

文章编号: 1001-1498(2010)06-0877-06

落叶松胚性细胞系分化能力及染色体变异的研究

张清国^{1,2}, 梁国鲁¹, 韩素英², 胡钠梅^{1,2}, 齐力旺^{2*}

(1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: 以落叶松未成熟合子胚诱导的 16 个胚性细胞系为材料, 对继代培养的细胞系间及不同世代间染色体数目和体细胞胚胎发生率进行对比研究, 结果表明: 落叶松胚性细胞系随继代培养时间的增加, 总体体细胞胚分化能力逐渐下降, 平均体细胞胚分化率从继代培养第 7 次后的 335.6 个·g⁻¹ 降低到第 22 次后的 268.2 个·g⁻¹, 细胞染色体数目变异率逐步增加, 从 5.4% 上升到 40.0%; 不同细胞系间体细胞胚分化能力及稳定性差异明显, 分化能力较高的细胞系染色体数目变异几率相应较小, 在继代培养第 25 次后, 细胞系 a214 染色体数目变异率为 0%, 体细胞胚分化率为 416.1 个·g⁻¹。

关键词: 落叶松; 细胞系; 染色体; 体细胞胚胎发生; 遗传稳定性

中图分类号: S791.22

文献标识码: A

Somatic Embryogenesis and Multiplicity of Chromosome Number in Embryogenic Cell Lines of *Larix* spp.

ZHANG Qing-guo^{1,2}, LIANG Guo-lu¹, HAN Su-ying², HU Na-mei^{1,2}, QI Li-wang²

(1. College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The embryogenesis ratios and the chromosome numbers during subculture among sixteen embryogenic cell lines derived from immature zygote of *Larix* spp. were compared. The results showed a negative correlation between the ability of somatic embryogenesis and the times of subculture, with embryogenesis ratios of 335.6 per gram in the 7th and 268.2 per gram in the 22nd subculture time; and a positive correlation between the embryogenesis ratios and the genetic stability, with chromosome variation ratio of 5.4% in the 7th and 40.0% in the 22nd subculture time. The ability and highly quality of somatic embryogenesis were different among cell lines, however, the most efficient embryogenic cell lines contain the most stability chromosome numbers, with embryogenesis ratio of 416.1 per gram and chromosome variation ratio of 0% in the cell line a214 after subculturing for 25times.

Key word: *Larix*; cell lines; chromosome; somatic embryogenesis; genetic stability

早在 1993 年的统计, 木本植物有 24 科 80 余种成功获得体细胞胚, 其中超过一半为针叶树, 经过 10 多年的发展, 植物体细胞胚胎发生的研究日趋完善, 体细胞胚胎发生及优化调控关键因素逐渐明确^[1-3], 但长期继代培养的植物胚性细胞系普遍存

在遗传变异及体细胞胚分化效率减弱的现象, 限制了优良株系的保存和规模化推广应用^[4-5]。如何保持胚性细胞系持续、稳定和高效的胚分化能力是体细胞胚胎发生技术应用于生产实践的重要问题, 也是目前仍未完全解决的难题之一。落叶松作为温带

收稿日期: 2009-03-19

基金项目: 国家 863 项目 (2006AA100109 与 2008AA10Z126); 国家自然科学基金重点项目 (30830086) 和国家 973 项目 (2009CB119100) 以及国家林业局“948”项目 (2007-04-03)

作者简介: 张清国 (1984—), 男, 硕士, 研究方向: 细胞遗传学及生物技术. E-mail: zhangqg2005@126.com

* 通讯作者: 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 树木遗传学. Tel: 010-62888445; E-mail: lwqi@caf.ac.cn

和寒带高山地区重要的速生造林用材树种,具生长快、产量高、材质优良、用途广等特点,在商品材的生产及研究中一直处于优先地位。我国现已成为世界上落叶松人工林经营第一大国,并且在落叶松遗传改良及体细胞胚胎发生领域的研究逐渐成为世界落叶松研究的前沿^[6-8],但生根极难限制了普通组织培养和扦插在落叶松快速扩繁中的应用,目前仍以种子繁殖为主。因此,体细胞胚胎发生已成为优良落叶松株系快速扩繁、人工种子研究及应用的主要途径和遗传转化的重要载体。同时,体细胞胚胎发生是个体发育等基础研究的重要方面^[3],在遗传改良、良种推广以及基础研究中具有极大的生产应用价值和理论研究意义。本课题组相继研究了胚性细胞系与非胚性细胞系的生理生化差异及体细胞胚发生过程中生理生化及分子生物学方面的变化规律,在稳定高效细胞系建立及规模化生产应用研究上有较大的突破^[7-12];但是,同样存在长期培养使胚性细胞系胚分化能力减弱的现象,因此,探索如何保持胚分化能力有极大的利用价值。植物胚性细胞系长期继代培养后,同时存在遗传变异率增加和胚分化能力下降,这二者之间是否存在联系仍无定论。Aderkas等^[13]进行了相关研究,发现长期培养的落叶松雌配子体胚性细胞系染色体数目极不稳定,二倍化细胞占绝大多数,仅有少部分细胞系具有分化能力。细胞系分化能力与基因型相关^[13],体细胞胚性细胞系是否存在类似现象还不得而知;因而,从细胞学水平进一步分析落叶松胚性细胞系在长期继代培养中的变异规律,探索落叶松胚性细胞系生长的细胞学特点,全面掌握体细胞胚胎发生规律,对稳定持续高效的体细胞胚发生体系的建立、筛选和生产利用具有极为重要的应用价值和理论研究意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

中国林科院林业研究所细胞生物学实验室继代培养的落叶松胚性细胞系,由未成熟的合子胚诱导而来,采集地点为黑龙江青山林场和辽宁大孤家林场,细胞系编号及其亲本如下:

(1) 日本落叶松(*Larix kaempferi* (Lambert) Carriere) 母株自由授粉: a211、a214、a214-、a24-11。

(2) 日本落叶松 × 长白落叶松(*L. loltgensis* var. *koreana*): n1、n1-1、n1-2、n1-5、n1-7、n166、n166-6

和 n26。

(3) 日本落叶松 × 日本落叶松: n105

(4) 日本落叶松 × 华北落叶松(*L. principis-rupprechtii* Mayr.): y16、y16-6 和 y68

1.2 培养条件

胚性细胞系继代培养基采用 S 培养基添加 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸) $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA(苄氨基嘌呤) $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 22 ~ 25 °C 暗培养,约 20 d 继代 1 次。

体细胞胚分化培养基为 S 培养基添加 ABA(脱落酸) $18.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + PEG4000(聚乙二醇) $88.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 22 ~ 25 °C 暗培养,分化培养 35 d 时,进行体细胞胚分化率统计及体细胞胚染色数目观察。

1.3 细胞系染色体数目观察

取生长旺盛的胚性细胞,通过去壁低渗法—火焰干燥法^[14]略加改进制取细胞标本:取胚性细胞约 0.5 g, $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉预处理 5 h,卡诺固定液固定 3 h 以上,去离子水洗净固定液,3% 纤维素果胶混合酶酶解 2 h, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集细胞,去离子水洗去残留酶液,卡诺固定液固定,重悬细胞,滴片火焰干燥, Giemsa 染色。显微观察,随机选择 3 个以上视野,拍照、统计。

1.4 体细胞胚染色体数目变异观察

对胚性细胞系进行体细胞胚分化培养,每个细胞系分化培养第 35 天,随机抽取 30 个以上的体细胞胚,用改良去壁低渗涂片法制取染色体标本,对每个体细胞胚染色体数目进行确定、统计。每个体细胞胚观察细胞数目 30 个以上,其中 85% 的细胞稳定含有的染色体数目为该体细胞胚的染色体数目。

1.5 染色体诱变处理

取生长旺盛的胚性细胞系 a211、y68、n1 和 a214,在终浓度分别为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秋水仙素水溶液中分别培养处理 12、24、36、48 h。取部分处理后的细胞进行体细胞胚分化,剩余的细胞进行继代培养。每组处理分化得到的体细胞胚随机抽取 30 个,进行染色体数目的测定统计。

多倍体诱导率(%)为多倍体体细胞胚占抽查体细胞胚的百分比。

体细胞胚分化率(个·g⁻¹)为每 g 愈伤组织分化的体细胞胚数目。

2 结果与分析

2.1 长期继代培养对落叶松胚性细胞系的影响

对16个细胞系进行体胚分化能力的检测, 结果发现落叶松胚性细胞系培养时间越长体细胞胚发生能力越弱。在继代第7次、第15次以及第

22次之后, 分别对所有细胞系进行体细胞胚分化能力和细胞染色体的检测, 结果见表1。随着继代次数的增加总体细胞系平均体细胞胚分化能力逐渐减弱, 发现部分细胞出现染色体数目变异, 并且变异细胞占有率随继代次数的增加而增加。

表1 落叶松胚性细胞系染色体数目变异情况及分化能力

继代次数 /次	检测的细胞数 /个	相应染色体数目的体细胞胚数/个				平均体胚分化率 /(个·g ⁻¹)
		2n=2x=24	2n=4x=48	2n=24~48	2n>48	
7	720	681	55	45	39	335.56
15	685	443	77	103	62	297.78
22	698	419	84	124	71	268.28

注: 平均体胚分化率是指所有细胞系分化率的平均值, 染色体数目变异细胞数目是指观察到所有细胞系染色体变异的细胞数目的总和。

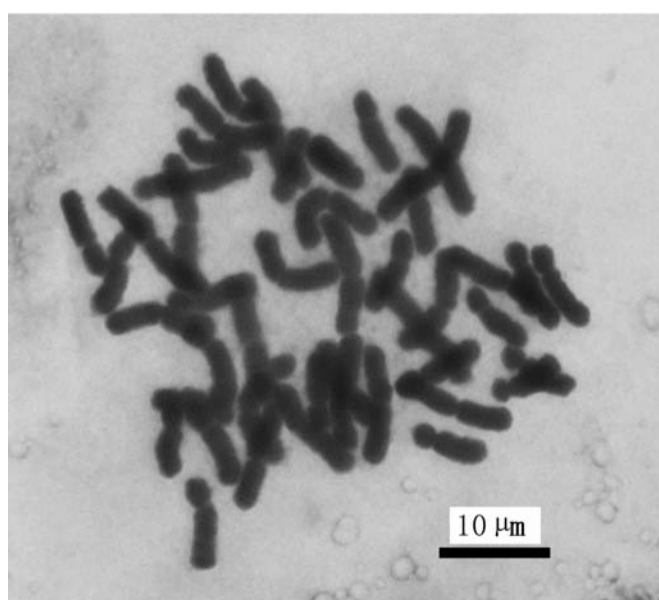
2.2 不同细胞系长期继代培养下胚分化能力的比较

对16个细胞系进行跟踪检测发现, 落叶松胚性细胞系之间体细胞胚分化能力差异显著, a214、a211、n1和y68细胞系体胚分化率一直保持较高的水平, 其中a214在继代第12代, 单次最高体胚分化率达到632.2个·g⁻¹, y68在继代培养超过2年后仍有较高的体胚分化率(303.7个·g⁻¹), 而a24-

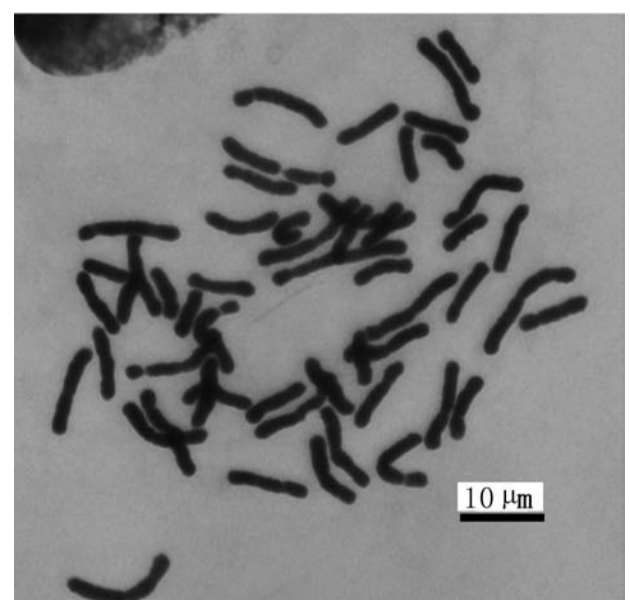
11、n26和y16系列细胞系则胚分化率较低, 并随继代次数增加分化能力迅速下降。通过染色体数目检测, 所有细胞系长期培养后部分细胞染色体数目发生了变异, 但在a214和a211中并没有发现染色体数目变异的体细胞胚(表2)。具高效分化体细胞胚能力的细胞系, 得到的体胚染色体数目较为稳定, 体胚分化率最低的y16系列, 得到的体胚的染色体数目变异率最高(图1), 平均达到40.4%。

表2 长期继代培养后的高效稳定细胞系与不稳定细胞系体细胞胚染色体变异率对比

细胞系	检测时间 继代次数	体细胞胚 总数/个	相应染色体数目的体细胞胚数/个				变异率 /%	体胚分化率 /(个·g ⁻¹)
			2n=2x=24	2n=4x=48	2n=24~48	2n>48		
a214	25	86	86	0	0	0	0.0	416.1
a211	25	72	72	0	0	0	0.0	401.5
n1系列	22	172	170	2	0	0	1.2	346.2
y68	>40	96	92	1	2	1	4.2	303.7
a24-11	22	78	69	1	5	3	11.5	223.1
n26	22	85	74	3	3	4	11.8	239.2
y16系列	22	114	68	11	19	16	40.4	181.9



2n=46



2n=52

图1 染色体数目变异

2.3 稳定高效胚性细胞系经秋水仙素诱导后的体细胞胚胎发生

图2、3表明:胚性细胞系在不同处理时间后,能分化出一定比例的多倍体体细胞胚,多倍体发生率为23.17%~85.18%,但在继代后分化多倍体体细胞胚的能力迅速降低,同时,体细胞胚分化率则明显回升,诱导后直接分化率平均为358.3个·g⁻¹,继代2次后平均为493.6个·g⁻¹,对比组为无菌水浸泡处理24 h加倍率为0.0%,三个世代体细胞胚分化率分别为342.1、533.9、595.0个·g⁻¹,继代培养后体细胞胚分化能力明显高于同世代的诱导组细胞系。

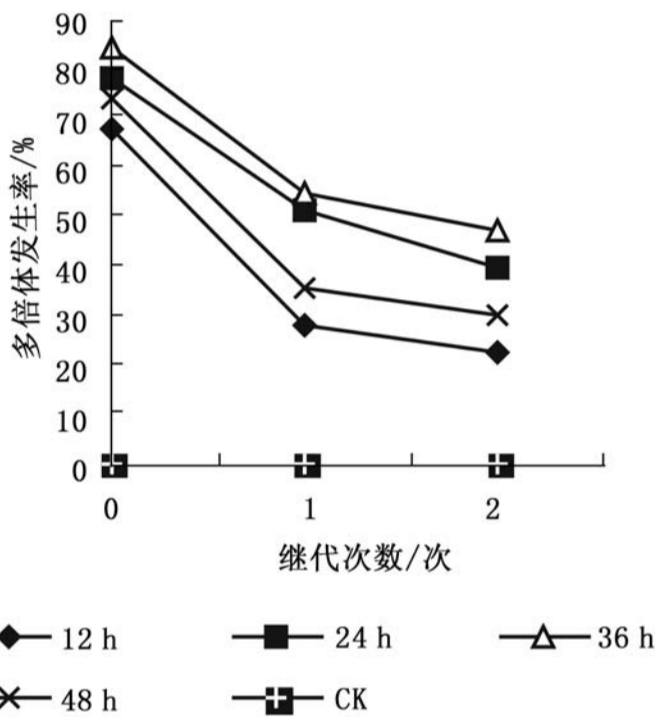


图2 继代培养对500 mg·L⁻¹秋水仙素水溶液诱导后的胚性细胞系多倍体发生率的影响

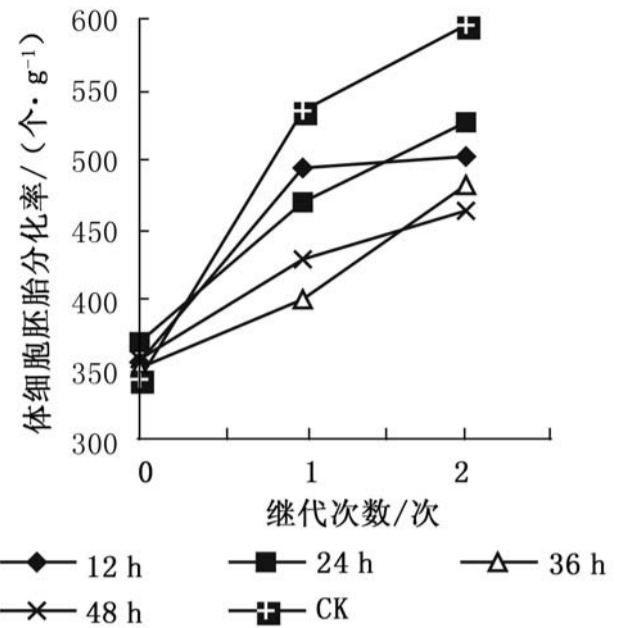


图3 继代培养对500 mg·L⁻¹秋水仙素水溶液诱导后的胚性细胞系体细胞胚胎分化率的影响

2.4 四倍体细胞系 a214- 在继代培养过程中体胚分化率及染色体变异率检测

通过秋水仙素诱导落叶松体细胞胚发生,再诱导细胞系分化,获得一个四倍体细胞系 a214-。在继代过程中,对其体胚分化率及染色体变异的观察发现,该细胞系体胚分化率较低并且在培养过程中逐渐减弱,染色体数目十分不稳定,随继代次数增加二倍体体细胞胚及非整倍体体细胞胚发生率逐渐上升,四倍体体细胞胚的分化能力逐渐散失(表3)。在继代培养第28代时,体胚发生率只有21.82个·g⁻¹,约为第7代分化率的1/5,而获得的体细胞胚之中二倍体比例成倍增加,四倍体比例急剧下降。

表3 四倍体细胞系 a214- 继代中体胚发生及染色体观察

继代次数/次	相应染色体数目的体细胞胚数/个			检测体细胞胚数	体胚发生率/(个·g ⁻¹)
	2n=2x=24	2n=4x=48	2n=24~48		
7	2	38	1	41	104.86
15	12	16	2	40	82.64
22	16	8	6	30	51.43
28	21	6	7	34	21.82

3 结论与讨论

至今已获得试管苗的1000多种植物中,大部分都可以通过体细胞胚胎发生获得再生植株^[15]。近年来,体细胞胚胎发生的研究热点,已从胚性细胞系的构建转移到如何提高胚性细胞系分化能力的高效性和稳定性以及规模化培养上,包括基本培养基的筛选、激素的选择以及聚乙二醇等添加剂对高效分化的影响等^[16];但是,持续、稳定、高效的植物体

细胞胚胎发生机理仍不透彻,长期继代培养后,体胚的分化能力急剧降低或散失是制约其应用的关键^[5]。相关研究发现,长期继代的植物细胞系普遍存在染色体数目变异^[4,15],目前,国内外在白杆(*Picea meyeri* Rehd. Et Wils.)^[17]、荔枝(*Litchi chinensis* Sonn)^[18]、番木瓜(*Carica papaya* Linn)^[19]、刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)^[20]、柑橘(*Citrus*)^[21]、银鹊树(*Tapiscia sinensis* Oli.)^[22]、栓皮栎(*Quercus suber* L.)^[23]等很多树种中均发现体细胞胚胎发生中染色体数目变异的现象。研究同时也显示,某些细胞系

比较稳定,能在数年的继代培养中一直保持体胚的分化,即使细胞系中存在染色体数目变异,但体细胞胚的染色体数目相对稳定^[13, 22 - 23]。胚性细胞系染色体数目的稳定性和变异性与植物的基因型密切相关^[24],杂种胚性细胞系则母本的影响比父本要显著一些^[25],胚性细胞系诱导培养的基本培养基^[16, 26]、继代培养中添加的激素种类和浓度大小^[27]、光照^[28]都影响到胚性细胞系的形成以及分化效率。此外,外植体种类和预处理方式对染色体稳定性也有很大的影响,特别是花药培养中存在比其他任何组织更广泛的染色体变异,有些无法形成胚性细胞系的单倍体培养物,在染色体被加倍后,形成的二倍体却具有体细胞胚胎的发生能力^[29],而四倍体细胞系会不断地通过细胞凋亡的方式恢复二倍体状态^[30]。由此可见,植物体细胞胚胎发生,特别是高效稳定持续的体系受多因素的影响,是待解决的难题。

本实验对落叶松及杂种落叶松的 16 个细胞系进行体细胞胚分化能力及染色体数目变异的研究显示,长期继代培养后也存在总体体细胞胚分化能力逐渐降低,染色体数目变异等现象。细胞系间染色体数目变异和体细胞胚分化能力差异较明显,据此把细胞系分为 3 类:在继代培养中迅速失去体细胞胚分化能力的极不稳定细胞系、在继代培养中分化能力逐步降低的不稳定细胞系和一直保持较高分化能力的稳定细胞系,其中, a214、a211 和 n1 系列细胞系在一年半的继代培养之后,保持着较高的体胚分化率, y68 细胞系继代培养超过 2 年半,仍保持高频率的体细胞胚分化能力($303.7 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$),而 a24-11、n26 和 y16 系列在继代培养开始就呈现出分化能力下降的趋势。通过细胞系间染色体数目的对比观察,体细胞胚分化能力较低的细胞系,染色体数目存在较大的变异现象,染色体数目非整倍体的变异几率越大,并且分化率越低。人工诱导获得的 a214 四倍体细胞系是一个极不稳定的细胞系,在继代培养过程中细胞系迅速二倍化,其中,在继代培养 28 代时,二倍体细胞已占绝大部分。通过秋水仙素对稳定高效细胞系进行多倍体诱导,其体胚发生随着继代次数的增加,多倍体体细胞胚分化率逐渐降低,同时整体体细胞胚分化率则逐步提高。

长期继代培养不利于落叶松胚性细胞系的遗传稳定和高效体细胞胚分化能力的保持,人工诱导的多倍体细胞系不稳定,容易低倍化。本文的研究结

果还表明,即使是亲本相同的 2 个细胞系间分化率及稳定性之间的差异也较为显著,这与 Alicja 等^[24]、Niskanen 等^[25]研究认为的体细胞胚胎发生及稳定性与基因型相关的结论不尽相同, Alicja 等^[24]、Niskanen 等^[25]研究仅以是否具备体细胞胚分化能力为参数研究胚性细胞系的稳定性,无法确定细胞系的具体分化能力大小,故有不足之处。本文的研究以体细胞胚分化率为指数,研究了胚性细胞系分化能力与染色体数目变异间的关系,明确了落叶松分化能力大小与染色体数目稳定性的关系,从细胞学水平为具有高效稳定持续体细胞胚分化能力的细胞系的初期筛选提供了试验依据,同时也为植物胚性细胞系研究提供了新的参考。

参考文献:

- [1] Jain S, Gupta P K. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants[C]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2005: 1 - 10
- [2] 吕守芳,张守攻,齐力旺,等.落叶松体细胞胚胎发生研究进展[J].林业科学研究,2004,17(3):392 - 404
- [3] Jain S, Gupta P K, Newton R. Somatic embryogenesis in woody plant, Netherlands[C]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995: 315 - 339
- [4] 盛德策,李凤兰,刘忠华.植物体细胞胚发生的细胞生物学研究进展[J].西北植物学报,2008,28(1):204 - 215
- [5] Pullman G S, Johnson S, Peter G, et al. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 747 - 758
- [6] 马常耕,孙晓梅.我国落叶松遗传改良现状及发展方向[J].世界林业研究,2008,21(3):58 - 63
- [7] 张守攻,邱宏伟,韩素英,等.落叶松树种的体细胞胚胎发生与规模化技术体系[J].中国生物工程杂志,2004,24(6):28 - 33
- [8] 张 蕾.日本落叶松 × 华北落叶松体细胞胚胎发生的生化机制和分子机理研究[D].北京:中国林业科学研究院,2008
- [9] 齐力旺,李 玲,韩一凡,等.落叶松不同类型胚性和非胚性愈伤组织的生理生化差异[J].林业科学,2001,37(3):20 - 29
- [10] 齐力旺,韩一凡,李 玲,等.应用 311-A 最优回归设计研究 ABA, PEG4000 及 AgNO₃ 对落叶松体细胞胚发生数量的影响[J].生物工程学报,2001,17(1):84 - 89
- [11] 齐力旺,韩一凡,韩素英,等.芽糖、NAA 及 ABA 对华北落叶松体细胞胚成熟及生根的影响[J].林业科学,2004,40(1):52 - 57
- [12] 张 蕾,齐力旺,韩素英.落叶松体细胞胚原胚团阶段差异表达基因文库的构建与分析[J].分子植物育种,2008,6(4):675 - 682
- [13] Von Aderkas, Pattanavibool R, Hristoforoglu K, et al. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophytederived cultures of larch[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003,

75: 27 - 34

- [14] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物染色体标本制备的去壁、低渗法及其在细胞遗传学中的意义 [J]. 遗传学报, 1982, 9(2): 151 - 159
- [15] 周 键, 孙建波, 彭 明. 高等植物体细胞胚胎发生的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(2): 129 - 133
- [16] Claudio S, Edward C, Yeung. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 74: 15 - 35
- [17] 杨金玲, 桂耀林, 郭仲琛. 白杆胚性愈伤组织长期继代培养中的分化能力及染色体稳定性研究 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(1): 44 - 47
- [18] 黄素华, 赖钟雄. 荔枝胚性愈伤组织及其体胚发生过程中染色体数目的变化 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2003, 34(4): 458 - 463
- [19] Wellington R C, de Carlos R C, Fernanda S A, et al. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 92: 207 - 214
- [20] 文晓鹏, 邓秀新. 利用细胞学和分子标记检测刺梨愈伤组织的遗传稳定性 [J]. 果树学报, 2003, 20(6): 467 - 470
- [21] Zhang J E, Guo W W, Deng X X. Relationship Between Ploidy Variation of Citrus Calli and Competence for Somatic Embryogenesis [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33 (7): 647 - 654
- [22] 陈发菊, 赵志刚, 梁宏伟, 等. 银鹊树胚性愈伤组织继代培养过程中的细胞染色体数目变异 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1600 - 1604
- [23] Loureiro J, Pinto G, Lopes T, et al. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry [J]. Planta, 2005, 221: 815 - 822
- [24] Alicja F, Jolanta M. The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetica 2004, 121: 145 - 154
- [25] Niskanen A M, Lu J, Seitz S, et al. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) [J]. Tree Physiol, 2004, 24(11): 1259 - 1265
- [26] He G Y, Zhang J R, Li K X, et al. An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.) [J], Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 86: 15 - 25
- [27] Shim Y S, Kasha K J, Simion E, et al. The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures [J], Protoplasma, 2006, 228: 79 - 86
- [28] Merkle SA, Montello PM, Xia X, et al. Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species [J]. Tree Physiol, 2006, 26(2): 187 - 194
- [29] Malik M R, Wang F, Dirpaul J, et al. Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(10): 2857 - 2873
- [30] Hao Y J, You C X, Deng X X. Evidences for the control of chromosome number variation by a programmed-cell-death-like pathway in citrus callus Chromosome number variation in citrus callus [J]. Euphytica, 2004, 140: 205 - 212