

## 鹅观草属——人工合成双二倍体 ( $2n = 10x = 70$ ) 的细胞学及育性的研究\*

卢宝荣 杨俊良

(四川农业大学小麦研究所, 都江堰 611830)

**摘要** 本文对缘毛鹅观草 (*Roegneria pendulina*)、鹅观草 (*R. tsukushiensis* var. *transiens*)及其人工合成杂种 $F_1$ 、双二倍体进行了细胞学、育性等分析和研究。结果表明双亲的减数分裂,花粉育性和结实性均正常,杂种 $F_1$ 的减数分裂不规则且完全不育;当代双二倍体的染色体数目为70,其减数分裂构型为:  $6.04 \text{ I} + 26.21 \text{ II} + 1.52 \text{ III} + 1.59 \text{ IV} + 0.02 \text{ V}$ ;第二代双二倍体的染色体数目为70,个别植株为69,减数分裂构型分别为:  $4.16 \text{ I} + 27.33 \text{ II} + 0.50 \text{ III} + 2.16 \text{ IV}$ 和 $4.79 \text{ I} + 26.26 \text{ II} + 1.13 \text{ III} + 2.13 \text{ IV}$ 。与期望染色体配对模式相比,双二倍体中二价体出现的频率有明显增大的趋势。在减数分裂 A I 和 A II 分别观察到数目不定的落后单价体,大部份的四分体中出现了微核。双二倍体的育性得到了很大程度的恢复,其花粉可染色性及结实率分别为54.4%和64.0%。

**关键词** 缘毛鹅观草; 鹅观草; 种间杂交; 双二倍体; 染色体组; 细胞学; 育性

多倍体的形成及发展在高等植物的演化过程中起着十分重要的作用<sup>[1]</sup>。两个重叠分布而具有一定亲缘关系的物种,有可能发生天然杂交而形成高度不育的杂种,并随染色体的自然加倍而形成兼具双亲不同性状的多倍体物种。

鹅观草属 (*Roegneria* C. Koch.) 是小麦族 (*Triticeae* Dumort.) 中仅由多倍体种构成的属。按目前的资料记载,该属是由3个染色体组不同的二倍体基本种(SS、HH和YY)以不同的组合方式通过天然杂交,染色体加倍等方式进一步演化形成的<sup>[6]</sup>。鹅观草属在我国按最新的记载约有70个种<sup>[4,5]</sup>。是麦类作物改良和牧草育种的重要基因资源。由于该属各个物种之间的亲缘关系较近,因而属内各个种之间发生天然杂交的情况较常见。如分布于我国的杂交鹅观草 (*R. hybrida*) 系由鹅观草 (*R. tsukushiensis* var. *transiens*, Syn *R. kamoji*) 与纤毛鹅观草 (*R. ciliaris*) 天然杂交而成<sup>[4]</sup>; 日本植物志所收录的东瀛鹅观草 (*R. mayebarana*) 则是鹅观草与湿生鹅观草 (*R. humidorum*) 之间的天然杂种<sup>[6]</sup>。此外,笔者在野外考察中也发现了大量天然杂种出现在该属不同物种的混居地带。这些例子均证明种间杂交及染色体自然加倍在该属的形成和不断演化中的重要作用。

本文对鹅观草属的两个种,鹅观草 (*R. tsukushiensis* var. *transiens*,  $2n = 6x = 42$ , SSHHYY), 缘毛鹅观草 (*R. pendulina*,  $2n = 4x = 28$ , SSYY) 及其杂种 $F_1$ 和双二倍体的细胞学和育性进行了分析,旨在探索对完全不育的种间杂种进行染色体加倍之后,其细胞学稳定性和育性的复杂程度。

### 材料和方法

#### (一) 实验材料

本研究涉及的实验材料系由野外采集的种子标本而萌生的植株,各材料的来源见表1,

\*本项研究由国家自然科学基金及联合国粮农组织 IBPGR 资助。

表1 实验材料及来源

Table 1. Experimental materials and their origin

种 名 Taxa	编 号 No. of accessions	2n	产 地 Locality	采 集 人 Collector
<i>Roegneria pendulina</i>	86—155	28	陕西, 西安 Xian, Shannxi	杨俊良, 卢宝荣 J. L. Yang, B.R.Lu
<i>R. pendulina</i> var. <i>pubinodis</i>	86—156	28	河南, 郑州 Zhengzhou, Henan	(同上)
<i>R. tsukushiensis</i> var. <i>transiens</i>	86—143	42	四川, 雅安 Yaan, Sichuan	(同上)

表2 种间杂交及双二倍体诱导结果

Table 2. Results of interspecific hybridization and colchicine treatment of F<sub>1</sub> hybrids

杂交组合 Combinations	授 粉 小花数 Florets pollinated	结 实		发 芽		秋水仙碱处理 F <sub>1</sub> 植株数 No. of F <sub>1</sub> plants treated with Colchicine	双二倍体 Amphi- diploid No. %	结实 Seed set (%)	发 芽 Germi- nation (%)
		Seed set	Germination	No. %	No. %				
<i>R. pendulina</i> × <i>R. tsukushiensis</i> var. <i>transiens</i>	201	125 62.2	38 30.4	30	3 10.0	68.5	82*		
<i>R. pendulina</i> var. <i>pubinodis</i> × <i>R. tsukushiensis</i> var. <i>transiens</i>	112	95 84.8	4 4.2	3	0 0	—	—		

\*其中有20%的种子只长根或只长芽。

\*20% of the germinated seed had either roots or shoots.

该材料现种植于四川农业大学小麦研究所。

## (二) 方法

1, 种间杂交及加倍处理: 对缘毛鹅观草进行人工去雄并套袋, 2天后授以成熟的鹅观草花粉。30天后收获杂种种子并统计杂交结实率, 杂种种子保存于干燥条件之下。播期将杂种置于培养皿内在室温下萌发, 统计杂种发芽率, 将幼苗种于盆内。当幼苗长到4—5叶时期, 取部分幼苗冲洗去泥沙, 浸泡于浓度为0.05%的秋水仙碱水溶液中进行染色体加倍处理, 时间为30小时, 温度为8℃(±1℃)。另一部份F<sub>1</sub>幼苗任其在盆中生长, 以供细胞学和育性分析。对染色体已经加倍的双二倍体植株, 让其自然结实, 种子成熟后收获。统计结实率并保存。于播期, 种植第二代双二倍体, 统计出芽率及成株数。

2. 细胞学分析: 杂种 $F_1$ 、双二倍体及第二代双二倍体的根尖染色体制片按 Hsiao 等<sup>[7]</sup>介绍的醋酸地衣红压片法进行。将根尖经 $\alpha$ -溴萘的饱和水溶液预处理6小时, 然后固定于0.2%的醋酸地衣红中, 在0—4℃条件下贮藏一星期后换至2%的醋酸地衣红染色2天, 在45%的醋酸中压片。当亲本、杂种 $F_1$ 和双二倍体处于孕穗期, 取幼穗置于卡诺氏II固定液中(冰醋酸: 氯仿: 纯酒精=1:3:6), 在0—4℃的低温条件下固定4小时后换至70%的酒精中, 贮藏于冰箱中至少24小时。幼穗的染色以盐酸酒精洋红(Snow's carmine)法进行<sup>[12]</sup>(该方法能起到染色体分散并着色好、细胞质不易被染色的作用)。具体步骤: 将贮于酒精中的幼穗移至盐酸酒精洋红中, 在62℃(±2℃)的恒温下染色48小时, 然后置于室温或保存于0—4℃的冰箱中(在低温条件下, 染色材料可以存放3—8月而染色效果不会变劣)。染色后的花药在45%的醋酸中进行压片。花粉母细胞(PMC)减数分裂的观察和统计及染色体形态、配对行为的显微摄影均在永久制片中进行。

3. 育性分析: 对亲本、杂种 $F_1$ 及双二倍体的花粉粒以棉蓝(cotton blue)水溶液进行染色, 统计花粉粒的可染色性; 对上述各材料进行结实率的统计, 并综合以上指标对各材料的育性作出估价。

亲本、杂种 $F_1$ 及双二倍体的凭证标本存放于四川农业大学小麦研究所标本室。

## 实验结果

### (一) 种间杂交结果

2个杂交组合均得到了杂种种子, 其杂交结实率及杂种萌发结果见表2。杂交组合86—156×86—143虽然结实率高, 但大多数杂种种子均不饱满, 故出芽率很低(4.2%), 从该

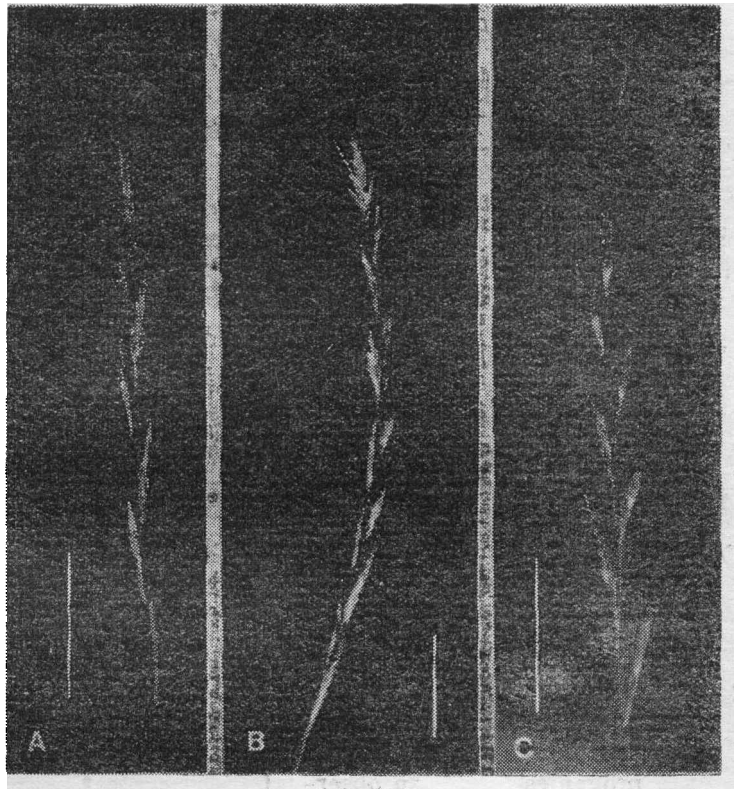


图1 亲本及双二倍体的穗形态

A. 缘毛鹅观草; B. 双二倍体; C. 鹅观草。比例尺=2cm。  
Fig. 1. Spikes of the parents and amphidiploid  
A. *Roegneria pendulina*; B. The amphidiploid;  
C. *R. tsukushiensis* var. *transiens*. Bar=2cm.

组合获得4株杂种幼苗；另一组合86—155×86—143的杂交结实率略低，但杂种种子大多饱满，出芽率也较高（30.4%），获得38株幼苗。杂种植株的形态介于双亲之间，既具有母本缘毛鹅观草穗子被毛、紫色花药的性状也具有父本鹅观草叶鞘边缘具纤毛和芒长的特征。亲本及杂种形态的比较见卢宝荣等<sup>[1]</sup>的分析。

### (二) 杂种 F<sub>1</sub> 染色体加倍处理的结果

2个经秋水仙碱处理的组合中，仅有1个组合，即86—155×86—143获得3株染色体已加倍的双二倍体植株，染色体加倍的诱导频率为10%。另一组合经秋水仙碱处理的幼苗全部死亡（表2）。该双二倍体植株高大，颜色浓绿，其形态兼具双亲的特征，但总体来看，该双二倍体植株在形态上较为明显地偏近于缘毛鹅观草（图1），结实率也较高，平均为68.5%，种子较双亲均大，其发芽率为82.0%（表2）。本实验只保留了6个幼株供细胞学观察和育性分析。第二代双二倍体植株的形态与亲代相似，但在株间有变异，如：有的植株颜色较为浓绿，直立，而有些则植株色浅且弯曲。

### (三) 细胞学观察结果及其分析

1. 杂种 F<sub>1</sub> 的细胞学：两个组合各杂种 F<sub>1</sub> 的染色体数目均为  $2n = 5x = 35$ 。其减数分

表3. 减数分裂MI双亲、杂种和双二倍体的染色体构型

Table 3. Chromosome pairing at MI of the parents, F<sub>1</sub> hybrid and amphidiploid

亲本及后代 Parents and progenies	观察细胞数 No. Cells	2n observed	染色体构型 Chromosome configuration							每细胞染色体交叉数 Chiasmata /cell
			I	I		II	IV	V		
				Total	Rods				Rings*	
<i>R. pendulina</i> 86—155	28	50	14.00 (14)	0.26 (0-3)	13.74 (11-14)	—	—	—	27.74 (25-28)	
<i>R. tsukushiensis</i> var. <i>transiens</i> 86—143	42	50	0.28 (0-2)	20.86 (20-21)	0.46 (0-2)	20.40 (19-21)	—	—	—	41.24 (39-42)
<i>R. pendulina</i> × <i>R. tsukushiensis</i> var. <i>transiens</i>	35	54	9.88 (6-17)	10.98 (6-14)	3.24 (0-7)	7.76 (0-14)	0.37 (0-2)	0.51 (0-1)	—	21.33 (15-28)
双二倍体 Amphidiploid (1st generation)	70	45	6.04 (1-15)	26.21 (21-30)	5.25 (2-11)	20.96 (15-28)	1.52 (0-3)	1.59 (0-1)	0.02 (0-1)	54.87 (44-62)
双二倍体 Amphidiploid (2nd generation)	70	21	4.16 (1-14)	27.33 (20-31)	4.87 (3-11)	22.46 (15-28)	0.50 (0-1)	2.16 (0-3)	—	58.43 (43-66)
双二倍体 Amphidiploid (2nd generation)	69	39	4.79 (1-14)	26.26 (21-30)	6.82 (3-12)	19.44 (15-27)	1.13 (0-3)	2.13 (0-4)	—	55.59 (44-64)

\*Total 二价体总数; Rods 棒形二价体; Rings 环形二价体。

裂过程均不正常。见卢宝荣等<sup>[8]</sup>的分析及表3。各杂种 $F_1$ 在减数分裂M I平均形成11.1和11.0个二价体,最高可达14 II,均有大量的单价体形成。每细胞的平均染色体交叉数为17.6和21.3。由于双亲的染色体组分别为SSYY和SSHYY<sup>[2,8]</sup>,故杂种 $F_1$ 的染色体组被推断为HSSYY。

2. 双二倍体的细胞学: 双二倍体的根尖细胞学观察表明,其染色体数目为 $2n=10x=70$ ,见图2 A及表3。杂种 $F_1$ 经染色体加倍之后,减数分裂过程得到了较大的改善。双二倍体的减数分裂构型为: $6.04 I + 26.21 II + 1.52 III + 1.59 IV + 0.02 V$ 。

二价体形成最高可达每细胞30 II,这与期望染色体配对模式 $4.67 I + 16.31 II + 4.67 III + 4.67 IV$ 相比有较大的差异。在减数分裂A I可见36:34的不均等染色体分离(图4 A)或落后单价体(图4 B)。88.3%的减数分裂A II细胞形成了数目不等的落后染色体,在87.1%的四分体中观察到了微核的形成。

3. 第二代双二倍体的细胞学: 亲代双二倍体结实产生的种子,其萌生的根尖在进行细胞学检查后发现,除多数 $2n=70$ 的个体外,还有少数 $2n=69$ 的个体(图2 B)。本实验只分别对 $2n=70$ 和 $2n=69$ 的各一株进行了减数分裂的分析。第二代双二倍体的减数分裂规则程度与亲代的较相似(图3)。其减数分裂构型分别为: $4.16 I + 27.33 II + 0.50 III + 2.16 IV$ 和 $4.79 I + 26.26 II + 1.13 III + 2.13 IV$ 。二价体形成数最高分别为30 II和31 II,每细胞平均染色体交叉数分别为58.43和55.95。与亲代双二倍体减数分裂相似,在A I中出现了不均等染色体分离和落后染色体。87.5%的A II细胞中可见数目为1—5的落后染色体,86.2%的四分体中形成数目为1—4的微核(图4 C, D)。

#### (四) 亲本及各衍生后代的育性分析

缘毛鹅观草的花粉可染色性及结实性均正常,而杂种 $F_1$ 则完全不育<sup>[8]</sup>。

花粉育性和结实率在各代双二倍体中均得到很大程度的恢复,亲代双二倍体的可染色花粉数为58.3%,结实率为68.7%(表4)。第二代双二倍体的花粉可染色性和结实率在植物间有所变异,各植株的可染色花粉数平均为50.4%(最高达74.7%),结实率为59.3%(最高达76.1%)。染色体数目为69的植株其花粉育性和结实率均略偏低,但这似乎与缺失

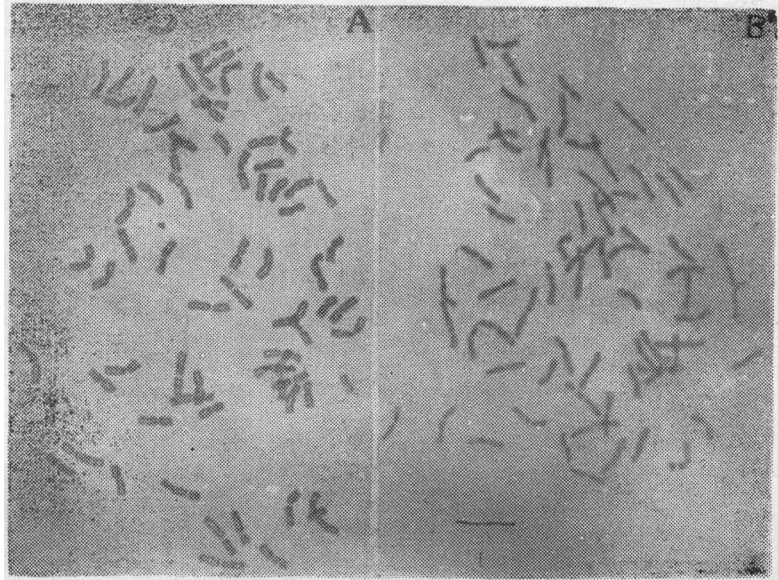


图2. 双二倍体的染色体形态

染色体数目为70(A)及69(B)的双二倍体。比例尺=10 $\mu$ 。

Fig. 2. Chromosome morphology of the amphidiploids with 70—(A) and 69— Chromosomes (B).

Bar=10 $\mu$

单个染色体并没有直接关联, 因为染色体数目为70的另一植株, 其育性也较低(表4)。

## 讨 论

多倍体的形成和进一步演变在小麦族的进化过程中占据着十分重要的地位, 这已为多年来该族各个种之间的细胞遗传学、生物系统学等的研究所证实<sup>[8]</sup>。鹅观草为多年生六倍体植物(SSHHYY), 广泛地分布于中国、朝鲜和日本<sup>[1, 10]</sup>, 缘毛鹅观草为四倍体多年生植物(SSYY), 分布于中国、日本和苏联<sup>[4, 13]</sup>。两个种在分布区上有一定的重叠区域, 而且两个种之间的杂交很容易进行, 在自然情况下也可产生种间杂种。本实验的种间杂种(HSSYY)完全不育, 但在双二倍体(HHSSSSYYYY)中育性得到了很大程度的恢复, 育性最高的个体已接近双亲的水平。如与小麦族中的其它一些物种, 如赖草属(*Leymus*)和偃麦草属(*Elyt-*



图3 双二倍体 PMC 减数分裂 MI 染色体图象

Fig. 3. Meiotic pairing of PMCs of the amphidiploids at MI

A.  $2n=69, 1\text{ I} + 28\text{ II} + 3\text{ IV}$ ; B.  $2n=70, 7\text{ I} + 29\text{ II} + 1\text{ III}$ ;  
C.  $2n=70, 2\text{ I} + 28\text{ II} + 31\text{ IV}$ ; D.  $2n=70, 1\text{ I} + 27\text{ II} + 1\text{ III} + 3\text{ IV}$ .

Bar = 10 $\mu$

*rigia*) 的某些种类相比, 该双二倍体的结实率已达到较高的水平, 能够进行正常的有性繁殖。该双二倍体的染色体期望配对模式为:  $4.67\text{ I} + 16.31\text{ II} + 4.67\text{ III} + 4.67\text{ IV}$ , 与之相比, 无论是亲代或第二代双二倍体的二价体配对数均有显著增加, 而多价体的形成数明显降低, 这说明染色体的配对趋于二倍体水平, 所谓“二倍体化”的作用明显地产生于染色体得到加倍的当代双二倍体材料之中。这对于该双二倍体材料的细胞遗传稳定性无疑是有重要意义的。在双二倍体的减数分裂后期曾观察到一定数目的落后染色体, 以致于86.2%的四分体中都出现了数目不等的微核, 即正常四分体的形成数大约为14%。但是, 双二倍体的无论是花粉育性还是结实率都远远高于这个水平, 这说明染色体数目为70的该双二倍体可以忍受

表4 亲本、杂种及各双二倍体的花粉育性和结实率  
Table 4. Pollen fertility (Pf) and seed set of the parents, F<sub>1</sub> hybrid and amphidiploids

亲 本 及 后 代 Parents and progenies	2n	观 察 花 粉 数 No. of pollens observed	花 粉 育 性		观 察 小 花 数 No. of floret observed	结 实	
			Pf			seed set	
			No.	%		No.	%
<i>R. pendulina</i>	28	179	150	83.8	100	91	91.0
<i>R. tsukushiensis</i> var. <i>transiens</i>	42	135	151	82.2	100	92	92.0
杂 种 F <sub>1</sub> ( F <sub>1</sub> hybrid )	35	400	1	0.25	3000	4	0.02
双二倍体 ( Amphidiploid )	70	168	98	58.3	262	180	68.7
第二代双二倍体 Amphidiploid (2nd generation)							
Am-2-1	70	214	160	74.7	138	105	76.1
Am-2-2	70	138	73	52.9	144	93	64.1
Am-2-3	69	107	43	40.2	258	93	41.6
Am-2-4	70	151	51	33.8	212	122	57.5
Am-2-5	70	102	43	44.1	168	76	45.2
Am-2-6	70	168	95	56.5	126	90	71.4
			x= 50.4			x= 59.3	

个别染色体的缺失或重复而对植株的育性影响不太大, 这对于该双二倍体的有性繁殖也具有非常重要的意义。

小麦族植物不仅是小麦、大麦和黑麦等粮食作物育种工程的巨大基因库, 而在该属中还拥有大量的优质牧草种类, 如: 冰草 (*Agropyron cristatum*)、老芒麦 (*Elymus sibiricus*) 以及羊草 (*Leymus chinensis*) 等。本实验所合成的双二倍体为多年生植物, 既具有较强的有性生殖能力, 又能进行无性繁殖, 无论在生长势和植株的高度等诸方面都明显优于双亲。对其是否可直接用于牧草尚待进一步研究。但是, 在牧草的育种程序中, 可否将两个分别具有不同优点的小麦族多倍体物种通过种间杂交和染色体加倍的方式, 合成新的双二倍体物种, 使之兼具双亲的优点, 而又由于其多倍体的特点而具较高的产青量和较好的品质。这种方法不仅具有一定的潜在价值, 而且在理论上和实践上也是可行的。

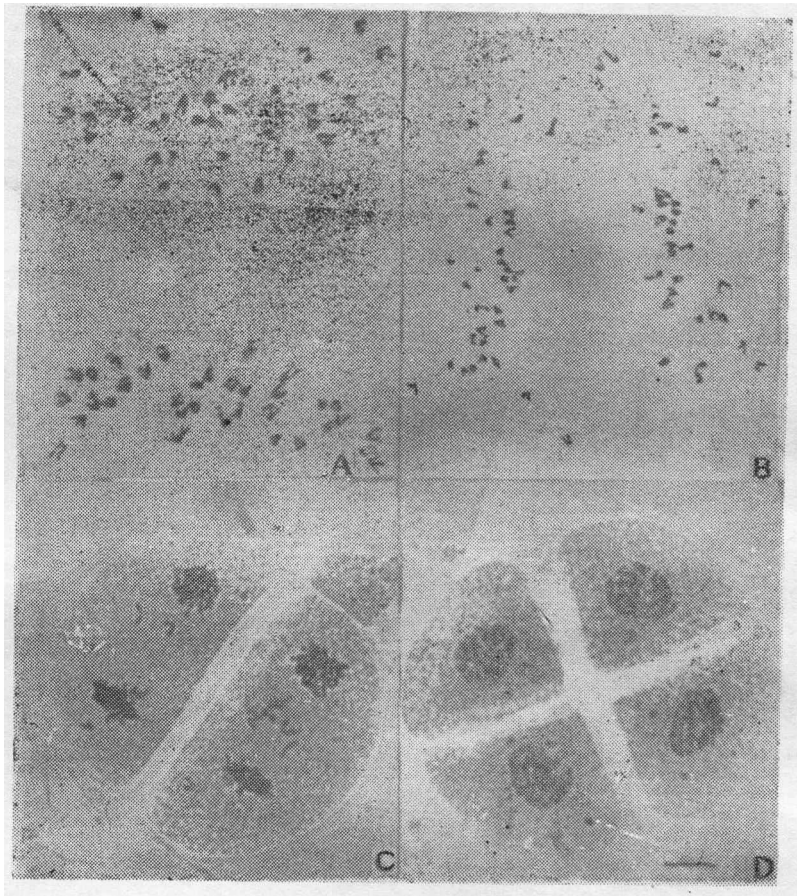


图4. 双二倍体的减数分裂A I, A II和四分体期

- A. 减数分裂A I形成34:36不均等染色体分离;  
 B. 减数分裂A I不均等染色体分离和落后单价体;  
 C. 减数分裂A II中的落后染色体;  
 D. 四分体中的微核(1—3)。比例尺=10 $\mu$ 。

Fig. 4. Meiosis of the amphidiploid at A I, A II and in a quartet

- A. Chromosome 34: 36 unequal segregation at AI; B. Chromosome unequal segregation in addition to laggards at AI; C. Laggards at AII; D. Micronuclei in a quartet. Bar=10 $\mu$ .

### 参 考 文 献

- 〔1〕卢宝荣等, 1988: 鹅观草属三个种的形态变异与核型的研究。云南植物研究, 10(2): 139—146。  
 〔2〕卢宝荣等, 1988: 鹅观草属三个种的染色体组分析与同工酶分析。云南植物研究, 10(3): 261—270。  
 〔3〕耿以礼等, 1959: 中国主要植物图说——禾本科。362—364, 科学出版社, 北京。  
 〔4〕耿以礼等, 1963: 国产鹅观草属 *Roegneria* C. Koch 之订正。南京大学学报, 1: 1—92。  
 〔5〕郭本兆等, 1987: 中国植物志。9(3): 51—104, 科学出版社, 北京。



## CYTOLOGY AND FERTILITY STUDIES OF ARTIFICIAL AMPHIDIPOIDS ( $2n=10x=70$ ) OF TWO ROEGNERIA SPECIES

Lu Baorong and Yang Junliang

(Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangan 611830)

**Abstract** Cytology and fertility of *Roegneria pendulina* ( $2n=4x=28$ , SSYY), *R. tsukushiensis* var. *transiens* ( $2n=6x=42$ , SSHHYY) and their artificial hybrids ( $2n=5x=35$ , HSSYY), amphidiploids ( $2n=10x=70$ , HHSSSSYYYY) were analysed and compared in this paper. Meiosis, pollen fertility and seed set of the two parental species were quite normal, while those of  $F_1$  hybrids were abnormal. Meiotic configuration of the amphidiploid which possessed 70 chromosomes was  $6.04 I + 26.21 II + 1.52 III + 1.59 IV + 0.02 V$ . The second generation of the amphidiploid contained 70 chromosomes plus very few individuals having 69 chromosomes. Meiotic configurations were  $4.16 I + 27.33 II + 0.50 III + 2.16 IV$  for a 70-chromosome individual, and  $4.79 I + 26.26 II + 1.13 III + 2.13 IV$  for a 69-chromosome one, respectively. Frequencies of bivalents in the amphidiploids tended to increase obviously in comparison with the expected chromosome pairing model of the meiosis. Lagging chromosomes were observed at Anaphase I and II. Micronuclei were found in most quaternets of the amphidiploids. Fertility of the amphidiploid was examined to be rather high with an average of 54.4% stainable pollen and 64.0% seed set, respectively.

**Key words:** *Roegneria pendulina*; *R. tsukushiensis* var. *transiens*; Interspecific hybridization; Amphidiploid; Genome; Cytology; Fertility