

棉花体细胞培养中染色体的变异

周志林^{1,2}, 聂以春¹, 张献龙¹, 胡婷婷²

(1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2. 江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 江苏 徐州 221121)

摘要: 以陆地棉体细胞培养获得的胚性愈伤、体细胞胚和再生植株的根尖为材料, 用饱和对氯二苯预处理, 固定、酸解、染色, 进行染色体制片, 观察分析棉花体细胞培养中染色体数目的变异。结果表明: 继代培养 14 d 的胚性愈伤组织在饱和对二氯苯处理 3.5 h 后制成的染色体涂片具有很好的观察效果; 染色体数目变异主要集中在偏向于 52 条染色体, 随着体细胞胚的发生、成熟、植株再生, 具有正常染色体数细胞的比例逐渐增加, 推测具有非正常染色体的细胞在体细胞胚的发育及植株再生过程中丧失了植株的分化能力。

关键词: 棉花; 组织培养; 变异

中图分类号: S562.032

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2008)02-0126-04

Chromosomal Variations during Culture of Somatic Cells of Cotton

ZHOU Zhi-lin^{1,2}, NIE Yi-chun¹, ZHANG Xian-long¹, HU Ting-ting²

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District, Xuzhou 221121, China)

Abstract: To observe the chromosomal variation during somatic cell culture of cotton, Chromosome smears were prepared using the embryogenic calli, somatic embryos and tips of regenerated plantlets of upland cotton as materials after pretreated with saturated paradichlorobenzene, and fixation, acidolysis and dyeing. Subculturing for 14 d and pretreating with paradichlorobenzene for 3.5 h made the chromosomes in the embryogenic calli rod shaped, which were good for counting. Most of the cells had chromosomes from 41 to 52; however, the percentage of cells with normal 52 chromosomes was increased gradually with somatic embryogenesis and plant regeneration. It was speculated that cotton cells with abnormal chromosome numbers lost the abilities of differentiation during somatic embryogenesis and plant regeneration.

Key words: cotton; tissue culture; variation; cytology

自 Davidonis^[1] 在改良 LS 和 MS 培养基上首次获得陆地棉再生植株以来, 棉花组织培养技术得到了快速地发展。由于在培养过程中激素、培养时间等因素影响, 导致棉花的体细胞发生无性系变异, 这种变异中大多是不利变异^[2,3]。随着继代培养时间

的延长, 体细胞的植株再生能力也逐渐下降, 再生苗表现为畸形、不育^[4], 对棉花细胞培养技术的应用带来一定的阻碍。由于棉花染色体比较小, 难分散, 染色困难, 制片难度较大^[5], 为此大多数学者都利用形态标记^[6-8]来研究体细胞无性系变异。从细胞学角度研究遗传变异则比较少, 特别是对体细胞胚胎发生和植株再生过程的探究。本研究拟从细胞学的角度探讨棉花的遗传变异。

1 材料与方法

1.1 材料

以鄂棉 23 种子无菌苗下胚轴获得的胚性愈伤、

收稿日期: 2007-07-31

基金项目: 国家“863”课题 (2001 AA241091)

作者简介: 周志林 (1979-), 男, 山西孝义人, 硕士, 研究实习员, 主要从事棉花生物技术研究。 (Tel) 0516-83257851, 0516-83257859; (E-mail) zhouzhilinting@163.com

通讯作者: 聂以春, (E-mail) nyc@mail.hzau.edu.cn

体细胞胚、再生苗根尖为材料。

1.2 方法

取继代培养 7 d、14 d、21 d 和 28 d 的胚性愈伤、体细胞胚、再生苗的根尖,用对二氯苯分别预处理 1.5 h、2.5 h、3.5 h 和 4.5 h 后,再转入到固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中固定 1 h 以上保存。制片时,首先用 5 mol/L 盐酸室温处理 20~30 min,根尖处理 30 min 以上,解离后用蒸馏水洗 1~2 次,卡宝品红染色、压片,生物显微镜下观察分裂相,统计染色体数目的变异情况。

2 结果

2.1 对二氯苯不同预处理时间对染色体制片效果的影响

取继代培养 7 d、14 d、21 d、28 d 的胚性愈伤、体细胞胚、再生苗根尖,压片观察其体细胞染色体数目,鉴定通过组织培养体细胞染色体的变异。结果(表 1)表明:预处理 1.5 h,染色体仍处于染色质状态,无明显收缩,无法计数;预处理 2.5 h 染色体比较细长,压片时不易分开,不利于计数;预处理 3.5 h 染色体处于短棒状,有利于统计染色体数;预处理 4.5 h 时染色体过度收缩,呈圆点状。可见,对二氯苯处理 3.5 h 为最佳处理时间,便于染色体计数。

表 1 对二氯苯不同预处理时间对染色体制片效果的影响

Table 1 Effect of pretreatment time of paradichlorobenzene on chromosome smearing

预处理时间 Pretreatment time(h)	染色体形态 Chromosome shape	观察效果 Observational results
1.5	长丝状 Filament	差,不能计数 Poor, uncountable
2.5	棒状,长丝状 Rod shaped, filament	较差,不能计数 Poor, uncountable
3.5	棒状 Rod shaped	好,可以计数 Good, countable
4.5	圆点 Dot	差,可以计数 Poor, countable

2.2 胚性愈伤继代培养时间对染色体制片效果的影响

取不同继代培养天数的胚性愈伤压片观察,结果表明,以 7~14 d 的材料分裂相为最多,随着继代培养时间的延长,分裂相逐渐减少,只有挑取靠近培

养基的新鲜愈伤,才能获得少数正在分裂的细胞(表 2)。

表 2 不同继代时间胚性愈伤的染色体制片效果

Table 2 Effect of different subculture time on chromosome smearing of embryogenic callus

继代时间 Subculture time(d)	每张图片平均分裂相数 Number of splitting cells per smear
7	15.1 A
14	17.2 A
21	8.2 B
28	3.0 C

平均分裂相数为 10 张图片的平均数;表中不同大写字母代表用新复极差法检测,达极显著差异。

Data followed by different letters mean significant differences at 0.01 level by the Duncan's new multiple range test.

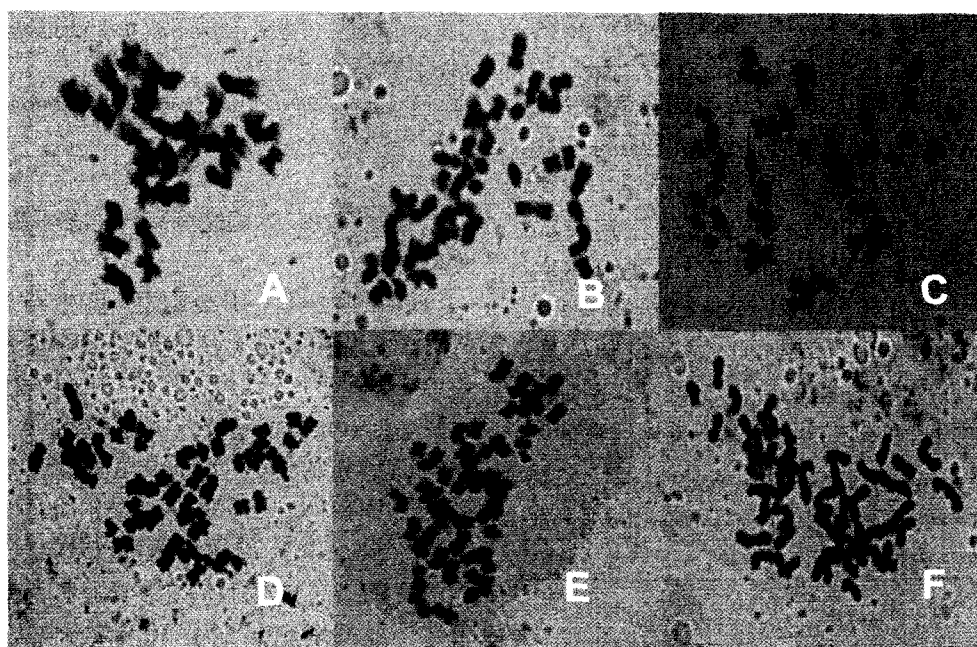
2.3 胚性愈伤、体细胞胚和再生苗根尖染色体统计分析

以胚性愈伤、体细胞胚、再生苗的根尖为材料,观察其体细胞染色体数目变异(表 3)。以胚性愈伤组织为材料,统计了 108 个细胞的染色体数目,其中具有四倍性、三倍性和二倍性染色体数的细胞分别占 18.5%、9.3% 和 3.6%,细胞的染色体数在 40~51 和 27~38 时的细胞占观察总数的 68.6%。以体细胞胚为材料,统计了 115 个细胞的染色体数目,其中具有四倍性和三倍性染色体数的细胞分别占 30.4% 和 8.7%,细胞的染色体数在 40~51 和 27~38 时的细胞占观察总数的 60.8%。以再生苗的根尖为材料,统计了 102 个细胞的染色体数目,其中具有四倍性和三倍性染色体数的细胞分别占 61.5% 和 3.1%,细胞的染色体数在 40~51 和 27~38 时的细胞占观察总数的 35.4%(图 1 为具有不同染色体数目的细胞)。以上结果表明:在体细胞培养过程中,存在着体细胞染色体的数目变异,其中有整倍体变异,也有非整倍体变异,这种变异影响到再生植株的分化和发育。由于染色体的丢失影响到细胞的发育,导致再生植株中具有正常染色体数目的细胞比例增加。造成体细胞染色体变异的主要原因可能与继代培养时间的长短、激素的种类和浓度等有关。

表 3 不同材料体细胞染色体数目的统计

Table 3 Number of chromosomes in different materials

材料 Material	调查项目 Item investigated	体细胞染色体数 Number of chromosomes				
		52	40 ~ 51	39	27 ~ 38	26
胚性愈伤 Embryogenic callus	细胞数 Cell number	20.0	64.0	10.0	10.0	4.0
	百分数 Percentage (%)	18.5	59.3	9.3	9.3	3.6
体细胞胚 Somatic embryo	细胞数 Cell number	35.0	65.0	10.0	5.0	0
	百分数 Percentage (%)	30.4	56.5	8.7	4.3	0
根尖 Root tip	细胞数 Cell number	63.0	35.0	3.0	1.0	0
	百分数 Percentage (%)	61.5	34.3	3.1	1.1	0



A:26 条染色体;B:39 条染色体;C:52 条染色体;D:52 条染色体;E:48 条染色体;F:44 条染色体。

A:26 Chromosomes;B:39 Chromosomes;C:52 Chromosomes;D:52 Chromosomes;E:48 Chromosomes;F:44 Chromosomes.

图 1 体细胞染色体数目观察图片

Fig.1 Number of chromosomes in the somatic cells

3 讨论

开展棉花细胞学研究,棉花染色体制片技术就显得至关重要。张宝红等通过研究预处理的药剂、时间、选材种类和时间等探讨了棉花愈伤组织染色体制片的方法,指出胚性愈伤组织为染色体观察的最佳材料,饱和对二氯苯水溶液预处理 3 ~ 4 h 可获得较好的分裂相^[9]。本试验采用胚性愈伤组织、体细胞胚和再生苗的根尖为材料,用对二氯苯进行预

处理,室温(20 ~ 25 ℃)下 3.0 ~ 3.5 h 为最佳;固定液处理大于 24 h,5 mol/L 盐酸室温处理 20 ~ 30 min,1 mol/L 盐酸则几乎不能解离,这一结果与张宝红等^[8]不同。通过对胚性愈伤、体细胞胚和再生苗根尖的染色体制片观察,发现体细胞染色体数目产生广泛变异,绝大多数体细胞的染色体数为 52 条或接近 52 条,变幅范围有二倍体、三倍体及混倍体,这一结果与李克勤等^[10]研究结果基本吻合。本研究结果显示,可能是由于染色体的丢失影响到细胞

的发育,以致部分具有非正常染色体数的细胞被淘汰,从而导致再生植株中具有正常染色体数目的比例增加。

郑泗军等^[11,12]认为胚性愈伤组织细胞的染色体数目和结构的变异是产生畸形胚的主要原因之一。植物材料中已存在的变异细胞是引起体细胞无性系变异的来源之一,但是大多数体细胞无性系变异主要是由于培养条件、培养时间、激素及激素浓度^[13]等造成的。为减少体细胞无性系变异给棉花组织培养带来的影响,须建立一套高效、快速、稳定的植株再生技术体系,改善培养条件^[14],降低激素的使用量,特别是生长素的使用量,建立茎尖培养或器官发生快速再生体系^[15,16],大大缩短由于培养时间长等因素影响造成的变异,为棉花组织培养与转外源基因育种提供可靠的保证。

参考文献:

- [1] DAVIDONIS G H, HAMILTON R H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Plant Sci Lett, 1983, 32: 89-93.
- [2] 丰 嵘, 郭腾龙, 张宝红, 等. 转基因再生植株后代变异及其在遗传育种上利用价值的研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(3): 230-237.
- [3] 郭香墨, 焦改丽. 陆地棉细胞培养中染色体的变异[J]. 中国棉花, 1988, 15(3): 12-13.
- [4] 薛美凤, 郭余龙, 李名扬, 等. 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 19-21.
- [5] 詹少华, 刘玉潭, 蔡永萍, 等. 棉花染色体制片三种方法比较研究[J]. 皖西学院学报, 2003, 19(5): 69-71.
- [6] 迟吉娜, 马峙英, 韩改英, 等. 陆地棉体细胞植株再生过程中的体胚苗变异新类型[J]. 中国农学通报, 2005, 14(4): 59-61.
- [7] 张宝红, 李秀兰, 李凤莲, 等. 棉花组织培养中的表型变异[J]. 安徽农业大学学报, 1995, 22(1): 13-16.
- [8] 张家明. 陆地棉花细胞胚的萌发及再生植株变异的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1992, 11(1): 31-35.
- [9] 张宝红, 丰 嵘, 张永胜, 等. 棉花组织培养中染色体制片方法的探讨及其染色体稳定性研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(3): 224-229.
- [10] 李克勤, 王喆之, 张大力, 等. 陆地棉组织细胞培养的研究[J]. 西北植物学报, 1991, 11(2): 144-153.
- [11] 郑泗军, 吴吉祥. 棉花组织培养中畸形胚产生原因的分析[J]. 浙江农业大学学报, 1993, 19(2): 193-197.
- [12] SIJUN Z. Chromosome variation in callus culture of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Genes, 1991(2): 1-8.
- [13] STELLY D M. Cytogenetic abnormalities in cotton cell culture[J]. Genome, 1989, 32: 762-770.
- [14] WU J H, ZHANG X L, NIE Y C, et al. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cotton[J]. In vitro Cell Dev Biol Plant, 2004, 40: 371-375.
- [15] 吴敬音, 余建明. 棉属茎尖腋芽的离体培养[J]. 江苏农业学报, 1990, 6(2): 22-26.
- [16] 吴敬音, 余建明. 泗棉3号叶片丛生芽形成及植株再生[J]. 江苏农业科学, 1994(2): 8-19.