葡萄与柴胡科间体细胞杂交 再生杂种植株

宋锡全* 夏光敏* 周爱芬 鲍雪珍 陈惠民

(山东大学生命科学院, 济南 250100. * 现工作单位: 贵州师范大学生物科学技术系, 贵阳 550001. • 联系人)

摘要 狭叶柴胡原生质体用强度为 $260 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 紫外线照射 0, 1, 2 和 3 min 后, 与酿酒葡萄原生质体融合. 对融合再生的 19 个单细胞克隆进行表型、同工酶、染色体和 5S rDNA 间隔序列分析. 结果表明, 它们均为体细胞杂种. 11 个杂种愈伤组织包括对称及不对称融合产物, 在培养 5 个月时, 再生了体细胞胚、幼叶及叶丛; 其中有 4 个不对称融合的杂种细胞系在培养 8~10 个月, 再生出有根的完整小植株. 染色体观察表明, 完整植株的再生与杂种细胞的染色体数目相对减少相关. 对部分小植株幼叶的核糖体 5S rDNA 间隔序列差异的分析, 证实它们为科间体细胞杂种.

关键词 葡萄(*Vitis vinifera* L.) 狭叶柴胡(*Bupleurum scorzonerifolium* Willd) 紫外线(UV) 体细胞杂交 科间杂种植株

植物体细胞杂交可以克服远缘不亲和性, 扩大杂交双亲的亲缘距离. 近年来, 随着原生质体再生体系的扩大, 体细胞杂交进展迅速, 已获得许多种、属间体细胞杂种植株^[1], 但到目前为止, 科间体细胞杂交再生植株的仅有几例: 胡萝卜(+)烟草^[2,3], 胡萝卜(+)水稻^[4], 胡萝卜(+)大麦^[5], 其中一例^[2]获得可育杂种植株. 但在以上例证中, 双亲或亲本之一属于组织培养较容易的模式植物(烟草或胡萝卜). 80 年代以来, X 或 γ 射线在不对称体细胞杂交中广泛应用, 通过照射双亲之一(供体)的细胞, 使其染色体消减, 以减小双亲的不亲和性. 1996 年, 夏光敏等人^[6]首次将紫外线成功地用于小麦的属间体细胞杂交. 酿酒葡萄“胜利”品种属于葡萄科(Vitaceae)欧亚种群. 葡萄原生质体培养难度较大, 鲍雪珍等人^[7]曾报道过其分裂形成较大的细胞团. 狭叶柴胡(红柴胡)属于伞形科(Umbelliferae)柴胡属(*Bupleurum*), 具退热解表、疏肝解郁等功能, 是重要的常用中药. 1992 年夏光敏等人^[8]从狭叶柴胡原生质体培养获再生植株. 本文报道这两种植物的不对称体细胞杂交获得再生杂种植株, 其结果为为数不多的科间体细胞杂交增添了又一成功的例证. 此外, 葡萄及柴胡均非模式植物, 而且它们的生长形式和生活特性完全不同, 前者为多年生木质藤本, 后者为一年生草本, 两者体细胞杂交成功也有一定意义. 这一工作的完成将为柴胡的某些药用性状转入葡萄, 改进葡萄品质打下基础.

1 材料与方法

(1) 葡萄与柴胡原生质体融合及培养. 用葡萄品种“胜利”的花药接种在 B₅₂₈ 培养基^[7]上诱导愈伤组织, 它们具有很高的胚胎发生能力, 现已继代培养 8 年, 尚能分化体细胞胚及幼叶. 取继代后新长出的小颗粒状愈伤组织建立悬浮细胞系, 用 B₅₂₈ 液体培养基每 7 d 转代 1 次, 取转代 4~5 d 的悬浮细胞分离原生质体. 酶液含 1% Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23, 0.6 mol/L 甘露醇, 5 mmol/L CaCl₂, pH=5.6, 酶解时间 3~4 h. 原生质体用 0.6 mol/L 甘露醇 + 5 mmol/L CaCl₂ 清洗 2 次, 调成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度, 用作融合受体. 取狭叶柴胡幼茎茎节诱

导并筛选出淡黄色粉粒状愈伤组织^[8], 经长期继代培养已经丧失分化能力, 此种愈伤组织在 MS+ 1 mg/L 2, 4-D 培养基上, 每 20 d 转代 1 次. 继代 6~8 d 时用于游离原生质体, 酶液及纯化同葡萄. 纯化后的原生质体以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 密度放入小培养皿中成薄层, 经强度为 260 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ UV 分别照射 0, 1, 2 和 3 min 后, 用作融合供体. 以上受体分别与 UV 照射不同时间的供体以葡萄: 狭叶柴胡= 1: 1 的比例混合均匀, 用改良的 PEG 法^[9]诱导融合. 分别培养双亲原生质体作对照. 融合及对照原生质体用 B₅₂₈ 附加 9% 葡萄糖的培养基进行培养. 培养物置于 25 °C 黑暗中. 培养物中再生的小愈伤组织长到 1~1.5 mm 大小时将其转入含 2, 4-D 1 mg/L 的 MS 培养基上增殖, 然后转移到 1/2 MS+ 0.5 mg/L 6-BA 的培养基上分化. 每天光照 10 h, 光强 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 温度 25 °C.

(2) 杂种鉴定. () 形态比较. 对融合再生的愈伤组织及幼叶与亲本在外形、颜色上进行比较. () 染色体组型分析. 取融合及对照的愈伤组织以及幼叶基部于 4 °C 处理 16 h, 经甲醇: 冰醋酸= 3: 1 的固定液固定, 用去壁低渗火焰干燥法制片^[9], Giemsa 染色, 观察染色体. () 同工酶鉴定. 取亲本及融合产物再生的愈伤组织各 100 mg, 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH= 8.0) 提取可溶蛋白质, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析酯酶, 电泳及染色方法同文献[9]. () 5S rDNA 间隔序列多态性分析. 亲本及杂种愈伤组织、再生幼叶用 CTAB 法提取总 DNA^[10]. 用两套 5S rDNA 引物: 1 套为 5'-GAGAGTAGTACATCGATGGG-3' 和 5'-GGAGTTCTGACGGGATCCGG-3' (20 mer); 另 1 套为 5'-GGATGGGTGACCTCCCGGAAGTCC-3' 和 5'-CGCTTAAGTCCGGAGTTCTGATGGG-3' (25 mer). 对以上 DNA 进行 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 15 μL 反应液中含 Tris-HCl (PCR buffer) 100 mmol/L, 5S rDNA 引物各 20 pmol, dNTP 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, MgCl_2 2.5 mmol/L, 样品 DNA 50 ng, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 温度循环在 SX-240 C 型基因扩增仪(西安顺达电子有限公司)上进行, 循环程序为: 94 °C 1 s, 65 °C 1 s, 72 °C 2 s; 40 个循环. 扩增产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察和照像.

2 结果

2.1 葡萄与柴胡原生质体融合产物的培养

葡萄与柴胡不同组合的融合产物在培养初期无明显区别, 除了 UV 照射 3 min 的组合外均在第 6 d 开始分裂, 15 d 后形成小细胞团, 其中少数继续生长至 70 d 左右成为直径大于 1 mm 的单细胞克隆. 将它们挑出在含 2, 4-D 1 mg/L 的 MB^[9] 培养基上增殖, 共选出 19 个克隆, 其中 5 个(1~5 号)属于非照射组(对称融合), 10 个(6~15 号)属于 UV 照射 1 min 组, 4 个(16~19 号)属于 UV 照射 2 min 组. 各组合中还有大量小于 0.2~0.5 mm 的小克隆, 由于它们不能继续长大而难以对其做单个克隆的分析.

将上述 19 个单细胞克隆再生的愈伤组织转移到分化培养基上, 培养 5 个月后共有 11 个克隆来源的愈伤组织分化出体细胞胚、幼叶及叶丛(图 1(a)), 它们生长极为缓慢. 对称融合产生的幼叶及叶丛以后未能生根, 它们逐渐变褐, 停止生长. 培养 8~10 个月以后, 经不对称融合产生的 6, 7, 11 和 18 号克隆再生愈伤组织新分化出根叶完整的小植株(图 1(b)~(d)) 并且生长较快. 此外, 6, 7 号克隆早期分化的部分幼叶基部长出根来, 形成完整的小植株. 作为对照的葡萄原生质体只能分裂至小细胞团, 柴胡原生质体再生愈伤组织没有分化.

2.2 融合产物杂种性质的鉴定

(1) 形态学鉴定. 融合再生愈伤组织表型均介于双亲之间. 狭叶柴胡原生质体幼叶为

图1 融合再生叶丛及植株

(a) 葡萄(+) 柴胡融合克隆2及再生的叶丛; (b)~(d) 葡萄(+) 柴胡融合克隆6, 7, 18再生的小植株

倒披针型, 全缘^[8]; 葡萄愈伤组织再生幼叶阔卵型, 叶缘深裂^[11]. 不同融合克隆早期(5个月时)形成的幼叶形态各异, 不同于双亲. 后期(8~10个月)新分化的植株表形有的介于双亲之间或不同于双亲(图1(b), (c)), 有的形态像葡萄(图1(d)), 未出现与柴胡类似的再生植株.

(2) 细胞学鉴定. 用于融合的葡萄愈伤组织染色体数目87%左右为20~38. 柴胡愈伤组织染色体数88%为9~12. 融合再生的19个细胞系在早期(5个月左右), 无论是对称还是不对称融合产生的克隆, 其染色体数目无明显差别, 90%左右分布在21~50之间, 其再生幼叶基部染色体数目70%在20~48之间(图2(a)). 8个月以后, 检查后期再生完整植株的愈伤组织及幼叶基部发现, 染色体数目明显减少, 90%以上分布在18~28之间(图2(b)).

图2 杂种克隆18再生幼叶(5个月)(a)及植株(8个月)(b)染色体
→示双着丝粒染色体

(3) 同工酶分析. 酯酶同工酶分析表明, 19个细胞系均具有双亲特征谱带并出现新带(图3(a)).

(4) 分子生物学鉴定. 对部分杂种细胞系及再生幼叶的总 DNA 用 5S rDNA 引物进行间隔序列差异分析. 结果表明, 所测试材料均具有双亲的特征序列(图 3(b)), 有的还有与双亲不同的序列.

图3 融合再生愈伤组织及幼叶的酯酶及 5S rDNA 间隔序列分析

(a) 杂种愈伤组织 1~8 号克隆及双亲的同工酶谱; (b) 杂种克隆 7, 10, 18 号再生幼叶及双亲幼叶经 25 mer, 引物 PCR 扩增的 5S rDNA 间隔序列图谱. G—葡萄, B—柴胡, M—标准分子量, ◀示双亲特征带, ▶示新带

根据以上测定, 以 5 个杂种克隆及其再生幼叶为代表, 它们的系统检测结果见表 1.

表1 融合细胞系及再生幼叶的细胞学、同工酶及 5S rDNA 间隔序列分析

融合类型	细胞系	染色体数目主要分布范围 ^{a)}		酯酶同工酶	5S rDNA 间隔序列
	编号	细胞系	幼叶基部	细胞系	幼叶
G ^{b)} (+) B ^{c)} (UV 0 min)	2	21~ 50	21~ 48	PN ^{d)}	PN
G(+) B(UV 1 min)	6	21~ 48	22~ 43	P	P
G(+) B(UV 1 min)	7	25~ 47	24~ 46	PN	P
G(+) B(UV 1 min)	11	26~ 48	—	PN	—
G(+) B(UV 2 min)	18	25~ 49	21~ 44	P	P

a) 培养 5 个月; b) G 示葡萄; c) B 示柴胡; d) P 示双亲特征带, N 示新带

综合以上各种分析资料可以确证, 葡萄与柴胡原生质体融合产生了科间体细胞杂种再生植株.

3 讨论

3.1 杂种的生长发育

葡萄与柴胡杂种细胞系在培养 5 个月左右便分化出体细胞胚、幼叶及叶丛, 但没有发育成根叶完整的植株. 8~10 个月以后, 部分不对称融合的杂种幼叶基部开始生根, 4 个不对称杂种克隆的愈伤组织又新分化出根叶完整的小植株. 并且生长速度比培养初期的幼叶明显加快. 此时的体细胞杂种染色体数目明显减少, 分布在 18~28 之间. 目前成功的 4 例科间体细胞杂交中, 均发现再生植株染色体数目远远低于双亲之和^[2~5], 甚至低于受体一方^[2]的现象. 本实验再次证明了远缘杂交中以染色体消减来降低双亲的遗传物质的不平衡是杂种愈伤组织再生植株的前提条件之一^[1]. 从 6 号和 18 号克隆得到了表型完全像葡萄的杂种植株, 由于葡萄可以靠扦插进行繁殖, 因而这些杂种植株长大后可望应用于改进葡萄种质的育种研究.

3.2 紫外线在体细胞融合中的效应

在本实验的融合物培养前期, UV 照射组合的染色体数与对称融合组差异很小, 但到后

来,不对称融合染色体数目减少迅速. 因此可以认为,UV使染色体损伤及不稳定的作用是在融合物生长发育过程中逐步显现出来的,同时,杂种的生长发育特性也随之变化,出现了表型完全像受体的植株.

参 考 文 献

- 1 Waara S, Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica*, 1995, 85: 217~ 223
- 2 Dudits D, Maroy D, Praznovsky T, et al. Transfer of resistance trait from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: regeneration of fertile plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 8434~ 8438
- 3 Kisaka H, Kameya T. Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L and *Nicotiana tobacum*. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 75~ 80
- 4 Kisaka H, Lee H, Kisaka M, et al. Production and analysis of asymmetric hybrid plants between monocotyledon (*Oryza sativa* L) and dicotyledon (*Daucus carota* L). *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 365~ 371
- 5 Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, et al. Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L) and carrot (*Daucus carota* L). *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 221~ 226
- 6 夏光敏, 王 槐, 陈惠民. 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. *科学通报*, 1996, 41(15): 1423~ 1426
- 7 鲍雪珍, 范自强, 林丛发. 葡萄原生质体分离和培养的研究. *山东大学学报(自然科学版)*, 1993, 28(2): 248~ 250
- 8 Xia G M, Li Z Y, Chen H M, et al. Plant regeneration from protoplast of *Bupleurum scorzonifolium*. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 155
- 9 Xia G M, Chen H M. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* and *Leymus chinensis*. *Plant Science*, 1996, 102: 197~ 203
- 10 Rogers D C, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissue. *Plant Molecular Biology Manual*, 1988, A6: 1~ 6
- 11 卢炳芝, 于向荣, 郭飞跃, 等. 葡萄花丝培养中的胚胎发生. *果树科学*, 1995, 12(增刊): 37~ 40

(1998-12-08 收稿, 1999-03-03 收修改稿)

原尾虫 DNA 序列变异及无翅类昆虫的系统进化

邵红光^④ 张亚平^④ 谢荣栋 尹文英

(中国科学院上海昆虫研究所, 上海 200025; ④中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223)

摘要 测定了3种原尾虫、5种跳虫和2种双尾虫约450 bp的线粒体 *cytb* 基因序列. 对核苷酸取代率进行了统计分析, 计算了种间 Kimura 双因子遗传距离, 用距离法和简约法构建了分子系统树. 原尾虫、跳虫和双尾虫均形成单系群, 原尾虫和跳虫为姊妹群, 双尾虫则与有翅类昆虫亲缘相近. 讨论了原尾虫等的系统发育和分类地位.

关键词 原尾虫 无翅类昆虫 线粒体 DNA 序列 进化

与有翅类昆虫相比, 低等无翅类昆虫在高级阶元系统分类问题上存在着诸多争论, 尤其是原尾虫、跳虫、双尾虫在节肢动物系统进化中的地位以及与现生有翅类昆虫的关系如何, 至今难以确定^[1]. 尹文英^[2, 3]依据胚后发育和比较精子学的研究结果, 对原尾虫是否属昆虫提出

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-17-1832>