

谷子(*Setaria italica*) Ch4n × 法氏狗尾草(*S. faberii*) 杂种幼胚培养及杂种 F₁ 的鉴定*

罗新谈 郭扶兴 周俊彦 马惠

(中国科学院西北植物研究所, 陕西杨陵, 712100)

吴权明 朱光琴 马云彤

(陕西省农业科学院粮食作物研究所)

提 要

1989年, 进行了谷子(*Setaria italica*) Ch4n × 法氏狗尾草(*S. faberii*) 的远缘杂交和杂种胚培养。共接种已授粉子房264个, 得到22株苗, 仅11株成活。试管苗经继代培养和繁殖, 得到了大量的小植株, 移栽成活并发育到成熟。经形态学和细胞学鉴定, 其中有两个株系是杂种, 杂种 F₁ 的染色体数为 $2n=4x=36$, 花粉母细胞在减数分裂中期 I 染色体配对不正常, 染色体构型为 $(18-2)I+(13-0)II+(0-9)III+(0-3)IV$, 后期染色体分离不正常, 形成不正常的四分体和微型小孢子, 花粉败育。F₁ 高度不育, 其形态特征介于双亲之间, 植株在许多性状上都与父本法氏狗尾草相似, 而与母本相差较远。

关键词 谷子 Ch4n; 法氏狗尾草, 杂种胚培养; 杂种

谷子是我国北方主要作物之一, 耐干旱和瘠薄土壤, 在西北和华北干旱地区广为栽培, 但产量较低。我们在谷子三系选育研究中, 利用远缘杂交, 以狗尾草属的5个野生种(包括法氏狗尾草在内)为母本与谷子杂交, 分别选育不育系。1989年安排其反交组合谷子 Ch4n × 法氏狗尾草, 其目的在于: (一) 根据雄性不育基因的多样性、彼此独立性和质核对应原理, 通过正、反交对比, 测验此雄性不育基因有无互补关系; (二) 使从法氏狗尾草中获得的恢复源具有谷子细胞质, 以避免野生种细胞质给恢复系带来不利影响。此外, 从反交组合中选育出具有显性核不育基因的谷子—法氏狗尾草种间杂种, 将成为谷子外源基因导入与染色体工程研究的基础材料。

近年来, 组织培养技术在大麦、小麦、水稻^{2,3,4}等作物远缘杂交育种中得到广泛应用, 但在谷子育种中应用较少。我们于1988年以云南狗尾草 × 谷子 4n 等不育的 F₁ 为材料, 在组织培养中完成了植株再生, 为克服谷子远缘杂种不育及其在育种中的应用开辟了新途。

* 国家自然科学基金资助项目

本文于1991年5月17日收到, 1992年3月5日终审完毕。

缩写(Abbreviation): BA(6-苄氨基嘌呤), BM(基本培养基), CTK(细胞分裂素), 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸), IAA(吲哚乙酸), KT(6-咪唑氨基嘌呤), TDZ(噻重氮苯基脒), ZT(玉米素)

径¹⁹。本研究通过谷子 Ch4n×法氏狗尾草的杂种胚培养,得到了F₁杂种试管苗,并建立了试管(in vitro)无性繁殖系,对F₁植株进行了形态学和细胞学鉴定。

1. 材 料 和 方 法

用谷子(*S. italica*)显性核不育材料CH的同源四倍体作母本,法氏狗尾草(*S. faberii*)作父本于1989年8月上旬进行杂交(整穗后人工重复授粉2—3次),取授粉后10—12天的幼穗,经低温(3—5℃)处理1—2天,表面灭菌用0.1%HgCl₂溶液处理15分钟,在无菌条件下剥出直径为0.5—1毫米的已授粉子房接种于附加不同生长调节物质的MS培养基上,培养基含蔗糖30克/升,高温灭菌前将pH调至5.8,培养间温度25±2℃,光强度1500—2000勒克司,光周期10小时光照/14小时黑暗。

生根试管苗1990年春季移栽于温室花盆内,在孕穗期早晨7时取样,用卡诺固定液固定,醋酸洋红液压片,观察F₁花粉母细胞减数分裂的染色体行为。成熟时收获杂种并进行形态比较。

2 实 验 结 果 与 分 析

2.1 杂种幼胚诱导出苗

将已授粉子房作外植体接种于下列三类培养基上:(一)BM;(二)较低浓度的2,4-D和较高浓度的细胞分裂素结合;(三)较高浓度的2,4-D和较低浓度的细胞分裂素结合(见表1)。在接种后5—10天,已有个别外植体萌发成苗,多数苗在30—40天内得到。在BM培养基上,接种42个外植体仅得到两株苗,后来证明其中一株为杂种。在附加外源激素的培养基上可以大大提高外植体的出苗率。如在第二类培养基上,出苗率提高到7—12%,

表1 在不同培养基上的出苗率

培养基 Media	接种子房数 No. of ovaries inoculated	出苗数 No. of seedlings obtained	出苗率(%) Germination (%)
BM	42	2(1) ^b	4.8
MS+2,4-D0.05+BA1.0	25	3	12.0
MS+2,4-D0.05+KT1.0	68	5	7.4
MS+2,4-D2.0+BA0.05	53	2 ^c	3.8
MS+2,4-D2.0+KT0.05	58	0	0
MS+2,4-D2.0+ZT0.1	18	1 ^c	5.6
总 计	264	13	
MS+BA1.0	9 ^a	2	22.2
MS+TDZ0.02	11 ^a	7(1) ^b	63.6

a: 在BM上培养90天后转移到新培养基上

After culturing for 90 days on BM, the pollinated ovaries were transferred on fresh MS media supplemented with BA or TDZ 0.02

b: (1) 真杂种 Hybrids

c: 苗基部产生大量愈伤组织

A lot of callus was produced at the lower part of the seedling

但所得的苗,全部为假杂种。在第三类培养基上,也可得到少量的苗,但苗基部长有大量的愈伤组织,甚至全部愈伤组织化,最后大都死亡。在BM培养基上培养90天未出苗的外植体选择其中一部分转移到附加BA1.0(单位为毫克/升,下同)或TDZ0.02的MS培养基上继代培养,30—40天后,共有9个外植体出苗,其中有1个是真杂种。

2.2 杂种F₁试管苗繁殖

将得到的22株苗按株系进行繁殖,其中11个株系在第二次转移到繁殖培养基上中途夭亡,只有11个株系保存下来。在进行F₁试管苗扩大繁殖的同时,试验了各种不同的细胞分裂素单独使用及其与低浓度的生长素结合使用的效果,列入表2。由表2看出,三种细胞分裂素在单独使用时,都有促进分蘖的作用,其中以TDZ作用最强,BA次之,KT的作用最弱。细胞分裂素与生长素结合使用,可以明显地增加繁殖系数,同时促进生根。BA1.0、TTZ0.2单独使用或者分别与IAA0.05结合使用,虽然可提高繁殖系数,但苗生长弱,部分叶变黄,矮小,甚至出现叶反卷等不正常现象。在TDZ0.02单独使用或者与IAA0.05结合使用的培养基上,苗生长繁殖最好,因此,我们用它作为主要繁殖培养基,进行继代培养20余次,得到大量生长健壮的试管苗。

表2 不同种类植物激素对试管苗的影响

Table 2 Influence of different hormones on the propagation and growth of seedling obtained from pollinated ovaries

培养基 Media	繁殖系数 Multiplication rate	平均苗高(cm) Average height of the shoots	叶颜色 Leaf colour	生根率(%) Rooting rate	苗长势 Growth of shoots
MS	4	8.9	黄绿	70	+++
MS+KT1.0	14	5.7	黄绿	50	+++
MS+KT1.0+IAA0.05	27	4.1	黄绿	65.7	+++
MS+BA1.0	28	2.5	黄绿	16.7	+
MS+BA1.0+IAA0.05	37	2.3	黄绿	25	+
MS+TDZ0.02	17	6.8	深绿	25	++++
MS+TDZ0.02+IAA0.05	31	6.0	深绿	40	++++
MS+TDZ0.2	30	2.9	黄绿	0	++
MS+TDZ0.2+IAA0.05	40	2.3	黄绿	0	++

+ 苗矮小细弱大部分叶片反卷。

+ Small seedlings whose leaves are mostly curled and abnormal

++ 苗矮小少部分叶卷。

++ Small seedlings, some leaves are curled.

+++ 苗生长正常。

+++ Seedlings growing normally.

++++ 苗生长很好

++++ Seedlings growing very well.

2.3 试管苗生根与移栽

F₁试管苗在BM上,生根率可达70%,在繁殖培养基上,也有部分试管苗生根。但频率较低(见表2)。如将试管苗转移到MS+IAA0.1—0.5的培养基上,生根率可达到100%。试管苗生根15—20天后,将生根苗从三象瓶内取出,用自来水反复洗净粘在苗和

根上的琼脂, 移栽于盛有腐殖质土或腐殖质土 + 蛭石(1:1)的花盆内, 移栽成活率约 95%。

2.4 杂种 F₁ 形态学观察

杂种 F₁ 在株高、穗长、穗粗、茎节数, 每穗小穗数等性状方面, 比母本具有其明显的优势(见表 3)。杂种 F₁ 的分蘖数平均为 5, 也超过母本, 并且具有大量节上分枝。杂种 F₁

表 3 杂种 F₁ 及双亲形态特征比较

Table 3 Comparison of morphological characters of hybrid F₁ with those of their parents

性 状 Characters	谷 子 (<i>S. italica</i>) Ch4n		法氏狗尾草 <i>S. faberii</i> ordinary plants	杂种 F ₁ 代 Hybrid F ₁ plants
	组培苗 * Culture plants	非组培苗 Ordinary plants		
株 高 (cm) Plant hight	37.2	117.3	92	60.58
茎 粗 (cm) Stem diameter	2.54	3.8	4	1.75
穗 长 (cm) Ear length	3.76	11.3	13	9.68
穗 粗 (cm) Ear diameter	1.0	2.2	1.0	1.58
茎节数 No. of nodes	4	9	9	6
分蘖数 No. of tillers	3/0	1	10/14 节上分枝	5/13 节上分枝
小穗刚毛数 No. of seta spikelet	10	12	15	11.3
小花数/小穗 No. of floret/spikelet	8	13.0	1-5	6-9
小穗数/穗 No of spikelets/spike	53	62.0	242	90
籽粒长 (mm) Grain length	3.0		2.9	3
籽粒宽 (mm) Grain width	2.0		1.5	1.5
千粒重 (g) 1000-grain wt.		4.18	2.46	3.2
花 序 Inflorescence	圆锥花序纺锤形 Panicle, spindle-shaped		紧密呈园柱形 Close cylinder	圆锥花序, 柱状, 紧密 Panicle, cylinder, close
籽 粒 Grains	黄色, 椭圆形, 先端钝 Yellow, ellipse the apex obtuse		黑色, 椭圆形, 先端尖 Black, lelipse, the apex acute	黑亮粒先端形状介于双亲间 Black lustre, apex showed intermediate type of parents
刚毛长 (mm) Length of seta	7.3		13	10

* 为假杂种, 减数分裂与母本相同(Pseudo-hybrids, meiosis of which is similar to female parents)

小穗刚毛较长,而且每小穗刚毛数目多,刚毛粗糙发达,坚硬直立,明显伸出小穗,与父本相似,而谷子 Ch4n 刚毛柔软弯曲,较短。杂种 F_1 的小花形状和穗形与父本相接近。 F_1 植株高度不育,开放授粉,秋季仅得到一粒种子。用母本花粉回交后也仅仅得到少数几粒种子。子粒黑色发亮,比法氏狗尾草种子颜色深,千粒重 3.2 克,介于父本(2.46 克)、母本(4.18 克)之间,子粒易脱落,未结实的小花也易脱落,刚毛宿存,具有野生性。总之,杂种 F_1 的形态特征介于双亲之间,植株在许多性状上都与父本法氏狗尾草相似,而与母本相差较远。从而证明它确是真杂种。

2.5 F_1 的细胞学观察

对经试管繁殖移栽成活并发育到成熟的 11 个株系的试管苗的花粉母细胞减数分裂中的染色体行为,进行了观察,多数为假杂种,染色体行为与 Ch4n 相同,仅发现其中有 2 个株系为真杂种,杂种 F_1 的染色体数为 $2n=4x=36$ (图版-8)。小孢子母细胞的减数分裂中期 I 染色体配对不正常(图版-9); (1) 在 30 个减数分裂中期 I 细胞中,观察到 29 个细胞中有 3—13 个二价体,有一个细胞不含二价体,但含有 9 个三价体和 9 个单价体; (2) 在 29 个细胞中有 1—9 个三价体,但有一个细胞含有 18 个单价体和 9 个二价体; (3) 少数细胞(约 13.3%)中有 1—3 个四价体(图版-1); (4) 所有细胞中均有单价体出现,数目变动在 2—18 之间,平均单价体数为 9.1 ± 3.6 ; (5) 减数分裂中期 I 细胞中,二价体、三价体和四价体数目的总和和分布于 9—15 之间,平均数为 11.4 ± 1.8 ,而且又以 11 的频率最高,占总细胞的 26.7%,见表 4。

在减数分裂后期 I 染色体的分离也不正常(图版-10),其中,二价染色体正常地向纺锤体的两极分离;三价体产生不等分离;单价染色体随机移向两极,有部分单价体在分裂后期 I 和末期 I 形成落后染色体,这些落后染色体有一部分被包在子核内形成了微核,分裂后期 I 和末期 I 有部分落后染色体分裂成染色单体,也常能看到染色体桥。



图 1 F_1 花粉母细胞减数分裂中期 I 示 9I+7II+3III+1IV(根据显微照片给图)
Fig. 1 Chromosome configuration in metaphase I of PMC meiosis of F_1 was 9I+7II+3III+1IV
(Drawn according to photomicrograph)

减数分裂的第二次分裂也很不正常,尤其在微核的形成上,结果常常形成不规则的四分体,甚至五分体、六分体和微型小孢子。花粉粒空瘪、败育。显而易见:形成大量败育花粉粒是因减数分裂不正常所造成的,因而最后造成了 F_1 植株高度不育。大孢子母细胞可能也由于同样原因产生不正常大孢子,回交时也只得极少种子。

表 4 二价体、三价体、四价体减数分裂中期 IPM 中总数的分布

Table 4 Total distribution of bivalent, trivalent and tetravalent in meiosis metaphase I of PMC

项 目 Item	数 值 Numerical value								
II+III+IV 细胞数 No. of cells	8	9	10	11	12	13	14	15	
百分比(%) Percent (%)	0	3	6	8	5	3	3	2	
	0	10	20	26.7	16.7	10	10	6.7	

3 讨 论

造成谷子远缘杂交不亲和性的原因之一为杂种胚早期夭亡, 因而得不到杂种种子。我们的试验表明在组织培养条件下, 将谷子 Ch4n × 法氏狗尾草的已授粉子房进行培养可以得到杂种 F₁ 的试管苗, 这证明离体培养可能拯救濒于夭折的杂种幼胚, 这是克服植物种间远缘杂交不亲和性的一条有效途径, 它对远缘杂交在生产中的应用具有重要意义(Laibach, 1929)^[1]。一般认为: 杂种胚的夭亡可能与母体的激素类物质对于克服幼胚夭亡是非常重要的(Islam, 1964, Krus, 1967)^[1]。我们在不含激素状态不适宜有关, 因此培养基中的激素物质的 BM 培养基上, 对谷子 Ch4n × 法氏狗尾草的已授粉子房已诱导出苗, 并且还得到杂种。这表明已授粉子房可能含有杂种胚发育所需的激素类物质, 所以外源激素并不是绝对必需的。外源激素, 特别是细胞分裂素的存在, 可提高已授粉子房的出苗率。但在我们的实验中, 未能从含 CTK 的 MS 培养基上直接得到杂种苗。值得注意的是有一个杂种苗是取自在 BM 上培养 90 天后又转移到含有 TDZ0.02 的培养基上的外植体。这似乎说明, 这些子房中含有的激素类物质虽不足以促使杂种胚出苗, 但仍可维持其生存的最低需要, 杂种胚在 BM 上培养 90 天后, 一旦被转移到含 CTK 的培养基上即可萌发成苗。

种间杂交不亲和性是生物种间的生殖隔离的一种表现, 在谷子 Ch4n × 法氏狗尾草杂交中, 经过杂种胚培养, 得到了杂种 F₁, 杂种 F₁ 的高度不育性和具有一系列介于双亲之间性状的表现可做为鉴定真伪杂种的重要指标之一。另外, 杂种 F₁ 花粉母细胞(PMC)减数分裂中期 I 染色体配对不正常, 存在着大量的二价体和三价体, 在有些细胞中还存在着四价体, 有些细胞中具有 9 个三价体和 9 个单价体, 而另一些细胞中则有 9 个二价体和 18 个单价体, 这些数值不仅证明其杂种的真实性而且还可以说明亲本的遗传组成及其染色体组之间的同源性或部分同源性的关系。在杂种 F₁ 中母本谷子 Ch4n 配子提供两个同源染色体组, 李竞雄^[6] 研究指出: 法氏狗尾草所提供的两个染色体组是不同源的, 而且其中有一组是与谷子染色体组完全同源的。但我们的观察表明: 法氏狗尾草与谷子中有同源关系的染色体组之间并不完全相同, 可能只是部分同源。F₁ 减数分裂中期 I 大量单价体(2—18, 其平均数为 9) 的出现, 也表明法氏狗尾草的两个染色体组之间缺乏部分同源染色体配对, 最易出现 18 个单价体, 或者由于法氏狗尾草与谷子染色体部分同源配对时形成了三价体, 因此减少了单价体的数目。在所观察的花粉母细胞中, 二价体数、三价体数与四价体数之总和不同程度的大于狗尾草属基本染色体数 9(x=9) 这些超过 9 的配对染色体间是部分同源配对或是由于缺少同源染色体而形成的异源配对, 目前还不清楚, 有待进一步研究。

以上结果表明, 可以通过远缘杂交和杂种胚培养技术相结合, 成功地将狗尾草的遗传物质和有益性状导入谷子栽培品种中。

参 考 文 献

- [1] 植物组织和细胞培养, 1978, 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译, 上海科学技术出版社, 上海。
- [2] 朱至清等, 1985, 遗传学报, 12(6), 430—433。
- [3] 付杰等, 1987, 西北植物学报, 7(1), 37—43。
- [4] 舒理慧等, 1990, 作物学报, 16(3), 259—265。

- [5] 周俊彦等, 1988, 作物学报, 14(3), 227—231.
- [6] Li et al., 1942, Interspecific crosses in *Setaria*. II. Cytological studies of interspecific hybrid involving: 1, *S. faberii* and *S. italica*, and 2, a three way cross, F₂ of *S. italica* × *S. viridis* and *S. faberii*. J. Heredity, 33, 351—353.
- [7] Nakamura, C. et al., 1981, Theor. Appl. Genet., 60, 89—96.

Immature Embryo Culture of a Cross between *Setaria italica* (Ch4n) and *S. faberii* and Studies on the Morphological and Cytological Characteristics of the F₁ Plant

Luo Xin-tan Guo Fu-xing Zhou Jun-yan Ma Hui

(Northwest Institute of Botany, Academia Sinica, Yangling Shaanxi 712100)

Wu Qun-ming Zhu Guang-qin Ma Yun-tong

(Agricultural Academy of Shaanxi)

Abstract

Immature embryo culture of a wide cross, *Setaria italica* (Ch4n)/*S. faberii*, was carried out in 1989. 22 seedlings were obtained from 264 pollinated ovaries cultured on modified MS medium with or without growth regulators, but only 11 survived after the second subculture. They were propagated into numerous plantlets and then transplanted to soil. Most of them grew up to flowering. Results of cytological examination of the pollen mother cells at meiosis and observation of the morphological characters of the adult revealed that only 2 lines were true hybrids whose chromosome numbers were $2n=4x=36$, and whose chromosome pairing at the metaphase I of meiosis were irregular. The chromosome configuration was $(2-18)I+(0-13)II=(0-9)III+(0-3)IV$ and the chromosome disjunction at the anaphase I of meiosis were also irregular. Abnormal tetrads and mini-spores were formed and the pollens were abortive. The hybrid F₁ plant was sterile and its morphological characters were somewhat intermediate between those of the parents, although nearer to the male parent.

Key words *Setaria italica*, *S. faberii*, Immature embryo culture, Hybrid

Explanation of photograph

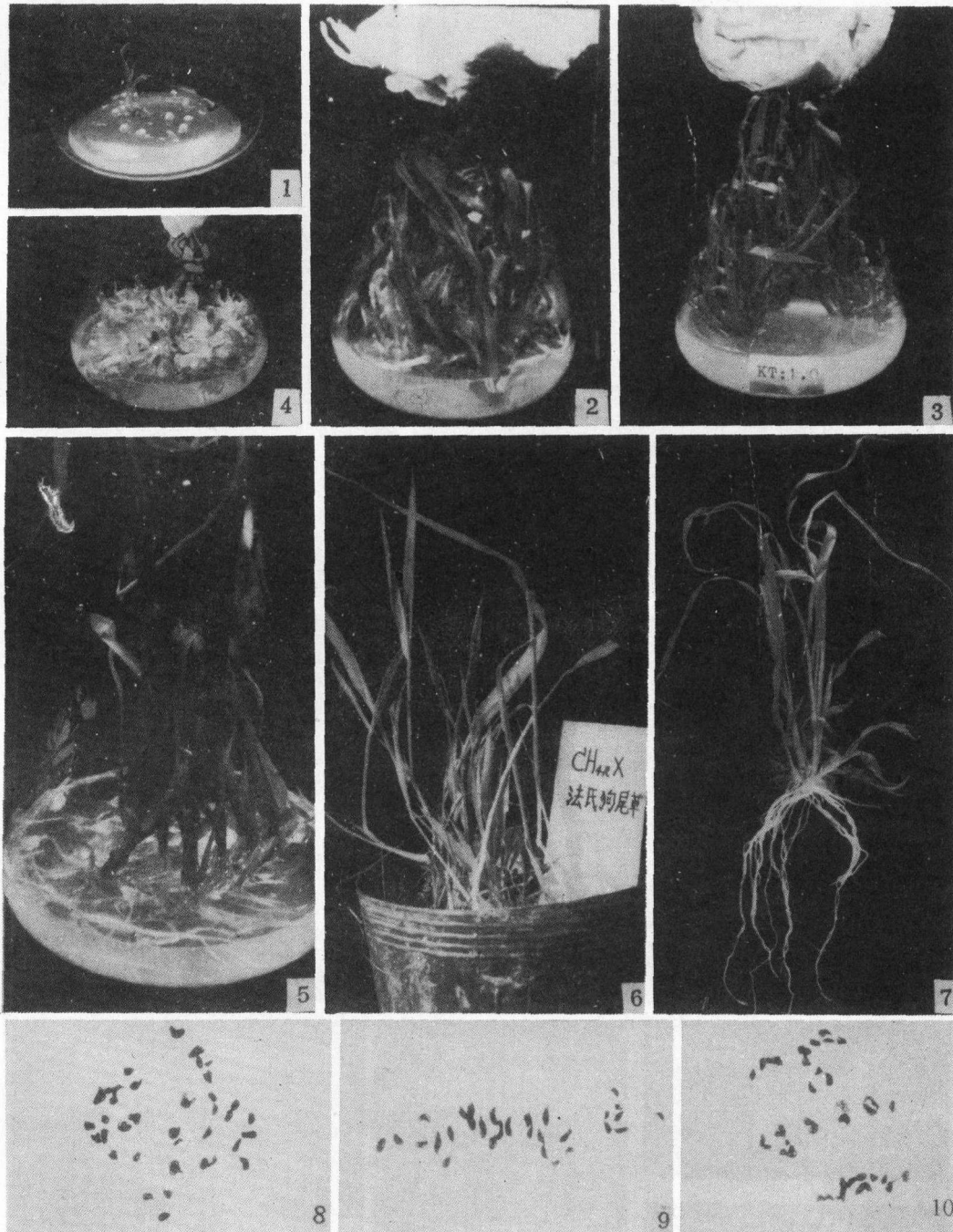
1. Shoots got from pollinated ovaries on the BM (MS medium without any plant growth regulator) 2. Shoots tillering on the MS medium with TDZ 0.02 3. Shoots tillering on the MS medium supplemented with KT1.0 4. A number of small shoots grown on the MS medium with BA1.0 5. Shoots tillering and rooting on the BM 6. Plant lets were transplanted into soil and most of them grew up to earing 7. Plantlets 8. Chromosome numbers in metaphase of meiosis of F₁ were $2n=4x=36$ 9. Chromosome configuration in metaphase I of meiosis of F₁ was $14I+8II+2III$ 10. Lagging chromosome in anaphase I of meiosis of F₁.

罗新谈等: 谷子 (*Setaria italica*) Ch4n × 法氏狗尾草 (*S. faberii*) 杂种幼胚培养及杂种 F₁ 的鉴定

图版 I

Luo Xin-tan et al.: Hybrid embryo culture of (*Setaria italica*) Ch4n × (*S. faberii*) and identification of F₁ plants

Plate I



图版说明

1. 在 BM 上已授粉的子房出苗; 2. 在 MS+TDZ0.02 上苗分蘖; 3. 在 MS+KT1.0 上苗分蘖; 4. 在 MS+BA1.0 上形成大量矮小分蘖苗; 5. 在 BM 培养基上苗分蘖和生根; 6. 移栽成活的试管苗; 7. 生根试管苗; 8. F₁ 减数分裂中期 I 染色体数 $2n=36$; 9. F₁ 减数分裂中期 I $14I+8II+2III$; 10. F₁ 减数分裂后期 I 落后染色体。