麦类作物学报 2007,27(5):781 - 786
Journal of Triticeae Crops

小麦单细胞再生植株后代染色体与 DNA 变异的初步研究

胡尚连[1],李文雄[2],曾寒冰[2]
(1. 西南科技大学生命科学与工程学院,四川绵阳 621010; 2. 东北农业大学农学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要: 为了使体细胞无性系变异更好地应用于作物品种改良,以小麦单细胞培养再生植株后代为材料,研究了其染色体和 DNA 的变异。结果表明,再生植株后代与未经培养的亲本相比,花粉母细胞减数分裂染色体行为发生异常,终变期染色体数目和体细胞染色体数目发生变化,而且早期世代变异幅度大。但随着繁殖世代的增加,花粉母细胞减数分裂染色体行为和体细胞染色体数目的变化渐趋稳定,至第五代基本稳定。对农艺性状已稳定的再生植株第九代不同株系总 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增,结果表明,不同株系与未经培养的亲本相比在 DNA 水平上存在变异,出现亲本特异性谱带缺失,该类株系表现为矮秆、早熟。

关键词: 小麦;单细胞培养;再生植株;染色体;DNA
中图分类号: S512.1;S337 **文献标识码**: A **文章编号**: 1009-1041(2007)05-0781-06

Preliminary Studies on Chromosome Variation and Change of DNA in Progenies of Regenerated Plants from Single Cell Culture In Vitro in Wheat

HU Shang-lian[1], LI Wen-xiong[2], ZENG Han-bing[2]
(1. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China;
2. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030 China)

Abstract: The chromosome variation and change of DNA were studied by using the progenies of regenerated plants derived from the single cell culture in vitro in wheat, to study the changes of genetic variation in the progenies derived from the regeneration plants, and to provide theoretical evidence for using somaclonal variation in crop improvement. The results showed that the chromosome behavior of pollen mother cell at meiosis was abnormal, the chromosome number of pollen mother cell at diakinesis and somatic chromosome number changed in progeny regenerated plants, compared with the uncultured parent. The range of changes was very wide in the early generations. Along with the increase of generation in the propagation of regeneration plants, the change of chromosomal behavior of pollen mother cell at meiosis and somatic chromosome number were stable gradually, and the changes were not stable until the fifth generation. The total DNA from the different lines in the ninth generation derived from the regeneratied plants with stable agronomic characters was amplified by RAPD-PCR. The results showed that the variation at the level of DNA existed, and deletion of the special bands in different lines from the regeneratied plants were observed compared with the uncultured parent. The lines with deletion of special DNA band have lower height and earlier maturity.

Key words: Wheat; Single cell culture; Regenerated plant; Chromosome; DNA

自 20 世纪 80 年代 Larkin 等[1]提出植物体细胞无性系变异以来,人们从农艺性状[2~5]、生化特性[6~8]和遗传学[9~12]等方面证明,植物体细胞无性系变异是普遍存在的,而且认为植物体细胞

* 收稿日期:2007-01-20 修回日期:2007-05-10
基金项目:黑龙江省"九五"重点攻关项目(G96B1-1-01-01);黑龙江省"八五"重点攻关项目(无编号)。
作者简介:胡尚连(1966 -),女,博士,教授,主要从事植物生理与生物技术研究。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

无性系变异是作物品种改良的一个变异来源[1,2,6]。有关小麦体细胞无性系变异的研究集中在20世纪80年代中期到90年代末期,主要针对小麦体细胞无性系早期世代的农艺性状,如株高、熟期、千粒重和每穗粒重等的变异[2,4~6];与小麦品质有关的一些理化性状,如籽粒蛋白质含量、贮藏蛋白含量及其组分的变化等[6~8];遗传学方面如体细胞无性系染色体数目的变化等[13~15]。20世纪90年代以来,有关体细胞无性系变异在作物品种改良应用方面的研究进展缓慢,尤其是对连续多世代体细胞无性系遗传变异规律的研究鲜见报道。鉴于此,笔者以连续多代的小麦单细胞培养再生植株后代为材料,研究花粉母细胞染色体行为和终变期染色体数目以及体细胞染色体数目和DNA水平上的变化,旨在进一步探明体细胞无性系遗传物质在再生植株后代变化规律,为体细胞无性系变异更好的应用于作物品种改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为遗传上早已稳定的春小麦品种NE124单细胞培养获得的不同细胞系(3332、2221c、2221d、352、442、12291、412、3132、22211a)的再生植株后代,以未经培养的NE124为对照。

1.2 试验方法

1.2.1 再生植株后代花粉母细胞减数分裂染色体终变期染色体数目观察 在孕穗初期取旗叶与倒二叶间距为5 cm左右时的幼穗,每株系最少取5个幼穗,卡诺固定液固定24 h,然后转入70%乙醇中保存。对每株系内每幼穗的各个小穗花粉母细胞用1%的改良Carbo品红溶液染色压片,Olympus光学显微镜下观察终变期染色体数目。

1.2.2 种子根尖有丝分裂染色体数目观察 将不同株系的种子于恒温箱25 ℃发芽,取长1 cm左右的根尖于水中,在0~4 ℃下预处理24 h,卡诺固定液(乙醇∶冰醋酸=3∶1)固定24 h,1%醋酸洋红染色1~2 d水解3 min,45%冰醋酸压片,先进行染色体数目观察。观察细胞数不少于30个中期细胞。Olympus显微镜观察并照相。

1.2.3 再生植株后代不同株系叶片DNA提取 DNA提取参考Brown(1993)的方法[16]进行。

1.2.4 引物 本研究使用引物为Operon公司F组的20个引物,A组和I组各两个引物,G组的5个引物及Q组的3个引物。经过筛选最后选定的2个引物OPF-6和OPF-13由宝生物工程(大连)有限公司合成;Taq DNA聚合酶及dNTP为美国PROMEGA公司产品。

引物序列OPF-13:5'GGCTGCAGAA 3'

1.2.5 RAPD-PCR技术体系 反应体积25 μL,d NTP终浓度200 μmol/L,引物终浓度为100n mol/L,$MgCl_2$终浓度为25 mmol/L模板50 ng,10×缓冲液10 μL(PROMEGA原装),通过PE2400(美国PERKIN ELMER公司)进行扩增。反应为40个循环,97 ℃预变性5 min,加Taq DNA聚合酶1U,94 ℃变性1 min,36 ℃退火1 min,72 ℃延伸2 min,最后72 ℃保温7 min。扩增产物通过DYY-III 8B型稳压稳流定时电泳仪于1.4%的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭0.5 mg/mL)电泳,电压70V,电泳缓冲液为1×TAE,电泳4 h,于Kodak EDS-120凝胶成像分析系统进行照相分析。

2 结果与分析

2.1 再生植株后代花粉母细胞的染色体行为

对最早成苗的4个体细胞再生株系3332、2221c、2221d和352的自交繁殖第三代(R_3)共26个株系的花粉母细胞染色体行为进行观察(图1),结果表明,染色体行为发生异常,观察到落后染色体、染色体桥、环形染色体、微核、花粉母细胞只进行核裂、四极纺锤体、染色体粘连等,以及四分体形成期有多分体的出现。这些异常行为发生的频率因不同株系而异,即使来自同一株系内的不同株系出现异常的比例也有明显差异。

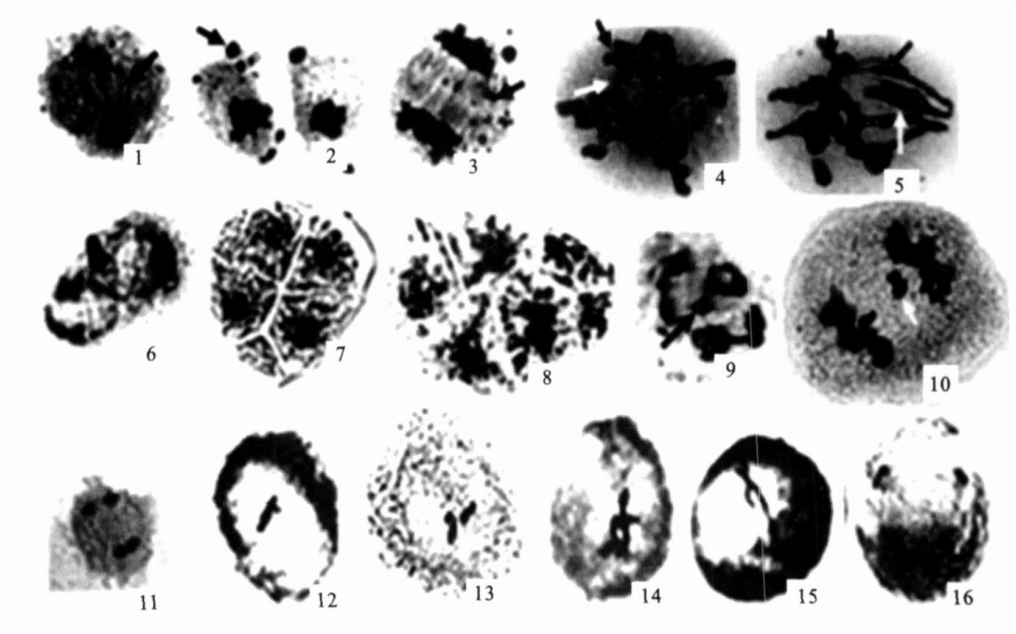
在所观察到的染色体异常行为中,各个株系均以具有落后染色体的花粉母细胞出现的频率最高,变化范围为8.03%~41.53%。落后染色体数目出现1~12条不等,其中有的发生在中期I,一至几条染色体不能正常排列到赤道板上;有的发生在后期I和后期II,一至几条染色体不能到达两极,表明单细胞离体培养严重影响再生植株花粉母细胞染色体的正常联会,从而导致染色体丢失。

染色体桥和断片的比例不如落后染色体出现的高,变化范围为0~16.85%。

从第四代起至第六代,随着再生植株后代繁殖世代的增加,花粉母细胞减数分裂过程染色体行为出现异常的比例越来越小,且绝大多数株系

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

正常花粉母细胞所占的比例均在 95 %以上。所有株系具有落后染色体的花粉母细胞的比率很低,仅为 0. 23 %～2. 79 %。第五代和第六代中 90 %株系未检测到染色体桥和断片的花粉母细胞,说明随着世代的增加再生植株花粉母细胞染色体结构变化基本趋于稳定,而 10 %株系具有染色体桥和断片中的一种或两种,但所占比率都很小,具有染色体桥的花粉母细胞所占比例为 0. 73 %～4. 41 %,具有染色体断片的花粉母细胞所占比例为 0. 47 %～0. 91 %,染色体结构仍在发生改变。进一步表明单细胞离体培养染色体的不稳定性有的株系可以延至第六代。



1. 染色体桥; 2 ,3. 微核; 4 ,5. 花粉母细胞减数分裂后期 I 染色体粘连; 6. 四极纺锤体; 7. 五分体; 8. 六分体;9. 环形染色体; 10. 落后染色体; 11. 花粉母细胞仅进行核裂; 12. 一条染色体; 13. 两条染色体; 14 ,15. 三条染色体; 16. 六条染色体.

1. Chromosome bridge; 2 , 3. Micronucleus;4 ,5. Chromosome sticking during the meiosis anaphase of pollen mother cell; 6. Quadripolar spindle; 7- Pentad; 8. Hexad; 9. Cycle chromosome; 10. Lagging chromosome; 11. The only nucleus division of pollen mother cell; 12. One chromosome; 13. Two chromosomes; 14 , 15. Three chromosomes; 16. Six chromosomes.

图 1　再生植株后代花粉母细胞染色体行为

Fig. 1　Chromosomal behavior of pollen mother cell from the progenies of regeneratied plants

表 1　R_3 代各株系终变期不同染色体数目的花粉母细胞所占比例(%)

Table 1　Percentage of pollen mother cell with different chromosome number derived from different lines in R_3 generation

株系 Lines	不同染色体数目的花粉母细胞所占比例(%) Percentage of pollen mother cell						NC
	n ≤5	5 < n ≤10	10 < n ≤15	15 < n ≤20	n = 21	21 < n ≤25	
2221c-47	14.00	10.00	22.00	32.00	20.00	2.00	50
2221d-2	0.00	0.00	5.41	21.61	70.27	2.70	37
3332-8	0.91	0.91	2.73	50.91	40.00	4.55	110
3332-9	0.00	2.44	21.95	39.02	17.07	19.05	41
3332-31	9.18	5.04	22.33	32.93	30.52	0.00	56
3332-106	1.35	1.35	7.26	49.35	40.64	0.00	90
352-4	3.89	0.00	0.00	1.85	94.26	0.00	86
CK(NE124)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	72

注:n. 终变期花粉母细胞染色体数目;NC. 观察终变期花粉母细胞总数。表 2、表 3 同。

Notes: n. Chromosome number of pollen mother cell at diakinesis. NC. Total number of the pollen mother cells observed at diakinesis. The same are as in table 2 and table 3.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 再生植株后代花粉母细胞终变期的染色体数目

再生植株 R_3 代花粉母细胞终变期染色体数目发生明显变化,7 个不同株系终变期花粉母细胞染色体数目变化范围较大(1～25 条),而且比例也有差异,尤其是在 2221c-47, 3332-8, 3332-31, 3332-106, 352-4 株系中观察到具有 1～6 条染色体数目的终变期花粉母细胞的存在。表明再生植株 R_3 代花粉母细胞染色体在数量上发生明显变化,说明单细胞离体培养对染色体有明显影响,但不同株系受影响程度不同(表 1)。

表 2 R_2 代再生植株后代种子根尖体细胞染色体数目的变化

Table 2 Change of somatic chromosome number in the root tip of seedlings derived from regenerated plant in generation R_2

株系 Lines	不同染色体数目的花粉母细胞所占比例(%) Percentage of pollen mother cell					NC
	2n ≤21	21 < 2n ≤30	30 < 2n < 42	2n = 42	2n > 42	
CK(NE124)	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	30
2221d-2	0.00	9.46	17.57	72.97	0.00	74
3332-31	10.34	6.90	20.69	55.17	6.90	58
3332-106	3.85	3.85	28.85	55.76	7.69	52

Notes: 2n = 6x = 42.

表 3 R_4 与 R_5 代再生植株后代种子根尖体细胞染色体数目所占比例的变化

Table 3 Change of somatic chromosome number in the root tip of seedlings derived from regenerated plant in generation R_4 and R_5

后代 Progenies	株系 Lines	不同染色体数目的花粉母细胞所占比例(%) Percentage of pollen mother cell						NC
		2n - 4	2n - 3	2n - 2	2n - 1	2n	2n + 1	
R_4	CK(NE124)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	30
	12291-1	0.00	2.80	0.00	8.30	88.90	0.00	36
	22211a-1-7	2.00	0.00	0.00	0.00	98.00	0.00	50
	3132-4	0.00	2.90	0.00	0.00	94.20	2.90	35
	3332-31-53	0.00	3.30	3.40	3.30	90.00	0.00	30
	3332-106-7	0.00	0.00	0.00	0.00	96.70	3.30	30
	3332-106-38	0.00	2.80	2.80	0.00	94.40	0.00	36
	412(1)-23	6.60	2.30	2.30	4.40	84.40	0.00	45
	442(3)-1	3.30	6.70	0.00	0.00	86.70	3.30	30
R_5	CK(NE124)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	30
	12291-1	0.00	5.90	0.00	0.00	94.10	0.00	51
	22211a-1-7	2.00	0.00	0.00	0.00	98.00	0.00	50
	3132-4	3.30	0.00	0.00	3.20	90.30	3.20	31
	3332-31-53	3.30	0.00	0.00	0.00	96.70	0.00	30
	3332-106-7	0.00	3.30	0.00	0.00	96.70	0.00	30
	3332-106-38	0.00	1.90	5.80	1.90	90.40	0.00	52
	412(1)-23	0.00	6.60	0.00	0.00	93.40	0.00	30
	442(3)-1	5.70	0.00	0.00	0.00	94.30	0.00	53

Notes: 2n = 6x = 42

2.3 再生植株体细胞的染色体数目

2.3.1 第二代(R_2)的染色体数目 单细胞培养再生植株后代不仅花粉母细胞染色体数目发生变化,体细胞染色体数目也发生明显改变,而且染色体数目变化的范围和分布的比例也有很大差异(表 2)。对 R_2 代 3 个株系再生植株后代种子根尖中期的体细胞进行染色体数目观察,结果表明,所有株系的体细胞除具有 2n = 42 的六倍体细胞外,仍有一定比例的非整倍体细胞存在,而且变化范围较广,为 18～44 条。不同株系具有 2n = 42 的细胞数所占比例有很大差异,最高达 72.97%,最低为 55.17%,即使来自同一细胞系的 3332-31 和 3332-106 株系间也存在不同。

2.3.2 R_4 和 R_5 代的染色体数目 再生植株第

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

四代(R_4)的 8 个株系来自 6 个不同的细胞系,这 8 个株系的体细胞中具有染色体 2n = 42 的细胞数所占比例均在 84 %以上,但仍有不同比例的非整倍体细胞存在。在 R_5 代,2n = 42 的正常体细胞所占比例均提高到 90 %以上,说明离体培养对单细胞再生植株体细胞染色体有丝分裂的影响随着世代的增加而逐渐减弱,使正常的体细胞的比例提高,最高可达 98 %(表 3)。意味着染色体数目变化在 R_5 代就基本稳定,但仍保留很小比例的非整倍体细胞。

通过以上分析可知,离体培养对早期世代再生植株染色体数量的影响很大,但随着世代的增加染色体数量变化愈趋稳定。

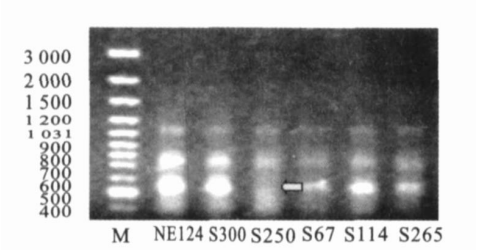
表 4　由引物 OPF-13 扩增的谱带

Table 4　Bands amplified by primer OPF-13

Bands	NE124	S250
OPF-131088	1	1
OPF-13726	1	1
OPF-13565	1	0

2.4　再生植株 DNA 水平的变化

通过 RAPD-PCR 对再生植株后代农艺性状已稳定的第九代共 28 个株系总 DNA 经随机引物 OPF-13 扩增,与未经培养的 NE124 总 DNA 扩增谱带相比较,出现两种类型:(1)仅出现亲本特异性谱带缺失,表现矮秆、早熟的体细胞无性系 3332-31-53(以 S250 表示)总 DNA 经 OPF-13 扩增后分子量为 565 bp 的亲本特异性 OPF-13565 谱带发生缺失(图 2 和表 4),可能控制该谱带合成的基因发生丢失;(2)扩增谱带与亲本相同(这样的株系未列入表内)。



箭头表示缺失 565 bp 的谱带

The arrow indicate the band of 565 bp was absent

图 2　OPF-13 扩增的谱带

Fig. 2　Bands amplified by primer OPF-13

3　讨 论

植物体细胞无性系再生植株后代能否稳定遗传关键在于遗传物质的遗传稳定性。已有报道也仅对早期世代再生植株(R_1、R_2)的染色体变异进行研究,但在早期世代染色体的不稳定性到高世代的表现鲜见报道,尤其是有关小麦单细胞培养再生植株后代染色体的遗传稳定性和 DNA 的变化至今还未见报道。本研究结果表明,小麦单细胞离体培养使再生植株后代性细胞和体细胞染色体产生不稳定性和 DNA 水平上的变化。这种变化是由单细胞离体培养过程中愈伤组织形成以及植株再生过程染色体的改变和 DNA 水平上的变化所致,并不是外界环境条件所致。这种染色体水平上的变化对再生植株后代体细胞和性细胞染色体的不稳定性影响也极深,尤其是再生植株早期世代通过其自交繁殖的过程花粉母细胞减数分裂过程发生紊乱,其染色体变异的频率较高,如出现较高频率的落后染色体、染色体桥和断片的花粉母细胞,这可能导致染色体数目、结构和基因的改变,有利于进一步拓宽再生植株后代变异的范围和增加变异频率。小麦单细胞培养再生植株 R_2 代种子根尖体细胞染色体数目要比 Karp 和 Maddock[13] 和吴鹤鸣等[15] 以未熟胚为外植体离体诱导获得的再生植株体细胞染色体数目变异范围广,随着繁殖世代的增加,在 R_6 代体细胞无性系后代的染色体遗传逐渐趋于稳定。尽管大多数无性系后代仍有极少数花粉母细胞含有落后染色体,意味着在无性系的体细胞中可能含有为数极少的非整倍体细胞的存在,但这些株系在高世代染色体结构不再发生改变。说明小麦单细胞离体培养对部分再生株系染色体的不稳定性具有深远的影响。通过 RAPD-PCR 技术对高世代体细胞无性系总 DNA 进行检测,认为经过小麦单细胞培养获得的部分体细胞无性系存在分子水平上的变异。

参考文献:

[1]Larkin P J, Ryan S A, Brettell R I, *et al*. Heritable somaclonal variation in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1984, 67: 443 - 455.

[2] Maddock S E, Semple J T. Field assessment of somaclonal variation in wheat[J]. Journal of Experimental Botany, 1986, 37: 1065 - 1078.

[3] Nayak S, Debata B K, Srivastava V K, *et al*. Evaluation of agronomically useful somaclonal variants in Jamrosa (a hybrid Cymbopogon) and detection of genetic changes through RAPD [J]. Plant Science, 2003, 164(6): 1029 - 1035.

[4] 胡尚连,曾寒冰,李文雄. 小麦单细胞培养的研究——再生植株后代主要农艺性状变异及遗传稳定性[J]. 东北农业大学

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

学报,1996,27(1):1-8.
[5] 胡尚连,曾寒冰,李文雄. 小麦单细胞培养的研究——再生植株后代穗部产量构成性状变异[J]. 东北农业大学学报,1997,28(1):1-8.
[6] Hu Shanglian, Zeng Hanbing, Li Wenxiong. The application of somaclonal variation in early maturity, high yield and high quality improvement in wheat[J]. The Journal of Northeast Agricultural University,1996,3(2):81-87.
[7] 胡尚连,李文雄,曾寒冰. 小麦未熟胚离体培养的研究——再生植株后代籽粒醇溶蛋白和谷蛋白亚基及蛋白质含量的变化[J]. 作物学报,1998,24(2):204-212.
[8] Hu Shanglian, Zeng Hanbing, Li Wenxiong. Studies on single cell culture in vitro in wheat - The variation of grain protein content and its fraction from regenerated plants[J]. The Journal of Northeast Agricultural University,1999,6(1):1-8.
[9] Thomas J, Vijayan D, Joshi S D, *et al*. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats[J]. Journal of Biotechnology, 2006,123:149-154.
[10] Carlos Polanco, María Luisa Ruiz. AFLP analysis of somaclonal variation in Arabidopsis thaliana regenerated plants[J]. Plant Science, 2002,162(5):817-824.
[11] Soniya E V, Banerjee N S, Das M R. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato [J]. Current Science, 2001, 80(9):1213-1215.
[12] Raimondi J P, Masuelli R W, Camadro E L. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analysis[J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90(1-2):19-29.
[13] Karp A, Maddock S E. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1984,67:249-25.
[14] 李士生,张玉岭. 小麦愈伤组织及再生植株的染色体变异[J]. 遗传学报,1991,18(4):332-338.
[15] 吴鹤鸣,陆维忠,周楠. 小麦体细胞再生植株(R_1)的染色体变异分析[J]. 植物学报, 1992,34(3):226-232.
[16] Brown P T H, Lange F D, Kranz E. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology [J]. Molecular Genetics and Genomics,1993,237:311-317.

《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办、科学出版社出版的核心期刊,已被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及NCBI、CABI等20多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研究生、大学生、中学生物学教师等。

2005年,《遗传学报》获得第三届国家期刊奖提名奖,2006～2007年,连续获得中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。自2007年起,《遗传学报》的外文刊名变更为Journal of Genetics and Genomics。

《遗传学报》(ISSN 1673-8527,CN11-5450/R)为月刊,全年12期,国内邮发代号2-819,国外发行代号:M63。2008年定价50元,全年600元。期刊中文网址:遗传学报.cn

《遗传》(ISSN 0253-9772,CN11-1913/R)为月刊,全年12期。国内邮发代号2-810,国外发行代号:M62。2008年定价40元,全年480元。期刊中文网址:遗传.cn

欢迎订阅,欢迎网上注册投稿,欢迎发布广告。

联系地址:北京市安定门外大屯路:中国科学院遗传与发育生物学研究所编辑室
主　　编:薛勇彪;　编辑室主任:李绍武　E-mail:ycxb@genetics.ac.cn; yczz@genetics.ac.cn
邮政编码:100101; 电话/传真:010-64889354, 64807669
http://www.Chinagene.cn; http://jgenetgenomics.org;中国遗传网.cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net