

大蒜体细胞无性系的染色体变异研究^{*}

张恩让¹, 程智慧¹, 周新民²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西安市科技局, 陕西 西安 710068)

[摘 要] 5个大蒜品种经愈伤组织途径诱导再生植株形成体细胞无性系, 对该无性系细胞进行染色体检查结果表明, 通过愈伤组织培养诱导再分化形成的再生植株, 其细胞染色体数目发生了不同程度的变异, 5个品种的体细胞无性系二倍体率分别为52%, 64%, 58%, 54%和62%, 其余为多倍体、超倍体和亚倍体细胞。用苍山蒜和改良蒜的蒜基、蒜瓣和蒜叶分别作外植体培养形成的体细胞无性系二倍体率在46%~60%。检查还发现了染色体结构的变异。

[关键词] 大蒜; 体细胞无性系; 染色体变异

[中图分类号] S633 401

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0073-04

植物在组织培养过程中通过愈伤组织再生诱导的体细胞无性系会发生广泛变异, 这些变异表现形式多样, 为育种工作者提供了丰富的种质资源^[1, 2]。大蒜因长期无性繁殖, 品种退化和老化现象严重, 又因花器退化而缺乏有效的育种途径。因此, 研究和利用体细胞无性系变异, 对以大蒜为代表的无性繁殖作物具有特殊的价值和意义。徐培文等^[3]研究发现, 大蒜在组织培养过程中愈伤组织细胞的染色体倍性发生了变化。但有关大蒜体细胞无性系研究的报道较少, 本试验对大蒜体细胞无性系染色体变异进行了研究, 旨在为利用大蒜体细胞无性系变异创制新种质资源以及大蒜育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

供试材料为改良蒜、金堂早蒜、彭县晚熟、苍山蒜和欧引01等5个栽培品种, 由西北农林科技大学园艺学院大蒜课题组提供。

1.2 方 法

1.2.1 大蒜愈伤组织诱导 外植体用水冲洗干净, 在体积分数70%酒精中消毒30 s, 然后用体积分数0.1%升汞溶液消毒15 min, 取出用无菌水冲洗4~5次, 然后按照试验要求进行切割、接种。同时对准备做外植体的材料进行细胞染色体检查, 确保试验材

料均为正常的二倍体。

叶片愈伤组织诱导是将蒜瓣长出的幼叶切成0.4~0.5 cm片段, 接种于培养基上进行愈伤组织诱导。蒜瓣愈伤组织诱导是将洁白无损伤的蒜瓣中部切成小块, 接种于培养基上进行愈伤组织诱导。蒜基培养是将带茎盘的蒜瓣基部组织(高0.3 cm)十字形切成4块, 每块都带有部分茎尖、部分茎盘和部分贮藏叶, 将其接种于培养基上进行愈伤组织诱导。

愈伤组织诱导培养以MS为基本培养基, 附加2, 4-D 2 mg/L和6-BA 1 mg/L, 蔗糖30 g/kg, 琼脂7 g/kg, pH值5.8, 培养温度(25±1)℃, 光照强度为2 000 lx, 光照时间为10 h/d。

1.2.2 愈伤组织继代培养 将诱导出的愈伤组织每4周继代培养1次, 培养基为MS+2, 4-D 0.1 mg/L和6-BA 0.3 mg/L, 培养条件同1.2.1。

1.2.3 体细胞无性系的获得 选取发育良好的愈伤组织转入分化培养基分化幼芽, 分化培养基为不附加任何激素的MS培养基。当幼芽分化完成后, 转入生根培养基生根, 生根培养基为MS+NAA 0.2 mg/L。即完成植株再生, 形成体细胞无性系。

1.2.4 体细胞无性系根尖细胞染色体检查 将再生植株的根尖切下, 置入饱和对氯二苯溶液中预处理2 h; 然后取出, 用无菌水冲洗2~3次; 放入卡诺氏固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)中, 在4℃固

* [收稿日期] 2004-01-05

[基金项目] 中德政府间合作项目(CH-01/04)

[作者简介] 张恩让(1960-), 男, 陕西扶风人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜生理生态及生物技术研究。

[通讯作者] 程智慧(1958-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜生理生态及生物技术研究。

定 20 h, 取出, 用无菌水冲洗 2 次; 放入 1 mol/L HCl 中, 在 60 ℃ 下解离 10 min; 取出后用体积分数 2% 的醋酸洋红染色 30 min, 压片; 在 Olympus 显微镜下观察, 选取染色体清晰的细胞拍照。

2 结果和分析

2.1 再生植株染色体数目变异与品种的关系

表 1 表明, 通过愈伤组织培养、诱导再分化形成的再生植株, 细胞染色体数目除二倍体外, 尚有部分细胞染色体数目发生了不同程度的变异, 由于试验材料都是正常的二倍体, 说明变异来自愈伤组织诱导和培养阶段。不同品种再生植株的细胞染色体倍性变化不同, 5 个品种再生植株中二倍体细胞占观察细胞总数的百分率从高到低依次是金堂早蒜

(64%)、欧引 01 (62%)、彭县晚熟 (58%)、苍山蒜 (54%) 和改良蒜 (52%)。再生植株中四倍体细胞也占较大比例, 欧引 01 和苍山蒜的四倍体细胞占观察细胞总数的 24%, 最低的改良蒜也有 16%。另外, 在供试的 5 个品种中都有亚倍体 (亚二倍体、亚四倍体) 细胞出现; 改良蒜、金堂早蒜、苍山蒜和欧引 01 还有少量的超倍体细胞存在, 这可能是大蒜在愈伤组织培养过程中, 由于受培养条件理化因素的影响, 细胞的不对称分裂所致。值得一提的是, 在再生植株同一根尖的细胞中存在混倍性, 染色体数目在 12~20, 而其外植体母蒜是二倍体, 这反映出染色体变异的复杂性和多样性。从镜检结果的分析得知, 染色体数目变异与基因型有关。

表 1 不同品种再生植株 (R₀) 根尖细胞染色体数目变异频率

Table 1 The frequency of chromosome number variation in root tip cells of regenerated plants (R₀) from different cultivars

观察材料 Materials observed	观察细胞数 No. of cells observed	二倍体 Diploid (2n= 16)		亚二倍体 Hypodiploid (2n< 16)		四倍体 Tetraploid (2n= 32)		亚四倍体 Hypotetraploid (16< 2n< 32)		超四倍体 Hypertetraploid (2n> 32)	
		细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%
改良蒜 Gailiang	50	26	52.0	4	8.0	8	16.0	9	18.0	3	6.0
金堂早蒜 Jintang early	50	32	64.0	1	2.0	10	20.0	5	10.0	2	4.0
彭县晚熟 Pengxian late	50	29	58.0	4	8.0	11	22.0	6	12.0	0	0
苍山蒜 Cangshan	50	27	54.0	1	2.0	12	24.0	9	18.0	1	2.0
欧引 01 Europe 01	50	31	62.0	1	2.0	12	24.0	3	6.0	3	6.0

2.2 再生植株染色体变异与外植体类型的关系

结果见表 2。

不同外植体再生植株根尖细胞染色体数目变异

表 2 不同外植体再生植株 (R₀) 根尖细胞染色体变异频率

Table 2 The frequency of chromosome number variation in root tip cells of regenerated plants (R₀) from differently explants of garlics

品种 Cultivars	外植体 Explants	观察细胞数 No. of cells observed	二倍体 Diploid (2n= 16)		亚二倍体 Hypodiploid (2n< 16)		四倍体 Tetraploid (2n= 32)		亚四倍体 Hypotetraploid (16< 2n< 32)		超四倍体 Hypertetraploid (2n> 32)	
			细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%	细胞数 No. of cells	百分率/%
改良蒜 Gailiang	蒜基 Clove basis	50	26	52.0	2	4.0	8	16.0	7	14.0	3	6.0
	蒜瓣 Clove	50	24	48.0	7	14.0	6	12.0	9	18.0	4	8.0
	叶片 Leaf blade	50	30	60.0	3	6.0	6	12.0	7	14.0	4	12.0
苍山蒜 Cangshan	蒜基 Clove basis	50	27	54.0	1	2.0	12	24.0	9	18.0	1	2.0
	蒜瓣 Clove	50	23	46.0	8	16.0	10	20.0	5	10.0	4	8.0
	叶片 Leaf blade	50	25	50.0	2	4.0	7	14.0	11	22.0	5	10.0

表 2 表明, 二倍体大蒜不同器官经组织培养再生的植株, 其细胞染色体数目有很大的变异。苍山蒜

蒜基、蒜瓣和叶片经愈伤组织培养再生的植株根尖细胞中二倍体细胞分别为54%, 46%和50%, 改良蒜分别为52%, 48%和60%, 其余细胞则为非整倍体和四倍体(两者之和为12%~24%)。由表2明显可见非整倍体细胞的增加, 由改良蒜蒜瓣诱导的再生植株非整倍体细胞(亚二倍体、亚四倍体和超倍体)达40%。细胞染色体数目变异与品种及外植体之间的规律性不强。

2.3 再生植株的染色体结构变异

对苍山蒜再生植株染色体观察发现, 二倍体细胞在染色体结构上也有不少变异, 图1中有1条染色体将另外2条染色体连在一起构成单桥, 也有1条染色体将3条染色体连在一起构成复桥; 在图1中还清晰可见外围两个染色体断片(图1中箭头所指); 在

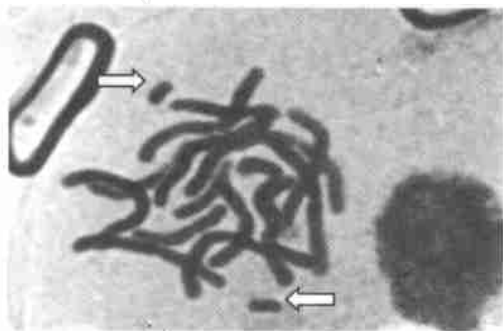


图1 苍山蒜再生植株细胞染色体断片、染色体桥
Fig.1 Chromosome fragments and chromosome bridge in cells of Cangshan's regenerated plants

图2中可见, 有两条染色体粘连在一块; 在图1和图2中都可以看到有2条染色体出现交叉现象。这些染色体结构异常在所观察的5个品种中都不同程度的存在, 而检查外植体母蒜时仅发现7%的细胞内染色体有粘连、交叉等现象。染色体结构变异在愈伤组织初期鉴定时发现较少, 例如改良蒜在诱导初期, 其愈伤组织细胞中检查发现有10%~20%的染色体异常。当对愈伤组织进行不同方式的处理时, 染色体结构变异增多, 特别是外观发育不良的愈伤组织, 对继代18次的愈伤组织细胞鉴定, 除了超倍体细胞大量增加外, 染色体结构异常也比较多, 占观察细胞总数的33%。这也可能是愈伤组织长期继代后, 其分化和成苗能力愈来愈差的原因。改良蒜再生植株中, 染色体结构异常的细胞占观察细胞总数的13%。



图2 苍山蒜再生植株细胞染色体粘连、交叉
Fig.2 Stickiness, cross of chromosome in cells of Cangshan's regenerated plants

3 讨论

3.1 关于染色体数目变异

愈伤组织随继代培养次数的增加, 常出现大量多倍体和非整倍体细胞。如小麦愈伤组织及其再生植株、马铃薯原生质体再生植株中, 出现染色体数目的广泛变异^[4~7]。马国斌等^[8]用子叶、真叶和未成熟子叶分别做外植体, 诱导出的甜瓜再生植株的根尖细胞染色体数目均存在明显变异, 在3种外植体的再生植株中, 除二倍体外还分别鉴定出了30%, 16.2%和42.9%的四倍体, 并有一定比率的亚倍体、多倍体和超倍体细胞。何欢乐等^[9]以两个甜瓜品种为材料, 经不定胚诱导再生植株发现, 再生植株中存在一定的变异, 随着继代培养时间的增加, 染色体数目的变异率从3.3%增加到30%, 变异幅度也从 $2n=23\sim24$ 增加到 $2n=13\sim48$ 。弈非时等^[10]对阿城大蒜茎尖愈伤组织诱导和植株分化研究发现, 再生植株中四倍体占97.5%。本研究证明, 供试的5个大蒜品种再生植株亦存在染色体数目的变异, 但变异幅度

不同, 这可能是由于品种不同所致。

3.2 关于染色体结构变异

在培养的细胞及再生植株中, 还可观察到多种染色体结构的变化。如染色体桥、双着丝粒染色体及染色体断片的出现等, 此外还见到微核的产生^[4,11]。向凤宁等^[11]在玉米组织培养过程中发现, 随着培养时间的延长, 愈伤组织中出现多种染色体结构变异, 分析认为这种变异源于培养时的理化条件, 并且这些结构变异有可能导致非整倍体细胞的形成。本研究中所见到的染色体结构变异, 可能也是这种原因所致。但是, 在本试验中见到的染色体桥、染色体粘连和交叉发生频率相对较高, 既有染色体本身发生的变异, 也可能是在压片时操作不当所致, 要明确大蒜体细胞无性系中染色体结构的变异规律, 尚需进一步深入研究。

3.3 关于染色体变异的影响因素

刁现民等^[12]对谷子体细胞无性系变异的研究表明, 在愈伤组织形成和继代过程中, 愈伤组织处于相对无组织的单个独立状态, 或联系松散的团块状

态,细胞对所处的物理和化学环境胁迫的缓冲能力差,细胞的DNA复制和染色体分裂在这种胁迫环境下,处在一种相对“慌乱”的状态,从而导致DNA复制和染色体分裂错误,再生植株发生变异。本研究证明,大蒜愈伤组织在诱导和增殖过程中,由于培养基

种类,培养基中附加激素种类、浓度的改变以及培养条件的改变,都加大了愈伤组织中染色体的变异,而且这种染色体变异不但体现在数目上,在结构上也有很大的变化,支持了刁现民的推论。

[参考文献]

- [1] 朱至清 体细胞无性系变异[A] 孙敬三,桂耀林 植物细胞工程实验技术[C] 北京:科学出版社,1995 112- 125
- [2] 冯志杰 植物体细胞无性系变异发生的遗传机理[J] 农业生物技术学报,1993,1(1): 8- 17
- [3] 徐培文,马伟青 大蒜组织培养染色体倍性变化研究[J] 山东农业科学,1998,(5): 30- 31
- [4] 吴鹤鸣,陆维忠,周楠 小麦体细胞再生株(R₁)的染色体变异分析[J] 植物学报,1992,34(3): 226- 232
- [5] 李士生,张玉玲 小麦愈伤组织及再生植株的染色体变异[J] 遗传学报,1991,18(4): 332- 338
- [6] 李耿光 马铃薯原生质体再生植株表现和染色体数目的变化[J] 植物学报,1992,34(9): 712- 716
- [7] Winfield M, Davey M R, Karp A. A comparison of chromosome instability in cell suspensions of diploid, tetraploid and hexaploid wheats[J] Heredity, 1993, 70: 187- 194
- [8] 马国斌,王鸣,郑学勤 甜瓜组织培养再生植株中的四倍体变异[J] 园艺学报,1999,26(2): 128- 130
- [9] 何欢乐,蔡润,潘俊松 甜瓜不定胚再生植株的染色体数目变异[J] 遗传,2002,24(2): 166- 170
- [10] 栾非时,陈典 大蒜茎尖愈伤组织诱导、植株再生及变异的研究[J] 北方园艺,1993,(4): 23- 25
- [11] 向凤宁,张举仁,陈惠民,等 玉米胚性愈伤组织的长期继代及其染色体分析[J] 西北植物学报,1994,14(3): 157- 163
- [12] 刁现民,孙敬三 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展[J] 植物学通报,1999,16(4): 1- 7

Study on chromosomal variation of somatic clones of garlic

ZHANG En-rang¹, CHENG Zhi-hui¹, ZHOU Xin-min²

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Science and Technology Bureau of Xi'an City, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: Somatic clones of 5 different ecotypic garlic varieties were obtained by way of regeneration from callus and their chromosomes were examined. The results were as follows. Among all the garlic varieties, the number of chromosomes of some plants regenerated from callus changed and the ratio of variation varied with varieties. The percentage of diploids of Gailiang, Jingtang Early, Pengxian Late, Cangshan and European 01 was 52%, 64%, 58%, 54% and 62% respectively, and others were polyploids, hyperploids and hypoploids. The percentages of diploids of somatic clones regenerated from calluses induced from cloves, clove bases and leaf blades of Cangshan and Gailiang ranged between 46% and 60%, and the changes of chromosomal structure were examined as well.

Key words: garlic; somatic clones; chromosome variation