键．

参　考　文　献

1　孙勇如．植物体细胞杂交的进展．生物工程学报，1989，5(3)：191～194

2　陈漱阳，高立贞，刘麦焕等．普通小麦与簇毛麦杂交的研究．遗传学报，1981，8(4)：340～343

3　刘大钧，陈佩度，裴广铮等．将簇毛麦种质转移给小麦的研究．遗传学报，1983，10(2)：103～113

4　Li Z Y, Xia G M, Chen H M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions of wheat (Triticum aestivum L). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 28: 79～85

5　Lindsey K ed. Plant Tissue Culture Manual. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. Section D: 1～17

6　张自立，俞新大．植物细胞和体细胞遗传学技术与原理．第一版．北京：高等教育出版社，1990．14～15

7　胡能书，万贤国．同工酶技术及其应用．第一版，长沙：湖南科技出版社，1985．96～104

8　Polgar Z S, Preiszner J, Dudits D *et al*. Vigorous growth of fusion products allows highly efficient selection of interspecific potato somatic hybrids: molecular proofs. Plant Cell Reports, 1993, 12: 399～402

9　Kameya T. The complementary restoration of plant regeneration-and flower initiation-ability through somatic cell fussion. Cytologia, 1989, 54: 385～388