

大麦×小麦杂种愈伤组织及再生植株的细胞学观察

朱 湄 李浚明 蔡体树

(北京农业大学)

提 要

本文研究了 Ant-13 大麦×中国春小麦未成熟胚诱导的愈伤组织细胞, 再生植株体细胞和花粉母细胞染色体的变化情况。发现在这三个不同分化和发育阶段中都存在着混倍体现象。但随着分化和发育过程的进行, 混倍体程度越来越小, 正常双单倍体细胞的比例越来越大。从再生植株花粉母细胞减数分裂前的有丝分裂开始到整个减数分裂过程中都可以看到染色体行为的异常现象, 从而形成败育花粉, 造成杂种不孕。花粉败育发生在单核小孢子时期。

关键词: 大麦; 小麦; 杂种; 愈伤组织; 染色体数目; 混倍体

前 言

自从1973年 Kruse^[3]首次获得大麦×小麦杂种植株以来, 若干作者已经对杂种的细胞学行为进行了研究^[3-6,10]。他们的结果表明, 绝大多数杂种植株皆具有预期的体细胞染色体数($2n=28$), 但由于孢子母细胞减数分裂前的有丝分裂异常, 导致花粉母细胞染色体数目的嵌合现象。最近本文作者通过首先将杂种幼胚诱导成愈伤组织的途径, 获得了大麦×小麦杂种的再生植株^[2]。为了研究杂种细胞在离体培养中的细胞学变化, 以及由这些变化引起的再生植株的细胞学特征, 因而进行了本项实验。

材 料 和 方 法

实验取材于以栽培大麦(*Hordeum vulgare* $2n=14$)品种 Ant-13 为母本和普通小麦(*Triticum aestivum* $2n=42$)品种中国春为父本杂交得到的杂种幼胚的愈伤组织及再生植株。为了对愈伤组织进行细胞学观察, 取80日龄的培养物用常规压片法制片。再生植株根尖的予处理、固定、解离和染色制片方法与愈伤组织相同。为了对花粉母细胞的减数分裂行为和小孢子发育过程进行观察, 取杂种植株孕穗早期的分蘖穗置甲醇和冰醋

酸(3:1)混合液中固定,在与上述相同的条件下水解15分钟,用海氏苏木精染色后,于45%醋酸中涂片。

结果和讨论

愈伤组织细胞中染色体数的变异 一系列作者已经报道了在很多物种或远缘杂种的离体培养物中染色体数的变异现象[9-12]。这种变异现象在太麦×小麦杂种培养物中也同样存在。根据我们在本实验中对100个杂种愈伤组织中期细胞的观察,其中具有预期染色体数($2n=28$)的细胞占46%(图1),其余多数为非整倍体,但也有4%的细胞发生了染色体的自发加倍($2n=56$)(图2)。染色体数目的变化范围是10—56(表1)。

表1 大麦Ant-13×小麦中国春愈伤组织细胞的染色体数目变异

Table 1 Chromosome number variation in callus of barley (Ant-13) × wheat (Chinese Spring)

观察细胞数 Number of cells observed	具 各 类 染 色 体 数 目 的 细 胞 数 Numbers of cells with certain chromosome number					
%	<21	21	22-27	28	29-55	56
	14	2	33	46	1	4

上述染色体数目变异的原因,固然可归结为两个远缘物种染色体组之间的不亲和性,但考虑到其他作者报道在不经愈伤组织途径,由杂种胚直接萌发而得到的大麦×小麦 F_1 植株体细胞中,往往并不出现染色体数的嵌合现象[2-6],因此似乎可以认为,造成这种染色体数嵌合现象的原因,主要是由于杂种细胞在离体培养条件下所遇到的特殊环境,或是由于外源生长素的诱导作用致使染色体不能进行有规律的复制和分裂。

再生植株根尖细胞的染色体数嵌合现象 上述在愈伤组织细胞中存在的混倍体现象在再生植株的体细胞中仍然存在。根据对12株再生植株的22个根尖共152个中期细胞的观察,具预期的正常杂种染色体数的细胞比例为62.4%,其余细胞则为非整倍体。

Fedak[5]在大麦Betzes×小麦中国春的正反交中所得到的全部根尖体细胞皆为 $2n=28$,Islam等[2]在上述组合反交中也只发现株间染色体数目的差异。陈孝等[10,11]在与上述相同或不同的大麦×小麦和小麦×大麦杂交组合中,也得到了类似的结果。与上述作者的结果相比,我们在本实验中所获得的大麦×小麦杂种的一个明显特点是80%以上的再生植株在同一株内体细胞染色体数存在着嵌合现象(表2)。这种结果上的差异显然是由于获得杂种途径的不同而引起的。如上所述,在本实验中,大麦×小麦杂种植株是通过愈伤组织的分化而产生的。一般认为由愈伤组织产生的器官原基是由一个或一小团分化细胞再经细胞分裂而形成的[9]。如果在这些细胞之间存在着染色体数目上的差异,那么由这些细胞参与形成的再生植株中自然就会出现混倍体现象。同一再生植株内体细胞染色体数的嵌合现象,可能也是导致若干再生植株内不同分蘖间发生明显形态差异的一个原因,这些株内分蘖间的性状差异涉及到穗形、芒长、穗

茎和芒的颜色以及颖壳上或叶鞘上腊质的有无等。

表 2 部分杂种植株体细胞染色体数

Table 2 Somatic chromosome numbers of some hybrid individuals

株号 Individual No.	观察细胞数 Number of cells observed	染 色 体 数 Chromosome number					
		<21	21	22—27	28	29—55	56
8	7	0	0	2	5	0	0
9	35	1	0	16	13	4	1
10	16	0	0	7	7	2	0
11	13	0	1	0	11	0	1
13	18	0	1	7	10	0	0
14	30	0	1	3	24	2	0
16	8	1	0	1	6	0	0

减数分裂前有丝分裂过程的异常 在减数分裂前的有丝分裂过程中可观察到许多异常情况, 如有的细胞中具有微核, 有的细胞分裂后期出现桥、断片、落后染色体等(图3)。这种减数分裂前有丝分裂的异常现象与Fedak[3]观察到的结果是一致的, 由此导致减数分裂过程的紊乱, 是造成杂种不孕的原因之一。

花粉母细胞中染色体数的嵌合现象 和Islam等[6]、Fedak[5]等许多作者的结果一样, 我们在花粉母细胞中也观察到染色体数目的嵌合现象。据对10株再生植株500个中期I细胞的统计结果, 平均每个细胞的染色体数为27.74。其中86.6%的细胞具有正常的双单倍体染色体数($2n=28$)。其余细胞则属于非整倍体, 染色体数目变化范围在13—55条之间(表3)。

表 3 花粉母细胞中的染色体数目

Table 3 Chromosome numbers in PMC

观察细胞数 Number of cells observed	染 色 体 数 / 细 胞 Chromosome numbers/Cells				
	<21	21	22—27	28	29—55
500	5	2	45	433	15

在再生植株花粉母细胞中虽然存在着上述的染色体数目嵌合现象, 但嵌合程度却明显低于愈伤组织和再生植株根尖体细胞, 因此可以认为, 在愈伤组织分化过程中, 那些染色体数严重偏离 $2n=28$ 的非整倍体细胞的竞争能力较小。在再生植株的个体发育过程中, 各种非整倍体细胞和双单倍体细胞之间的竞争仍在继续, 整个个体发育过程可能是对双单倍体细胞的一个选择过程。所以尽管在再生植株花粉母细胞中存在着染色体数目的嵌合现象, 但其比例已大为降低。

减数分裂过程紊乱 在再生植株花粉母细胞的减数分裂过程中染色体行为十分异常。

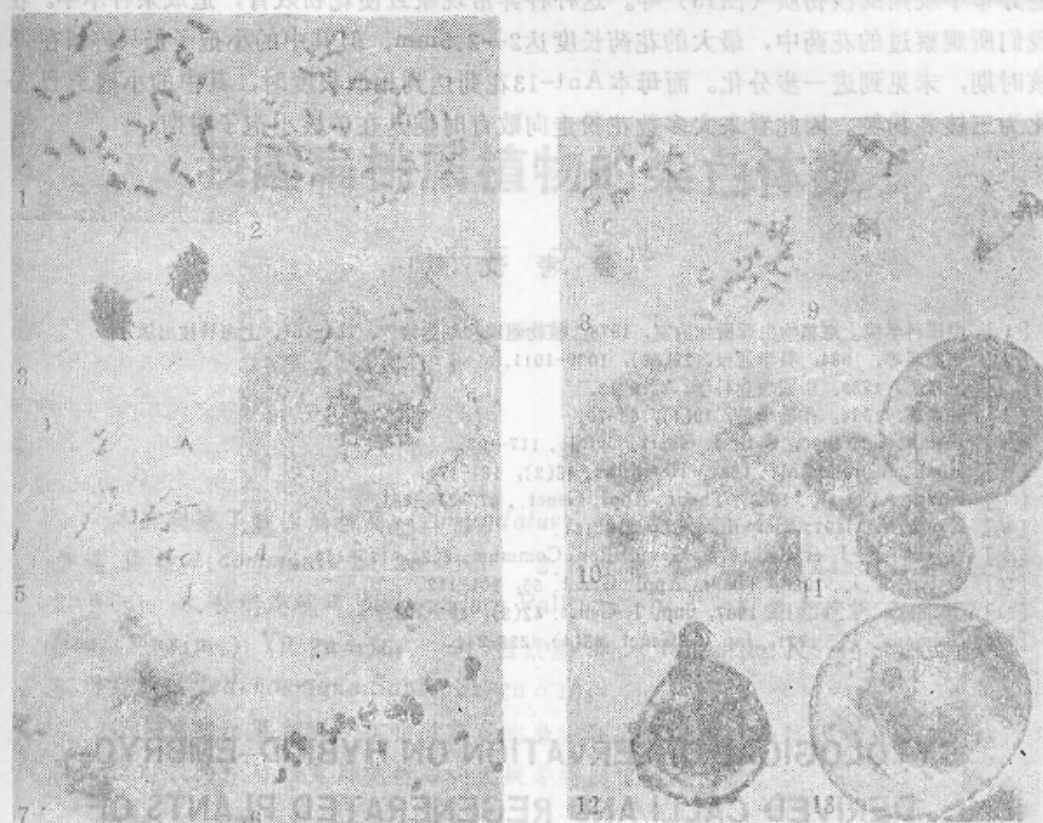
正常的大麦×小麦杂种的双单倍体细胞应具有大麦和小麦各一套染色体,由于它们之间没有同源关系,在减数分裂前期 I 就不会有同源染色体间的联会现象,原则上也不应具有偶线期和双线期。在所观察到的细胞中,从细线期到粗线期,除相互缠绕的一团染色体外,常可见到游离的单条染色体或小团染色体(图4),这种现象在粗线期尤为常见。在前期 I 细胞中也看不到典型的终变期图象。在减数分裂中期 I 本不应产生任何二价体。但实验结果表明,在中期 I 的个别细胞中,不仅可见到一个或一个以上的链状或环状二价体,极少数情况下甚至可见到三价体链或四价体链(图5)。根据对433个具28条染色体的中期 I 细胞的统计结果,染色体的平均配对是 $27.18 \text{ I} + 0.26 \text{ II} + 0.04 \text{ III} + 0.01 \text{ IV}$ (表4)。造成这种现象的原因, Fedak[5]认为是由于大麦染色体组对小麦染色体5 B长臂上严格控制染色体配对的pH基因有微弱的抑制作用,因而非同源染色体的同源部分之间就可能发生联会,并因此导致染色体配对。Islam等[6]则提出另一种解释,认为一些具有28条染色体的孢子母细胞可能并不包含两套完整的大麦和小麦染色体组,而是其中一个或一个以上的染色体发生了重复或缺失的非整倍体。这两种解释看来皆不无道理,但在对杂种染色体组做出精确的组型和带型分析之前,还难于做出定论。

表4 花粉母细胞中染色体配对情况
Table 4 Chromosome pairing in PMC

株号 Individual No.	观察细胞数 Number of cells observed	配对情况 Pairing
1	19	$27.07 \text{ I} + 0.11 \text{ II} + 0.11 \text{ III}$
6	55	$27.02 \text{ I} + 0.42 \text{ II} + 0.05 \text{ III}$
7	51	$27.06 \text{ I} + 0.37 \text{ II} + 0.02 \text{ III} + 0.02 \text{ IV}$
8	30	28 I
9	46	$27.36 \text{ I} + 0.24 \text{ II} + 0.02 \text{ III} + 0.02 \text{ IV}$
10	53	$27.28 \text{ I} + 0.28 \text{ II} + 0.38 \text{ III}$
12	29	$25.9 \text{ I} + 0.38 \text{ II} + 0.1 \text{ III}$
13	48	$27.19 \text{ I} + 0.33 \text{ II} + 0.02 \text{ III} + 0.02 \text{ IV}$
15	55	$27.24 \text{ I} + 0.15 \text{ II}$
16	48	$27.08 \text{ I} + 0.4 \text{ II} + 0.04 \text{ IV}$
共计	433	$27.18 \text{ I} + 0.26 \text{ II} + 0.04 \text{ III} + 0.01 \text{ IV}$

此外,在中期 I 和中期 II 细胞中均可见到游离于赤道板外的单价染色体(图6),在后期—末期细胞中除出现染色体桥、断片(图7)以及两子细胞中染色体分配不均现象(图8)外,在末期 II 还存在二分体分裂的不同步现象及多极分裂现象(图9)。

小孢子败育 由于减数分裂中出现的一系列异常现象,结果在减数分裂产物中不仅有四分体,而且出现三分体、五分体、六分体等(图10);在许多小孢子的细胞质中有数目不等的染色颗粒,最后形成的花粉粒之间大小差异明显(图11),形状也不尽相同,有的花粉粒上长有芽孢(图12);大量花粉粒具有2个以上萌发孔,有的甚至多达5—6个萌发孔;有的花粉粒无细胞内含物,仅有一个空壳;有的无细胞核,只有一



1. 示具预期染色体数目的愈伤组织细胞, $2n=28$
A callus cell with expected chromosome number.
2. 自然加倍的愈伤组织细胞, $2n=56$
A spontaneous polyploid callus cell with $2n=56$.
3. 杂种植株减数分裂前的异常有丝分裂后期
Irregular premeiotic mitosis (anaphase) in the hybrid.
4. 杂种植株减数分裂前期 I 的异常现象
Irregular prophase I in the hybrid.
5. 具有多价体的杂种植株减数分裂中期 I 细胞
Metaphase I, showing multivalents in the hybrid.
6. 杂种植株减数分裂中期 I 侧面观
The equatorial view of metaphase I in the hybrid.
7. 杂种植株减数分裂后期 I 出现桥、断片等
Bridges and fragments at anaphase I in hybrid.
8. 二分体, 示染色体的不平衡分配
A diad, showing unbalanced disjunction of chromosomes.
9. 减数分裂后期 II 示多极分裂现象
Anaphase II, showing multipolar division.
10. 异常四分体
An abnormal tetrad.
11. 花粉粒大小差异显著
Remarkable difference in pollen size.
12. 示芽孢及多个萌发孔的花粉粒
A pollen grain with several apertures and an abnormal process.
13. 无细胞核仅含核物质的花粉粒
A pollen grain without nucleus but containing nuclear substance.

些分布不规则的核物质(图13)等。这种种异常现象致使花粉败育,造成杂种不孕。在我们所观察过的花药中,最大的花药长度达2—2.5mm,但其中的小孢子仍只停留在单核时期,未见到进一步分化。而母本Ant-13花药达到相似长度时,其中的小孢子已分化为三核花粉粒。因此看来大多数花粉走向败育时期是在单核小孢子时期。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海植物生理所细胞室, 1978; 植物组织和细胞培养, 154-167, 上海科技出版社。
- [2] 李凌明等, 1984; 科学通报, 29(16): 1009-1011。
- [3] 陈孝等, 1983; 中国农业科学, 2: 9-13。
- [4] 陈孝等, 1984; 作物学报, 10(1): 65-70。
- [5] Fedak, G., 1980; Can. J. Genet. Cytol., 117-123。
- [6] Islam, A. K. et al., 1981; Hereditas, 46(2): 161-174。
- [7] Karp, A. et al., 1984; Theor. Appl. Genet., 67: 249-251。
- [8] Kruse, A., 1973; Hereditas, 73: 157-161。
- [9] Novak, F. J. et al., 1978; Genet. Res. Commun., 6(2): 135-144。
- [10] Orton, T. J., 1980; Theor. Appl. Genet., 56: 101-112。
- [11] Shimada, T. et al., 1967; Jap. J. Genet., 42(3): 195-201。
- [12] Shimada, T., 1971; Jap. J. Genet., 46(4): 235-241。

CYTOLOGICAL OBSERVATION ON HYBRID-EMBRYO- -DERIVED CALLI AND REGENERATED PLANTS OF HORDEUM VULGARE $\times$ TRITICUM AESTIVUM

Zhu Mei Li Junming and Cai Tishu

(Beijing Agricultural University)

Abstract

Cytological observation was made to detect chromosome aberrations in hybrid-embryo-derived calli as well as in somatic cells and PMC's of regenerated plants of barley ($2n=14$) cv. Ant-13 $\times$ common wheat ($2n=42$) cv. Chinese Spring. The results reveal that mixoploidy exists throughout the whole process of the above-mentioned stages. However, as the differentiation and development proceed, mixoploidy level become less and less, and the proportion of diploid cells ($2n=28$) become greater and greater. Abnormality of chromosome behavior occurs from premeiotic mitosis until various stages in meiosis, thus resulting in pollen abortion and self-sterility of the hybrid plants. Pollen abortion occurs at the uninuclear stage of PMC's.

Key words: Barley; Wheat; Hybrid; Callus; Chromosome number; Mixoploidy