

大蒜分生组织培养的染色体遗传稳定性研究*

张恩让¹, 任媛媛¹, 胡华群¹, 程智慧²

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:选取改良蒜、金堂早蒜、彭县晚熟、苍山蒜和欧引01等5个不同生态型大蒜的分生组织,在MS固体培养基上进行培养,并对培养的后代进行染色体倍性鉴定。结果表明,茎尖分生组织诱导出幼芽的细胞染色体二倍体率保持在96.7%~100.0%;增殖芽的细胞染色体二倍体率保持在93.7%~100.0%;生根阶段根尖的细胞染色体二倍体率保持在93.3%~100.0%;再生植株的染色体数目基本没有变异,二倍体率在93.7%~100.0%。

关键词:大蒜;分生组织;组织培养;细胞染色体;遗传稳定性

中图分类号:S633.401 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0457(2006)06-0497-04

Study on chromosome hereditary stability of the garlic tissues of dividing and growing when cultured

ZHANG En-rang¹, REN Yuan-yuan¹, HU Hua-qun¹, CHENG Zhi-hui² (1. College of Agriculture, Guizhou University, Guizhou Guiyang 550025, China; 2. College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shanxi Yangling 712100, China)

Abstract: Five different ecotypic garlic cultivars (gailiang garlic, Jintang early garlic, Pengxian late-maturing, Cangshan garlic and Europe 01) were chosen to catch the tissue of dividing and growing, it is cultured at the solid MS medium, and chromosome times are identified in later generation. The result shows that the number of chromosome does not change basically in bud which comes from tissues of dividing and growing in stem sharp, in proliferation stage of bud, in taking root stage and in recycling plants, the liploid rate is between 93.7% and 100.0%.

Key words: garlic; tissue of dividing and growing; cultivation; chromosome; hereditary stability

植物组织培养的一个重要作用是保存与快速繁殖稀有、珍贵物种,保存种质资源。但是大量的研究表明,在组织培养过程中,被培养物种会发生高频率的体细胞无性系变异,在细胞水平上表现为染色体数目和结构与母体植株相比有不同程度的变异,不能保持物种正常的遗传稳定性。大蒜是重要的蔬菜作物之一,在世界上种植范围很广,但是大蒜由于花器退化,不能进行有性繁殖。现在资源保存和新品种选育均利用植物组织培养技术和体细胞无性系变异筛选技术,关注和研究植物组织培养过程中的遗传稳定性有积极意义。迄今为止,对大蒜这方面的研究报道很少。本试验研究了大蒜的分生组织在组织培养过程中及再生植株的细胞染色体数目变异情况,以期为大蒜种质资源的保存理论提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验所用大蒜 *Allium sativum* L. 品种由西北农林科技大学园艺学院大蒜种质资源课题组提供。品种选用主要考虑不同的生态类型及生产上常用(见表1)。

本试验所用5个品种的待用大蒜蒜头,在使用前均按照四分法取样,然后置于培养皿中并加少量水让

其生根,取根尖进行染色体观察,确定其是符合要求的二倍体($2n=16$)材料。

表 1 供试大蒜品种、生态类型及来源

Tab. 1 Garlic cultivars and their ecotype and sources in the experiment

品 种	生 态 类 型	来 源
改 良 蒜	低温反应中间型	陕西兴平
金堂早蒜	低温反应敏感型	四川金堂
彭县晚熟	低温反应中间型	四川彭县
苍 山 蒜	低温反应中间型	山东苍山
欧引 01	未 知	英 国

1.2 培养方法

供试大蒜鳞茎先在 4°C 下贮存 7d, 然后取出, 经表面消毒后, 解剖镜下切取长度为 0.5mm 的带叶原基的分生组织, 接种在培养基上进行芽诱导。培养 50d 后, 取 3 个幼芽进行细胞染色体检测; 将剩余诱导出的幼芽转入增殖培养基进行增殖培养, 50d 后统计芽的增殖情况, 鉴定增殖芽细胞的染色体; 选取发育良好的增殖芽转入生根培养基生根, 28d 后统计生根情况, 同时鉴定根尖细胞的染色体; 将发育完整的再生植株转移培养, 30d 后鉴定再生植株的染色体。

芽诱导基本培养基为 MS, 附加 $\text{IAA} 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6-\text{BA} 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。增殖培养基为 $\text{MS} + \text{IAA} 0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + 6-\text{BA} 2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 生根培养基为 $\text{MS} + \text{NAA} 0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

培养条件: 培养温度为 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$; 光[照]度为 2 支 40W 的日光灯; 光照时间: 每天 10h。

1.3 染色体鉴定

将待检材料置入饱和对氯二苯溶液中预处理 2h, 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)中低温(4°C)固定 20h 取出, 用无菌水冲洗 2 次; 放入 1M HCl 中, 在 60°C 下解离 10min, 取出用 2% 的醋酸洋红染色 30min, 压片; 在 Olympus 显微镜下观察、鉴定。

2 结果与分析

2.1 芽诱导阶段的染色体数目

将 5 个品种的分生组织直接接种在诱导芽的培养基上, 观察统计幼芽的形成和生长情况, 50d 后取 3 个幼芽鉴定细胞染色体的倍性, 结果见表 2。

表 2 表明, 供试 5 个品种的茎尖分生组织在培养 50d 后, 不断膨大和伸长形成一个绿色幼芽, 出芽率因品种不同而不同, 其中金堂早蒜出芽率 100%; 彭县晚熟出芽率只有 58.3%; 其余 3 个品种の出芽率界于二者之间。没有出芽的部分外植体形成颗粒状的愈伤组织。对幼芽的染色体鉴定结果表明, 新生芽细胞染色体基本没有变异。

表 2 芽诱导及细胞染色体鉴定

Tab. 2 Bud induction and chromosome identification in cells

品 种	接 种 块 数	芽 诱 导		细 胞 染 色 体		
		出芽块数	百分率 (%)	鉴定细胞数	二倍体细胞数	二倍体率 (%)
改 良 蒜	12	10	83.3	30	30	100.0
金 堂 早 蒜	12	12	100.0	30	29	96.7
彭 县 晚 熟	12	7	58.3	30	30	100.0
苍 山 蒜	12	10	83.3	30	30	100.0
欧 引 0 1	12	9	75.0	30	29	96.7

2.2 芽增殖阶段的染色体数目

将前面培养并诱导出幼芽的分生组织一同转入增殖培养基进行芽增殖培养, 50d 后统计芽的增殖情况。在芽增殖过程中, 取 5 个增殖芽鉴定其细胞的染色体, 结果见表 3。

表 3 表明, 分生组织在诱导增殖时, 其成芽能力因品种而异, 5 个品种平均每块增殖的幼芽数 4.6~5.8,

其中金堂早蒜最高(5.8),彭县晚熟最低(4.6)。取5个所成芽对其细胞染色体鉴定发现,金堂早蒜和欧引01的细胞染色体均是二倍体;改良蒜细胞染色体的二倍体率为93.3%;彭县晚熟和苍山蒜细胞染色体的二倍体率为96.7%,染色体数目变异很小。

表3 芽的增殖和细胞染色体鉴定

Tab. 3 Bud proliferation and chromosome identification in cells

品 种	接 种 数	平 均 每 块 成 芽 数	细 胞 染 色 体		
			鉴定细胞数	二倍体细胞数	二倍体率 (%)
改 良 蒜	8	5.5	30	28	93.3
金 堂 早 蒜	8	5.8	30	30	100.0
彭 县 晚 熟	5	4.6	30	29	96.7
苍 山 蒜	8	5.2	30	29	96.7
欧 引 0 1	7	5.0	30	30	100.0

2.3 生根阶段的染色体数目

将增殖的幼芽转入生根培养基诱导生根,生根过程中,取5个根尖进行染色体鉴定,28d后统计生根情况,结果见表4。

表4表明,5个品种增殖芽生根正常,平均每芽生根数在2.4~3.4。生根阶段的染色体鉴定表明变异很小,改良蒜和欧引01的根尖细胞染色体中二倍体细胞占鉴定总数的96.7%;金堂早蒜和苍山蒜的根尖细胞染色体中二倍体细胞占鉴定总数的93.3%;彭县晚熟所鉴定的根尖细胞染色体中100%是二倍体细胞。

表4 每芽生根数和细胞染色体鉴定

Tab. 4 Number of root per bud and chromosome identification in cells

品 种	平 均 每 芽 生 根 数	细 胞 染 色 体		
		鉴定细胞数	二倍体细胞数	二倍体率 (%)
改 良 蒜	3.4	30	29	96.7
金 堂 早 蒜	2.4	30	28	93.3
彭 县 晚 熟	2.8	30	30	100.0
苍 山 蒜	3.0	30	28	93.3
欧 引 0 1	2.6	30	29	96.7

2.4 再生植株的染色体数目

将再生植株转入基本培养基中让其继续生长28d,然后观察试管苗的形态,在5个品种中均没有明显的变异发生。根尖压片观察,其染色体数目基本保持稳定,绝大部分($\geq 93.3\%$)为正常的二倍体细胞($2n=16$),只有极少数($\leq 6.7\%$)非整倍体细胞出现,变异率很低。总的看来,利用直接诱芽途径再生植株很少有体细胞无性系变异发生,能较好地保持其遗传稳定性。

3 讨 论

3.1 关于源植株的染色体倍性水平与体细胞无性系变异。一般而言,多倍体材料更易发生染色体数目和结构变异;而基因突变在二倍体和单倍体中更易表达,但多倍体则能更好地存活。首例SV研究的重要报道之一是关于在甘蔗愈伤组织培养中发现的变异,愈伤组织系在生长习性和颜色方面都有所不同,后来发现它们具有不同的染色体数目,同样的差异也在其再生植株中注意到^[1-2]。在苜蓿 *Medicago sativa* L. 组织培养中,Bingham等^[3]发现二倍体品种再生植株中最常见的染色体变异是自发加倍现象,而从愈伤组织或原生质体再生的植株除染色体加倍外,还有非整倍体和某些染色体结构变异。在比较二倍体、四倍体和六倍体小麦细胞悬浮培养中,二倍体最稳定而六倍体最不稳定,即使在同一倍性水平下,不同基因型的遗传稳定性也不同^[4],在二倍体的禾本科作物中,大麦中的SV较少,但在裸麦中则很广泛^[5-8]。这种差异可能与其交配行为(大麦自交而裸麦异交)与DNA序列有关。除染色体倍性外,基因组中染色质含量与扩增序列,可转位因子的存在与否都可能与SV有关,这些都还需要进一步地研究验证。本试验材料是二

倍体大蒜,因试验并没有经过愈伤组织阶段,所以其结果也未发现染色体的加倍现象,即使不同基因型的大蒜结果也如此。

3.2 关于外植体的来源与体细胞无性系变异。相关研究以菠萝无刺卡因种 Mitsubishi 品系为材料,分别从顶芽、腋芽和果实不同外植体上诱导出团状愈伤组织,经 7~14 个月的继代培养后均再生了植株,但以果实为外植体的所有的再生植株均发生变异,顶芽的有 7% 发生变异,腋芽的变异率为 34%。在花椰菜上观察到同样的现象。据报道,由花椰菜根诱导的不定芽和再生植株中有不少变异体,而从顶端分生组织(菜花)产生的 400 个再生植株上基本没有变异。刘进平等^[9]也综述到,从外植体来源考虑,取腋芽、茎尖和分生组织进行培养要比从无分生组织功能的叶、根、细胞和原生质体培养产生的变异少。即便从 *Nicotiana glauca* Link & Ottok 叶外植体上不经愈伤组织培养直接再生的不定植株,在诸如花形、叶形、株高以及花粉活力和染色体数目上都存在很大的变异^[10-11]。在菊花 *Chrysanthemum* 培养中,从花瓣再生的植株中比从花梗再生植株表现更为多花,同时有很高的异常频率^[12-13]。在天竺葵 *Pelargonium* 的组织培养中,茎段再生植株与对照一致,但从根和叶柄的再生植株则表现形态变异^[14]。本试验以大蒜鳞茎为试材,取分生组织进行培养,结果发现再生植株的染色体基本没有变异,至于和前人在其他作物上的研究结果相互印证的问题,则需要做更深入的研究。

3.3 植株再生的方式。在组织培养过程中,外植体通常有 3 种方式可以实现植株再生,即通过愈伤组织分化不定芽的方式再生、通过分化胚状体途径再生和通过茎尖或分生组织培养增殖侧芽再生。愈伤组织培养由于经历脱分化和再分化等变化剧烈的过程,因而常与 SV 联系起来,以致于将第一例愈伤组织培养产生的变异体称为“愈伤组织无性系(calliclones)”。但其他途径也有不少变异发生,Evans 等^[15]报道利用 *Nicotiana glauca* Link & Ottok 叶外植体上不经愈伤组织培养直接再生的不定植株,在诸如花形、叶型、株高以及花粉活力和染色体数目上都存在很大的变异。一般认为,通过愈伤组织分化不定芽的方式再生的植株变异多,通过分化胚状体途径再生的植株变异较少,通过茎尖或分生组织培养增殖侧芽可以保持基因型基本不变,本研究结果证实了这一理论。

参 考 文 献:

- [1] HEINZ D J, MEE G W P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species[J]. Crop Sci, 1969(9): 346-348.
- [2] HEINZ D J, MEE G W P. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus culture[J]. Amer J Bot, 1971, 58: 257-262.
- [3] BINGHAM E T, MCCOY J T. Somaclonal variation in alfalfa[J]. Plant Breeding Rev, 1986(4): 123-152.
- [4] 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.
- [5] BREIMAN A, ROTEM D, KARP A, et al. Heritable somoclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*)[J]. Theor Appl Genet, 1987, 74: 104-112.
- [6] CHANG S S, BASETT M J, QUESENBERRY K H. Cytogenetic analysis of interspecific hybrids between common bean and scarlet runner bean[J]. Crop Sci, 1981, 21: 75-79.
- [7] KARP A, OWEN P, STEELE S H, et al. Variation in telomeric heterochromatin in somaclones of rye[J]. Genome, 1992, 35: 590-593.
- [8] RUIZ M L, RUEDA M I, PELAEZ F J, et al. Somatic embryogenesis, plant regeneration and somaclonal variation in barley[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1992, 28: 97-101.
- [9] 刘进平, 郑成木, 胡新文. 体细胞无性系变异研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2001, 6(2): 22-29.
- [10] LINACERO R, VAZQUEZ A M. Genetic analysis of chlorophyll-deficient somaclonal variation in rye[J]. Genome, 1992, 35: 981-984.
- [11] NAKAKUBO T, NAGASAWA A, OHKAWA H. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1993, 32(2): 175.
- [12] BOTTERMAN J, LEEMANS J. Engineering of Herbicide Resistance in Plants[J]. Biotechnology & Genetic Engineering reviews Ed G E Russell Intercept Ltd, 1988(6): 321-324.
- [13] DE JONG J, CUSTERS J B M. Induced changes in growth and flowering of *Chrysanthemums* after irradiation and in vitro culture of pedicels and petal epidermis[J]. Euphytica, 1986, 35: 137-148.
- [14] SKIRVIN R M, JANICK J. 'Velvet Rose' *Pelargonium*, ascertained geranium[J]. Hort Science, 1976b(11): 61-62.
- [15] EVANS D A, SHARP W R, MEDINA-FILHO H P. Somaclonal and gametoclonal variation[J]. Amer J Bot, 1984, 71: 759-774.