

植物体细胞遗传研究的近期进展

金润洲 吴长明

(吉林省农科院水稻所)

摘 要

笔者认为植物体细胞遗传学是经典细胞遗传学和近代组织培养技术相结合而发展起来的一门新兴学科,是研究植物离体细胞构成因子与遗传关系的科学。本文根据有关报道,着重论述了提高愈伤组织的再生植株能力、原生质体培养、原生质体融合等植物组织培养技术中的植物体细胞无性系的形态学、细胞学变异及其遗传稳定性等体细胞遗传研究方面的近期进展。

遗传学是研究生物遗传和变异的科学。80多年来,由于遗传学广泛应用近代化学、物理、数学的新成就,新技术和新仪器设备,因而能够由表及里、由宏观到微观,逐步地深入研究遗传物质的结构和功能,使遗传学得到了迅速的发展。从孟德尔、摩尔根时代的细胞学水平,已深入发展到现代分子水平^[1]。近代随着组织培养技术的迅速发展,诞生了细胞工程和基因工程,使植物遗传学处于一个在概念和方法上迅速变化的时期。

植物体细胞遗传研究与应用的历史较长,在园艺、花卉和无性繁殖作物上应用“芽变”改进品种,对生产作出了巨大贡献^[2]。然而,这些经典遗传学是研究在整体植株中的细胞和微细分子结构的遗传变异,而现代体细胞遗传研究的主要特点是研究离体培养细胞及其构成因子的遗传变异。所以,笔者认为体细胞遗传学是经典细胞遗传学和近代组织培养技术相结合而发展起来的一门新兴学科,是遗传学的另一个分支之一。

在国内的一些文献中,将遗传工程分成狭义和广义两种^[1]。狭义的遗传工程就是基因工程,人们习惯上所讲的遗传工程多指这一类基因工程。从广义上讲,遗传工程是基因工程、细胞工程、染色体工程、细胞器工程的总称。然而,日本学者渡边(1982)^[3]则认为“细胞工程是有计划地改变细胞遗传物质的技术”,根据其遗传物质的种类,可分成基因工程、染色体工程、染色体组工程、细胞质工程和细胞杂交5类。笔者认为,根据遗传物质的种类划分工程种类是较科学的划分法。所以遗传工程就是细胞工程,而基因工程是其中的一部分。笔者认为,细胞工程是为当前植物育种服务的近期的主要研究课题,也是体细胞遗传研究的主要研究内容。它为分子水平上的基因工程及其分子遗传学奠定了坚实的理论基础。

渡边认为,从广义上讲细胞遗传学是研究“细胞构成因子与遗传关系的科学”。而经典遗传学是在完整植株水平上研究亲代与子代之间细胞与遗传物质的传递规律。因此,笔者认为体细胞遗传学应该是研究“离体细胞构成因子与遗传关系的科学”,主要研究植株——离体培养物(愈伤组织、细胞、原生质体)——无性系之间遗传物质的传递规律。其主要研究内容应包括离体组织培养物的培养技术及其无性系的遗传变异、体细胞杂交、核移植、细胞器摄取等。本文主要综述培养技术及体细胞遗传研究方面的近期进展。

一、组织培养基本技术

70年代以来,已在多种农作物的不同器官、组织培养中成功地获得了大量的体细胞无性系,从中观察到多种作物的形态特征、生理生化特性及抗性方面的丰富变异。并在细胞水平上进行某些抗性的定向选择。80年代又在培养物的再生能力及原生质体培养、体细胞融合技术等方面得到了迅速提高。

(一) 提高愈伤组织再生植株能力的技术

在离体培养细胞的生长、分化、器官形成过程中,愈伤组织随着继代培养代数的增加,分化再生植株的能力明显降低,直至完全丧失。导致产生这一过程的内在原因,看法很不一致。罗士苇等(1982)⁽⁴⁾认为,在继代培养中可能与耗尽了某些与器官形成有关的特殊物质或者与多倍性细胞和非整倍性细胞的大量出现有关。尽管其机制方面尚不清楚,但近几年在如何保持、恢复及提高愈伤组织的再生植株能力方面进展很快。

1. 形态方面:Л·А·Кучеренко(1984)报道⁽⁵⁾,在相同条件下得到的愈伤组织形态特征都不同,根据颜色、密度、含水量、细胞大小及有无绒毛等性状,将愈伤组织分成13种。其中,再生植株能力最强的愈伤组织是由小细胞组成、白色或浅黄色的无绒毛致密愈伤组织。李良材、陈英等(1988)⁽⁶⁾也提出:生长缓慢、组织紧密的愈伤组织,表现出较高的植株再生能力,而生长快、色深黄、组织松散的愈伤组织没有再生植株能力。邹高治、葛扣麟等(1984)报道⁽⁷⁾,只有颗粒状、淡黄色的致密愈伤组织具有分化能力。凌定厚(1987)⁽⁸⁾报道,在不定芽、愈伤组织、胚状体三个分化成苗的途径中,体细胞胚胎发生的方式能满足长期保持高度分化能力的要求。

根据上述愈伤组织形态特征的研究,认为提高愈伤组织分化再生植株能力的具体措施是:(1)越幼嫩的愈伤组织,再生的植株越多,从转移后培养10天的愈伤组织比30天的再生植株多一倍⁽⁵⁾;(2)在10—15℃冷温下继代培养有助于愈伤组织的植株再生⁽⁵⁾,这与继代中愈伤组织老化速度减慢有关。当然不排除冷温直接促进愈伤组织形态发生的可能性;(3)以附加2—3%甘露醇等方法,增加培养基的渗透压,也能提高植株的再生能力⁽²⁾;(4)在培养基中附加生长抑制剂脱落酸(ABA)或增加琼脂浓度,使愈伤组织生长慢,组织紧密,利于提高再生植株的能力⁽⁶⁾。

2. 生化方面:邹高治、葛扣麟等报道⁽⁷⁾,在不同形状的愈伤组织中各类氨基酸含量不一致,一般在愈伤组织中观察到21—25种氨基酸,其中天门冬酰胺、谷氨酸、丙氨酸、 γ -氨基丁酸、丝氨酸、酪氨酸等6种氨基酸最多,占各类氨基酸总含量的85—90%。所以提高培养基中的这6种氨基酸含量有助于植株的再生。叶和春(1984)报道⁽⁹⁾,培养基中补加酵母提取物,有利于提高植株再生能力。但至今对愈伤组织再生植株能力的机理尚缺乏研究。上述的补救措施还是不够完善,解决不了根本问题。所以,在长期继代培养或利用某种选择剂(病毒素、盐类等)筛选突变体后,愈伤组织丧失再生植株能力,仍然是体细胞遗传研究中的一大障碍,是亟待研究解决的主要问题之一。

(二) 原生质体培养技术

从植物原生质体培养得到再生植株是开展细胞操作和遗传操作的基础⁽¹⁰⁾,是植物体

细胞遗传研究中的主要基础技术之一。

Cocking (1960) 首次用水解酶抽提液从蕃茄根尖游离出原生质体以来, 许多人相继开始用酶法大量地游离各种植物的各个组织部位细胞的原生质体^[11], 到1984年已报道了近百种植物的原生质体经离体培养有全能性表达, 得到了再生植株, 但大部分例证属于双子叶植物的茄科、伞形科、十字花科、芸香科等。对于单子叶植物的禾本科, 特别是禾谷类及双子叶植物中的重要农作物原生质体培养都没有得到成功, 长期停滞不前, 一度被认为国际性难题^[12]。近年通过培养方法的不断改进, 才有了突破性进展: (1) 从植物原生质体培养得到再生植株, 1984年为80余例, 1988年已增加到140余例; (2) 主要粮食作物如水稻原生质体培养, 在近几年进展迅速。日本、法国、中国、英国、美国、瑞士等国都相继获得成功。目前在梗、柚、糯稻中均有再生成熟植株的报道^[10]。而且, 在小麦、玉米、棉花、栽培大豆、油菜等重要农作物上都获得再生植株; (3) 木本植物如杨树、樱桃等原生质体培养也获得了再生植株; (4) 不断改进和完善了培养基和培养条件。如李良材等^[6]用两步法游离原生质体, 避免了原生质体发生融合。在培养基中附加脱落酸(ABA)和采用琼脂糖包埋法, 大大提高植板率(2.5%)。

(三) 原生质体融合技术

通过植物原生质体融合进行体细胞杂交, 可以克服有性过程的局限性, 扩大遗传重组范围, 克服远缘种间的不亲和性, 有可能育成突破性的新品种或创造新型作物^[11]。而且, 运用原生质体融合可以对体细胞遗传学进行常规有性杂交无法办到的遗传分析。由于原生质体融合是一个累加过程, 可对双亲细胞核和细胞质的全部遗传物质进行研究, 它们的相互影响, 问题比有性杂交复杂得多。因此, 目前的研究尚未涉及到体细胞杂种的遗传问题, 仍然停留在改进融合技术、扩大体细胞杂种种类的阶段。

在原生质体融合技术方面, 目前引人注目的方法是电融合技术。Michael Jones (1989) 报道^[13], Senda等1979年首次报道利用电场诱导植物原生质体的融合后, 接着Zimmerman等报道了电融合方法。电融合包括两个步骤, 第一步, 将原生质体植板在低电率的培养基上的两个电极之间, 在电极间加入高频交流电场(0.5—1.5MHZ)。在这一步中原生质体密度、电场强度和进入电场时间的长短等都是主要影响因素; 第二步是施用一次或多次足够强的短时(10—100 μ s)直流电脉冲(1—3KV cm^{-1}), 以引起可逆性膜破裂(形成小孔)。在原生质体开始融合时, 应短时重复施加交流电场, 以保持原生质体间的紧密接合状态, 然后使电场强度降至零。

在扩大体细胞杂种种类方面, 目前仍然以茄科为多, 其中以烟草属为主; 十字花科芸苔属的细胞杂交进展也较快。另外也得到了禾本科中栽培稻和野生稻的细胞杂种及水稻和大豆的杂种愈伤组织。目前虽然通过原生质体融合得到的细胞杂种事例不断增加, 但近几年只增加了十多个组合, 进展较迟缓。其主要原因是: (1) 对双亲原生质体的培养规律尚不清楚; (2) 对双亲完整的染色体组融合为一体后的相互影响、遗传规律等尚一无所知; (3) 细胞杂交虽然在细胞水平上克服了远缘有性杂交中的不亲和性, 但在这些细胞杂种的生长发育和再生植株中的不亲和性仍然没有得到解决。这是今后亟待研讨的关键问题。

二、体细胞无性系的遗传变异

体细胞无性系变异是近年来的主要研究课题之一。在高等植物和细胞培养中筛选各种抗性变异体的研究,有了相当大的进展^[14]。到目前为止,已在烟草、水稻等十多种植物上对20多种病害进行了抗病突变体的筛选,获得了不同程度的成功^[15];在研究植物抗盐性方面,已发表百余篇论文,研究的植物种类近40种;在高氨基酸、高蛋白^[16]、抗寒性、耐辐^[17]等突变体筛选中也有成功的报道。

越来越多的研究证明,植物体细胞在离体培养条件下生长和繁殖都伴随着细胞遗传学变异和形态学的大量变异。其变异的主要特点是:(1)变异频率高;(2)变异类型多;(3)变异的性状能遗传给再生的无性系后代。

(一)形态学变异

植物体细胞无性系变异的现象相当普遍,即不局限于某些物种,也不局限于某些器官。变异所涉及到的性状也相当广泛,不仅涉及到质量性状,也涉及到数量性状即有单一性状的变异,也有一系列多种性状的变异^[18,19]。而且,其变异频率高、变异幅度广。以植株为单位时,在燕麦品种试验中各类性状发生变异的无性系占50—87%^[20],在水稻上的变异率为72%^[18]。据Давоян报道,在水稻上理化处理的诱变率一般为7—8%,而组织培养获得的突变率可达16.7%,比理化诱变高二倍。有关变异幅度方面,大野^[19]有详细报道,其中就水稻的不育性来看,变幅达3.4—81.8%。这些广幅、高频率的体细胞无性系变异给植物育种创造了丰富的遗传选择基础。Xie 1988年报道^[21],在2900个无性系中获得93个(3.2%)抗稻瘟病的无性系。其中也有超亲的无性系,来自品种 Labelle 的体细胞无性系中,有4个无性系的抗病性明显超亲,其抗病性与高抗品种 Tetep、Tadukan 相等。潘重光(1989)报道^[18],卡尔逊用组织培养法已得到蛋白质含量提高14%的高赖氨酸水稻植株。这些事实说明,对培养细胞进行诱变筛选,在效力、数量及选择方法上的准确性方面,有可能满足植物育种的需要。

(二)细胞学变异

离体培养细胞遗传的不稳定性引起各类遗传物质如染色体组、染色体、基因和细胞质等的突变,是导致完整植株表型变异的主要原因。

已往的研究表明,植物培养细胞的一个最常见的变化是染色体数目及其结构的变化。随着愈伤组织代数的增加,经常出现大量的多倍体及非整倍体细胞。近年来,在再生的无性系中也观察到染色体数目及染色体结构的大量变异。叶新荣等(1989)^[15]报道,在小麦再生植株根尖细胞中,发现R₁代具有较高频率的染色体数目的变异,有20.61%为非整倍体,其染色体变异范围在39—43条之间,未发现倍性变异。同时发现再生植株减数分裂过程均表现出不同程度的异常,存在染色体数目及其结构的变异。其中常见的变异以落后染色体、桥和微核为主。并指出,这种高频率的细胞学异常可能是多倍体植物的特点。Давоян(1983)^[18]在水稻体细胞无性系R₁代中观察到非整倍体(25、27、30条染色体)和多倍体(48条染色体)细胞。并发现,培养30天的愈伤组织所分化的再生植株染色体的倍数性,观察的50株都是二倍体,而从培养90天的愈伤组织分化出来的50株中有2株

是非整倍体(4%)，1株是四倍体(2%)。说明随着愈伤组织继代培养天数的增加染色体数目发生变异的无性系数增多。同时也观察到染色体结构的改变。所以说，染色体数目及其结构的改变是引起体细胞无性系变异的主要原因之一。

三、体细胞无性系变异的遗传稳定性

植物体细胞无性系变异能否应用于植物育种?关键在于培养物及其无性系的遗传稳定性。近年来，在这一领域也取得了一些进展。

周荣仁(1989)报道^[1]，美国获得的烟草体细胞无性系的自交一、二代，燕麦体细胞无性系的一、三代都具有耐盐性。日本鹿儿岛大学在水稻体细胞培养中得到3个耐盐细胞系，并都分化出再生的无性系，其第三代在1%NaCl溶液中生长良好。李海民等(1987)^[11]通过花药培养获得3个耐镉突变体，其再生植株及由再生植株根尖诱导产生的愈伤组织都保持稳定的耐镉性，从而认为所获得的突变体耐镉特性是可以遗传的。孟征等(1987)^[12]从水稻花药培养中筛选出抗赖氨酸类似物S—(2—氨基乙基)L—半胱氨酸(AEC)突变体。突变体愈伤组织经过6个月继代培养后仍保持稳定的抗性。从其再生植株根尖诱导的愈伤组织经过3个月继代培养也保持稳定的抗性。并发现这些抗性突变体的细胞内赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、丝氨酸等都有较大量的提高。门勋等(1988)报道^[23]，用限制性内切酶(PstI)观察线粒体DNA(mtDNA)的结果，在水稻愈伤组织和幼苗的DNA之间，没有发现断片、缺失等本质的变化，显示了mtDNA的高度稳定性。上述典型事例证明，在培养细胞与体细胞无性系之间存在着相对的遗传稳定性。但也有证明在选择培养细胞中表达的特性不能全部在无性系中表达的报道^[14]。再生的无性系不能表达突变细胞系所具有的表型可能有许多原因，如由后生遗传导致的表现型改变被分化和减数分裂所逆转，而且突变基因的功能可能受某一发育过程的制约。同时在细胞水平上所选择的性状，只限于细胞功能范围之内，其基因表达的数目和系列，在细胞和植株两个水平上可能并不相同。因此尚需要对变异型的生理学、生物化学和遗传学进行重点研究。

有关体细胞无性系变异的遗传规律方面，大野(1983)报道^[19]，显性突变能在二倍体组织的再生植株(R_1)中出现；隐性突变将在 R_2 中发生分离，突变性状纯合的品系将在 R_3 中得到。但也有一些突变性状(株高、无毛等)在 R_2 代表现为纯合。表明在二倍体组织中出现了纯合突变。凌定厚(1986)^[24]在水稻抗胡麻叶斑病突变体筛选研究中发现 R_1 代的3个抗病系统在 R_2 代中分离成抗性及敏感的两类植株。

总之，植物体细胞无性系变异丰富了植物的遗传变异，有可能满足各种植物育种目标的需要。一个理想的筛选系统应该具有下面几点：(1)在预定的选择压作用下，选出目标的突变体细胞；(2)这种目标性状在继代培养中保持稳定性；(3)被选细胞系或愈伤组织系必须具有再生无性系的能力；(4)目标性状能够在再生的无性系中表达，并能遗传给无性系后代；(5)再生的无性系除具有目标的突变性状以外，要保留原亲本的优良农艺性状。

参 考 文 献

[1] 浙江农业大学等：《遗传学》(全国高等农业院校教材)，农业出版社，1984。

[2] 奚元毅：生物技术作物育种中的应用，《作物遗传研究通讯》，1987，(1)：1—4。

(下转第21页)

手段。杂交种组配要求双亲一般配合力均高，在此基础上谋求双亲来源不同、性状互补。配出的杂交种除满足一般农艺要求外，对穗部性状严格要求。各产量因素均须中等以上。一个因子差得太多很难由其它因子得到补偿。穗部性状优良是杂交种高产的必要条件，但实际测产是确定杂交种产量能力的唯一手段。自交系配合力测定、杂交种产量测定在高产杂交种选育中占绝对重要地位。

参 考 文 献

- (1) I. Kovacs. Some methodological achievements of the Hungarian hybrid maize breeding. 1970, 54—72. Akademiai kiado, Budapest.
 - (2) M.A. El-Lakany et al. Crop Sci. 1971, Vol. 11, 699—701.
 - (3) M. T. Jenkins. Iowa State Coll. J. Sci. 1935, Vol. 9, 429—450.
 - (4) I. J. Johnson et al. J. Am. Soc. Agron. Vol. 28, 246—252.
 - (5) Elto F. G.e Gama et al. Crop Sci. 1977, Vol. 17, 703—706.
 - (6) K. R. Lamkey et al. Crop Sci. 1986, Vol 26, 1114—1118.
 - (7) 宋秀岭:《中国农业科学》, 1977, (4), 13—17.
- (上接第15页)
- (3) 渡边好郎: 育种における细胞遗传学, 养贤堂发行, 1982.
 - (4) 罗士第等: 植物基因工程研究的现状与问题,《细胞生物学杂志》, 1982, 4(4): 1—7.
 - (5) Л. А. Кучеренко: 水稻组织培养获得再生植株的条件,《国外农学—水稻》, 1985 (4) 37—39.
 - (6) 李良行等: 水稻原生质体培养及植株再生的研究,《遗传学报》, 1988, 15(5): 321—328.
 - (7) 邹高治等: 继代培养中单倍三倍体水稻愈伤组织游离氨基酸的变化和再分化的研究初报,《作物学报》, 1984, 10(2): 95—100.
 - (8) 凌定厚: 影响水稻体细胞胚胎发生几个因素的研究,《植物学报》, 1987, 29(1): 1—8.
 - (9) 叶和春: 水稻细胞悬浮培养及再生植株的研究,《植物学报》, 1984, 26(1): 52—59.
 - (10) 夏镇夔: 植物原生质体培养和细胞杂交,《生物科学信息》, 1989, 1(3): 6—7.
 - (11) 罗希明: 植物原生质体培养与融合(综述),《吉林农业科学》, 1988, (2): 26—30.
 - (12) 夏镇夔: 植物原生质体培养研究新进展,《植物生理学通讯》, 1989, (2): 1—6.
 - (13) Michael Jones: 植物原生质体融合,《生物技术通报》, 1989, (3): 1—5.
 - (14) 周崇仁: 应用组织与细胞培养技术筛选耐盐突变体的进展,《生物科学信息》, 1989, 1(3): 8—16.
 - (15) 叶新荣等: 小麦再生植株的交屏研究, I. 再生植株当代(R1代)的细胞学和形态学变异,《遗传学报》, 1989, 16(2): 105—110.
 - (16) 潘重光等: 生物工程与农业,《上海农学院学报》, 1989, 7(2): 154—153.
 - (17) 李海民等: 通过花药培养筛选水稻耐腐突变体,《遗传学报》, 1987, 14(1): 42—43.
 - (18) О. М. Даволян: 水稻组织培养中突变的发生及由此获得新的原始材料,《国外农学—水稻》, 1985, (2): 32—35.
 - (19) 大野清春: 水稻细胞培养再生植株的遗传变异,《国外农学—水稻》, 1985, (2): 11—14.
 - (20) 李俊明: 体细胞无性系及其变异,《遗传》, 1983, 5(1): 41—44.
 - (21) Xie, Q.L. ...: 通过体细胞无性系变异增进水稻抗病的潜力, Phytopathology, 77(12): 1723,《生物技术通报》, 1989, (2): 65.
 - (22) 孟征等: 水稻抗氨基类似物突变体的筛选,《遗传学报》, 1987, 14(2): 100—106.
 - (23) 门腾光一、大渊滋平等: 培养细胞におけるイネオルガネラのDNAの安定性,《育种学杂志》, 1988, 36(别册2): 143—149.
 - (24) 凌定厚: 运用植物毒素分离本筛选水稻抗烟草花斑病毒的研究,《遗传学报》, 1986, 13(3): 194—200.