

• 实验简报 •

欧美杂种山杨体细胞无性系变异的分析

詹亚光¹ 齐凤慧^{1*} 高瑞馨¹ 杨传平²

(1 东北林业大学生命科学学院 哈尔滨 150040) (2 东北林业大学林学院 哈尔滨 150040)

摘要 以成年欧美杂种山杨(*Populus tremula* × *P. tremuloides*)优良无性系为材料, 通过组织培养方法获得体细胞无性系, 利用细胞学和分子生物学方法对其发生的变异进行研究。结果表明: 用 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D诱导的再生植株的细胞染色体稳定性较差, 所检测的144个细胞中, 变异的细胞中多数发生了染色体加倍, 二倍体细胞数仅占36.81%。有些染色体还发生了形态变异, 染色体加长, 形成带有随体或长臂较长的大型染色体。用 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA诱导再生植株中染色体数量稳定性介于对照和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D诱导的再生植株之间, 在观察的142个细胞中二倍体细胞占54.93%。再生植株的AFLP分析表明, 由激素诱导的再生植株中, AFLP谱带发生了变化, 表明发生了体细胞无性系分子水平变异。

关键词 欧美杂种山杨, 体细胞无性系, 染色体, AFLP

Cytological and Molecular Biological Assay of the Somaclonal Variations of *Populus tremula* × *P. tremuloides*

Yaguang Zhan¹, Fenghui Qi^{1*}, Ruixin Gao¹, Chuanping Yang²

(1 College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

(2 College of Forest, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract The leaves, stems and leafstalks of adult *Populus tremula* × *P. tremuloides* were cultured to generate somaclonal lines, and the variations during culture were assayed by cytological and molecular biological methods. Only 36.81% were diploid in the 144 observed cells from regenerated lines induced by $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D, which was much lower than that of the control (77.78%) and indicates that the stability of chromosome quantity of these cells was lower. The shape of chromosome of these cells also changed, with increments in length and the formation of giant chromosomes with a satellite. 54.93% were diploid in 142 observed cells from regenerated lines induced by $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, which indicates that the stability of chromosome quantity of these cells was between that induced by 2,4-D and that of controls. AFLP data also showed that the variation occurred at the DNA level.

Key words *Populus tremula* × *P. tremuloides*, somaclonal line, chromosome, AFLP

体细胞无性系变异是植物细胞自然发生的可变性的表达方式, 或在植物再生过程中细胞体外诱导变异的结果。植物组织培养研究者很早就发现经组织培养后再生植株上的变异现象

(Skirvin and Janick, 1976; Sibi, 1976; Shepard et al., 1980), 通过愈伤组织再生诱导的体细胞无性系会产生广泛的变异, 这些变异表现形式多样, 是进行良种选育的途径之一(冯志杰, 1993; 朱至

收稿日期: 2005-09-02; 接受日期: 2005-11-14

基金项目: 国家林业局 948 项目(2000-04-10)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: qifenghui2001@yahoo.com.cn

清, 1995; Ostry and Skilling, 2003)。

杨木造纸是杨树利用的重要方面之一。目前, 我国杨树造纸业已进入一个新的阶段。而杨树良种的选育对杨树造纸业可持续发展具有不可忽视的影响。本文在体细胞染色体水平利用 AFLP 分子标记检测技术对 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 诱导的再生植株变异的影响进行了观察与分析, 同时对培养时间与体细胞无性系变异的关系进行了跟踪。这对于了解该树种的无性繁殖过程中的遗传变异和保持后代特征的稳定性、一致性和特异性具有重要理论和实际意义。同时它对山杨种质资源创新及其良种选育具有一定的指导作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

欧美杂种山杨(*Populus tremula* × *P. tremuloides*), 取自从芬兰引进的3个40年生的成年优良无性系。

1.2 方法

1.2.1 欧美杂种山杨愈伤组织诱导 诱导方法见詹亚光等(2004)。将诱导出的愈伤组织每4周继代1次。

1.2.2 体细胞无性系的获得 在只加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的培养基中, 外植体直接分化出芽, 当幼芽长至2 cm高时, 转入生根培养基, 即完成植株再生, 形成体细胞无性系。在含 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 培养基中, 外植体形成愈伤组织, 选取良好的愈伤组织转入分化培养基分化幼芽, 当幼芽长至2 cm高时, 转入生根培养基, 即完成植株再生, 形成体细胞无性系。

1.2.3 体细胞无性系根尖细胞染色体检查 当再生植株根尖长至1 cm时, 在上午9:00~12:00(李懋学和张敦方, 1991)之间取健壮的根剪下并将根尖切下, 于室温下用0.2%的秋水仙素水溶液暗处理1.5小时, 在卡诺固定液(95%乙醇:冰醋酸=3:1, V/V)中固定2~24小时, 取出, 用无菌水冲洗2次, 放入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 解离3~5

分钟(60°C), 取出用蒸馏水洗涤2~3次, 用卡宝品红染色、制片。使用 Olympus 光学显微镜在 $1600\times$ 下进行染色体观察、计数, 每个根至少选定3个细胞进行统计。

1.2.4 体细胞无性系变异 AFLP 检测 以腋芽增殖的欧美杂种山杨无性系为对照。分别取含 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 激素培养基诱导出的体细胞无性系叶片, -40°C 保存。将获得的体细胞无性系继代培养5次, 分别取叶片, -40°C 保存。采用 CTAB 法提取 DNA。

1.2.4.1 AFLP 分子标记的实验条件 用鼎国公司生产的 AFLP 试剂盒, 按照说明书要求操作。

1.2.4.2 数据统计与分析方法 用凝胶成像系统分析软件 Labworks 统计并确定各谱带分子量, 分别以1和0代表每个个体在某一迁移率处有或无扩增片段(谱带)出现, 将所得的 AFLP 指纹图谱转换成1和0构成的数字矩阵。用 TREECON 软件计算 Nei and Li 指数, 即 $GD=1-2N_{XY}/(N_X+N_Y)$, N_{XY} 表示两材料间共有的带数, N_X 表示材料 X 的 AFLP 带数, N_Y 表示材料 Y 的 AFLP 带数。按 $D=-\ln I$ 计算遗传相似系数 I (王卓伟等, 2001)。

2 结果与分析

2.1 再生植株染色体变异与激素的关系

表1表明, 由不同激素诱导分化形成的再生植株, 细胞染色体数目有不同程度的变异。

在检测实验材料细胞染色体数目时, 所检测的25株植株的细胞染色体数稳定性很好, 全部为二倍体($2n=38$)细胞的植株为15株, 其余10株为二倍体占多数(为75%以上)的混倍体细胞的植株。

在150个细胞中, 二倍体细胞占77.78%, 单倍体占15.56%, 三倍体占6.67%, 其他变异细胞占22%, 若按60%以上的细胞所具有的染色体数来确定该植株的染色体数(王关林和方宏筠, 1995), 可以确定, 对照植株全部是二倍体(图

表 1 不同激素处理对植株染色体数目的影响

Table 1 Frequencies of cytological variations observed in hormones treated plant cells								
Explant	Sum of observed cell	Haploid 2n=19	Hypoctiploid 19<2n<38	Diploid 2n=38	Hypotriploid 38<2n<57	Triploid 2n=57	Hypertriploid 57<2n	Sum of variated cells
Control	150	13 (8.67%)	10(6.67%)	117(77.78%)	2 (1.33%)	8 (5.33%)	0 (0)	33 (22.00%)
6-BA treated	142	10 (7.04%)	9 (6.34%)	78(54.93%)	17(11.97%)	12 (8.45%)	16(11.27%)	64 (45.07%)
2, 4-D treated	144	13 (9.03%)	19(13.19%)	53(36.81%)	14 (9.33%)	22 (15.28%)	23(15.00%)	91 (63.19%)

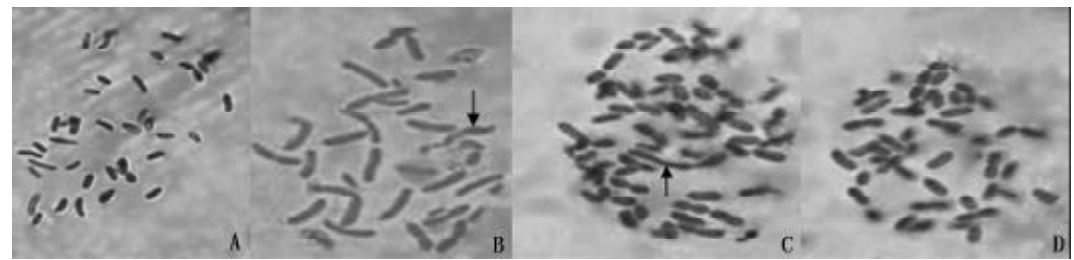


图 1 再生植株根尖细胞中染色体

A. 对照植株细胞染色体; B, C. 3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D 诱导的再生植株的细胞染色体; D. 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 诱导的再生植株的细胞染色体

Fig. 1 Chromosomes of the root tip cell of regenerated plantlet

A. Chromosome of control; B, C. Treated with 3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D; D. Treated with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA

1 A)。

用3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D诱导的再生植株的细胞染色体稳定性较差。在检测的 25 株植株中, 有6株是二倍体植株, 即保持2n=38的植株仅为 24%, 有 76% 的植株发生变异。所检测的 144 个细胞中, 二倍体细胞数仅占36.81%, 其比例明显下降, 多倍体细胞的比例明显增加。在变异的细胞中多数发生了染色体加倍, 同时还出现一些混倍体。此外, 有些染色体还发生了形态变异, 如染色体加长或形成带有随体或长臂较长的大型染色体(图 1B、C, 箭头所指)。出现这样的结果可能是在愈伤组织培养过程中, 由于受外界因素的影响, 细胞发生不对称分裂所致。用 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA诱导再生植株中染色体数量稳定性介于对照和3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D诱导的再生植株之间。在检测的 25 株植株中, 二倍体的植株为 12 株, 占 48%。在观察的 142 个细胞中二倍体细胞占54.93%, 同时也有多倍体细胞发生(图 1D)。以上数据表明, 6-BA 和 2, 4-D 均能使

体细胞无性系染色体数目发生变异, 而2, 4-D的变异频率较大, 不仅能使细胞染色体数目发生变化, 而且也能导致染色体的结构发生变异。

2.2 再生植株的AFLP分析

由图 2 可以看出, 再生植株与对照相比发生了较大变异。1、4 和 7; 2、5 和 8; 3、6 和9, 差异清晰可见, 在图谱中可以看出谱带出现了缺失和增加, 如泳道 1、4 和 7 均为 3 号无性系, 1 为对照, 4 为 6-BA 诱导的再生植株, 7 为 2,4-D 诱导的再生植株, 在 800、590、610 和 400 bp 处, 4 和 7 均增加特异带。由此可见, 由不同激素诱导的再生植株发生的变异有趋同倾向, 但个体间仍有差异。

其余 11 对引物扩增出的片段同样有明显差异, 结果见表 2。与对照相比, 6-BA 和 2,4-D 所诱导的再生植株均发生变异, 6-BA 所诱导的再生植株多态性片段比例为10.04%, 而2,4-D 所诱导的再生植株多态性片段比例达18.64%, 说明在培养过程中加入不同的生长调节剂后, 体细

表 2 12 对选择性扩增引物在欧美杂种山杨基因组 DNA 中检出的扩增片段总数、多态性片段比例			
Table 2 Polymorphic fragments in genomic DNA amplified with 12 pairs of primer			
Treatment	Total fragments	Polymorphic fragments	Percentage of polymorphic fragments (%)
Control	1 718	-	-
Induced by 6-BA	2 559	257	10.04
Induced by 2, 4-D	3 149	587	18.64

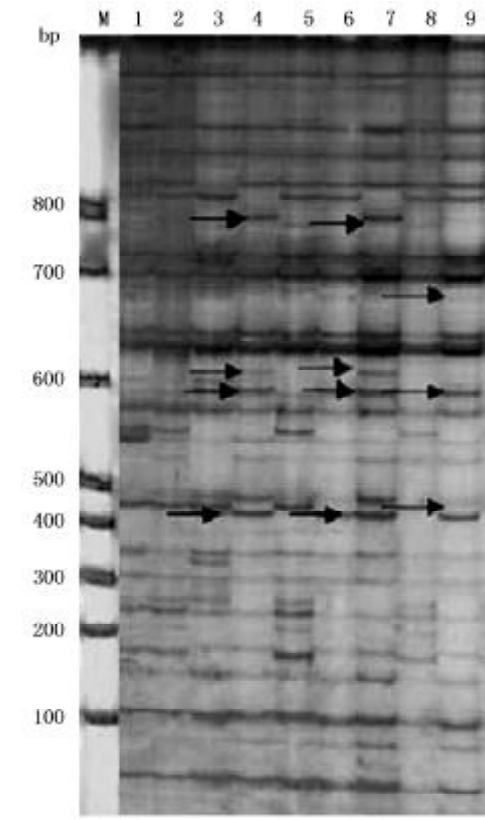


图 2 不同激素处理的无性系 3、11、13 的 M-CTT/E-ACG 引物指纹图谱
1~3. 对照; 4~6. 6-BA; 7~9. 2,4-D
Fig. 2 AFLP fingerprinting of line 3,11,13 treated with different hormones amplified by primers M-CTT/E-ACG
1-3. Control; 4-6. 6-BA; 7-9. 2, 4-D

胞无性系会出现变异,这与Sumita和Roy (2003)对 *Holarrhena antidysenterica* 用 15 mmol·L⁻¹ 的6-BA 诱导的再生植株DNA 检测结果相似。
从相似系数和遗传距离上分析,冯丽春等 (1997)认为相似系数0.7500(遗传距离为0.25 cM)是区分个体差异的界点,这一界点也正好能界定

本研究中的 3 个无性系,结果见表 3。从相似系数上看,由6-BA诱导的再生植株与对照比相似系数均在0.77以上,而2,4-D诱导的再生植株与对照比相似系数只有11号为0.7548,其余在0.75 以下。由此可说明,6-BA 诱导的再生植株遗传稳定性好,基本保持了亲本性状,而2,4-D 诱导的再生植株遗传稳定性差。

总之,从染色体数目、结构和 DNA 分子标记两方面均表明,在组织培养中,不同激素诱导欧美杂种山杨得到的体细胞无性系,均产生不同程度的变异,6-BA诱导的再生植株其遗传稳定性要好于 2,4-D 诱导的再生植株。

2.3 培养时间与体细胞无性系变异的关系
研究表明,体细胞无性系变异率随体细胞无性系继代次数和培养时间的增加而增高。本文对继代5次后的再生植株作了 AFLP 分析,结果见表 4。继代 5 次后的相似系数均在 0.66 以下,说明随着培养时间的延长,体细胞无性系变异也随之增加。这可能是在体细胞无性系中存在一个变异积累的问题。但这种变异可通过缩短培养时间来控制变异频率。这与 Al-Zahim等(1999)对大蒜体细胞无性系继代培养1 年后的 RAPD 多态性增加结果相似。

3 讨论

3.1 激素等培养成分诱导对体细胞无性系变异的影响

一些外界因素,如在组织培养过程中培养时间的长短、不同激素的诱导等,均能增加体细胞无性系变异的频率。Mitra 和 Steward (1961)在*Haplopappus gracilis*体细胞组织培养中首次发现体细胞减数分裂。顾蔚(1999)利用

表3 再生植株的相似系数和遗传距离

	3	11	13	3(BA)	11(BA)	13(BA)	3(2, 4-D)	11(2, 4-D)	13(2, 4-D)
3		0.8391	0.8143	0.7732	0.7538	0.7606	0.7343	0.7366	0.7512
11	0.1755		0.8821	0.8175	0.7834	0.7790	0.7651	0.7548	0.7678
13	0.2054	0.1255		0.8393	0.8025	0.7865	0.7592	0.7643	0.7773
3(BA)	0.2572	0.2015	0.1752		0.8636	0.8207	0.7874	0.7815	0.7692
11(BA)	0.2826	0.2442	0.2201	0.1466		0.8669	0.8001	0.8024	0.7895
13(BA)	0.2736	0.2497	0.2402	0.1976	0.1427		0.8503	0.8308	0.8253
3(2, 4-D)	0.3088	0.2678	0.2754	0.2390	0.2230	0.1622		0.8438	0.8275
11(2, 4-D)	0.3057	0.2813	0.2688	0.2466	0.2201	0.1854	0.1697		0.8818
13(2, 4-D)	0.2861	0.2642	0.2519	0.2624	0.2363	0.1920	0.1894	0.1258	

植物激素对蚕豆胚轴愈伤组织诱导产生染色体加倍和减倍现象,为实验所证实。王关林等(1989)对7种小冰麦异附加系进行愈伤组织诱导从而建立了体细胞无性系,并检测出再生植株的染色体有65.6%发生变异。Soniya等(2001)由毒莠定作为选择生长素和6-BA一起诱导番茄的愈伤组织,提取母本和11个随机选取来自单一愈伤组织再生体的DNA,用RAPD检测,出现15个非双亲带、3个相同带和12条特异带。张恩让等(2004)对大蒜体细胞无性系的染色体变异研究证明: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。郭晓红等(2001)对四合木组织培养中染色体变异的研究证明,染色体数目的变异以多倍体和超倍体细胞居多,染色体数不均等分裂和染色体组内少数染色体滞后的有丝分裂异常现象较常见,由于染色体数的不均等分裂,使得子代细胞的染色体数目发生了增加或减少,直接导致了非整倍体细胞的形成。同样,少数染色体滞后,使之落后于正常染色体分裂进程,造成染色体丢失,也导致了非整倍体的形成。本文使用 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D不同激素诱导的再生植株,染色体数目均发生变异,产生了非整倍体、多倍体和超倍体的细胞。将所得的

再生植株的基因组DNA进行AFLP分析,结果也表明了激素诱导可使体细胞无性系产生变异。这一结果也证明了培养基中重复使用2, 4-D和6-BA 2种激素是引起染色体数目变异的因素之一。至于激素引起染色体数目变异的机制,国内外有学者认为激素常引起核内的异常有丝分裂,2, 4-D可通过诱发内多倍体和再组核而使多倍体细胞频率加大,还可通过诱发多极分裂而加大非整倍体细胞频率;而6-BA可选择性地刺激多倍体细胞的分裂,并可引起内复制,从而导致培养组织中多倍体细胞频率加大(李士生和张玉玲, 1991)。可见,大量多倍体和非整倍体细胞形成的直接原因是由于有丝分裂异常造成的,而异常的有丝分裂与染色体数目的变异有某种相关关系(郭晓红等, 2001)。

植物组织培养中多倍体及非整倍体细胞的形成,看来不但与培养基中的激素成分有很大关系,还与培养时间有关(许智宏, 1985)。郭晓红等(2001)采用2, 4-D和6-BA 2种激素,诱导四合木的愈伤组织,2种激素的浓度虽不大,但由于长时间恒定使用,致使激素对染色体的损伤具有累加效应。本文对继代5次后的再生植株作了AFLP分析,结果表明继代培养时间越长,在DNA水平上的变异也随之增加。

3.2 愈伤组织与再生植株之间变异的联系

刁现民和孙敬三(1999)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

表 4 继代 5 次后的再生植株与第 1 代植株的遗传距离和相似系数

Table 4 Similarity coefficient and genetic distance between lines subcultured once and 5 times																																					
	3	11	13	3(BA)	11(BA)	13(BA)	(2, 4-D)			3	11	13	(2, 4-D)			3(5)	11(5)	13(5)	(BA, 5)			3	11	13	(2, 4-D, 5)			3	11	13	(2, 4-D, 5)						
3		0.8391	0.8143	0.7732	0.7538	0.7606	0.7343	0.7366	0.7512	0.6476	0.6266	0.6426	0.6569	0.6564	0.6495	0.6372	0.6474	0.6277																			
11		0.1755		0.8821	0.8175	0.7834	0.7790	0.7651	0.7548	0.7678	0.6500	0.6328	0.6506	0.6565	0.6445	0.6453	0.6469	0.6299																			
13		0.2054	0.12547		0.8393	0.8025	0.7865	0.7592	0.7643	0.7773	0.6502	0.6331	0.6480	0.6612	0.6655	0.6357	0.6500	0.6532	0.6346																		
3(BA)		0.2572	0.20147	0.17518		0.8636	0.8207	0.7874	0.7815	0.7692	0.6516	0.6334	0.6536	0.6537	0.6607	0.6374	0.6500	0.6443	0.6378																		
11(BA)		0.2826	0.24417	0.22005	0.14663		0.8669	0.8001	0.8024	0.7895	0.6337	0.6253	0.6371	0.6525	0.6504	0.6497	0.6384	0.6379	0.6233																		
13(BA)		0.2736	0.24969	0.24020	0.19759	0.14286		0.8503	0.8308	0.8253	0.6400	0.6356	0.6379	0.6504	0.6497	0.6384	0.6394	0.6379	0.6270																		
3(2,4-D)		0.3088	0.26775	0.27543	0.23902	0.22304	0.16216		0.8438	0.8275	0.6286	0.6146	0.6306	0.6502	0.6389	0.6291	0.6376	0.6287	0.6163																		
11(2,4-D)		0.3057	0.28133	0.26879	0.24656	0.22013	0.18537	0.16986		0.8818	0.6380	0.6273	0.6273	0.6412	0.6356	0.6300	0.6358	0.6267	0.6259																		
13(2,4-D)		0.2861	0.26422	0.25189	0.26238	0.23632	0.19202	0.18939	0.12581		0.6317	0.6175	0.6198	0.6419	0.6274	0.6219	0.6322	0.6246	0.6135																		
3(5)		0.4345	0.43077	0.43045	0.42826	0.45612	0.44625	0.46432	0.44944	0.45940																											
11(5)		0.4674	0.45755	0.45714	0.45671	0.46957	0.45316	0.48678	0.48140	0.48214	0.31034																										
13(5)		0.4422	0.42982	0.43388	0.42519	0.45081	0.44962	0.46112	0.46637	0.47836	0.29608	0.27040																									
3(BA, 5)		0.4203	0.42081	0.41375	0.42508	0.42698	0.43017	0.43051	0.44444	0.44330	0.31653	0.27604	0.25553																								
11(BA, 5)		0.4210	0.42155	0.40723	0.41447	0.43022	0.43121	0.44795	0.45324	0.46619	0.36383	0.30344	0.30083	0.27137																							
13(BA, 5)		0.4316	0.43934	0.45305	0.45035	0.44548	0.44884	0.46353	0.46200	0.47494	0.35214	0.36478	0.32847	0.32116	0.28524																						
3(2,4-D, 5)		0.4507	0.43800	0.43084	0.43080	0.43722	0.44719	0.45000	0.45285	0.45853	0.38399	0.36382	0.36097	0.34443	0.35124	0.34773																					
11(2,4-D, 5)		0.4348	0.43554	0.42593	0.43964	0.44394	0.44954	0.46404	0.46730	0.47059	0.36842	0.37474	0.37384	0.36161	0.35597	0.37004	0.33689																				
13(2,4-D, 5)		0.4657	0.46226	0.45476	0.44971	0.47271	0.46682	0.48410	0.46860	0.48865	0.36611	0.35152	0.32359	0.37204	0.36667	0.37654	0.37081	0.30099																			

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。黄道强等(2001)以5个籼稻品种的幼穗为外植体,采用愈伤组织继代培养方法诱导水稻体细胞无性系,愈伤组织经继代培养后,绿苗分化率随着继代数的增加而迅速下降。经3次继代培养后,有些材料已经或几乎失去绿苗分化能力,有些甚至出现白化苗。本文通过对欧美杂种山杨愈伤组织诱导形成的再生植株的检测,证实了细胞在染色体数目、结构和DNA水平上均发生不同程度的变异,这可能是由于在愈伤组织诱导过程中激素等其他因素的影响而使细胞发生不同程度的变异,这些变异结果一部分被遗传,一部分则丧失。愈伤组织在长期继代中会形成大量的多倍体、非整倍体及少数染色体桥、落后染色体或染色体缺失、易位及倒位等,从而导致组织分化能力下降,不能分化出再生植株,能够再生的植株多数是没有变异或变异很小的植株。另一原因可能是将愈伤组织转入分化培养基诱导的过程中,由于培养基的组成改变而诱导产生新的变异。

3.3 分子标记在体细胞无性系变异研究中的应用

Sumita 和 Roy (2003) 对 *Holarrhena antidysenterica* 的体细胞无性系进行染色体数目和DNA的分析,结果表明,染色体倍性没有变化,但将不同时期的再生植株经4C核DNA估计,确定在培养过程中加入不同的生长调节剂后,在愈伤组织形态学和体细胞胚中出现变异。有的学者将水稻经离体培养后,得到的表型改变和正常的再生植株进行RAPD分析,结果表明所有的体细胞无性系与母株材料都有明显不同。这说明无论表型如何,在所有株系中都发生了基因组改变,从DNA水平上讲,没有任何

一个变异株系与供体是近等基因系,一些DNA水平上的变异可能是高度重复序列,所以,没有表现型上的改变。这个研究从基因组水平上清楚地演示了体细胞无性系变异的程度和类型(姜淑梅等, 2004)。Rahman和Rajora (2001) 用SSR检测随机选取来自 *Populus tremuloides* 3个基因型的组培苗的体细胞无性系变异,结果表明, *P. tremuloides* 微繁苗的遗传忠实性不能得到保证,甚至将组织良好的营养芽用于组培时,也存在体细胞无性系变异。Patzak (2003)对麻草体细胞无性系通过分子方法(RFLP、RAPD、STS、ISSR和AFLP)分析,在AFLP反应中,每个分生无性系与其母本之间,在DNA序列上的可变性为82.4%~99.3%,在这些无性系中,无性系之间DNA序列的可变性的确高于无性系内DNA序列的可变性。本文用AFLP分子标记技术分析欧美杂种山杨体细胞无性系的变异。结果说明在组织培养过程中,不同的生长调节物质能导致体细胞无性系发生变异,愈伤组织的诱导、继代培养和分化过程均可产生新的变异。

大量的资料表明,植物组织培养可产生体细胞无性系变异。对体细胞无性系变异的认识由染色体水平深入到分子水平,这有助于了解植物细胞在离体培养过程中的基因表达和调控,以及植物组织和细胞在分化、发育及遗传等方面的复杂性(张春义和杨汉民, 1994)。本文对欧美杂种山杨在无性繁殖过程中的遗传变异进行了染色体水平和分子水平的研究,得到的研究结果将对山杨种质资源创新及其良种选育具有一定的指导作用;对林木遗传改良具有一定的应用价值。

参考文献

- 刁现民, 孙敬三 (1999). 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展. 植物学通报 16, 1-7.
- 冯丽春, 杨光伟, 余茂德, 张孝勇, 向仲怀 (1997). 利用RAPD对桑属植物种间亲缘关系的研究. 中国农

- 业科学 30, 52-56.
- 冯志杰 (1993). 植物体细胞无性系变异发生的遗传机理. 农业生物技术学报 1, 8-17.
- 顾蔚 (1999). 植物激素对蚕豆胚轴愈伤组织染色体加倍和减倍的影响. 陕西师范大学学报 27, 100-102.
- 郭晓红, 慈忠玲, 孙静 (2001). 珍稀濒危树种——四合木组织培养过程中的染色体变异. 内蒙古农业大学学报 22, 55-59.
- 黄道强, 黄慧君, 陈文丰, 高云, 程俊彪 (2001). 水稻幼穗继代培养体细胞无性系变异及其在育种上的应用. 广东农业科学 1, 2-4.
- 姜淑梅, 孙霞, 胡尚连, 李文雄 (2004). 春小麦体细胞无性系变异早期检测研究. 生物技术 14, 20-23.
- 李懋学, 张敦方 (1991). 植物染色体研究技术(哈尔滨: 东北林业大学出版社), pp. 30-30.
- 李士生, 张玉玲 (1991). 小麦愈伤组织及再生植株的染色体变异. 遗传学报 18, 332-338.
- 王关林, 方宏筠 (1995). 异源八倍体小冰麦体细胞无性系的建立及其染色体变异. 植物学报 37, 458-464.
- 王关林, 何孟元, 郝水 (1989). 小冰麦异附加系的体细胞无性系建立及其变异的研究. 植物学报 31, 495-504.
- 王卓伟, 余茂德, 鲁成, 杨光伟, 敬成俊 (2001). 桑树多倍体育种材料遗传背景的 AFLP 分析. 桑业科学 27, 170-175.
- 许智宏 (1985). 植物体细胞的遗传变异. 遗传 7, 37-40.
- 詹亚光, 齐凤慧, 杨传平 (2004). 欧美杂种山杨愈伤组织再生系统的建立. 植物生理学通讯 40, 437-440.
- 张春义, 杨汉民 (1994). 植物体细胞变异的分子基础. 遗传 16, 44-48.
- 张恩让, 程智慧, 周新民 (2004). 大蒜体细胞无性系的染色体变异研究. 西北农林科技大学学报 32, 73-76.
- 朱至清 (1995). 体细胞无性系变异. 见: 植物细胞工程实验技术, 孙敬三和桂耀林主编 (北京: 科学出版社), pp. 112-125.
- Al-Zahim, M.A., Ford-Lloyd, B.V., and Newbury, H.J. (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Rep. 18, 473-477.
- Mitra, J., and Steward, F.C. (1961). Growth induction in cultures of *Haplopappus gracilis*. II. The behavior of the nucleus. Am. J. Bot. 48, 358-368.
- Ostry, M.E., and Skilling, D.D. (2003). Somaclonal variation in hybrid poplars for resistance to septoria leaf spot. In Proceedings of the 5th North Central Tree Improvement Conference: North Central Tree Improvement Cooperative, G. A. Tuskan, ed (New Delhi: Fargo), pp. 89-100.
- Patzak, J. (2003). Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. Euphytica 131, 343-350.
- Rahman, M.H., and Rajora, O.P. (2001). Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). Plant Cell Rep. 20, 531-536.
- Shepard, J.F., Bidney, D., and Shahin, E. (1980). Potato protoplasts in crop improvement. Science 208, 17-24.
- Sibi, M. (1976). The idea of a genetic programme in higher plants. II. Experimental aspect. Obtaining variants by *in vitro* tissue culture of *Lactuca sativa* L. Appearance of vigour in the crosses. Annl. Amelior. Plantes 26, 523-547.
- Skirvin, R.M., and Janick, J. (1976). Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 101, 281-290.
- Soniya, E.V., Banerjee, N.S., and Das, M.R. (2001). Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. Curr. Sci. India 80, 1213-1215.
- Sumita, R., and Roy, S.C. (2003). Chromosome stability in culture-derived plants of *Holarrhena antidysenterica* Wall. and study of differentiating tissues using SEM. Caryologia 56, 329-335.

(责任编辑: 白羽红)