

混合小麦亲本与新麦草不对称体细胞杂交体系的建立

李翠玲 夏光敏*

(山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘 要 以小麦品种济南 177 悬浮细胞系来源的原生质体与同品系胚性愈伤组织制备的原生质体混合后作为受体,以经过 $380\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 紫外线照射 1min、2min 的新麦草原生质体分别作为供体,用 PEG 法诱导融合。组合 I(176 + cha9 + 新麦草 UV 1min) 获得 16 个再生克隆。经过形态学、同工酶、染色体和 RAPD 分析,确定其全部为属间体细胞杂种。其中的 5 个克隆再生杂种植株。用 7 对小麦 SSR 引物对杂种克隆的叶绿体基因组进行了分析。组合 II(176 + cha9 + 新麦草 UV 2min) 只获得 3 个克隆,且逐渐褐化死亡。表明以小麦济南 177 的两种培养细胞混合作受体的融合体系有利于杂种的获得及再生,紫外线对融合产物的生长发育有明显的剂量效应。

关键词 小麦 新麦草 不对称体细胞杂交 再生体系 RAPD

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0610-05

植物体细胞杂交技术能有效地克服有性杂交的不亲和性,同时实现细胞核基因和胞质基因的转移,创造远缘体细胞杂种。不对称体细胞杂交可以转移供体细胞中的少数染色体、染色体片段以及胞质基因组,获得转移部分供体核基因组的不对称杂种,或者仅有胞质基因组重组的胞质杂种,因此,体细胞杂交技术在作物遗传改良中占有特殊的地位^[1,2]。小麦是世界上最重要的粮食作物之一,对其产量、品质及抗性进行改良具有非常重要的意义。在小麦的一些野生近缘种中,存在许多对小麦品质改良有用的基因,利用体细胞杂交技术,可将这些基因转移到小麦中,是丰富小麦种质资源的一条重要途径。

新麦草(*P. juncea*(Fisch.)Nevski $2n = 14$)属禾本科(Poaceae)小麦族(Triticeae)新麦草属(*Psathyrostachys* Nevski),为山地草原及山地半荒漠常见牧草,具有耐寒、耐旱、耐盐碱、耐贫瘠、抗病害等优良性状,尤其对小麦主要病害,如黄矮病(Comeau and Plourde 1987)、白粉病、赤霉病、叶锈及条锈病有很好的抗性。是改良禾谷类的重要种质资源^[3,4,5]。因此研究新麦草的基因组和基因向小麦转移的方法具有重要意义。小麦与新麦草的远缘杂交十分困难,至今仅有极少数成功的报道^[6]。但目前还未见在育种中利用的报道。本实验室曾在 1996 年简要报道过小麦与新麦草的体细胞杂交,但杂种再生频率低,未能结实^[7]。因此,有必要探索新的融合体系,为利用体细胞杂交技术将新麦草中的目标性状转移到小麦奠定基础。

小麦(*Triticum aestivum* L.)品种济南 177 幼胚来源的愈伤组织经过长期的继代培养后,形成了两种类型的细胞系。其中胚性愈伤组织 176 结构紧密,具有分化能力,但分裂能

力较弱,而非胚性愈伤组织 cha9 结构松散,其形成的悬浮细胞系分裂旺盛,但由于继代时间较 176 长,已经丧失植株再生能力。本文报道用济南 177 的两种培养细胞 cha9 和 176 混合作为受体,与 UV 照射的新麦草培养细胞进行融合,通过基因组互补,获得小麦与新麦草的属间不对称体细胞杂种植株。

1 材料与方 法

1.1 双亲原生质体的游离

以小麦品种济南 177 的悬浮细胞系 cha9 及胚性愈伤组织 176 为材料,在含 2,4-D 为 2 mg/L 的液体和固体 MB 培养基上继代培养,取继代 3d 的悬浮细胞系和继代 7d 的胚性愈伤组织游离原生质体。方法参照文献[8,9]。

新麦草原生质体来源于其分裂旺盛的悬浮细胞系。其继代培养基同小麦。由于长期继代,在进行融合实验时,分化能力已经丧失。取继代 3d 的悬浮细胞系,按材料:酶液 = 1:2 的比例混合,于 25℃ 缓慢振荡游离 8 h。酶液成分:1% 纤维素酶 RS,1% 半纤维素酶,0.5% 的果胶酶 Y-23,5 mmol/L MES,0.6 mol/L 甘露醇,5 mmol/L CaCl_2 , pH 5.8。原生质体收集方法同小麦,用洗液(0.6 mol/L 甘露醇,5 mmol/L CaCl_2 , pH 5.8)将密度调至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取直径为 3.5 cm 的培养皿放入约 0.2 mL 悬浮液,在皿底成一薄层,用强度为 $380\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线照射 1min、2min 后作为融合供体。

1.2 原生质体的融合和培养

将两种小麦的原生质体按 1:1 的比例混合后与等体积的新麦草原生质体混合均匀,用 PEG 法诱导融合,设计的融合组合如下:

收稿日期 2003-12-10,修回日期 2004-03-17。

基金项目 国家自然科学基金项目(No.30370857)和国家 863 高技术项目(No.2001AA241032)资助。

* 通讯作者。Tel:86-531-8364525;E-mail:Xiagn@sdu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

I 176 + cha9 + 新麦草 1min ;II 176 + cha9 + 新麦草 2min ;III 176 + 新麦草 ;IV cha9 + 新麦草 ;V 176 + cha9

以单独培养的双亲原生质体及混合双亲原生质体作为对照,用 P₅ 培养基 25℃ 下暗培养。培养再生的愈伤组织长至 1.5~2.0 mm 大小时,分别挑出转至增殖培养基上增殖,增殖 1~2 个月后,转至分化培养基上^[9],诱导植株再生。

1.3 再生愈伤组织、克隆的鉴定

1.3.1 同工酶分析:取再生愈伤组织及亲本,加入 2 倍体积的 1mol/L Tris·HCl (pH 8.3) 充分研磨,4℃ 沉降 2 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,用聚丙烯酰胺凝胶电泳作过氧化物同工酶分析,电泳及染色方法同文献^[10] (胡能书等 1985)。

1.3.2 染色体分析:挑取生长旺盛的亲本及再生愈伤组织进行低温预处理,用压片法制片^[4]。

1.3.3 RAPD 分析:CTAB 法提取再生愈伤组织及亲本的基因组总 DNA^[11,12]。选用 8 个随机 RAPD 引物 OPA-01, OPA-17, OPA-19, OPF-05, OPF-12, OPH-04, OPH-20 和 OPG-19 (Operon 10-mer primer, Operon Technology, USA)。PCR 扩增反应条件参考夏光敏等的报道^[4]。扩增产物用 TAE 缓冲的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像仪照相。

表 1 所用 SSR 引物的序列

Table 1 The sequence of the SSR primers

Locus	Location (gene)	Repeat	Primer sequence (5'-3')
WCt6	Intergenic region (<i>trnC-rpoB</i>)	(C)10	TCACAGGCTGCAAAATTCAG GGATAATAATGCTGTCCGACC
WCt7	coding region (<i>ropC2</i>)	(A)12	ATCGTCCCAACAAGACAAG AGGGTTAAATGTTAAATGGGG
WCt9	Intergenic region (<i>atpI-atpH</i>)	(T)12	CGCAGCCTATATAGGTGAATCC TTGCAACCAAGCAGATTATCC
WCt11	Intron (<i>atpF</i>)	(A)14	TTTTATCTAGGCGGAAGAGTCC TCATTTGGCTCTCACGGCTC
WCt13	Intergenic region (<i>trnF-ndhJ</i>)	(A)15	TGAAAATCTCGTGTACCA TGTATCACAAATCCATCTCGAGG
WCt20	Coding region (<i>infA</i>)	(T)10	TTCCATGGGTAGGGCTTC GTAATGCCCCCGCTATAGT
WCt23	Intergenic region (<i>rpl14-rpl16</i>)	(T)10	TCCAGAAAAGAAAACCGGG TAGCTGCCAGTAAAAATGCC

1.3.4 SSR 分析:CTAB 法提取再生愈伤组织及亲本的基因组总 DNA,小麦叶绿体特异的 SSR 引物(表 1)及 PCR 扩增和电泳条件参考文献^[13] (Ishii *et al.*, 2001),电泳完毕后,凝胶置于 1L 脱色液(10% 冰醋酸)中摇床振荡脱色 40 min,水洗 3 次,时间分别是 5 min、5 min、10 min;摇床振荡银染 30 min,(银染液:1g AgNO₃ + 1.5 mL 甲醛 + 1L 水);水洗 5 min;置于预冷的显影液(30g NaCO₃ + 1.5 mL 37% 甲醛和 200μL 10 mg/mL Na₂S₂O₃ + 1L H₂O)中振荡显影至条带清晰;1L 固定/停显液(10% 冰醋酸)中摇床振荡停显 3~5 min;水洗 2 次,每次 2 min;室温干燥,观察,拍照^[14]。

2 结果

2.1 融合产物的培养与植株再生

融合产物在培养 7~8 d 时发生第一次分裂,约 40 d 后

形成小愈伤组织。其中组合 I 再生 16 个克隆,再生克隆长至 2~3 cm 时转至含 1mg/L 2,4-D 的 MB 培养基上增殖,继代 1~2 次后转至分化培养基上分化。其中 5 个克隆再生出绿色植株,再生频率为 32%。这些克隆扩散迅速,植株形态偏向小麦(图 1)。

组合 II 在培养约 60 d 后再生了 3 个克隆,再生愈伤组织转到增殖培养基上继代几次后,褐化现象严重,生长缓慢,不能分化成植株。在培养 3 个月以后由于褐化严重而死亡。组合 III 和 IV 在分裂 1 次后停止生长,不能再生愈伤组织。组合 V 的细胞有一定程度的增殖,只形成部分的小细胞团,未能形成愈伤组织。

作为对照培养的济南 177 悬浮系 cha9 的原生质体在分裂几次后停止生长,未得到再生的愈伤组织;济南 177 胚性愈伤组织 176 来源的原生质体没有观察到分裂。新麦草悬浮系来源的原生质体在本实验条件下不分裂。亲本原生质体混合培养后 5~6 d 观察到有分裂,形成较多的细胞团,但均未形成愈伤组织。

2.2 融合再生愈伤组织杂种性质的鉴定

2.2.1 同工酶分析:组合 I 再生克隆的过氧化物同工酶分析发现,16 个再生克隆中都含有小麦特征谱带及新麦草的 1~2 条特征谱带。其中 3、5、7 号克隆中还出现了新带(图 2)。表明所获得的再生克隆均为体细胞杂种。



图 1 6号克隆的杂种植株

Fig. 1 Hybrid plant from No. 6 hybrid clone

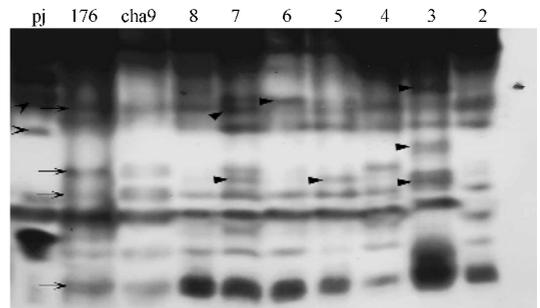


图 2 过氧化物酶分析结果

Fig. 2 Peroxidase analysis of the parental and regenerated clones
→: characteristic bands of wheat; >: characteristic bands of *P. juncea*;
▶: new bands; 176, cha9 (lane 2, 3): two lines of wheat Jinan 177; pj (lane 1): *P. juncea*

2.2.2 染色体分析结果:在对照亲本中,两种类型的小麦(2n=42)愈伤组织由于继代时间不同,染色体数目有很大的

差异。176 的染色体数目是 32~38 条, cha9 的染色体数目约为 24~28 条。新麦草 ($2n=14$) 的愈伤组织经过 7 年的继代和筛选, 其染色体数目也发生了一定程度上的变异, 多为 11~14 条(图 3A-C)。杂种克隆中, 染色体的数目多分布于 35~55 之间(表 2)。有分化能力的杂种克隆的染色体数目大多数在 40~50 之间, 平均染色体数目为 46 条(表 2)。在所有再生克隆中都观察到有少量染色体断片的存在(图 3D~F)。

表 2 部分再生克隆的染色体分析

Table 2 The chromosome numbers of some regenerated clones

Chromosome number	Clone 3	Clone 6	Clone 9	Clone 12
< 35	Number 13	6	4	1
	Ratio/% 14.4	7	4	3
35 - 45	Number 53	28	39	18
	Ratio/% 59	33	39	60
45 - 55	Number 18	44	49	9
	Ratio/% 20	52	49	30
> 55	Number 6	7	8	2
	Ratio/% 6.6	8	8	7
Total number analysed	90	85	100	30

2.2.3 RAPD 分析: 选用 8 对 RAPD 引物对 16 个克隆的再生愈伤组织及亲本总基因组 DNA 进行 PCR 扩增。所有克隆都具有双亲特征带, 但是带型普遍偏向小麦。部分克隆出现新带(图 4)。同一小麦济南 177 来源的愈伤组织 176 和悬浮系 cha9, 由于不同的组织培养变异, 在部分引物的扩增带型有差异。在 OPH4 的扩增产物中, 杂种克隆 2、3、4、5、7、10、11、12 分别具有 176 和 cha9 的特征带, 从分子水平上证明了两种类型的小麦细胞都参与了融合过程(图 4)。

2.2.5 SSR 分析: 在选用的 7 对引物中, 亲本之间的扩增谱带有差异的是 Wct6、Wct7、Wct9、Wct11、Wct20、Wct23 六对引物。而在这六对引物中, 所有再生克隆的扩增带型都与小麦的带型完全相同, 没有新麦草的特征带。引物 Wct13 在亲本和所有再生克隆中的扩增带型相同, 没有多态性。Wct6 的扩增结果如图 5 所示。

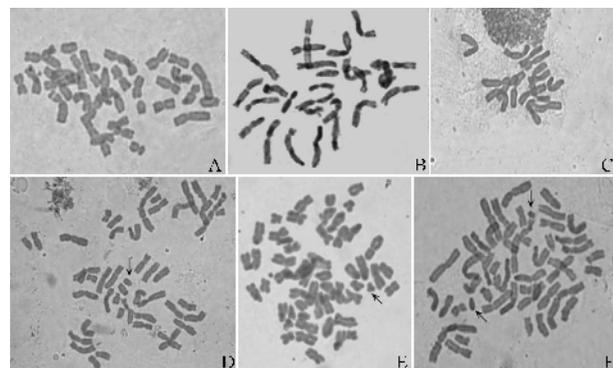


图 3 再生克隆及亲本染色体分析

Fig. 3 Chromosomes of the parental and regenerated clones
 ↑ chromosome fragments; A callus chromosomes of wheat (176) ($2n=34$); B chromosome numbers of wheat suspension (cha9) ($2n=27$); C chromosomes of *P. juncea* ($2n=14$); D chromosomes of clone No. 6 ($2n=48$); E chromosomes of clone No. 9 ($2n=50$); F chromosomes of clone No. 12 ($2n=46$)

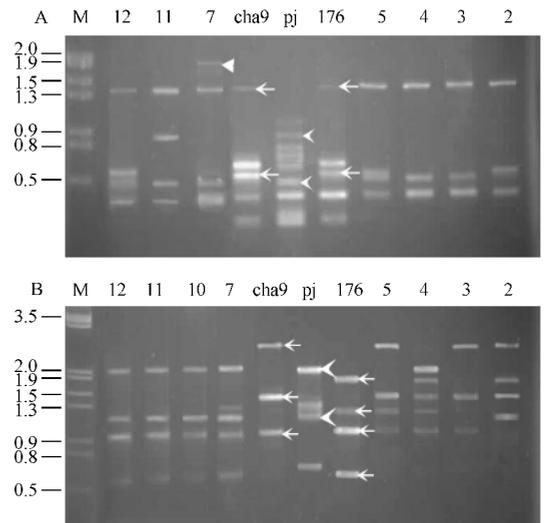


图 4 RAPD 引物 OPF12(A) 和 OPH4(B) 的扩增结果

Fig. 4 RAPD analysis of regenerated clones and the parents

Cha9, 176 the two lines of wheat Jinan177; pj: *P. juncea*; 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12 number of the regenerated clones; M: λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I molecular marker. A electrophoresis pattern of RAPD with primer OPF-12; B electrophoresis pattern of RAPD with primer OPH-4; ← characteristic bands of wheat; < characteristic bands of *P. juncea*; ◀ new bands

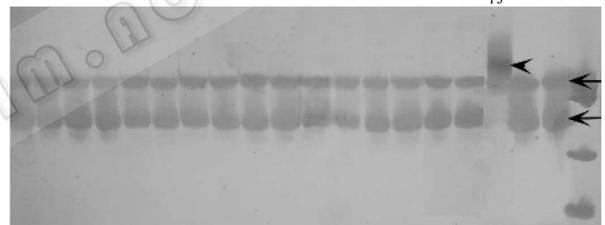


图 5 SSR 引物 Wct6 的扩增结果

Fig. 5 SSR analysis result of regenerated clones and the parents with primer Wct6 (Cha9, 176) the two lines of wheat

3 讨论

由于受基因型及胚性细胞系不能长期保持等因素的限制, 小麦的体细胞杂交体系难以建立。在早期的实验中, 我们利用小麦济南 177 的胚性悬浮系与新麦草愈伤组织为材料分离原生质体并进行与本实验相似的紫外融合, 曾获得杂种植株^[7]。但此悬浮细胞系的胚性未能长期保持。利用新建立的胚性愈伤组织作材料虽有再生能力, 其原生质体不能分裂。而建立新的胚性悬浮系周期长, 难度大, 建成后又会很快丧失胚性。为此, 建立新的小麦融合体系已成为小麦体细胞杂交技术的关键问题。

小麦济南 177 经过长期的继代培养, 形成了两种细胞系: 分化能力高的胚性愈伤组织 176 和快速分裂的悬浮细胞系 cha9。由于体细胞无性系变异, 它们的染色体都有不同程度的削减, 其中 Cha9 的染色体数目仅为 24~28 (Fig. 2b), 176 的染色体数目只有 32~38 (Fig. 2a) 条。可能其中一些控制再生和分化的染色体或者基因组发生了变异, 所以单独用 176 或者 Cha9 与新麦草进行融合, 都只有一定程度的细胞增殖, 不能获得再生愈伤组织及植株。本试验将这两种细

胞系混合后作为受体,与 UV 处理的新麦草融合获得了绿色再生植株。这可能是由于 cha9 的快速分裂能力与 176 的再生能力相互补偿后,所得到的融合产物才可能具有持续分裂和再生的能力。所以 cha9 和 176 的遗传物质对于小麦与新麦草融合后,愈伤组织及植株的再生是必要的^[14]。在小麦与簇毛麦的体细胞杂交中,我们首次试验了此融合体系,但当时认为其中的一个细胞系 cha9 起到看护作用^[15]。本实验的 RAPD 分析发现,所选用的 8 对引物对 176 和 cha9 的扩增谱带之间都有差异,表明组织培养过程造成了两类型培养细胞基因组的差异。从图 4 中 OPH4 引物的扩增结果可以看出,所分析的再生克隆中分别含有 176、cha9、新麦草的特征带,表明在这些克隆中,三种细胞系都参与了融合过程,杂种克隆再生是三个细胞系基因组互补的结果。小麦的愈伤组织诱导和原生质体培养是高度基因型依赖的,所以这种互补细胞系的发现,对小麦体细胞杂交新体系的建立具有重要的

意义。除了杂种植株因基因组互补而再生以外,在本实验中,所有组合 I 的再生克隆经检测全部为杂种,因此,在此融合体系中,体细胞杂种存在着优势生长现象^[16],这对于杂种愈伤组织的形成和筛选也是十分有利的。

对杂种克隆及双亲的染色体分析表明,其染色体数目并不是简单的亲本之和(67~80)。大多数细胞的染色体在 36~55 这个范围内,其中染色体数目在 42~50 条左右的杂种克隆易于再生植株(表 2、3)。这表明在融合后,细胞内的染色体发生了一定程度上的削减,从而使细胞内的遗传物质达到相对平衡的状态。部分杂种克隆具有与再生克隆相似的染色体数目(表 3)却未能再生植株。这可能与杂种中的三亲基因组未能互补有关。在许多杂种细胞中发现有染色体断片的存在。断片形成的原因及染色体削减的机制还有待于进一步的研究。

表 3 部分再生克隆的细胞学、同工酶、RAPD 及分化能力的分析

Table 3 Cytology, isozyme and RAPD and differentiation of some regenerated clones

No. of cell clone	Chromosome counting (average)	SCF (small chromosome fragment)	Peroxidase isozyme pattern ^A	RAPD pattern	Differentiation capacity
3	44.62	1~3	P	PN	-
6	46.67	1~2	PN	P	plant
9	46.66	1~3	PN	P	plant
12	46.1	1~2	P	PN	-

A P, containing partial specific bands of both parents; N, containing new band(s). - : no differentiation

UV 照射原生质体能引起染色体的广泛变异,尤其是断裂频率增加和染色体数目削减,有剂量效应^[18]。Forsberg (1998)用 UV 照射拟南芥后,与油菜进行体细胞杂交,发现 UV 照射能够引起染色体片段化,并发现有剂量效应^[17]。在小麦与簇毛麦、小麦与燕麦的 UV 融合中,UV 射线对体细胞杂种染色体削减及片段化也存在剂量效应^[19,20]。表明 UV 的利用对供体染色体削减及转移部分供体遗传物质到受体、获得高度不对称的杂种是可行的。王槐等研究了紫外线对小麦原生质体分裂及染色体变异的影响,发现 UV 对原生质体的分裂及进一步生长有抑制作用,并且剂量过高有致死作用。随着 UV 辐射剂量的增加,获得的再生克隆的数量减少,而再生克隆的分化能力也相应下降。在小麦与谷子、小麦与獐毛的远缘体细胞杂交组合中也发现有类似现象^[21,22]。在本试验中,UV 照射 1min 的组合 I 中,获得了 16 个杂种克隆,但在 UV 照射 2min 的组合 II 中只获得了 3 个克隆,而且由于褐化严重,在继代几次后死亡。这可能是由于高剂量的 UV 照射在直接引起供体染色体削减和断裂的同时,也间接导致受体染色体的伤害,从而使再生克隆致死。因此,在 UV 诱导的不对称体细胞杂交中,适宜的剂量是获得成功的关键因素。

体细胞杂种中叶绿体基因易发生不等分离(偏向一方亲本)或者重组。Buiteveld *et al* (1998)报道在 *Allium anpeloprasum* + *Allium cepa* 的体细胞杂种中,受体核 DNA 的含量与胞质基因的不等分离有关^[23]。从 SSR 分析结果来看,我们

所获得的小麦与新麦草的属间体细胞杂种中,所有克隆的叶绿体都完全偏向小麦(Fig. 5)。这可能与所有杂种克隆均含有较多的小麦核及胞质基因组有关。我们在小麦与其它异属禾草的体细胞杂种中发现有少数位点存在双亲叶绿体 DNA 的整合及重排^[15,24]。与本实验得到的结果不完全一致。由于所检测的叶绿体基因组位点较少,因此对杂种叶绿体基因组的组成规律有待进一步的研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Li F (李锋). Asymmetric somatic hybridization and crop breeding. *Journal of Huizhou University (Nat. Sci.)* (惠州大学学报), 1999, **19**(4): 47-50
- [2] Binsfeld PC, Schnabl H. Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. *Plant Cell Reports*, 2002, **21**: 58-62
- [3] Sun ZX (孙震晓), Xia GM (夏光敏), Chen HM (陈惠民). Tissue culture and chromosome analysis of *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) nevski. *Chinese Bulletin of Botany (植物学通报)*, 1995, **12**(4): 53-54
- [4] Wang Z, Lehmann D, Bell J *et al.* Development of an efficient plant regeneration system for Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*). *Plant Cell Reports*, 2002, **20**: 797-801
- [5] Wei JZ, Zhu FS, Wang R-C *et al.* Cytological and molecular analysis of genetic variation in *Psathyrostachys juncea*. *Acta Agronomica Sinica*, 1997, **23**(1): 7-19
- [6] Chen Q, Zhou RH, Li LH *et al.* First intergenetic hybrid between *Triticum aestivum* and *Psathyrostachys juncea*. *Chinese Science Bulletin*, 1988, **33**: 2071-2074

- regeneration from intergeneric asymmetric hybridization between wheat (*Triticum aestivum* L.) and Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski) and wheat grass (*Agropyron elongatum* (host) Nevishi). *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1996, **41**(16):1382-1386
- [8] Li ZY, Xia GM, Chen HM. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic cell suspension of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 1992, **98**:79-85
- [9] Xia GM, Chen HM. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Leymus chinensis* (trin.) Tzvel. *Plant Science*, 1996, **120**:197-203
- [10] Hu NS (胡能书), Wan GX (万国贤). Application of Isozyme Technique. Changsha: Hunan Sciences and Technology Press, 1985, pp.96-104 (in Chinese)
- [11] Xia GM(夏光敏), Li ZY(李忠宜), Zhou AF(周爱芬) et al. RAPD method for the identification of intergeneric asymmetric somatic hybrid plants of wheat. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*(实验生物学报), 1999, **32**(3):265-271
- [12] Doyle JJ, Doyle JJ. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, **12**:13-15
- [13] Ishii T, Mori N, Ogiwara Y. Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theor Appl Genet*, 2001, **103**:896-904
- [14] Xu CH, Xia GM, Zhi DY et al. Integration of maize nuclear and mitochondrial DNA into the wheat genome through somatic hybridization. *Plant Science*, 2003, **165**:1001-1008
- [15] Zhou AF, Xia GM, Chen XL et al. Production of somatic hybrid plants between two types of wheat protoplasts and the protoplasts of *Haynaldia villosa*. *Acta Botanica Sinica*, 2002, **44**:1004-1008
- [16] Zhou AF(周爱芬), Xia GM(夏光敏), Chen HM(陈惠民). Plant regeneration from asymmetric somatic hybridization between common wheat and *Haynaldia villosa*. *Science in China* (series C)(中国科学), 1996, **26**(1):31-37
- [17] Forsberg J, Dixelius C, Lagercrantz U et al. UV dose-dependent DNA elimination in asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 1998, **131**:65-76
- [18] Wang H(王槐), Xia GM(夏光敏), Chen HM(陈惠民) et al. Effect of UV on the protoplast division and chromosome variation of wheat. *Acta Phytobiologica Sinica*(植物生物学学报), 1994, **4**(1):69-72
- [19] Xiang FN, Xia GM, Chen HM. Effect of UV dosage on somatic hybridization between common wheat (*Triticum aestivum*) and *Avena sativa* L. *Plant Science*, 2003, **164**:697-707
- [20] Zhou AF, Chen XL, Xia GM et al. Study of UV-fusion between common wheat and *Haynaldia villosa*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, **28**(4):305-310
- [21] Yue W, Xia GM, Zhi DY et al. Transfer of salt tolerance from *Aeluropus litoralis* sinensis to wheat (*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization. *Plant Science*, 2001, **161**:259-263
- [22] Li LL, Xia GM, Chen YL et al. Asymmetric hybridization between wheat and millet. *Acta Phytophysiological Sinica*, 2001, **27**(6):455-460
- [23] Buiteveld J, Kassies W, Geels R et al. Biased chloroplast and mitochondrial transmission in somatic hybrids of *Allium ampeloprasum* L. and *Allium cepa* L. *Plant Science*, 1998, **131**:219-228
- [24] Zhou AF, Xia GM, Zhang X et al. Analysis of chromosomal and organellar DNA of somatic hybrids between *Triticum aestivum* and *Haynaldia villosa* Schur. *Mol Genet Gen*, 2001, **265**:387-393

Asymmetric Somatic Hybridization Between Mixed Wheat and *Psathyrostachys juncea*

LI Cui-Ling XIA Guang-Min*

(School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract *Psathyrostachys juncea* is a potential source of useful genes, such as the barley yellow dwarf virus resistance, salt tolerance and drought tolerance, for wheat improvement. Conventional sexual hybridization between wheat and *Psathyrostachys juncea* is very difficult to occur as the two are sexual incompatible. Somatic hybridization is a promising technique for creating hybrids across the sexual border. Here we report a fusion system for somatic hybridization of wheat using PEG method. Mixed protoplasts of two wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Jinan 177) culture cells (cha9 and 176) were used as the recipients to fuse with the donors, the protoplasts of *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski irradiated with ultraviolet light (UV) at an intensity of $380\mu W/cm^2$ for 1 min or 2 min. Sixteen clones were generated in the combination I (wheat 176 + wheat cha9 + *P. juncea* 1 min UV treatment) and five of the hybrid clones could differentiate to green plants. All the regenerated clones were confirmed as somatic hybrids by cytological, isozyme, chromosome and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Chloroplast genome of the hybrids was analyzed using 7 pairs of wheat-specific chloroplast microsatellite (SSR) primers. Three clones were obtained from the combination II (wheat 176 + wheat cha9 + *P. juncea* 2 min UV treatment), and all browned slowly and died in 3 months. This result indicated that the mixed wheat cells was helpful to the formation and regeneration of hybrid callus and the dosage of the UV had significant effect on the development of the fusion products.

Key words *Triticum aestivum* L., *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski, asymmetric somatic hybridization, regeneration system, RAPD

Received: 12-10-2003

This work was supported by a grant from the National Natural Foundation of China (No.30370857) and the National High Technological Program "863" (No. 2001AA241032).

* Corresponding author. Tel: 86-531-8364525; E-mail: Xiagm@sdu.edu.cn. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>