

文章编号:1001-1498(2005)03-0321-04

多年生黑麦草核型分析与组织培养再生植株染色体变异研究

冯霞¹, 孙振元^{1*}, 刘建锋¹, 彭镇华¹, 杜小娟²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2. 北京西山实验林场, 北京 100093)

摘要:对多年生黑麦草核型及组织培养再生植株细胞染色体变异进行了观察研究。结果表明:多年生黑麦草为二倍体,属中等染色体,由中部着丝点染色体和亚中部着丝点染色体组成,属“1A”型,其核型公式为 $2n = 2x = 14 = 2sm + 12m(2SAT)$ 。组培再生苗根尖细胞有40%发生了染色体数目变异,其中以非整倍体变异居多;同时存在一定数量的染色体倒位、断裂、凝聚、双着丝点等染色体结构变异及染色体桥、落后染色体、染色体不均等分裂等染色体有丝分裂异常现象。

关键词:多年生黑麦草;核型分析;染色体变异;再生植株

中图分类号:S688.4 文献标识码:A

Studies on the Karyotype and Chromosome Variation of Regenerated Perennial Ryegrass

FENG Xia¹, SUN Zhenyuan^{1*}, LIU Jianfeng¹, PENG Zhenhua¹, DU Xiaojuan²

(1. Research Institute of Forestry, CAF; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Beijing Xishan Experimental Forestry Farm, Beijing 100093, China)

Abstract: The chromosome karyotypes and the chromosome variation of regenerated plants of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) were studied. The results showed that perennial ryegrass was diploid and composed of metacentric chromosomes and submetacentric chromosomes and belonged to "1A" type. Its karyotypical formula was $2n = 2x = 14 = 2sm + 12m(2SAT)$. It was also found that the chromosome amount changes happened in 40% of regenerated plants cells and there were also obvious chromosome structure variations (fragment, dicentrics, condensation and transposed ring etc.), mitotic aberrations (lagging chromosome, bridges) as well as numerical alterations (including haploid, aneuploid and polyploid etc.) in some cells of regenerated plants.

Key words: perennial ryegrass; karyotype analysis; chromosome variation; regenerated plant

多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 是禾本科黑麦草属草本植物,具有叶片质地细、柔软、叶色绿,成坪速度快等特性^[1],是一种优良的草坪草。核型分析是远缘杂交育种和染色体工程的理论基础,组织培养是新品种培育的重要生物技术手段。Terrell^[2]报道体细胞染色体数为 $2n = 2x = 14$,但未对其核型进

行分析,组织培养再生植株染色体变异的研究也未见报道。本文对多年生黑麦草的核型及组织培养条件对再生植株染色体变异的影响进行了研究,试图为利用离体培养技术与其它生物技术相结合的方法,创造新的种质资源,最终为实现新品种培育的目标提供理论依据。

收稿日期:2004-10-10

基金项目:国家转基因植物研究与产业化专项(J-2002-B-006)

作者简介:冯霞(1976—),女,云南人,博士研究生。

* 通讯作者: Email: Sunzy@caf.ac.cn

1 材料与方法

1.1 材料培养

1.1.1 实生苗 将多年生黑麦草栽培品种“德比(Derby)”种子置于培养皿,27℃恒温条件下催芽,种子开始萌动后置于4℃冰箱中低温处理12 h,然后在27℃下培养24 h。

1.1.2 组织培养再生苗 以多年生黑麦草成熟胚为外植体,按冯霞等^[3]组织培养方法2次继代后再分化获得再生植株。

1.2 取材及处理

(1)实生苗 将长约1.5 cm的实生苗新生健壮根浸于 0.004 mol L^{-1} 的8-羟基喹啉溶液与对二氯苯饱和溶液的1:1混合液中,室温下避光预处理1.5 h;用清水冲洗后置于卡诺固定液中固定24 h;用清水充分冲洗后转入 1 mol L^{-1} HCl中,60℃水浴解离15 min;水洗后于4%硫酸铁铵溶液中媒染4 h,水洗后在0.5%的苏木精溶液中染色2~4 h;经 $450 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 醋酸进行分色和软化后压片。

(2)组织培养再生苗 取组培再生苗长度约为2 cm的新生健壮根,处理方法同上。

1.3 核型分析与染色体观察

(1)核型分析 随机选取5株实生苗,于相同部位截取根尖,每个根尖选取10个细胞进行染色体数目鉴定并进行核型分析。核型按Levan^[4]的分类法和李懋学等^[5]植物染色体标准化的规定分析,核型分类根据Stebbins^[6]的核型分类标准,染色体大小的划分参照Lima-De-Faria^[7]的染色体场理论,核型不

对称系数参照Arano^[8]公式,观察与照相均采用Leica显微镜及其照相系统。

(2)组培苗染色体变异观察 随机选取15株再生植株(来自同一成熟胚的2次继代培养)根尖,每个根尖选取10个细胞进行观察和相关数据统计。以实生苗为对照同时观察。

2 结果与分析

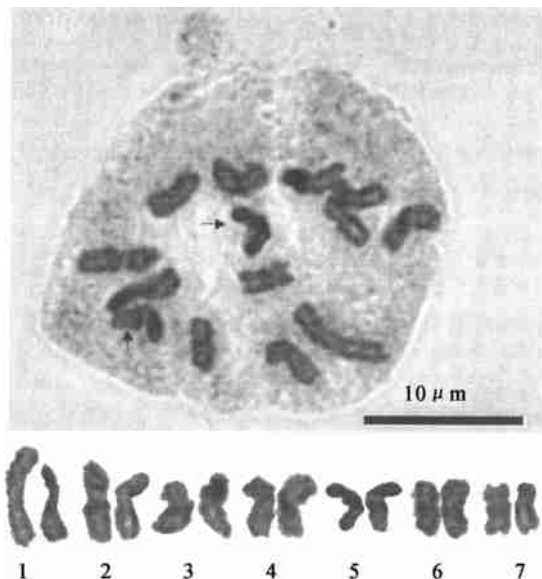
2.1 核型分析

对核型参数(表1)和核型及核型模式图(图1)分析表明:多年生黑麦草的核型公式为: $2n = 2x = 14 = 2sm + 12m(2SAT)$ 。染色体组绝对全长为 $27.77 \mu\text{m}$,绝对长度变化范围为 $2.96 \sim 4.84 \mu\text{m}$,其中12条属小染色体,2条为中等染色体;相对长度变化范围为 $10.7 \sim 20.5 \mu\text{m}$,最长染色体与最短染色体相对长度比为1.66;平均长短臂比为1.56;无臂比 > 2 的染色体;核型分类为1A;核型不对称系数为60.78;第5条染色体为随体染色体,其随体为椭圆形。

表1 多年生黑麦草的核型参数

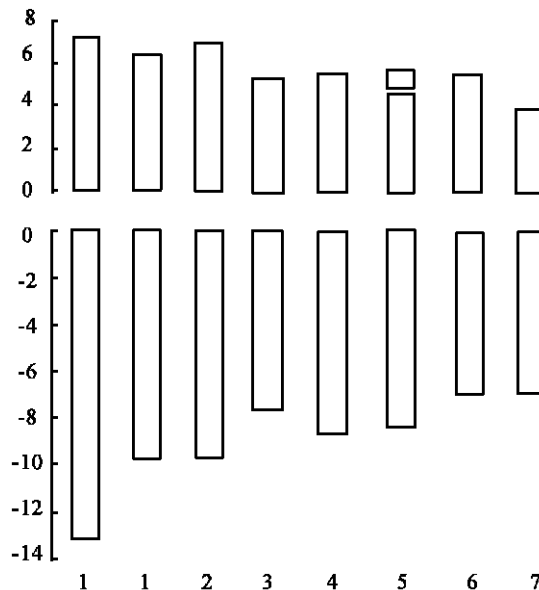
染色体编号	相对长度		臂比值	着丝点类型
	(短臂+长臂=总长度)/ μm			
1 ¹⁾	7.26+13.20=20.5		1.81	sm ¹⁾
	6.46+9.66=16.1		1.49	m
2	7.01+9.65=16.7		1.38	m
3	5.30+7.62=12.9		1.44	m
4	5.59+8.64=14.2		1.55	m
5 ²⁾	4.65+8.37=13.0		1.80	sm ²⁾
6	5.48+6.91=12.4		1.26	m
7	3.88+6.77=10.7		1.74	m

注:1)杂合染色体对;2)具随体的染色体(随体长度未计算在内)。



箭头所示为具随体的染色体

图1 多年生黑麦草染色体核型图及模式图



2.2 组织培养再生植株根尖染色体数目变异

再生植株及实生苗的倍性水平分析结果表明:二者所有植株的二倍体细胞均占绝大多数(60.6%~88.0%),为二倍体类型植株;但实生苗根尖细胞染色体数目发生变异的比率占 12%,变异类型有亚

单倍体、单倍体、超二倍体。组织培养再生苗根尖细胞染色体数目发生变异的比率为 40%,比实生苗变异高 28 个百分点,变异类型除了有亚单倍体、单倍体和超二倍体之外,还有亚二倍体,并出现了四倍体及超四倍体类型,变异类型多样化(表 2)。

表 2 再生植株与实生苗根尖染色体数目变异比较

材料类型		染色体数						总计	
		<7	7(n)	8~13	14	14~27	28		>28
		亚单倍体	单倍体	亚二倍体	二倍体	超二倍体			
实生苗	细胞数	1	3	0	44	2	0	50	
	百分率/%	2.0	6.0	0.0	88.0	4.0	0.0	100	
再生植株	细胞数	3	3	13	91	32	4	150	
	百分率/%	2.0	2.0	8.6	60.6	21.3	2.7	100	

2.3 组织培养再生植株染色体的结构变异

从图版 2 可知,组织培养再生植株染色体数目变异除比率较大、类型多样外,染色体的结构也出现

了多种类型的变异,如染色体断片、染色体凝聚、染色体倒位等;细胞有丝分裂异常现象也很丰富,如染色体桥、染色体不均等落后染色体等。

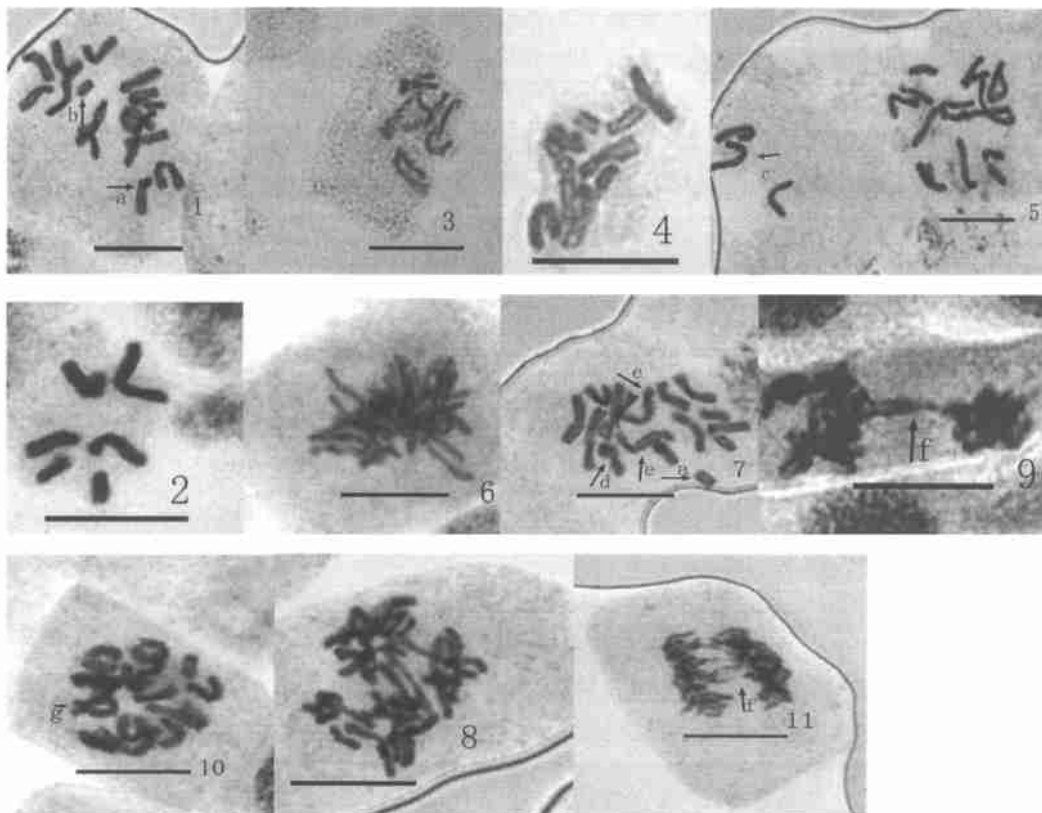


图 2 组织培养再生植株染色体的结构变异

说明:箭头所示为染色体结构变异与有丝分裂异常。a 代表端着丝点染色体;b 为染色体断片;c 为染色体落后;d 为染色体凝聚;e 为双着丝点染色体;f 为染色体桥;g 为染色体倒位。图中标识为 10μm。1. 2n = 14 二倍体,染色体断片及端着丝点染色体;2. 2n = 6 亚单倍体;3. 2n = 7 单倍体;4. 2n = 8 亚二倍体;5. 2n = 15 超二倍体,落后染色体;6. 多倍体;7. 染色体断片,染色体凝聚,双着丝点染色体;8. 染色体不均等分裂;9. 染色体单桥;10. 染色体多桥。

3 结论与讨论

(1) 核型分析发现多年生黑麦草品种‘德比’第1对染色体杂合性明显,其中包括一个 sm 染色体和一个稍小的 m 染色体。这种罕见的现象也存在于铁线莲属 (*Clematis* L.) 中^[9,10],但出现这种现象的原因尚不清楚。笔者认为可能是由于多年生黑麦草是一种自交不亲合的专性杂交植物^[11],在长期的杂交繁殖过程中,当同源染色体配对时分别保留了父母本的各一条染色体,从而出现同源染色体的杂合现象。

(2) 根据 Stebbins^[6]的核型分类标准,多年生黑麦草属对称的 1A 型,与禾本科其它属的植物相比^[12],多年生黑麦草比稻属 (*Oryza* L.) 原始,而与小麦属 (*Triticum* L.)、黑麦属 (*Secale* L.)、大麦属 (*Hordeum* L.)、狗尾草属 (*Setaria Beauv*) 及狼尾草属 (*Pennisetum Rich*) 等属的大多数种的进化程度相近,这可为研究多年生黑麦草的起源、进化以及育种提供参考。Levitzy^[13]和 Stebbins^[6]均认为:在被子植物中,核型进化的基本趋势是由对称向不对称发展的。系统演化处于比较古老或原始的植物,大多具有较对称的核型,不对称的核型则主要见于衍生的、特化的以及进化的植物类群中。

(3) 许多研究证明,组织培养再生植株中存在有广泛地变异,如大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、刚毛绵鸡尾 (*Haworthia setata* Haw.) 等植物组织再生植株中染色体数目发生了整倍性及非整倍性变化,刚毛绵鸡尾的再生植株中还有染色体倒位、易位、缺失等染色体结构变异的细胞,而且在再生植株的减数分裂中染色体行为异常^[14,15]。有学者^[9~21]指出继代次数和培养时间均会对愈伤组织及再生植株染色体变异的频率产生影响。一般来说随着继代次数增多、培养时间延长,愈伤组织染色体变异率加大,但愈伤组织分化出再生植株的能力却持续增强至一定程度后才会降低。因此研究继代次数及培养时间在什么样的范围内即能获得较高的愈伤组织变异率又不影响其再生能力很有意义。本研究观察到多年生黑麦草的组培再生植株中也有大量单倍体、多倍体及非整倍体细胞,染色体数目变异率也高于实生苗 28 个百分点,这一结果验证了前人^[15~18]认为组织培养可以诱导和提高体细胞无性系变异的观点,也为利用组织培养方法进行多年生黑麦草的种质资源创新提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 孙吉雄. 冷地型足球场草坪混播组合多年生黑麦草最佳含量的研究[J]. 草业学报, 1995 (4): 66~70
- [2] Terrell E E. A taxonomic revision of the genus *Lolium* [M]. USDA-ARS Tech Bull No 1392, U S Govt Printing of Washington, DC, 1968
- [3] 冯霞, 孙振元, 彭镇华, 等. 多年生黑麦草愈伤组织诱导和植株再生[J]. 草业科学, 2004, 21 (10): 23~28
- [4] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosome [J]. Hereditas, 1964, 52: 201~220
- [5] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型的标准化问题[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297~302
- [6] Stebbins GL. Chromosomal evolution in higher plants [J]. Edward Arnold Ltd. London, 1971, 87~89
- [7] Lima-De-Faria A. Classification of genes, rearrangements and chromosomes according to the chromosome field [J]. Hereditas, 1980, 93: 1~46
- [8] Arano H. Cytological studies in subfamily Carduoideae of Japan. The karyotype analysis and phylogenetic consideration on *Pertya* and *Ainsliaea* (2) [J]. Bot Mag Tokyo, 1963, 76: 32~39
- [9] 龚维忠, 李懋学. 北京地区铁线莲属植物的核型研究[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 371~379
- [10] 张镜铨, 贺士元. 7 种铁线莲的染色体研究[J]. 武汉植物学研究, 1991, 9(2): 105
- [11] Cornish M A, Hayward M D, Lawrence M J. Self-incompatibility in ryegrass. Genetic control in diploid *Lolium perenne* [J]. Heredity, 1979, 43: 95~106
- [12] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2003
- [13] Levitzky G A. The karyotype in systematics [J]. Bull Appl Bot Genet Plant Breed, 1931, 27: 220~240
- [14] Jacobsen E. Polyploidization in leaf callus tissue and in rophos-methyl, and colchicine in potato [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1981, 1: 77~84
- [15] 商效民. 植物离体培养中染色体的变异 [J]. 细胞生物学杂志, 1984, 6(1): 5~11
- [16] 许智宏. 植物体细胞的遗传变异 [J]. 遗传, 1985, 7(6): 37~40
- [17] 叶新荣, 余毓君. 小麦再生植株的变异研究. 再生植株当代 (R1 代) 的细胞学和形态学变异 [J]. 遗传学报, 1989, 16(2): 105~110
- [18] 杜捷, 王刚, 幸亨泰, 等. 兰州百合继代培养过程中的染色体变异 [J]. 西北师范大学学报 (自然科学版), 2003, 39(2): 61~65
- [19] 王仑山, 丁惠宾, 王亚馥, 等. 伊贝母愈伤组织在继代培养过程中染色体变异和分化频率的研究 [J]. 西北植物学报, 1990, 10(1): 54~60
- [20] 唐巍, 吴绛云, 张丽梅. 平贝母愈伤组织继代过程中染色体变异的研究 [J]. 东北林业大学学报, 1994, 25(1): 70~74
- [21] Yoshida S Y, Kazuhiko W, Mōrihiro F J. Non-random gameto-clonal variation in rice regenerants from callus subcultured for a prolonged period under high osmotic stress [J]. Euphytica, 1998, 104: 87~94